



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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E  
XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO

SUSANA JULIANO KALIL  
Orientador

RIO GRANDE, RS  
2020



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

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E  
XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A PARTIR DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

GABRIELLE VICTORIA GAUTÉRIO

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

SUSANA JULIANO KALIL  
Orientador

RIO GRANDE, RS

2020

Ficha Catalográfica

G275p Gautério, Gabrielle Victoria.  
Produção e caracterização de enzimas xilanolíticas e  
xilo-oligossacarídeos a partir de substratos agroindustriais / Gabrielle  
Victoria Gautério. – 2020.  
290 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande –  
FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de  
Alimentos, Rio Grande/RS, 2020.

Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.

1. Biomassa Lignocelulósica 2. Cultivo Microbiano 3. Hidrólise  
Enzimática 4. Xilanases 5. Xilo-oligômeros 6. Atividade Antioxidante  
I. Kalil, Susana Juliano II. Título.

CDU 631.145:663.15

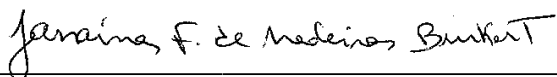
Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

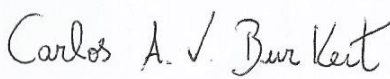


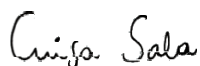
## APROVAÇÃO

Tese defendida por Gabrielle Victória Gautério e aprovada em 27 de março de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert - FURG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos André Vieira Burkert – FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Luisa Sala – FURG

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ailton Cesar Lemes – UFRJ



À minha mãe Maristela, por tudo o que representa na minha vida e por me permitir chegar até aqui.

À minha vó Aracy (*in memoriam*), pelas melhores lembranças da infância.

Dedico





## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida com muita saúde para realizar meus sonhos.

À minha **mãe** Maristela, por ser minha maior inspiração e por sempre me incentivar a continuar meus estudos. Obrigada por todo cuidado e carinho que sempre tivesse comigo, por me apoiar nas minhas decisões e me encorajar na busca pelos meus sonhos. Obrigada por me acompanhar no laboratório aos finais de semana e ser minha “iniciante científica” por alguns dias. Obrigada por me fazer enxergar as minhas pequenas vitórias diárias. Obrigada por ser incansável em me proporcionar uma vida feliz, e espero conseguir te retribuir o tanto que já fizeste por mim! Te amo muito!

À minha **família**, principalmente por entender minhas ausências e escutar minhas lamúrias sobre o doutorado. À minha avó Aracy (*in memoriam*), que sempre perguntava “como estão os estudos?”, mesmo sem saber o que era um doutorado. Em especial às minhas dindas Marisa e Márcia, minha prima Vanessa, minha avó Teresa, minha comadre Cristine e minha afilhada Manuela, que deixaram esta caminhada um pouco mais leve através dos nossos encontros. Amo vocês!

À minha **orientadora**, Professora Susana, por todas as oportunidades e pelo aprendizado durante estes oito anos de convivência. Nada do que eu escreva aqui será suficiente para expressar o quanto sou grata pela tua orientação, carinho, compreensão e amizade. Não apenas guiaste o meu caminho profissional, mas também me ensinaste muito sobre a vida, sobre como enfrentar os desafios diários, sobre ética e sobre como é importante confiarmos em nós mesmos. Obrigada por me permitir crescer como pessoa e profissional, além de me ajudar na descoberta daquilo que amo fazer. Saiba que é uma grande honra ser tua última orientada de doutorado, e eu sou muito grata pelo tanto de ti que deixaste em mim!

À minha **amiga** Marina Amarante, que mesmo com a distância continua presente na minha vida, permitindo que eu aprenda muito com a amizade que construímos. Obrigada por cada palavra de incentivo, abraço, conselho e ajuda técnica-científica. Agradeço por toda a tua generosidade e por acreditar em mim quando nem eu mesma conseguia enxergar que era capaz. És aquele tipo de pessoa que consegue extrair o melhor do outro, dando sempre o melhor de si. Muito obrigada!

À minha **amiga** Sibebe pelos mais de dez anos de amizade! Palavras não são suficientes para descrever o que significas para mim. Fico extremamente feliz em concluirmos juntas este ciclo tão importante em nossas vidas, onde o teu apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui. Obrigada por tudo o que compartilhamos e pela parceria imbatível que construímos. Que a gente siga buscando nossos sonhos da mesma forma que iniciamos: sempre juntas (mesmo que seja em pensamento).

À minha **amiga** Dai, minha aquariana preferida, que esteve do meu lado quando eu mais precisei, não deixando que eu desanimasse antes do intercâmbio. Obrigada pela nossa amizade, pelos puxões de orelha, pelas longas conversas, pelos abraços, pelos conselhos e por estar sempre presente (fisicamente, mentalmente e no coração). És um dos melhores presentes que ganhei ao longo deste ciclo na FURG.

À minha **amiga** Joana, um an(Jô) que apareceu durante a minha trajetória acadêmica. Obrigada pela paciência de Jó(ana) em tirar minhas dúvidas sobre cultivo e/ou cromatografia. Obrigada por me acolher desde 2012 quando entrei no laboratório, pelos momentos que compartilhamos juntas, pelas conversas e conselhos, pelas risadas que alegravam minha rotina, pela amizade, e por me fazer enxergar aquela luz no fim do túnel dos meus dramas. Obrigada por fazer com que esse trabalho tivesse muito do que aprendi contigo!

Aos meus **amigos** nos quais me inspiro diariamente, Ailton e Luisa, que foram fundamentais no meu crescimento profissional. À Lui, que me introduziu na área de Bioprocessos e que me ensinou muito do que sei hoje. Obrigada por toda ajuda naqueles momentos difíceis, fossem eles pessoais ou do doutorado. Obrigada por cada palavra amiga e abraço apertado. Ao Ailton, por ser incansável no incentivo à minha ida para Portugal, além dos conselhos e ajuda. Obrigada por me ensinar a confiar que “tudo vai dar certo”. As minhas melhores lembranças no laboratório incluem vocês, pelas pessoas que vocês são, pelo que compartilhamos juntos e pelo muito que me ensinaram.

Ao trio maravilha (e hoje meus **amigos**) que eu tive o prazer imenso em coorientar em 2018: Taiele, Junior e Mariana. Obrigada por permitirem que eu contribuísse com a formação de vocês. Obrigada por permitirem que eu aprendesse MUITO com vocês. Obrigada pela companhia diária sempre regada com muita brincadeira, risada e bom humor! O carinho e a gratidão que eu tenho por vocês é imensurável. A minha caminhada se tornou muito mais leve, divertida e prazerosa quando vocês fizeram parte dela, e eu só tenho a agradecer por isso.

À minha **amiga** Karen, por ser a melhor pessoa com quem eu poderia dividir a minha rotina! Obrigada pelos bons momentos que compartilhamos juntas e pela boa convivência que sempre tivemos. Guardo com muito carinho todas as nossas idas à academia, almoços e jantas, filmes e passeios. Obrigada por me ensinar a ver a vida sempre com muita alegria e em um tom esperançoso.

À minha **amiga** Sabrina, minha “*partner forever*”, pela amizade e por compartilhar a experiência da representação discente do PPGECA durante dois anos. Obrigada pelo apoio, parceria e amizade que construímos. A tua alegria e o modo como enxergas as pequenas batalhas do dia a dia me incentivaram a me tornar uma pessoa melhor. Obrigada por ser do jeitinho que és e por fazer parte da minha vida.

Às minhas **amigas** Naralice, Letícia e Susi, por sempre torcerem por mim e pelos encontros regados a muita risada e boa conversa! Obrigada pelo apoio e por me proporcionarem momentos felizes no meio da correria do doutorado.

Às **amigas** que fiz nos últimos anos no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações: Thais, Andressa, Nathiéli e Igreine. Obrigada pela companhia diária, conversas e momentos de descontração que compartilhamos juntas. Vocês foram fundamentais para o desempenho deste trabalho, seja por uma palavra amiga ou pela ajuda técnico-científica. Agradeço também a todos com quem pude conviver durante os oito anos de LMB e que sempre me acolheram com muito carinho. Obrigada por todo aprendizado, conversas, cafês e festinhas que compartilhamos juntos.

À minha “**mãe de laboratório**” Ana Sanzo, por sempre cuidar de mim e por me ensinar muito do que sei sobre microbiologia. Obrigada por todo apoio, carinho em forma de chá/bolinho que você trazia, conversas, conselhos, enfim, por tudo o que compartilhamos. Sempre vou lembrar do teu “Guriaaaaas!” com muito carinho!

Aos meus anjos em forma de **iniciantes científicos** que tanto me ajudaram nessa trajetória: Matheus, Larissa, Tamires e Tairine. Obrigada por TODO auxílio na parte experimental, por irem à noite e finais de semana me ajudar sempre com sorriso no rosto, por serem dedicados, interessados e responsáveis pelo nosso trabalho. E obrigada pela companhia, conversas e risadas (principalmente quando algo dava errado!) que vocês me proporcionaram.

À minha **psicóloga** Cândida Aline, que foi muito importante no meu crescimento pessoal ao longo do doutorado. Obrigada por me fazer enxergar que tudo o que preciso está dentro de mim mesma!

Aos meus **colegas** do PPGECA, em especial ao Wesclen, Daiane, Viviane, Joyce, Belkis, Pedro, Silvia e Paola, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo carinho com que sempre me trataram. Saibam que meu carinho por vocês é recíproco e eu só tenho a agradecê-los pela convivência durante todos estes anos!

Aos **técnicos** Aline, Jean, Maristela e Sabine, e as **pós-doutorandas** Taiana, Juliana e Meritane, por toda ajuda a mim dedicada. Em especial ao Jean, Maristela e Taiana por tirarem todas as minhas dúvidas operacionais sobre HPLC, sempre com muita paciência e sabedoria. Obrigada por dedicarem o tempo de vocês comigo, vocês são anjos que eu tive a sorte de encontrar durante o doutorado.

Aos **professores** do PPGECA por todos os ensinamentos durante os anos de pós-graduação. Um agradecimento especial às professoras Eliana, Jaqueline e Janaína, e ao professor André, os quais sempre me ajudaram naqueles probleminhas experimentais que pareciam não ter solução. Agradeço também ao professor Juliano por todo aprendizado e pela disponibilidade em sanar minhas dúvidas sobre estatística ao longo do doutorado. Tenho um carinho muito grande por vocês!

À **professora** Ligia Rodrigues da Universidade do Minho, por aceitar me orientar mesmo no curto tempo de mobilidade acadêmica, e por me receber tão bem no Centro de Engenharia Biológica. Às **pós-doutorandas** Sara, Cláudia e Lina, com as quais eu pude aprender muito sobre XOs e atividade antioxidante e antimicrobiana, e por serem incansáveis em me proporcionar a melhor experiência durante o intercâmbio. Agradeço também à Marta, Gabriela, Nuno, Beatriz, Ruth, Abigail e Carolina, pessoas especiais que tornaram a minha vivência em Braga a melhor possível. Obrigada por tudo!

Aos **laboratórios** da Escola de Química e Alimentos pelo empréstimo de equipamentos e insumos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

À **secretaria do PPGECA** pela cordialidade e eficiência de sempre.

À **banca examinadora** da presente tese pela disponibilidade em participar deste momento tão importante na minha formação.

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

À **Universidade Federal do Rio Grande** por ter sido a minha segunda casa durante onze anos, pelo auxílio financeiro da mobilidade acadêmica, e por me proporcionar ensino público, gratuito e de qualidade.



“Everything you want is a dream away  
Under this pressure, under this weight  
We are diamonds taking shape”



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA

<b>Tabela 1</b> – Composição química de biomassas lignocelulósicas. ....	37
<b>Tabela 2</b> – Produção de xilanases microbianas em cultivo submerso utilizando substratos agroindustriais como fonte de xilana. ....	49
<b>Tabela 3</b> – Propriedades bioquímicas de xilanases de diferentes espécies microbianas.....	52
<b>Tabela 4</b> – Produção de XOs por hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.....	60

### CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

#### ARTIGO 1

<b>Tabela 1</b> – Atividades enzimáticas de xilanase (MX) e $\beta$ -xilosidase (MBX), atividade específica de xilanase (AEX), produtividade enzimática ( <i>P</i> ) e parâmetros cinéticos de produção obtidos durante o cultivo de cepas de <i>A. pullulans</i> em meio contendo xilana de faia. ....	81
<b>Tabela 2</b> – Produção de XOs pelas três cepas de <i>A. pullulans</i> em 12 h de cultivo em meio contendo xilana de faia. ....	84
<b>Tabela 3</b> – Composição proximal dos substratos agroindustriais. ....	85
<b>Tabela 4</b> – Composição lignocelulósica de substratos agroindustriais. ....	86

#### ARTIGO 2

<b>Tabela 1</b> – Valores reais e codificados utilizados nos delineamentos fatoriais. ....	110
<b>Tabela 2</b> – Valores reais e codificados (em parênteses) para o DFF $2^{6-2}$ e atividade de xilanase (variável resposta) em 96 h de cultivo ....	113
<b>Tabela 3</b> – Valores reais e codificados (em parênteses) para o DCC $2^3$ , atividade de xilanase em 72 h de cultivo (variável resposta), valores preditos pelo modelo e desvio relativo. ....	117
<b>Tabela 4</b> – Coeficientes de regressão (CR), erro padrão (EP), valores de <i>p</i> e <i>t</i> obtidos no DCC $2^3$ para a atividade de xilanase. ....	118
<b>Tabela 5</b> – ANOVA fatorial do DCC para a atividade de xilanase. ....	118
<b>Tabela 6</b> – Validação do DCC e cultivos adicionais.....	121

#### ARTIGO 3

<b>Tabela 1</b> – Purificação parcial de xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-30%/30-60%). ....	145
<b>Tabela 2</b> – Composição enzimática dos extratos de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. ....	146
<b>Tabela 3</b> – Valores de <i>z</i> , <i>D</i> , <i>K<sub>d</sub></i> e meia vida ( <i>t</i> <sub>1/2</sub> ) obtidos a partir da desnaturação térmica xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 bruta e parcialmente purificada.....	152
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros termodinâmicos de xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 bruta e parcialmente purificada.....	154
<b>Tabela 5</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. ....	155
<b>Tabela 6</b> – Produção de XOs e xilose percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase parcialmente purificada de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. ....	156

#### ARTIGO 4

<b>Tabela 1</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. Condições de hidrólise: 40 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica). ....	182
--	-----



<b>Tabela 2</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. Condições de hidrólise: 45 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica).....	182
<b>Tabela 3</b> – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. Condições de hidrólise: 50 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica).....	183
<b>Tabela 4</b> – Valores codificados e reais (em parênteses) do DCCR 2 <sup>3</sup> , concentração de XOs totais, concentração de xilobiose e xilotriose, e percentual de XOs obtidos em 24 h de hidrólise enzimática de xilana de faia. ....	190
<b>Tabela 5</b> – Coeficientes da regressão (CR), erro padrão (EP) e valores de <i>t</i> e <i>p</i> obtidos no DCCR 2 <sup>3</sup> para as três variáveis respostas avaliadas. ....	191
<b>Tabela 6</b> – ANOVA fatorial do DCCR para as três variáveis respostas avaliadas.....	192
<b>Tabela 7</b> – Ensaios de validação do DCCR (resultados obtidos em 24 h de hidrólise).....	196

## ARTIGO 5

<b>Tabela 1</b> – Condições de crescimento das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antibacterianos. ....	217
<b>Tabela 2</b> – Teor de XOs totais e rendimento para os hidrolisados obtidos por diferentes estratégias de produção.....	219
<b>Tabela 3</b> – Valores de IC <sub>50</sub> obtidos nos ensaios de atividade antioxidante (DPPH e ABTS). ....	222
<b>Tabela 4</b> – Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides totais de hidrolisados contendo XOs, antioxidantes sintéticos e prebióticos comerciais. ....	223

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA

<b>Figura 1</b> – Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica. ....	36
<b>Figura 2</b> – Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas: (1) endo- $\beta$ -1,4-xilanases (2) $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (3) glicuronidase (4) feruloil e p-coumaroil esterases (5) acetil xilana esterase.....	42
<b>Figura 3</b> – Modos de ação das xilanases das famílias GH10 e GH11 em glicuroxilanas.....	43
<b>Figura 4</b> – Estrutura esquemática da xilose e dos xilo-oligossacarídeos. ....	56
<b>Figura 5</b> – Estratégias de produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos.....	59
<b>Figura 6</b> – Principais vantagens e desvantagens dos métodos de produção de XOs.....	56

### CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

#### ARTIGO 1

<b>Figura 1</b> – Acompanhamento da atividade (a) de endo- $\beta$ -1,4-xilanases, (b) $\beta$ -xilosidase, (c) pH e (d) biomassa durante o cultivo de três cepas de <i>A. pullulans</i> .....	81
<b>Figura 2</b> – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos agroindustriais não tratados e pré-tratados com NaOH 2% (m/v).....	88
<b>Figura 3</b> – Atividade de xilanase e pH durante o cultivo de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 em meio com substratos agroindustriais não tratados (a,b) e pré-tratados (c,d) com NaOH 2% (m/v). 90	

#### ARTIGO 2

<b>Figura 1</b> – Cinética de produção de xilanase (a,b), comportamento do pH (c) e conteúdo de proteínas solúveis (d) durante o cultivo de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 nas condições dos ensaios do DFF 2 <sup>6-2</sup> .....	115
<b>Figura 2</b> – Efeitos principais do DFF 2 <sup>6-2</sup> . ....	116
<b>Figura 3</b> – Cinética de produção de xilanase (a) e comportamento do pH durante o cultivo de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 nas condições dos ensaios do DCC 2 <sup>3</sup> . ....	117
<b>Figura 4</b> – Curvas de contorno para a atividade de xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261.....	120
<b>Figura 5</b> – Cinética de produção de xilanase e comportamento do pH durante o cultivo de <i>A. pullulans</i> CCT 1261 nas condições dos ensaios A-C. ....	122

#### ARTIGO 3

<b>Figura 1</b> – Efeito da (a) temperatura e do (b) pH na atividade de xilanase bruta e parcialmente purificada de <i>A. pullulans</i> CCT 1261.....	149
<b>Figura 2</b> – Linearização da cinética de desnaturação à 40 °C da xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. (■) Extrato bruto, R <sup>2</sup> = 0,96 (○) Extrato purificado, R <sup>2</sup> = 0,92. A <sub>0</sub> é a atividade enzimática antes da incubação (t = 0) e A é a atividade enzimática após a incubação.....	152
<b>Figura 3</b> – Produção de XOs totais e xilose em 24 h de hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase bruta e parcialmente purificada de <i>A. pullulans</i> CCT 1261.....	159

#### ARTIGO 4

<b>Figura 1</b> – Efeito da temperatura de hidrólise na produção de (a) XOs totais e xilose e (b) conversão de xilana em XOs.....	186
<b>Figura 2</b> – Cinética de produção de XOs e xilose a partir da hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. Condições de hidrólise: 40 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação orbital).....	187

<b>Figura 3</b> – Perfil de carboidratos obtidos a partir da hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase de <i>A. pullulans</i> CCT 1261. Condições de hidrólise: 40 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação orbital).....	188
<b>Figura 4</b> – Curvas de contorno para concentração de xilobiose e xilotriose.....	195
<b>Figura 5</b> – Curvas de contorno para o percentual de XOs.....	196

## ARTIGO 5

<b>Figura 1</b> – Fluxograma de obtenção de XOs por diferentes estratégias de produção. XFB –XOs obtidos a partir do cultivo submerso com <i>B. subtilis</i> , XFH – XOs obtidos a partir da hidrólise enzimática da xilana de faia e XAH – XOs obtidos a partir da hidrólise enzimática da xilana de arroz .....	213
<b>Figura 2</b> – Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados obtidos por diferentes estratégias de produção.....	221
<b>Figura 3</b> – Crescimento de <i>E. coli</i> CECT 736 em meio MHB contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MHB + bactéria. ....	228
<b>Figura 4</b> – Crescimento de <i>P. fluorescens</i> DSMZ 50090 em meio MHB contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MHB + bactéria.....	229
<b>Figura 5</b> – Crescimento de <i>L. fructivorans</i> CECT 8288 em meio MRS contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MRS + bactéria.....	230
<b>Figura 6</b> – Cromatografia em camada delgada das CIMs. ....	231

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I: RESUMO GERAL, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>RESUMO GERAL.....</b>	<b>24</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>26</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
<b>CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>34</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>36</b>
3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	36
3.1.1 Considerações gerais.....	36
3.1.2 Substratos lignocelulósicos agroindustriais.....	39
3.1.3 Pré-tratamento de substratos agroindustriais.....	40
3.2 ENZIMAS XILANOLÍTICAS.....	42
3.2.1 Xilanases.....	42
3.2.2 Xilanases microbianas.....	44
3.2.3 Xilanases de <i>Aureobasidium pullulans</i> .....	46
3.2.4 Aspectos de produção de xilanases microbianas.....	48
3.2.5 Purificação de xilanases microbianas.....	51
3.2.6 Caracterização de xilanases microbianas.....	52
3.3 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	55
3.3.1 Estrutura e propriedades biológicas.....	55
3.3.2 Produção de xilo-oligossacarídeos.....	58
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
<b>CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....</b>	<b>64</b>
<b>ARTIGO 1: PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR <i>Aureobasidium pullulans</i> EM CULTIVO SUBMERSO. 68</b>	
<b>RESUMO.....</b>	<b>70</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
2.1 MATERIAL.....	74
2.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.....	74
2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.....	75
2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	76
2.4.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo.....	76
2.4.2 Seleção da levedura para produção de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos.....	76
2.4.3 Seleção do substrato agroindustrial para a produção de xilanases.....	77
2.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO.....	77
2.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	78
2.6.1 Atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e de $\beta$ -xilosidase.....	78
2.6.2 Biomassa, pH e proteínas solúveis.....	78
2.6.3 Análises de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	79
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	79

<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ....	80
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS.....	85
3.3 USO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE XILANASES .	89
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>94</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

<b>ARTIGO 2: MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE POR <i>Aureobasidium pullulans</i> UTILIZANDO FARELO DE ARROZ COMO FONTE DE XILANA .....</b>	<b>104</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>105</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>108</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
2.1 MATERIAL .....	109
2.2 PRODUÇÃO DE XILANASES EM CULTIVO SUBMERSO .....	110
2.2.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo .....	110
2.2.2 Cultivo submerso.....	110
2.2.3 Planejamento experimental.....	110
2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	112
2.3.1 Atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase .....	112
2.3.2 Proteínas solúveis e pH .....	112
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	113
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>113</b>
3.1 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ATRAVÉS DO DELINEAMENTO FRACIONÁRIO ...	113
3.2 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE.....	117
3.3 DISCUSSÃO.....	123
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>126</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>126</b>

<b>ARTIGO 3: CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO DE XILANASE BRUTO E PARCIALMENTE PURIFICADO DE <i>Aureobasidium pullulans</i> E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....</b>	<b>132</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>134</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>136</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>138</b>
2.1 MATERIAL .....	138
2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE XILANASE.....	138
2.2.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo .....	138
2.2.2 Cultivo submerso e obtenção do extrato enzimático bruto .....	139
2.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO .....	139
2.4 COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS .....	140
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS.....	140
2.5.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade de xilanase.....	140
2.5.2 Determinação da termoestabilidade de xilanase e parâmetros termodinâmicos ..	141
2.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de reação .....	142
2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	143
2.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	143
2.7.1 Atividades enzimáticas .....	143
2.7.2 Proteínas solúveis e pH .....	144
2.7.3 Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência .....	144

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	145
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>145</b>
3.1 PURIFICAÇÃO DE XILANASE E COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS .....	145
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO.....	149
3.2.1 Temperatura e pH ótimo de atuação das xilanases .....	149
3.2.2 Parâmetros cinéticos de reação: $K_m$ e $V_{max}$ .....	150
3.2.3 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos da xilanase.....	151
3.3 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	156
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>160</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>161</b>

<b>ARTIGO 4: MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO XILANASE BRUTA DE <i>Aureobasidium pullulans</i>.....</b>	
<b>RESUMO .....</b>	<b>172</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>176</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>177</b>
2.1 MATERIAL.....	177
2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE XILANASE .....	178
2.2.1 Manutenção do micro-organismo, pré-inóculo e inóculo.....	178
2.2.2 Cultivo submerso e obtenção do extrato bruto .....	178
2.3 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	179
2.3.1 Efeito da temperatura na produção de xilo-oligossacarídeos.....	179
2.3.2 Cinética de produção de xilo-oligossacarídeos em agitador orbital.....	179
2.3.3 Maximização da produção de xilo-oligossacarídeos.....	180
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	181
2.4.1 Atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase .....	181
2.4.2 Proteínas solúveis e pH.....	181
2.4.3 Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência .....	181
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	182
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>182</b>
3.1 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS .....	182
3.2 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS EM AGITADOR ORBITAL .....	186
3.3 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS .....	189
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>200</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>200</b>

<b>ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS CONTENDO XILO-OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO.....</b>	
<b>RESUMO .....</b>	<b>208</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>210</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>211</b>
2.1 MATERIAL.....	211
2.1.1 Micro-organismos.....	211
2.1.2 Substratos agroindustriais .....	212
2.1.3 Demais reagentes .....	212

2.2 OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS .....	212
2.2.1 Obtenção de xilo-oligossacarídeos por cultivo submerso .....	213
2.2.2 Obtenção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática .....	213
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	215
2.3.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS .....	215
2.3.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH .....	215
2.3.3 Capacidade de redução do ferro (FRAP) .....	216
2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES .....	217
2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais .....	217
2.4.2 Determinação de flavonoides .....	217
2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	217
2.6 ANÁLISES DOS HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	219
2.7 ANÁLISES DOS HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	219
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	220
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>220</b>
3.1 COMPOSIÇÃO DOS HIDROLISADOS .....	220
3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES .....	222
3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA .....	227
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>233</b>
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>233</b>
<b>CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>242</b>
<b>4 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>244</b>
<b>5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>246</b>
<b>CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>248</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>250</b>
<b>APÊNDICE I .....</b>	<b>285</b>

## **CAPÍTULO I**

### **RESUMO GERAL, GENERAL ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS**





## RESUMO GERAL

O presente estudo teve como objetivo produzir e caracterizar enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos (XOs) obtidos a partir de substratos agroindustriais. Para tal, a tese foi dividida em cinco artigos. No primeiro artigo, três cepas de *Aureobasidium pullulans* foram avaliadas quanto a produção conjunta de xilanase,  $\beta$ -xilosidase e XOs em cultivo submerso, utilizando xilana de madeira de faia como substrato. Além disso, o uso de substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento alcalino foi avaliado na produção de xilanase. A maior produção de xilanase foi alcançada pela cepa *A. pullulans* CCT 1261 (74,9 U/mL), apresentando também baixa secreção de  $\beta$ -xilosidase (0,10 U/mL), além de XOs (1,68 mg/mL) formados majoritariamente por xilobiose e xilotriose. O farelo de arroz não tratado apresentou alta quantidade de hemicelulose (29,6%) e baixo teor de lignina (12,2%), o que resultou em alta produção de xilanase (11,7 U/mL) quando utilizado como substrato. No segundo artigo, foi realizada através de uma sequência de planejamento a maximização da produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 utilizando farelo de arroz como substrato. A máxima produção da enzima (82,2 U/mL) foi alcançada com 3,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g/L de extrato de levedura e 61,9 g/L de farelo de arroz em pH 7,0 e 28 °C. O terceiro artigo compreendeu a caracterização da enzima xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 na forma bruta e purificada por precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-30%/30-60%), bem como sua aplicação na hidrólise da xilana de faia para produção de XOs. A precipitação permitiu a purificação da xilanase em 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,4%. As xilanases bruta e purificada apresentaram temperatura e pH ótimos de 50 °C e 4,5, respectivamente, e maior estabilidade à 40 °C dentro da faixa avaliada. Ainda, a enzima bruta apresentou menor valor da constante de Michaelis-Menten (25 mg/mL) para substrato xilana de faia quando comparado à enzima purificada (50 mg/mL). Os teores de XOs totais (7,7 mg/mL e 7,9 mg/mL) e as conversões de xilana em XOs (25,7% e 26,5%) não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pela aplicação das enzimas bruta e purificada na hidrólise enzimática. Ainda, os hidrolisados foram compostos por xilobiose (50,9% e 53,8%), xilotriose (30,9% e 32,8%) e XOs de maior grau de polimerização (GP) (4,3% e 3,7%). No quarto artigo, foi estudada a maximização da produção de XOs pela variação das condições de hidrólise de xilana de faia utilizando o extrato bruto de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. Altas concentrações de XOs totais (10,1 mg/mL) e de XOs de baixo GP (9,7 mg/mL), além de alto percentual de XOs (99,1%) no hidrolisado, foram obtidas a 6% (m/v) de xilana de faia, 260 U/g de xilanase bruta, pH 6,0, 180 rpm (agitação orbital), 40 °C em 24 h. No quinto artigo, os XOs obtidos por hidrólise enzimática de xilana de faia (XFH) e de casca de arroz (XAH) foram caracterizados em termos de teor e composição de XOs, enquanto que XFH, XAH e XOs obtidos em cultivo submerso contendo xilana de faia (XFB) foram caracterizados quanto à atividade antioxidante e atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus fructivorans*. Os maiores teores de XOs foram observados em XFH (10,3 mg/mL) e XAH (2,0 mg/mL), os quais apresentaram maior conteúdo de xilobiose e xilotriose em relação ao XFB. A maior atividade antioxidante foi observada por XFB, seguido de XAH e XFH. Os hidrolisados não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas testadas, sendo necessário estudos futuros frente à outras cepas bacterianas.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica. Cultivo microbiano. Hidrólise enzimática. Xilanases. Xilo-oligômeros. Atividade antioxidante.



## GENERAL ABSTRACT

### PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF XYLANOLYTIC ENZYMES AND XYLOOLIGOSACCHARIDES OBTAINED BY AGRICULTURAL SUBSTRATES

The aim of this study was to produce and characterize xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides (XOs) obtained by agricultural substrates. To achieve this goal, the thesis was divided into five articles. In the first article, the production of xylanolytic enzymes and XOs by three *Aureobasidium pullulans* strains was evaluated during submerged cultivation, as well as the use of untreated and alkali pretreated agricultural substrates for xylanase production. The CCT 1261 strain showed the highest xylanase activity (74.9 U/mL), low  $\beta$ -xylosidase production (0.10 U/mL) and XOs (1.68 mg/mL) comprised by xylobiose and xylotriose. Untreated rice bran showed the highest amount of hemicellulose (29.6%) and a low lignin content (12.2%), which implied in high xylanase activity (11.7 U/mL) when used as substrate. In the second article, the xylanase production by *A. pullulans* CCT 1261 was maximized using rice bran as xylan source. Maximum xylanase production (82.2 U/mL) was obtained using 3.6 g/L of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1.5 g/L of yeast extract and 61.9 g/L of rice bran at initial pH 7.0 and 28 °C. The third article comprised the characterization of the crude and purified xylanase of *A. pullulans* CCT 1261, and its application in the hydrolysis of beechwood xylan to produce XOs. The fractional precipitation with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-30%/30-60%) allowed the xylanase purification in 6.8-fold, enzymatic recovery of 69.4% and decrease in the activity of other enzymes ( $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -glucosidases and total cellulases) present in the original extract. Crude and purified xylanase showed optimum temperature and pH of 50 °C and 4.5, respectively, and higher stability at 40 °C within the evaluated range. Crude xylanase showed a lower Michaelis-Menten constant (25 mg/mL) for beechwood xylan in comparison to the purified enzyme (50 mg/mL). The total XOs levels (7.7 mg/mL and 7.9 mg/mL) and the conversions of xylan to XOs (25.7% and 26.5%) not showed significant difference ( $p > 0.05$ ) by the application of crude and purified extracts in the enzymatic hydrolysis. Besides that, the hydrolysates were composed by xylobiose (50.9% and 53.8%), xylotriose (30.9% and 32.8%) and XOs with a higher degree of polymerization (DP) (4.3% and 3.7%). In the fourth article, the XOs production was maximized by studying the hydrolysis conditions of beechwood xylan using a crude xylanase extract of *A. pullulans* CCT 1261. The high concentrations of total XOs (10.1 mg/mL) and XOs with low DP (9.7 mg/mL), as well as the high percentage of XOs (99.1%) in the hydrolysate, were obtained at 6% (w/v) beechwood xylan, 260 U/g of crude xylanase, pH 6.0, 180 rpm (orbital shaking), 40 °C and 24 h. In the fifth article, the XOs obtained by enzymatic hydrolysis of beechwood xylan (BXH) and of rice husk xylan (RXH) were characterized in terms of XOs content and composition; BXH, RXH and XOs obtained in submerged cultivation containing beechwood xylan (BXB) were evaluated for antioxidant activity and antibacterial activity against the *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* and *Lactobacillus fructivorans* strains. The highest contents of XOs were observed for BXH (10.3 mg/mL) and RXH (2.0 mg/mL), which were comprised mainly of xylobiose and xylotriose in opposition to BXB. The highest antioxidant activity was observed by BXB, followed by RXH and BXH. The hydrolysates did not exhibit antibacterial activity against the three strains evaluated, however, future should be carried out with other bacterial species.

**Keywords:** Lignocellulosic biomass. Microbial cultivation. Enzymatic hydrolysis. Xylanases. Xylooligomers. Antioxidant activity.



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A biomassa lignocelulósica é a matéria-prima renovável mais abundante e disponível na natureza (BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2018; JÖNSSON; MARTÍN, 2016), sendo composta principalmente por celulose (30-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%) fortemente associadas entre si (ISIKGOR; BECER, 2015; KUMAR; SHARMA, 2017). Anualmente, quantidades consideráveis desta biomassa são descartadas na natureza ou eliminadas por queima (SARKAR et al., 2012; TAHA et al., 2016), causando impacto ambiental. No entanto, substratos lignocelulósicos podem ser utilizados de modo mais racional na obtenção de biocombustíveis (ALTHURI; GUJJALA; BANERJEE, 2017), filmes biodegradáveis (PEREIRA et al., 2017), fibras (OLIVEIRA et al., 2017), açúcares fermentescíveis (ABAIDE et al., 2019a), prebióticos (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019), compostos químicos (VARANASI et al., 2013) e enzimas fibrolíticas (SALOMÃO et al., 2019).

Substratos agroindustriais como bagaço de cana, sabugo de milho, palha, casca e farelo de cereais, possuem a fração hemicelulósica composta principalmente por xilana, heteropolissacarídeo formando por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4, além de ramificações contendo arabinose, galactose, manose, glicose e ácidos urônicos. A complexidade estrutural da xilana requer que enzimas com distintas especificidades e modos de ação atuem na sua desconstrução (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; GULLÓN et al., 2010). Dentre as enzimas xilanolíticas atuantes na cadeia da xilana, duas merecem destaque: a endo-1,4- $\beta$ -xilanasase (CE 3.2.1.8) e a  $\beta$ -xilosidase (CE 3.2.1.37). As xilanasases estão envolvidas na quebra das ligações  $\beta$ -1,4 e liberação de xilo-oligossacarídeos (XOs) e eventual xilose, enquanto as  $\beta$ -xilosidasases atuam na extremidade não redutora da xilobiose ou de outros XOs, resultando em xilose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; SHALLOM; SHOHAM, 2003).

As xilanasases têm sido extensivamente estudadas devido às suas aplicações promissoras na indústria de papel e celulose (ADHYARU et al., 2017), ração animal (GHAYOUR-NAJAFABADI et al., 2018), têxtil (ATY et al., 2018) e biocombustíveis (ASTOLFI et al., 2019). Na indústria de alimentos, as xilanasases são importantes no melhoramento de processos e de características tecnológicas e/ou nutricionais, sendo aplicadas na extração e clarificação de suco de frutas (SHAHRESTANI et al., 2016), na elaboração de pães e biscoitos (LI et al., 2013; PASSARINHO et al., 2019), na extração de óleo (MARASABESSY et al., 2011) e na despolimerização de biomassa rica em xilana para produção de XOs (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; MAZLAN et al., 2019).

As xilanasases são produzidas principalmente por fungos filamentosos (MARTINS et al., 2018) e bactérias (KALLEL et al., 2016), os quais secretam concomitantemente celulasas (ANG et al., 2013) e  $\beta$ -xilosidasases (TERRASAN et al., 2013) no meio extracelular, fato este inconveniente para algumas aplicações industriais (por exemplo, no branqueamento de papel e na obtenção de oligômeros,

respectivamente). Por outro lado, diversas leveduras são capazes de secretar xilanases livres de celulasas (BANKEEREE et al., 2016) e baixas quantidades de  $\beta$ -xilosidases (GAUTÉRIO et al., 2018; OTERO et al., 2015), tornando-as promissoras para aplicação na produção de XOs. A levedura *Aureobasidium pullulans* tem sido reconhecida como potencial produtora de xilanases (MANITCHOTPISIT et al., 2009; YEGIN et al., 2017) com baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase (CHRISTOV et al., 1997), até quando substratos agroindustriais são utilizados no meio de cultivo (BANKEEREE et al., 2016; YEGIN, 2016; YEGIN et al., 2017) em substituição à xilana comercial.

Os XOs são oligômeros não digeríveis formados por unidades de xilose conectadas por ligações  $\beta$ -1,4 (FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019). A estrutura dos XOs pode apresentar entre 2 a 10 monômeros de xilose (IUPAC, 1982), bem como grupamentos laterais ligados à cadeia principal, os quais são responsáveis pela existência de oligômeros ramificados (AACHARY; PRAPULLA, 2011). A principal propriedade dos XOs está relacionada ao seu efeito prebiótico e consequente promoção do crescimento de bactérias benéficas ao intestino humano (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012), podendo ser aplicados na formulação de adoçantes de baixa caloria (XIAO et al., 2013) e em alimentos com alegação funcional (BRASIL, 1999; ESFA, 2018). Os XOs são atóxicos e não carcinogênicos (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015), e em baixas doses diárias (1,4 a 2,8 g/d) (FINEGOLD et al., 2014) são capazes de desempenhar atividades biológicas como melhorias no metabolismo lipídico (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015), estimulação à resposta imune (SUN et al., 2013), ação antioxidante (ZHOU et al., 2018), anti-inflamatória (HANSEN et al., 2013) e antimicrobiana (YU et al., 2015).

Diferentes processos de obtenção de XOs podem resultar em oligômeros com distintas estruturas e graus de polimerização (GP) (AMORIM et al., 2018; SINGH et al., 2018), refletindo diretamente em suas propriedades biológicas (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). A auto-hidrólise (SUREK; BUYUKKILECI, 2017), a hidrólise química (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009), a hidrólise enzimática (GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019), o cultivo microbiano (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019), ou a combinação destas, são algumas das estratégias aplicadas na produção de XOs. Dentre estas, a hidrólise enzimática se destaca devido à especificidade das enzimas, não formação de produtos secundários tóxicos e/ou indesejáveis, operação em condições brandas de reação e baixa liberação de monossacarídeos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Diversos substratos agroindustriais têm sido explorados como fonte de xilana para a produção de XOs (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; KALLEL et al., 2015a; LIU et al., 2018; MAZLAN et al., 2019), o que além de reduzir os custos de processo, explora o aspecto único destes oligômeros em serem obtidos a partir da biomassa lignocelulósica (MONIZ et al., 2016).

A produção de XOs por hidrólise enzimática requer a extração da xilana contida na porção hemicelulósica da biomassa vegetal (JÖNSSON; MARTÍN, 2016), o que acrescenta mais uma etapa ao

processo e encarece os custos de produção. Por outro lado, o uso da biomassa lignocelulósica por microorganismos têm demonstrado notável potencial para produção de XOs, principalmente devido à simplicidade do processo (AMORIM et al., 2019a). Poucos são os relatos na literatura que exploram a produção de XOs em cultivos microbianos, onde a obtenção conjunta de oligômeros e enzimas xilanolíticas no meio fermentado (GAUTÉRIO et al., 2018; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; PEREIRA et al., 2018), ou a otimização das condições de cultivo para a recuperação de XOs propriamente dita (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019), são mencionadas.

Com base no exposto, a presente tese visa preencher algumas lacunas na literatura frente à produção de enzimas xilanolíticas por leveduras utilizando substratos agroindustriais como fonte de xilana. A aplicação adequada das xilanases na obtenção de XOs por hidrólise enzimática requer o conhecimento das suas propriedades bioquímicas e termoestabilidade, as quais também são exploradas neste trabalho. A tese também aborda a obtenção de XOs por diferentes estratégias e como estas podem impactar as propriedades estruturais (composição e GP) e biológicas dos oligômeros, em especial na atividade antioxidante e antimicrobiana.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos (XOs) a partir de substratos agroindustriais, e caracterizá-los a fim de conhecer suas propriedades para futuras aplicações.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção conjunta de enzimas xilanolíticas e XOs, por três cepas de *A. pullulans* – CCT 7521, CCT 4154 e CCT 1261 –, em cultivo submerso utilizando xilana de madeira de faia como substrato;
- Avaliar a influência de pré-tratamento de substratos agroindustriais na produção de xilanases por *A. pullulans*;
- Maximizar a produção de xilanases por *A. pullulans* em cultivo submerso utilizando substrato agroindustrial como fonte de xilana;
- Purificar xilanases por precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e caracterizar a enzima bruta e purificada quanto às suas propriedades bioquímicas e termoestabilidade;
- Avaliar a aplicação de xilanase de *A. pullulans*, na sua forma bruta e purificada, na produção de XOs a partir de xilana de madeira de faia;
- Maximizar a produção de XOs em meio reacional contendo xilanase bruta de *A. pullulans* e xilana de madeira de faia;
- Caracterizar os hidrolisados contendo XOs – em termos de teor e composição de XOs, atividades antioxidante e antibacteriana – obtidos por diferentes estratégias de produção.



**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**



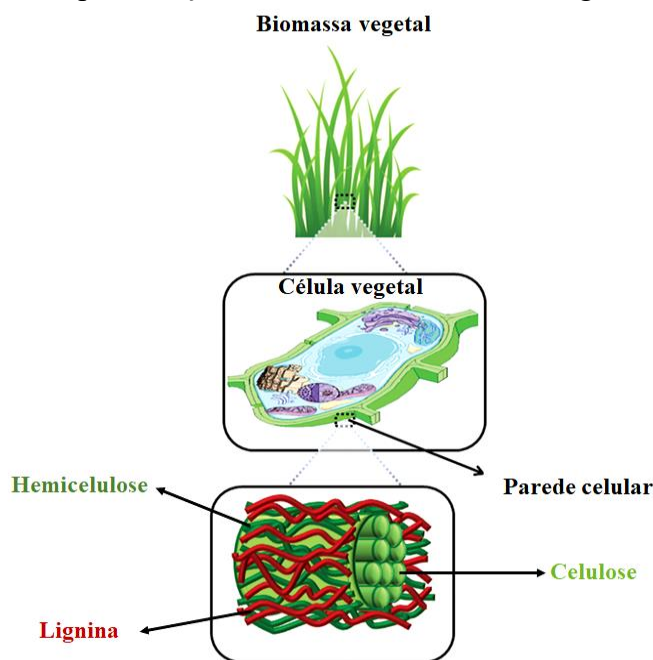
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

##### 3.1.1 Considerações gerais

O termo genérico “lignocelulose” é utilizado para descrever a biomassa oriunda de plantas, a qual é considerada a matéria-prima renovável mais abundante e amplamente distribuída na natureza que abrange os materiais oriundos da agroindústria, culturas energéticas (cultivadas para produção de biocombustíveis, tais como capim-elefante), resíduos urbanos e florestais (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). A biomassa lignocelulósica é composta por três polímeros associados entre si através de ligações covalentes ou não covalentes – celulose (30-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%) –, e em menor quantidade por pectina, proteínas, lipídios, cinzas e sais minerais (MAMMAN et al., 2008; SUN et al., 2016), conforme exemplifica a Figura 1.

**Figura 1** – Representação da estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Adaptado de Isikgor e Becer (2015).

A celulose consiste num polissacarídeo linear composto por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 com grau de polimerização (GP) variando entre centenas a mais de dez mil unidades, conforme a origem da biomassa (KLEMM et al., 2005). Cada unidade monomérica contém três carbonos ligados a grupos hidroxílicos (OH), os quais são

responsáveis por estabelecer ligações de hidrogênio intermoleculares (intra e intercadeias de celulose), formando agregados de cadeias paralelas chamados de microfibrilas. Estes agregados, por sua vez, resultam em regiões desordenadas (amorfas) e ordenadas (cristalinas), esta última responsável pela rigidez e caráter recalcitrante da celulose (HORN et al., 2012; TRACHE et al., 2016).

A hemicelulose possui menor GP em relação à celulose (entre 80 e 200 unidades) (PENG; SHE, 2014) e é composta por pentoses (D-xilose, L-arabinose), hexoses (D-manose, D-glicose, D-galactose) e ácidos urônicos (4-O-metil-D-glicurônico, D-glicurônico e D-galacturônico). Em menor quantidade, outros açúcares como L-ramnose e L-fucose também compõem a estrutura da hemicelulose, enquanto os grupos hidroxílicos podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila (GÍRIO et al., 2010). A hemicelulose se encontra ligada com outros componentes da parede celular através de ligações covalentes, ligações de hidrogênio e por interações iônicas e hidrofóbicas (PENG et al., 2012; SUN et al., 2000).

As hemiceluloses mais relevantes são as xilanas e as glicomananas (GÍRIO et al., 2010). A xilana constitui cerca de 20 a 30% da biomassa de madeira dura e de plantas herbáceas, e em alguns tecidos de cereais e gramíneas, o seu teor pode representar até 50%. As xilanas estão disponíveis em grandes quantidades em madeira dura, resíduos florestais, urbanos e da agricultura, enquanto as glicomananas são os principais componentes da madeira mole (GÍRIO et al., 2010). A cadeia principal da xilana é semelhante à da celulose, porém ao invés de D-glicose é composta basicamente por unidades de D-xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4. Com base nos grupamentos laterais ligados à cadeia principal, as xilanas são classificadas como arabinoxilanas, glicuroxilanas e glicuronoarabinoxilanas. Em geral, as glicuroxilanas e as glicuronoarabinoxilanas estão presentes em madeiras duras e materiais não lenhosos, respectivamente, enquanto as arabinoxilanas compõem a parede celular de gramíneas. Homopolímeros de xilose, conhecidos como homoxilanas, somente ocorrem em algas marinhas (GÍRIO et al., 2010; PENG; SHE, 2014; ZABED et al., 2016).

A lignina, um dos mais recalcitrantes para biodegradação dentre os polímeros naturais, compreende cerca de 15% de toda biomassa terrestre. Estruturalmente, a lignina é um polímero hidrofóbico, amorfo e heterogêneo, formado pela polimerização de três componentes fenólicos (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool cumárico) em unidades de hidroxifenil, guaiacil e siringil. Estas unidades, por sua vez, estão conectadas por ligações cruzadas incluindo  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ - $\beta$ . A lignina confere rigidez estrutural à planta, impermeabilidade e proteção contra o ataque de patógenos, estresse oxidativo e degradação enzimática de polissacarídeos estruturais (MA et al., 2016; VANHOLME et al., 2010).

A composição da biomassa lignocelulósica depende tanto da sua origem (madeira dura, madeira mole, gramínea, substrato agroindustrial) quanto dos componentes individuais de um mesmo organismo (caule, galhos, raízes, cascas, semente) (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; PENG et al., 2012), conforme mostra a Tabela 1.

**Tabela 1** – Composição química de biomassas lignocelulósicas.

Fonte	Composição (%)			Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	
Bagaço de cana	35,2	24,5	22,2	REZENDE et al. (2011)
Sabugo de milho	43,5	37,9	16,5	GUO et al. (2016)
Casca de arroz	34,0	28,0	18,0	GUPTA et al. (2016)
Casca de aveia	35,0	28,2	4,0	GOMEZ-TOVAR et al. (2012)
Casca de soja	35,4	17,2	2,3	YOO et al. (2011)
Engaço de uva	30,3	21,0	17,4	PROZIL et al. (2012)
Farelo de arroz	27,3	26,9	12,2	GAUTÉRIO et al. (2018)
Farelo de trigo	31,4	20,3	22,3	CANTERO et al. (2015)
Pergaminho de café	46,1	27,8	34,2	BEKALO; REINHARDT, (2010)
Película prateada de café	23,7	16,7	28,6	BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO (2014)
Gramínea (Switchgrass)	32,2	26,0	18,4	AYOUB et al. (2013)
Madeira (Spruce)	42,5	22,9	27,9	ISIKGOR; BECER (2015)
Madeira (Eucalipto)	54,1	18,4	21,5	ISIKGOR; BECER (2015)

Em geral, a madeira mole apresenta os teores mais elevados de lignina e maior quantidade de manose na molécula da hemicelulose, em relação à madeira dura, gramíneas e substratos agroindustriais. A madeira dura apresenta hemicelulose mais heterogênea (isto é, contendo xilana, manose, glicose e ramnose na cadeia principal) em relação às gramíneas e substratos agroindustriais, que possuem hemicelulose composta majoritariamente por xilose (MATHEWS; PAWLAK; GRUNDEN, 2015; SEIDL; GOULART, 2016).

A biomassa lignocelulósica é uma das matérias-primas mais promissoras a ser utilizada como recurso natural e renovável na obtenção de produtos de alto valor agregado como bioetanol (SKIBA et al., 2017), biodiesel (PATEL et al., 2015), biogás (LATTIEFF, 2016),



fibras (OLIVEIRA et al., 2017), filmes biodegradáveis (PEREIRA et al., 2017), açúcares fermentescíveis (ABAIDE et al., 2019a; SUBHEDAR; RAY; GOGATE, 2018), prebióticos (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019), químicos (VARANASI et al., 2013) e enzimas fibrolíticas (PEREIRA et al., 2018; SALOMÃO et al., 2019).

### **3.1.2 Substratos lignocelulósicos agroindustriais**

Os subprodutos são materiais resultantes de um processo específico cujo principal objetivo não é a sua produção (BRASIL, 2018a), isto é, são obtidos incidentalmente ou como resíduos a partir da matéria-prima processada. Anualmente, grandes quantidades de subprodutos e resíduos vegetais são geradas a partir da atividade agrícola e processamento de produtos agrícolas (BHOWMICK; SARMAH; SEN, 2018; VAN DYK et al., 2013). Estes materiais incluem bagaço de cana, sabugo de milho, palhas, farelos e cascas de cereais (trigo, arroz, aveia, centeio), entre outros, e normalmente são descartados inadequadamente na natureza ou eliminados por queima (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014; TAHA et al., 2016).

Devido à sua composição lignocelulósica aliada à presença de outros compostos bioativos, os substratos agroindustriais podem ser utilizados na obtenção de produtos de maior valor agregado (IQBAL; KYAZZE; KESHAVARZ, 2013), o que não apenas diminui o desperdício e impacto ambiental, como também proporciona rendimento adicional aos agricultores, promove a geração de empregos e implementação de novas tecnologias (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Segundo Palumbo, Avellaneda e Lacasta (2015), as vantagens do uso destes substratos industrialmente incluem: são anualmente renováveis; são facilmente acessíveis; e não competem no uso de terra fértil com a produção de alimentos. Adicionalmente, o uso sustentável e inteligente de subprodutos da agroindústria fortalece o desenvolvimento da economia circular (cujo elemento principal é o reciclo), fazendo com que o conceito de “resíduo” desapareça (LIGUORI; FARACO, 2016).

No Brasil, alguns dos substratos oriundos do processamento ou beneficiamento de produtos agrícolas incluem as cascas de soja, aveia, e ainda, a casca e o farelo de arroz, o pergaminho de café e o engaço de uva. A casca de soja é um subproduto do processamento do respectivo grão para a obtenção de óleo e farelo, e que corresponde entre 5 a 8% do total de grãos produzidos (MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009). A casca de aveia é oriunda do processamento do respectivo cereal e equivale a 25 a 30% do seu peso (CHAUD et al., 2012). A casca e o farelo de arroz são geradas no beneficiamento do grão, e correspondem a 23% e 10%, respectivamente, do seu peso (ABAIDE et al., 2019b). O pergaminho consiste na camada fina que envolve o grão do café (endocarpo) (MUSSATTO et al., 2011), sendo removido durante o processamento do fruto por via seca, antes da etapa de torrefação (BEKALO;

REINHARDT, 2010; MURTHY; MADHAVA NAIDU, 2012). Já o engaço corresponde ao esqueleto responsável pela sustentação das uvas em forma de cacho, sendo o principal resíduo sólido gerado no processo de vinificação (2 a 8% do material processado) (PANOUILLE et al., 2007; PING et al., 2011).

Conforme o último relatório do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), de 10 de janeiro de 2020, a produção mundial de arroz e soja deverá ser de 496 e 338 milhões de t, respectivamente, para a safra de 2019/2020 (USDA, 2019). De acordo com a Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB), o Brasil está entre os dez países que mais produzem estas culturas, com uma estimativa de 10,6 e 122,2 milhões de t arroz e soja, nesta ordem, para safra de 2019/2020. A região Sul se destaca na produção de arroz e soja, especialmente o estado do Rio Grande do Sul, o qual produziu até o momento 7,4 e 18,6 milhões de t, respectivamente, na safra de 2019/2020, representando 69,8% e 15,2% da produção nacional destas culturas (CONAB, 2020). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil também é considerado um dos maiores produtores mundiais de café, cuja produção foi de 3 milhões de t na safra 2019. O Rio Grande do Sul destaca-se, ainda, na produção de uva e aveia, contribuindo com 46% e 72% da safra nacional (IBGE, 2019).

Com base nos dados nacionais de produção mencionados, a quantidade de cascas de aveia e soja, casca e farelo de arroz, pergaminho de café e engaço de uva gerada durante o processamento das suas respectivas matérias-primas corresponde a valores próximos a 13 milhões de t por ano. Pensando no melhor aproveitamento destes materiais, inúmeras aplicações na área de bioprocessos já foram estudadas, em especial na produção de enzimas xilanolíticas e celulolíticas (ASTOLFI et al., 2019; CERDA et al., 2017; GAUTÉRIO et al., 2018; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017), na obtenção de açúcares fermentescíveis (ABAIDE et al., 2019a; YOO et al., 2011) e xilo-oligossacarídeos (XOs) (KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013; RIVAS et al., 2013), e na produção de biocombustíveis (CORTIVO et al., 2018; EGÜÉS et al., 2013; WU et al., 2018b). Contudo, o maior desafio no uso destes substratos está relacionado à resistência da parede celular vegetal, causada pela complexidade da fração lignocelulósica. Por esta razão, os substratos podem ser submetidos à pré-tratamentos que permitem a separação eficaz de cada fração e o aumento da acessibilidade aos componentes individuais (KUMAR; SHARMA, 2017).

### **3.1.3 Pré-tratamento de substratos agroindustriais**

Os pré-tratamentos envolvem métodos físicos (moagem, irradiação gama, micro-ondas, ultrassom) (AMINI; HARITOS; TANKSALE, 2018; LEITE et al., 2016; YIN; WANG, 2016), físico-químicos (auto-hidrólise, extrusão, CO<sub>2</sub> supercrítico, explosão a vapor) (BONFIGLIO et al., 2019; ERTAS et al., 2014; WANG et al., 2020; YOO et al., 2011; ZHAO et al., 2019), químicos (solução ácida ou alcalina, líquidos iônicos, métodos oxidativos) (ALAYOUBI et al., 2020; MENEGOL et al., 2016;

RABELO et al., 2014), biológicos (culturas fúngicas específicas) (XIE et al., 2017), ou a combinação destes processos. Cada pré-tratamento tem um efeito específico nas frações de celulose, hemicelulose e lignina, e sua escolha dependerá das características do substrato e do seu uso final, dos custos operacionais e do impacto ambiental causado pela estratégia adotada (BHUTTO et al., 2017).

A finalidade comum em aplicar pré-tratamentos aos substratos agroindustriais consiste em modificar a área superficial da biomassa e abrir a sua estrutura (ISIKGOR; BECER, 2015). Em especial na área de bioprocessos, onde muitas vezes as frações de interesse são a hemicelulose e a celulose, o pré-tratamento atua na degradação da lignina, tornando as demais frações acessíveis aos processos posteriores de hidrólise enzimática e cultivo microbiano (BHATIA et al., 2020; KUMAR; SHARMA, 2017). Ainda, o pré-tratamento ideal deve preservar os componentes de interesse e evitar a formação de produtos tóxicos que possam inibir a ação de enzimas hidrolíticas e micro-organismos (AGBOR et al., 2011). Dentre os pré-tratamentos aplicados aos substratos agroindustriais, o uso bem sucedido do tratamento alcalino, isto é, uso de hidróxido de sódio ou cálcio, amônia, etc., é mencionado em diversos estudos (BANDIKARI; POONDLA; OBULAM, 2014; GOYAL et al., 2008; SINDHU et al., 2017), principalmente pela baixa formação de inibidores, operação em condições moderadas de temperatura e pressão, e remoção seletiva da lignina sem degradar os demais carboidratos (KIM; LEE; KIM, 2016; SUN et al., 2016).

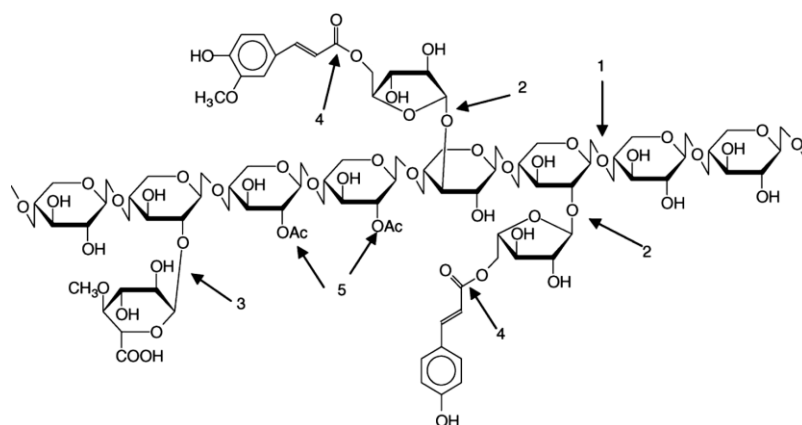
O tratamento alcalino promove o inchamento da biomassa vegetal, levando ao aumento da porosidade e área superficial interna, diminuição do GP de cada componente e redução da cristalinidade da celulose. Álcalis como o hidróxido de sódio atuam na clivagem das ligações éter e éster entre a lignina e a hemicelulose, o que promove a solubilização da lignina e exposição dos demais carboidratos presentes na biomassa (AGBOR et al., 2011; SUN et al., 2016). Durante o tratamento alcalino com NaOH, o reagente é dissociado em íons hidróxido ( $\text{OH}^-$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ), fazendo com que a taxa da hidrólise aumente conforme o aumento da concentração do álcali (KIM; LEE; KIM, 2016). De modo geral, o tratamento alcalino é mais efetivo em certos tipos de materiais como, por exemplo, substratos agroindustriais, uma vez que estes não possuem teores elevados de lignina, não sendo necessário o uso de concentrações elevadas do reagente. No entanto, materiais como a madeira mole necessitam de condições mais severas de pré-tratamento, tornando-o mais próximo a um processo de cozimento em condições alcalinas (GALBE; ZACCHI, 2012). O pré-tratamento de substratos agroindustriais, em especial aqueles que utilizam NaOH em baixas concentrações, têm colaborado na produção de enzimas como xilanases quando biomassas pré-tratadas são utilizadas como substrato no meio de cultivo (BANDIKARI; POONDLA; OBULAM, 2014; GAUTÉRIO et al., 2018).

### 3.2 ENZIMAS XILANOLÍTICAS

A estrutura da hemicelulose (xilana) é quimicamente complexa e sua completa degradação requer a atuação de um sistema múltiplo de enzimas específicas com distintos modos de ação (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). As enzimas que compõem o sistema xilanolítico são as endo- $\beta$ -1,4-xilanase (C.E. 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidase (C.E. 3.2.1.37), e enzimas auxiliares como  $\alpha$ -arabinofuranosidases (C.E. 3.2.1.55),  $\beta$ -glicuronidases (C.E.3.1.1.139), acetil xilana esterase (C.E.3.1.1.72), *p*-coumaroil (C.E. 3.1.1.73) e feruloil esterase (C.E.3.1.1.73) (ALOKIKA; SINGH, 2019; ZABED et al., 2016).

As enzimas xilanolíticas podem ser divididas em dois grupos principais: aquelas que atuam sobre o esqueleto de xilose, e as que atuam na remoção dos grupamentos laterais. Conforme a Figura 2, as xilanases estão envolvidas diretamente na quebra das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal da xilana, liberando os XOs com baixo ou alto GP e eventual xilose, dependendo da família na qual a enzima pertence e região de atuação no esqueleto polissacarídeo (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016); enquanto as  $\beta$ -xilosidases atuam na extremidade não redutora da xilobiose ou de outros XOs, liberando xilose (SHALLOM; SHOHAM, 2003). As enzimas auxiliares atuam na remoção dos substituintes laterais da cadeia de xilana (ALOKIKA; SINGH, 2019; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

**Figura 2**– Estrutura esquemática da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas: (1) endo- $\beta$ -1,4-xilanases (2)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (3) glicuronidase (4) feruloil e *p*-coumaroil esterases (5) acetil xilana esterase.



Fonte: Chávez, Bull e Eyzaguirre (2006).

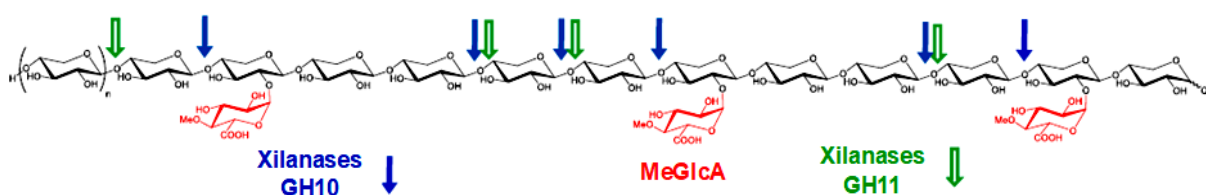
#### 3.2.1 Xilanases

As xilanases são cientificamente conhecidas como endo- $\beta$ -1,4-xilanase e vários sinônimos são utilizados para descrevê-las, tais como  $\beta$ -xilanases,  $\beta$ -1,4-xilanases, endoxilanases e  $\beta$ -1,4-xilana hidrolases (KUMAR; DANGI; SHUKLA, 2018). Estas enzimas

são classificadas em seis famílias de glicosil-hidrolases (GH) – GH5, GH7, GH8, GH10, GH11 e GH43 – as quais se diferem quando às propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade. Duas famílias principais merecem destaque: GH10 e GH11. As xilanases da família GH10 não são totalmente específicas para as xilanas, podendo atuar sobre outros substratos, tais como aril-celobiosídeos e alguns celo-oligossacarídeos. Os membros desta família possuem massa molar acima de 30 kDa e ponto isoelétrico ácido. Já a família GH11 consiste em xilanases “verdadeiras”, específicas para substratos contendo xilose e/ou longas cadeias de XOs, e os produtos de sua ação podem ser hidrolisados pelas enzimas da família GH10. Os membros da família GH11 possuem massa molar abaixo de 30 kDa e ponto isoelétrico básico (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

Devido ao seu menor tamanho, as xilanases da família GH11 conseguem acessar mais facilmente a cadeia da xilana na matriz lignocelulósica, hidrolisando-a mais eficientemente quando comparado com às xilanases GH10 (JUTURU; WU, 2012). No entanto, outros estudos demonstram que as xilanases GH10 são mais efetivas na hidrólise de biomassa lignocelulósica pré-tratada quando atuam sinergicamente com celulasas (HU; SADDLER, 2018). O modo de ação das xilanases GH10 e GH11 em glicuroxilanas também se difere e está relacionado à aceitação e reconhecimento dos resíduos laterais de ácido metil glicurônico (MeGlcA) na formação dos complexos enzima-substrato (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016), conforme mostra a Figura 3.

**Figura 3** – Modos de ação das xilanases das famílias GH10 e GH11 em glicuroxilanas.



Fonte: Adaptado de Biely, Singh e Puchart (2016).

Com exceção da extremidade redutora, as xilanases GH10 requerem dois resíduos de xilose consecutivos não substituídos para atuar na cadeia principal de xilana, e são capazes de clivar a ligação glicosídica adjacente ao resíduo de xilose substituído por MeGlcA. Por outro lado, as xilanases GH11 requerem três resíduos de xilose não substituídos na cadeia polimérica, clivando apenas a ligação  $\beta$ -1,4 que antecede o resíduo de xilose contendo MeGlcA. Devido à isto, as xilanases GH10 geram mais xilose e XOs de menor GP comparado às xilanases GH11 (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). De modo semelhante, as xilanases GH10 são capazes de

clivar a ligação  $\beta$ -1,4 próximas à xilose substituída por resíduos de arabinose, enquanto as xilanases GH11 hidrolisam mais eficientemente as regiões não substituídas na cadeia de arabinoxilanas (KUMAR; MARÍN-NAVARRO; SHUKLA, 2016).

As xilanases têm atraído interesse em pesquisas científicas devido ao seu amplo espectro de aplicação industrial. Essas enzimas têm sido utilizadas na indústria de papel e celulose, mais especificamente no branqueamento da polpa em substituição aos compostos clorados tóxicos (ex.  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{Cl}_2$ , hipoclorito) (ADHYARU et al., 2017; BORUAH et al., 2016); na indústria de tecidos em etapas como desengomagem, biopurga (*bioscouring*) e biopolimento das fibras têxteis (ATY et al., 2018; BATTAN et al., 2012); e na conversão de biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, na produção de biocombustíveis (ASTOLFI et al., 2019; BOONCHUAY et al., 2018; ALMEIDA et al., 2014; YANG et al., 2015b).

Na indústria de alimentos, as xilanases apresentam importante papel no melhoramento de processos e de característica tecnológicas e/ou nutricionais, tais como: extração e clarificação de suco de frutas (ADIGUZEL et al., 2019; SILVA et al., 2019; SHAHRESTANI et al., 2016); extração de óleo a partir de plantas (MARASABESSY et al., 2011); fabricação de pães (LIU et al., 2017; PASSARINHO et al., 2019; YEGIN; ALTINEL; TULUK, 2018) e biscoitos (LI et al., 2013), atuando na modificação das propriedades reológicas da massa; e formulação de rações animais (GHAYOUR-NAJAFABADI et al., 2018; VANDEPLAS et al., 2010), aumentando a sua digestibilidade e valor nutricional. Além disso, as xilanases têm sido extensivamente estudadas para produção de XOs por hidrólise enzimática de substratos agroindustriais (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; BIAN et al., 2013; LIU et al., 2018; MAZLAN et al., 2019; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017; REDDY; KRISHNAN, 2016; SUKRI; MIMI SAKINAH, 2018), a qual é considerada a principal via de obtenção destes prebióticos comerciais.

### **3.2.2 Xilanases microbianas**

As xilanases são de natureza generalizada e podem ser encontradas em bactérias, fungos, algas, protozoários, crustáceos, insetos e sementes de plantas (RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2017; SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997). No entanto, o interesse em xilanases microbianas tem aumentando devido à capacidade destes organismos em produzir altas quantidades da enzima em relação às fontes vegetais e animais, além de serem cultivados sob processos controlados e possíveis de sofrerem manipulação genética (UDAY et al., 2016).

Em relação às xilanases microbianas, a produção a partir de bactérias (IRFAN et al., 2016; KALLEL et al., 2016) e fungos filamentosos (BORUAH et al., 2016; CARVALHO et al., 2017; MARTINS et al., 2018) é extensivamente estudada em comparação às de leveduras (ANDRADE et al., 2015; DING; LI; HU, 2018; GAUTÉRIO et al., 2018; OTERO et al., 2015), e pode ser realizada em cultivo em estado sólido (DIAS et al., 2017) ou submerso (KHUSRO et al., 2016). Além disso, as xilanases podem ser intra (menos frequente) (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2019) ou extracelulares (BEDADE et al., 2017), sendo produzidas por micro-organismos selvagem (MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017) ou cepas microbianas recombinantes (CAYETANO-CRUZ et al., 2016; CHANG et al., 2017).

Fungos dos gêneros *Aspergillus* (ADHYARU et al., 2016), *Trichoderma* (AJIJOLAKEWU et al., 2017), *Thermomyces* (KUMAR; CHHABRA; SHUKLA, 2017), *Penicillium* (BORUAH et al., 2016) e *Fusarium* (ALMEIDA et al., 2014), bem como algumas espécies termófilas (GOLUGURI et al., 2016; ZHAO et al., 2013), têm sido reportados como produtores de xilanases. Os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são utilizados na produção comercial de xilanase e estudados com maior frequência quanto à produção desta, onde espécies como *Aspergillus tubingensis* (ADHYARU; BHATT; MODI, 2015), *Aspergillus fumigatus* (ANG et al., 2013), *Aspergillus terreus* (KAUSHIK; MALIK, 2016), *Trichoderma stromaticum* (CARVALHO et al., 2017), *Trichoderma reesei* (ASTOLFI et al., 2019), *Trichoderma viride* (IRFAN; NADEEM; SYED, 2014), entre outras, se mostraram potencialmente produtoras da enzima até quando substratos agroindustriais foram utilizados no meio de cultivo.

A produção de xilanases bacterianas tem sido mencionada com frequência para os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, incluindo as espécies *Bacillus* sp. (IRFAN et al., 2016; PANWAR; SRIVASTAVA; KAPOOR, 2014), *Bacillus mojavenis* (KALLEL et al., 2016), *Bacillus mojavenis* (KHUSRO et al., 2016), *Bacillus pumilus* (KAUR; BHARDWAJ; SHARMA, 2016), *Streptomyces* sp. (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; KUMAR et al., 2012; ROSMINE et al., 2017), *Streptomyces thermocarboxydus* (CHI et al., 2013), *Streptomyces thermovulgaris* (BOONCHUAY et al., 2016), *Streptomyces violaceoruber* (KHURANA et al., 2007) e *Streptomyces griseorubens* (WU et al., 2018a). Além disso, estudos envolvendo a secreção de xilanases pelos gêneros *Geobacillus* (BIBI et al., 2014), *Paenibacillus* (LIU et al., 2018), *Acetobacter* e *Cellulomonas* (ANTHONY et al., 2016), também são mencionados na literatura científica.

Fungos filamentosos apresentam a desvantagem de secretarem grandes quantidades de xilanases em conjunto com celulasas (ANG et al., 2013; REIS et al., 2013) e  $\beta$ -xilosidases (TERRASAN et al., 2013) no meio extracelular, o que pode ser inconveniente em

algumas aplicações industriais. Por outro lado, diversas leveduras são capazes de secretar xilanases livres de celulasas (BANKEEREE et al., 2016; OTERO et al., 2015) e quantidades baixas de  $\beta$ -xilosidases (CHRISTOV et al., 1997; GAUTÉRIO et al., 2018; OTERO et al., 2015), tornando-se promissoras para aplicação na indústria de papel e celulose e na produção de XOs. Outra vantagem na utilização de leveduras está relacionada ao seu rápido crescimento e capacidade de suportar a presença de inibidores (CAVKA; J NSSON, 2014). Estudos mostram que leveduras associadas à decomposição de madeira nos ecossistemas da Mata Atlântica (MORAIS et al., 2013) ou à outros materiais lignocelulósicos (LARA et al., 2014), são capazes de secretar xilanases. Além disso, espécies como *Pichia stipits* (DING; LI; HU, 2018; YANG et al., 2011), *Cryptococcus flavescens* (ANDRADE et al., 2015), *Cryptococcus laurentii* (OTERO et al., 2015), *Cryptococcus flavus* (PARACHIN et al., 2009), *Pseudozyma hubeiensis* (ADSUL; BASTAWDE; GOKHALE, 2009) e *Aureobasidium pullulans* (YEGIN et al., 2017) são mencionadas como produtoras de xilanases.

### 3.2.3 Xilanases de *Aureobasidium pullulans*

*Aureobasidium pullulans* é um fungo tipo levedura classificado como ascomiceto, da classe Dothideales e subclasse Dothideaceae (GOSTINČAR et al., 2014). Com base na sua morfologia, fisiologia nutricional e metabólitos produzidos, três principais subespécies de *A. pullulans* são mencionadas na literatura científica: *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova e *A. pullulans* var. *melanogenum* (HOOG; YURLOVA, 1994). Além disso, outras duas subespécies de *A. pullulans* foram identificadas por Zalar et al. (2008) na região Ártica: *A. pullulans* var. *subglaciale* e *A. pullulans* var. *namibiae*. A presença de *A. pullulans* está associada a diversos habitats terrestres e aquáticos em ambientes tropicais, temperados e polares (GAUR et al., 2010).

Devido à sua característica polimórfica, *A. pullulans* apresenta morfologia distinta conforme o seu ciclo de vida, isto é, varia de formas unicelulares (isto é, pequenas células elípticas típicas de levedura, blastosporos e clamidósporos) até filamentos alongados contendo septos e ramificações (CAMPBELL et al., 2004; RAMOS; GARCÍA-ACHA, 1975). As colônias de *A. pullulans* podem apresentar coloração amarela, creme, rosa e marrom claro, tornando-se oliváceas ou negras devido a produção de clamidósporos na fase final de crescimento (CHI et al., 2009), sendo também caracterizado pela produção de um pigmento escuro semelhante à melanina (HOOG; YURLOVA, 1994; LI et al., 2009). A síntese deste pigmento nem sempre é desejável e é estimulada sob condições desfavoráveis para o crescimento do micro-organismo (DESHPANDE; RALE; LYNCH, 1992).



O micro-organismo *A. pullulans* é reconhecido principalmente pela produção do polissacarídeo pululana (AN et al., 2017; CHOUDHURY; BHATTACHARYYA; PRASAD, 2012; SUGUMARAN et al., 2013; TERÁN HILARES et al., 2017; WU et al., 2016), que possui certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (GRN 99, FDA, 2002), sendo também utilizado na produção de oligômeros como fruto-oligossacarídeos (CASTRO et al., 2017; DOMINGUEZ et al., 2012) e feruloil oligossacarídeos (YU; GU, 2014). Adicionalmente, diversos estudos mencionam a produção de enzimas por *A. pullulans* como lacases (LEATHERS et al., 2013), lipases (LEATHERS et al., 2013), glicosidasas (LEITE et al., 2008), amilases (LI et al., 2007a), esterases (LEMES et al., 2019) e xilanases (BANKEEREE et al., 2016; GAUTÉRIO et al., 2018).

Estudos envolvendo a produção de enzimas xilanolíticas por diferentes cepas de *A. pullulans* são mencionados na literatura, seja utilizando xilana comercial (YEGIN, 2017a) ou substratos agroindustriais (BANKEEREE et al., 2016; NASR et al., 2013; YEGIN, 2016; YEGIN et al., 2017) no meio de cultivo. Os primeiros relatos de xilanases de *A. pullulans* mencionam a produção da enzima (atividade entre 47 a 373 U/mL) por espécies isoladas de regiões tropicais e conhecidas como “variantes de cor”, utilizando xilana de aveia como substrato (LEATHERS, 1986). Posteriormente, outros estudos demonstraram que a produção de xilanases por *A. pullulans* é induzida por xilose e xilana (DOBBERSTEIN; EMEIS, 1989), e que a enzima pode ser produzida quando substratos agroindustriais (ex. farelo de trigo, palha e casca de arroz) são utilizados (KARNI; DEOPURKAR; RALE, 1993). Cepas de *A. pullulans* também foram mencionadas como produtoras de xilanases livres de celulasas (LEATHERS, 1986) e com baixa produção de  $\beta$ -xilosidase (CHRISTOV et al., 1997). Além disso, a purificação de xilanases de *A. pullulans* após a produção em cultivo submerso (OHTA et al., 2001; TANAKA; MUGURUMA; OHTA, 2006), a especificidade enzimática a diferentes substratos (CHRISTOV et al., 1999), caracterização (MYBURGH; PRIOR; KILIAN, 1991) e a aplicação da enzima na hidrólise de xilana (CHRISTOV et al., 1997) também são relatados na literatura científica.

Estudos taxonômicos de *A. pullulans* demonstram que a produção de xilanase varia conforme a espécie, principalmente entre as cepas “variantes de cor” e as tipicamente pigmentadas (MANITCHOTPISIT et al., 2009). Yegin (2017a) avaliou a secreção de xilanase por três cepas de *A. pullulans* – DMS 2404, NRRL Y-2311-1 e NRRL Y12, 974 – e otimizou a produção da enzima utilizando xilana comercial como substrato. A cepa Y-2311-1 se mostrou a maior produtora da xilanase, alcançando a atividade máxima de 252,8 U/mL após a definição das condições adequadas de cultivo. Posteriormente, Yegin et al. (2017) substituíram a xilana comercial por substratos agroindustriais na produção de xilanase por *A. pullulans* Y-2311-1. O uso de farelo de trigo como fonte de carbono se mostrou o substrato mais promissor para a produção da enzima, alcançando a atividade enzimática de 67,4 U/mL. A partir da definição das melhores condições de cultivo, a atividade de xilanase aumentou

para 85,2 U/mL. Em outro estudo realizado por Yegin (2016), a produção de xilanase por *A. pullulans* Y-2311-1 utilizando haste de alcachofra como substrato alcançou o valor máximo de 66,5 U/mL, seis vezes superior ao obtido nas condições iniciais de cultivo (10,5 U/mL).

Após o isolamento da cepa *A. pullulans* SN090 a partir de *Capsicum annum*, Nasr et al. (2013) avaliaram a produção de xilanase utilizando xilana comercial e substratos agroindustriais (farelo de trigo e de arroz, bagaço de cana) como fontes de carbono. A atividade enzimática de xilanase alcançou o valor máximo de 2,73 U/mL, o qual foi similar quando farelo de trigo foi usado em substituição à xilana. Bankeeree et al. (2016) otimizaram a produção de xilanase por *A. pullulans* CBS 125684 utilizando sabugo de milho como substrato, e alcançaram o valor máximo de 8,7 U/mL, resultado este 2,1 vezes superior à atividade obtida nas condições iniciais de cultivo.

### 3.2.4 Aspectos de produção de xilanases microbianas

A síntese de xilanases por bactérias e fungos é induzida pela presença de xilana no meio de cultivo, onde fragmentos de baixa massa molar do polissacarídeo desempenham um papel chave na regulação gênica e expressão da enzima. Estes fragmentos, que incluem xilose, xilobiose e demais XOs, são liberados a partir da clivagem da xilana pela ação de pequenas quantidades de xilanases constitutivas. Após a sua liberação, os fragmentos entram em contato com o mecanismo regulador da célula microbiana, induzindo a secreção de xilanases extracelulares. As enzimas secretadas, por sua vez, irão hidrolisar a xilana em novos fragmentos, os quais serão transportados facilmente para o interior da célula e novamente estimular o processo de indução. Este mecanismo de indução, todavia, é influenciado não apenas pela fonte de carbono presente no meio, mas também pela disponibilidade de precursores da síntese proteica (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; UDAY et al., 2016).

Na produção de xilanases microbianas, a seleção da cepa selvagem é um dos critérios mais importantes, pois espera-se que o micro-organismo seja capaz de secretar a enzima com alta atividade, além de não produzir toxinas ou outros produtos indesejáveis. Os principais desafios relacionados ao uso de cepas selvagens incluem a disponibilidade de linhagens microbianas potencialmente produtoras de xilanases, além da ampla aplicação do biocatalisador produzido em processos industriais ou em larga escala (UDAY et al., 2016). Além disso, parâmetros físicos como pH, temperatura, agitação/aeração, volume do inóculo, tempo de incubação e concentração de nutrientes (fonte de carbono, nitrogênio, elementos traços, vitaminas), aliado à umidade, atividade de água e tamanho de partícula do substrato, influenciam o crescimento microbiano e produção de xilanases (WALIA et al., 2017).

O tipo de cultivo (estado sólido ou submerso) também influencia no crescimento microbiano e produção de xilanases, e sua escolha depende do tipo de micro-organismo utilizado (BHARDWAJ; KUMAR; VERMA, 2019). Frequentemente, a produção de xilanases por bactérias e leveduras é realizada em cultivo submerso (CS), enquanto fungos filamentosos são cultivados em estado sólido (CES). O CES apresenta vantagens na produção de enzimas como alta produtividade volumétrica, baixo custo operacional e de capital de investimento (WALIA et al., 2017); no entanto, o CES é dificilmente adotado na produção em larga escala devido à incapacidade de padronizar processos e à reprodutibilidade limitada dos resultados (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). Já a produção de xilanases por CS apresenta vantagens como melhor controle das condições de cultivo, fácil separação da biomassa do meio líquido, mistura apropriada dos componentes do meio (devido à alta quantidade de água livre), aeração uniforme e possibilidade de aumento para escala industrial (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018). Ainda, a estratégia de CS é responsável por 90% da xilanase total produzida mundialmente (UDAY et al., 2016).

Um dos principais obstáculos na aplicação industrial de xilanases microbianas é o seu alto custo de produção, o qual está relacionado principalmente à fonte de carbono. A xilana pura apresenta custo elevado, não sendo possível o seu fornecimento a nível industrial para produção em massa da enzima (KALLEL et al., 2016). Assim, substratos agroindustriais ricos em xilana podem ser utilizados como fonte de carbono para o crescimento microbiano e consequente produção de xilanases (MARTINS et al., 2018). Com base nisso, estudos têm sido realizados substituindo a xilana comercial por resíduos ou subprodutos agrícolas no meio de cultivo, conforme exemplifica a Tabela 2. Substratos como farelo de trigo, sabugo de milho, dreche cervejeira, broto de malte, farelo de aveia, haste de alcachofra, polpa de beterraba, semente de azeitona, haste de algodão e casca de avelã, na concentração de 1% (m/v), foram utilizados na produção de xilanases por *A. pullulans* Y-2311-1, cuja atividade enzimática variou entre 0,51 a 67,4 U/mL (YEGIN et al., 2017). Em estudo realizado por Bankeeree et al. (2014), xilanases foram produzidas por *A. pullulans* CBS 135684 em meio contendo 1% (m/v) de germe de trigo, farelo de trigo ou sabugo de milho como fonte de xilana. A produção da enzima variou entre 2,6 a 4,1 U/mL conforme o substrato utilizado.

Considerando que a composição do meio e as condições de cultivo influenciam a secreção de xilanases por micro-organismos (WALIA et al., 2017), a otimização destes fatores é essencial para que se atinja a máxima produção enzimática, permitindo também minimizar os custos energéticos de produção e a quantidade de nutrientes não utilizados pela espécie microbiana (UDAY et al., 2016). A maximização da produção de xilanases pode ser atingida

através de planejamentos experimentais em sequência, os quais permitem avaliar a influência de diversos parâmetros simultaneamente utilizando número limitado de experimentos (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2018; DESAI; IYER, 2017).

**Tabela 2** – Produção de xilanases microbianas em cultivo submerso utilizando substratos agroindustriais como fonte de xilana.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade (U/mL)</b>	<b>Referência</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	Casca de maracujá	61,2	MARTINS et al. (2018)
<i>Aspergillus foetidus</i>	Resíduo de soja	13,9	CUNHA et al. (2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Sabugo de milho	110,4	DESAI; IYER (2017)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Haste de alcachofra	66,5	YEGIN (2016)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Sabugo de milho	10,1	BANKEEREE et al. (2016)
<i>Bacillus mojavensis</i>	Farelo de trigo	41,9	KALLEL et al. (2016)
<i>Bacillus subtilis e</i>			YARDIMCI;
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Cascas de avelã	49,1	CEKMECELIOGLU (2018)
<i>Cryptococcus flavescens</i>	Bagaço de cana	8,3	ANDRADE et al. (2015)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Palha de milho	114	ALMEIDA et al. (2014)
<i>Penicillium sp.</i>	Farelo de arroz	21,8	BAJAJ; SHARMA; SHARMA (2011)
<i>Streptomyces sp.</i>	Palha de trigo	505,1	KUMAR et al. (2012)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Farelo de trigo	119,9	KUMAR; CHHABRA; SHUKLA (2017)
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Palha de arroz	59,6	RANI et al. (2014)

Diferentes abordagens estatísticas (Delineamento Composto Central, Box-Behnken, Plackett-Burman, entre outros) têm sido empregadas com sucesso na maximização da produção de xilanase (ANDRADE et al., 2015; ANTHONY et al., 2016; CUNHA et al., 2018; DESAI; IYER, 2017; KALLEL et al., 2016; KHURANA et al., 2007; KUMAR et al., 2012; LEE, 2018; LONG et al., 2017; MARTINS et al., 2018; SHARMA; BAJAJ, 2018; YARDIMCI; CEKMECELIOGLU, 2018; YEGIN, 2016), principalmente quando substratos agrícolas são utilizados no meio de cultivo.

### 3.2.5 Purificação de xilanases microbianas

Conforme a aplicação final das xilanases, etapas de purificação são necessárias para obtenção de extratos enzimáticos mais puros. Para tal, técnicas como cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico e precipitação salina têm sido utilizadas na purificação de xilanases microbianas (BHARDWAJ et al., 2019; KOCABAŞ; GÜDER; ÖZBEN, 2015). Dentre estas, a precipitação com sal é extensivamente empregada isoladamente (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017) ou na primeira etapa (CHEN et al., 2019; DING; LI; HU, 2018) de purificação parcial de xilanases.

A precipitação pela adição de sais neutros é um dos métodos mais utilizados no fracionamento de proteínas de origem microbiana. A adição de sais em altas concentrações – também chamado de *salting out* – reduz a disponibilidade de água ao redor da proteína, devido à hidratação dos íons adicionados. Por consequência, ocorre a exposição dos resíduos hidrofóbicos da proteína, o que aumenta a interação entre estes e resulta na formação de agregados proteicos (precipitados). Os sais empregados podem estabilizar as proteínas contra a desnaturação, proteólise ou contaminação bacteriana, sendo empregado com maior frequência o citrato de sódio, sulfato de sódio e sulfato de amônio (ROE, 2001; SCHMIDELL et al., 2001). As vantagens da precipitação como método de concentração e purificação de proteínas incluem a facilidade de operação em grande escala, o uso de processo contínuo e de equipamentos relativamente simples, e a grande variedade de agentes precipitantes que podem ser aplicados (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005; ROE, 2001).

O sal mais utilizado na precipitação de xilanases é o sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017; BHARDWAJ et al., 2019; DING; LI; HU, 2018; GOLUGURI et al., 2016; PAL; KHANUM, 2011), sendo este aplicado na faixa entre 20 a 90% de saturação em único (WU et al., 2018a; ZHANG et al., 2012) ou em dois estágios (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; CHEN et al., 2019). No caso da precipitação direta, a saturação

empregada compreende os valores entre 50 a 80% (BHARDWAJ et al., 2019; NINAWA; KAPOOR; KUHAD, 2008; SEEMAKRAM et al., 2016; ZHANG et al., 2012); enquanto na precipitação fracionada, as saturações nas faixas de 20-60% (DING; LI; HU, 2018), 30-60% (GOLUGURI et al., 2016), 30-65% (PAL; KHANUM, 2011), 40-60% (CHEN et al., 2019), 30-70% (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012) e 50-80% (BANKEEREE et al., 2014) já foram utilizadas na purificação de xilanases.

Com relação à purificação de xilanases de leveduras, Ding, Li e Hu (2018) utilizaram a precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20-60%) na purificação de xilanase de *P. stipitis*, possibilitando a purificação da enzima em 11,7 vezes e recuperação de 88,2%. Na obtenção de xilanases purificadas de *A. pullulans*, Bankeeree et al. (2014) empregaram  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como agente precipitante (50-80%), e alcançaram fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC) de 1,8 vezes e 50,3%, respectivamente. Andrade (2014) utilizou a precipitação direta com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (70%) na purificação de xilanases de *C. flavescens*, obtendo FP e REC iguais a 7,5 vezes e 42,2%, respectivamente.

### 3.2.6 Caracterização de xilanases microbianas

A aplicação eficiente de xilanases brutas ou purificadas requer o conhecimento das suas propriedades bioquímicas e termodinâmicas, em especial seu pH e temperatura ótimos de atuação, especificidade pelo substrato e estabilidade térmica, os quais são fundamentais para o entendimento do comportamento enzimático e determinação das condições adequadas de trabalho (ATY et al., 2018; ASTOLFI et al., 2019). Em geral, as xilanases fúngicas e bacterianas apresentam temperatura ótima entre 45 e 60 °C (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; AJIJOLAKEWU et al., 2017; ASTOLFI et al., 2019; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015; KAUSHIK; MALIK, 2016; LIU et al., 2018), exceto para algumas espécies termofílicas cujo o ótimo é observado entre 70 e 80 °C (ANAND; KUMAR; SATYANARAYANA, 2013; BANKEEREE et al., 2014; LOPES et al., 2011; MAALEJ et al., 2009).

Além disso, xilanases de fungos filamentosos e leveduras apresentam atividade ótima em pH ácido (entre 4 e 6) (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017; BEDADE et al., 2017; LIAO et al., 2012; YEGIN, 2016), enquanto xilanases de bactérias se mostram mais ativas em valores de pH neutro ao alcalino (BAJAJ; MANHAS, 2012; KAUR; BHARDWAJ; SHARMA, 2016; PRADEEP et al., 2013). A Tabela 3 apresenta as propriedades bioquímicas de xilanases produzidas por diversas espécies microbianas.

**Tabela 3** – Propriedades bioquímicas de xilanases de diferentes espécies microbianas.

Micro-organismo	Extrato de xilanase	T ótima (°C)	pH ótimo	K <sub>m</sub> * (mg/mL)	Referência
<i>Aspergillus sp</i>	Bruto	60	4,8	1,9 <sup>2</sup>	DAS; RAY (2016)
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Purificado	50	4,0	19,4 <sup>1</sup>	YEGIN (2017b)
<i>Bacillus sp.</i>	Purificado	55	6,0	< 0,1 <sup>2</sup>	PANWAR; SRIVASTAVA (2014)
<i>Cryptococcus flavescens</i>	Bruto	80	4,8	1,37 <sup>2</sup>	LOPES et al. (2011)
<i>Penicillium roquefortie</i>	Bruto	60	3,0	84,1 <sup>1</sup>	SOUZA et al. (2018)
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Purificado	60	6,5	2,0 <sup>1</sup>	LIU et al. (2018)
<i>Picha stipitis</i>	Purificado	50	6,0	4,5 <sup>1</sup>	DING; LI; HU (2018)
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Purificado	40	5,5	11,8 <sup>1</sup>	MOHAMED et al. (2018)
<i>Streptomyces sp.</i>	Purificado	60	6	2,4 <sup>2</sup>	ADIGÜZEL; TUNÇER (2016)
<i>Thielaviopsis basicola</i>	Purificado	60	5,5	1,4 <sup>2</sup>	GOLUGURI et al. (2016)
<i>Trichoderma inhamatum</i>	Purificado	50	5,5	10,7 <sup>2</sup>	SILVA; TERRASAN; CARMONA (2015)
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Purificado	60	5,0	20 <sup>2</sup>	ATY et al. (2018)
<i>Trichoderma stromaticum</i>	Purificado	59,5	4,7	9,5 <sup>1</sup>	CARVALHO et al. (2017)

<sup>1</sup>Substrato xilana de madeira de faia; <sup>2</sup>Substrato xilana de madeira de bétula.

Xilanases de mesmo gênero microbiano se diferem quanto à afinidade por determinado substrato (por exemplo, xilana de madeira de faia ou de bétula) (ATY et al., 2018;

SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015; KNOB et al., 2013; SOUZA et al., 2018). Além disso, a mesma xilanase pode apresentar afinidades distintas conforme o substrato de reação (BHARDWAJ et al., 2019; CHEN et al., 2019; GHOSH; SUTRADHAR; BAISHYA, 2019; SHENG et al., 2014). A literatura menciona que a cinética das reações catalisadas por xilanases seguem o modelo proposto por Michaelis-Menten (CAYETANO-CRUZ et al., 2016; SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015; MOHAMED et al., 2018), onde os parâmetros cinéticos  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten) e  $V_{max}$  (velocidade máxima de reação) são utilizados para compreender a afinidade da enzima por xilanas de diferentes origens.

A desnaturação térmica de enzimas envolve a perda das suas estruturas secundária, terciária e quaternária (caso presente) sem a quebra de ligações covalentes (DANIEL; DINES; PETACH, 1996). A termoestabilidade compreende a estabilidade térmica e cinética de enzimas, e consiste na capacidade destas em resistir ao desdobramento de sua estrutura na ausência de substrato (USTOK; TARI; HARSA, 2010). Enquanto a estabilidade termodinâmica está associada à resistência ao desdobramento reversível da estrutura proteica, a estabilidade cinética está relacionada a resistência à desnaturação irreversível (POLIZZI et al., 2007). O conhecimento dos parâmetros termodinâmicos ( $E_d$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$ ) e cinéticos ( $k_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $D$  e  $z$ ) de desnaturação térmica permitem a compreensão da relação entre a estabilidade da enzima e sua estrutura (SANT'ANNA et al., 2010), bem como do provável mecanismo de desnaturação, o qual é de grande importância em processos enzimáticos (YEGIN; GOKSUNGUR; FERNANDEZ-LAHOORE, 2012) que utilizam altas temperaturas.

A termoestabilidade de xilanases depende de várias forças moleculares como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, pontes dissulfeto, entre outras, as quais podem promover uma estrutura conformacional proteica com maior eficiência de empacotamento, menor entropia do desdobramento, liberação da tensão conformacional e estabilidade das  $\alpha$ -hélices (BAJAJ; MANHAS, 2012). Xilanases podem apresentar valores de entalpia ( $\Delta H^*$ ) positivos ou negativos, indicando que o processo de inativação enzimática é endo ou exotérmico, respectivamente, à pressão constante (PAL; KHANUM, 2011); do mesmo modo, valores negativos de entropia ( $\Delta S^*$ ) demonstram a ocorrência do desdobramento da proteína em estrutura mais desordenada (BANKEEREE et al., 2014; ROBLEDO et al., 2014), enquanto valores positivos indicam a agregação entre as cadeias proteicas (YEGIN, 2017b).

O aumento na energia livre de Gibbs –  $\Delta G^*$ , a qual mede a espontaneidade do processo de desnaturação enzimática – conforme a temperatura sugere maior estabilidade térmica à enzima (ATY et al., 2018; ZHOU et al., 2015). Por outro lado, a diminuição do  $\Delta G^*$  demonstra que a enzima é sensível à desnaturação com a elevação da temperatura (ANDRADE,



2014). Valores negativos de  $\Delta G$  indicam que o processo de desnaturação é exergônico, isto é, energeticamente favorável e com liberação de energia (LOPES; VALERI; PESSOA-JÚNIOR, 2013), enquanto valores positivos sugerem que o processo é endergônico e de menor espontaneidade (PAL; KHANUM, 2011).

Os principais parâmetros cinéticos de estabilidade térmica compreendem a constante de desnaturação térmica ( $k_d$ ) e meia vida ( $t_{1/2}$ ), cujo valores costumam variar consideravelmente entre as xilanases microbianas. A  $t_{1/2}$  – tempo em que a atividade enzimática atinge 50% do seu valor inicial – diminui conforme a elevação de temperatura, o que reflete no aumento nos valores de  $k_d$  (ATY et al., 2018; BANKEEREE et al., 2014; FANG et al., 2007; ROBLEDO et al., 2014; YEGIN, 2017b). Algumas xilanases microbianas apresentam diminuição brusca da  $t_{1/2}$  quando submetidas ao pequeno incremento de temperatura (ANDRADE, 2014), enquanto outras se mostram menos sensíveis e demonstram queda menos acentuada na  $t_{1/2}$  (PAL; KHANUM, 2011).

Para fins industriais, a desnaturação térmica de enzimas é comumente expressa em termos de valor  $D$  (tempo de redução decimal) e  $z$  (intervalo de temperatura requerido para reduzir o valor  $D$  em um ciclo logarítmico). Assim como a  $t_{1/2}$ , os valores de  $D$  diminuem com o incremento da temperatura (PAL; KHANUM, 2011). Adicionalmente, valores baixos de  $z$  estão associados à sensibilidade da enzima ao incremento da temperatura (BARRETT; GRANDISON; LEWIS, 1999).

### 3.3 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

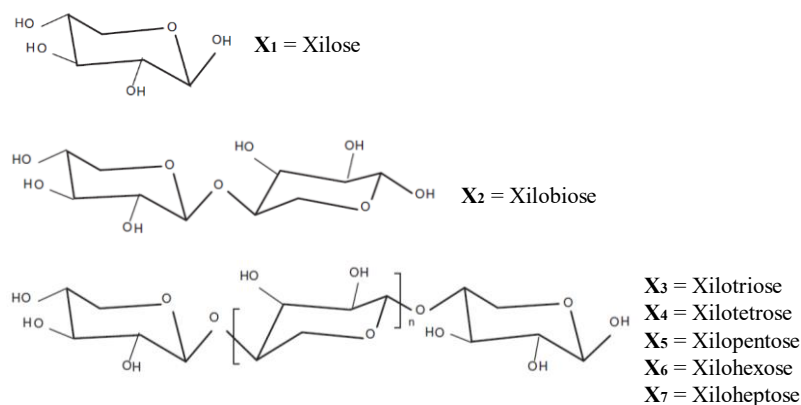
#### 3.3.1 Estrutura e propriedades biológicas

Os XOs são oligossacarídeos contendo entre duas a dez unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (IUPAC, 1982) (Figura 4). Estes oligômeros são produzidos a partir da hidrólise da xilana, principal polissacarídeo presente na fração hemicelulósica da parede vegetal (GÍRIO et al., 2010). Conforme o grau de substituição da xilana, os XOs podem apresentar em sua estrutura grupamentos laterais como  $\alpha$ -D-glicopiranosil ácido urônico ou seu derivado, grupos acetila e resíduos de arabinofuranosil, os quais são responsáveis pela existência de XOs ramificados (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Os XOs estão presentes em brotos de bambu, frutas, vegetais e mel, mas não em quantidades suficientes para exibir efeito prebiótico (SAMANTA et al., 2015), o que justifica a necessidade de sua produção em escala industrial (AMORIM et al., 2019a).

Os XOs são atóxicos e não carcinogênicos (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015), e estudos têm demonstrado que estes são capazes de exercer seus efeitos benéficos mesmo em baixas doses

diárias (isto é, dose mínima entre 1,4 a 2,8 g/d) (FINEGOLD et al., 2014). Além disso, os XOs possuem certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para uso em alimentos (GRN 458, FDA, 2013), sabor doce (SAMANTA et al., 2015), preço competitivo em relação a outros prebióticos (AMORIM et al., 2019a), sendo os únicos oligossacarídeos no mercado produzidos a partir de biomassa lignocelulósica (MONIZ et al., 2016). Devido a estas características, os XOs têm sido aplicados na formulação de alimentos (AYYAPPAN et al., 2016; FERRÃO et al., 2018) e em rações animais (ABASUBONG et al., 2018). Na América do Norte e na Europa, a aplicação dos XOs é regulamentada pela *Food and Drug Administration* (GRN 458, FDA, 2013; GRN 816, FDA, 2019) e pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2018), respectivamente, as quais salientam a seguridade dos oligômeros. No Brasil, no entanto, os XOs ainda não possuem legislação específica que regulamente a sua utilização.

**Figura 4** – Estrutura esquemática da xilose e dos xilo-oligossacarídeos.



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

Os XOs se mostram mais promissores industrialmente frente a outros oligômeros como fruto-oligossacarídeos (FOs) e galacto-oligossacarídeos (GOs), devido à sua estabilidade sob temperaturas elevadas e pH ácido, fato este fortemente relacionado à sua estrutura (COURTIN et al., 2009; WANG et al., 2009). Courtin et al. (2009) demonstraram que 67% e 60% das ligações  $\beta$ -2,1 dos FOs foram clivadas nos valores de pH 2,0 e 3,0, respectivamente, após 60 min a 100 °C; enquanto 21% e 9% das ligações glicosídicas dos XOs foram hidrolisadas nos valores de pH 2,0 e 3,0, nesta ordem. No estudo de Wang et al. (2009), 3% e 25% dos XOs e FOs foram degradados, respectivamente, no processo de pasteurização (60 a 100 °C e pH 2,0, por 30 min); enquanto que na esterilização (121 °C e pH 2,0 por 50 min), apenas 16% dos XOs sofreram degradação, sendo os FOS completamente degradados. A estabilidade térmica e ao pH ácido são fatores fundamentais para posterior aplicação dos XOs em produtos alimentícios, uma vez que a maioria dos processos de preservação de alimentos utilizam temperaturas

elevadas e acidez, os quais podem levar à degradação dos açúcares, afetando as características do produto final.

Os XOs são considerados oligômeros não digeríveis devido à capacidade em atravessarem o trato gastrointestinal superior sem seres degradados (CARVALHO et al., 2013). Devido a isto, a principal propriedade dos XOs está relacionada ao seu efeito prebiótico, estimulando o crescimento da microflora benéfica ao intestino humano e inibindo o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (AMORIM et al., 2020; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017; SAJIB et al., 2018). A microflora intestinal utiliza os XOs para sua multiplicação e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), gases (hidrogênio e CO<sub>2</sub>), lactato, entre outros metabólitos (TOPPING; CLIFTON, 2001). Os AGCC, em especial o propionato, o acetato e o butirato, além de outros compostos como o lactato, são essenciais para o bom funcionamento do intestino, podendo influenciar positivamente outros locais distantes do órgão (GIBSON et al., 2017).

O efeito prebiótico dos XOs está fortemente relacionado com a estrutura e o GP destes oligômeros: XOs de baixo GP (GP<5) produzem acetato e butirato possuem forte efeito bifidogênico, enquanto XOs de alto GP (GP>5) resultam na diminuição acentuada de AGCC (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015); e XOs com GP entre 2 e 3 apresentam cinética de utilização mais rápida do que XOs com GP de 4 a 5 (GULLÓN et al., 2008). Além disso, o grau de substituição dos XOs pode afetar a fermentação dos XOs por bactérias bifidogênicas e lactobacilos, onde estudos demonstraram que espécies como *Bifidobacterium adolescentes* são capazes de utilizar XOs lineares ou contendo ramificações de arabinose, enquanto *Lactobacillus brevis* fermenta apenas XOs não substituídos (FALCK et al., 2013). Em outro estudo, XOs lineares ou XOs contendo ramificações de arabinose foram fermentados mais rapidamente por inóculo fecal do que XOs de estrutura mais complexa, isto é, contendo acetilações ou grupamentos de ácido metil glicurônico (KABEL et al., 2002). Tratando-se de outras atividades biológicas dos XOs, Valls et al. (2018) demonstraram que a atividade antioxidante destes oligômeros aumenta com o seu GP e presença de ramificações de ácido metil glicurônico.

Nos últimos anos, os efeitos prebióticos de XOs obtidos de sabugo de milho (BOONCHUAY et al., 2014; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012), palha de trigo (FARYAR et al., 2014), palha de alho (KALLEL et al., 2015a), palha de milho (BURUIANA et al., 2017), dreche cervejeira (AMORIM et al., 2020; SAJIB et al., 2018) e bagaço de cana (REDDY; KRISHNAN, 2016) foram demonstrados. No entanto, outras propriedades biológicas são atribuídas aos XOs, a saber: prevenção do desenvolvimento de diabetes (YANG et al., 2015a), neurotoxicidade (KRISHNA et al., 2015) e câncer do cólon (AACHARY et al., 2015); melhoria no metabolismo lipídico (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015); estimulação à resposta imune (SUN et al., 2013); ação antioxidante (VALLS et al., 2018; ZHOU et al., 2018), anti-inflamatória (HANSEN et al., 2013) e antimicrobiana (YU et al., 2015). Com base nestas

propriedades, os XOs podem ser aplicados na formulação de adoçantes de baixa caloria (XIAO et al., 2013) e em alimentos com alegação funcional (BRASIL, 1999; ESFA, 2018).

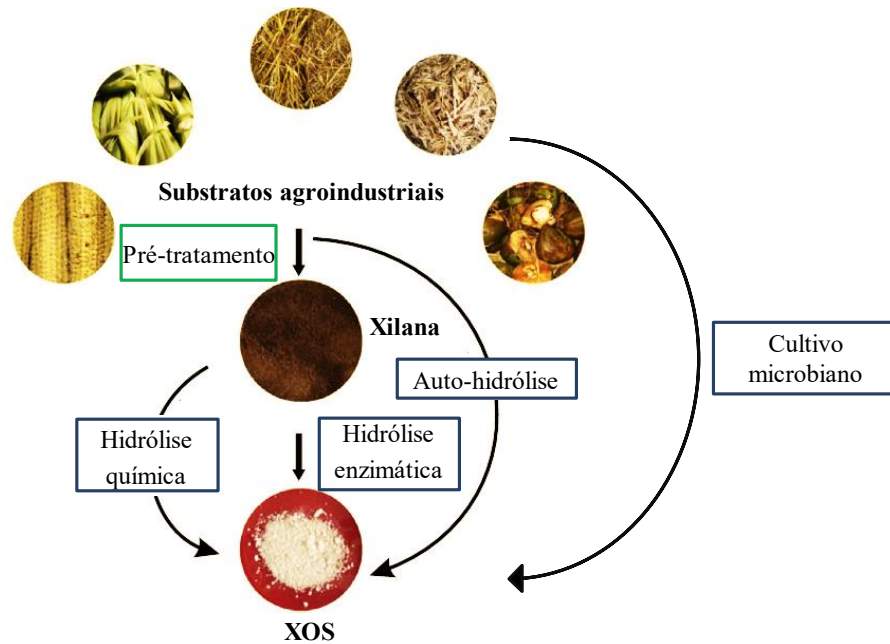
### 3.3.2 Produção de xilo-oligossacarídeos

Atualmente, diferentes processos de obtenção de XOs têm sido desenvolvidos a fim de atender as necessidades do mercado. No entanto, a produção de XOs ainda é mais dispendiosa comparada a de outros prebióticos comerciais. Avanços recentes têm sido realizados no desenvolvimento de processos ecológicos e mais eficientes, principalmente utilizando materiais abundantes, renováveis e de baixo custo como fonte de xilana, e aplicando estratégias integradas de produção, as quais posteriormente podem ser incluídas no processo de economia circular (AMORIM et al., 2019a).

Segundo Vázquez et al. (2000), três abordagens distintas podem ser descritas para a produção de XOs a partir de biomassa lignocelulósica: (a) Hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos contendo xilanas nativas; (b) Fracionamento químico do material lignocelulósico para isolar ou solubilizar a xilana, seguido de hidrólise enzimática do polissacarídeo em XOs; (c) Degradação hidrolítica do material lignocelulósico em XOs, através do uso de vapor, água e/ou soluções diluídas de ácidos ou álcalis. Já Samanta et al. (2015) mencionam que, após a extração da xilana contida na biomassa lignocelulósica, os XOs podem ser obtidos por hidrólise química, enzimática ou a combinação destes processos. Ainda, os autores mencionam que a biomassa rica em xilana pode ser submetida à auto-hidrólise para a obtenção direta dos oligômeros (Figura 5). Mais recentemente, a degradação do material lignocelulósico por micro-organismos têm demonstrado notável potencial para produção de XOs, principalmente devido à simplicidade do processo (AMORIM et al., 2019a). Cabe lembrar que diferentes estratégias de produção de XOs resultam em oligômeros com distintas estruturas e graus de polimerização (GP) (AMORIM et al., 2018; REDDY; KRISHNAN, 2016; SINGH et al., 2018), o que reflete em suas propriedades biológicas (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). As vantagens e desvantagens de cada estratégia de produção de XOs são apresentadas na Figura 6.

A auto-hidrólise consiste no tratamento hidrotérmico da biomassa lignocelulósica com água quente ou vapor em reatores em batelada com controle de temperatura (entre 150 e 220 °C). Em condições de temperatura elevadas, a cadeia de xilana é progressivamente quebrada em porções menores sob a influência dos íons hidrogênio, os quais atuam como catalisadores na quebra das ligações glicosídicas e dos grupos acetila, resultando na liberação dos XOs na fase líquida. O tratamento por auto-hidrólise é considerado simples e de baixo custo, além disso não utiliza agentes químicos prejudiciais ao meio ambiente (CHEN et al., 2014; SAMALA; SRINIVASAN; YADAV, 2015).

**Figura 5** – Estratégias de produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Samanta et al. (2015).

**Figura 6** – Principais vantagens e desvantagens dos métodos de produção de XOs.

	Auto-hidrólise	Hidrólise enzimática	Cultivo microbiano
<b>Vantagens</b>	<p>Tratamento simples e de baixo custo;            Não utiliza reagentes químicos;            Celulose e lignina permanecem na fração sólida, que pode ser utilizada para produção de biocombustíveis.</p>	<p>Não resulta em produtos tóxicos ou indesejáveis;            Condições amenas de temperatura e pressão;            Resulta em XOs de baixo GP (GP&lt;6)            Especificidade enzimática            Alto rendimento em XOs</p>	<p>Processo realizado em única etapa;            Especificidade das enzimas secretadas no meio extracelular;            Alto rendimento em XOs;            Não necessita da produção prévia de enzimas;            Permite a produção conjunta de outros biocompostos</p>
<b>Desvantagens</b>	<p>Difícil controle do GP dos XOs;            XOs de maior cadeia (GP&gt;6) comparado aos obtidos em outros processos;            Baixo rendimento em XOs;            Formação de compostos tóxicos e indesejáveis;            Necessita de longas etapas de purificação.</p>	<p>Muitas vezes, necessita de etapa prévia de extração química da xilana presente no material lignocelulósico.</p>	<p>Alguns micro-organismos podem consumir os XOs formados, o que pode influenciar no rendimento final dos XOs.</p>

Por outro lado, a auto-hidrólise resulta em XOs de maior cadeia ( $GP > 6$ ) (LI et al., 2018; SUREK; BUYUKKILECI, 2017) comparado aos obtidos por hidrólise enzimática ( $2 < GP < 6$ ) (REDDY; KRISHNAN, 2016; SINGH et al., 2018). Os hidrolisados obtidos pela

auto-hidrólise contêm grande número de compostos tóxicos (5-hidroxi metil furfural e furfural) e outros indesejáveis, tais como lignina solúvel, monossacarídeos, ácido acético, compostos fenólicos e cinzas, sendo necessário realizar longas etapas de purificação. Como alternativa, os XOs podem ser produzidos por hidrólise enzimática de xilanas extraídas de biomassa lignocelulósica (AKPINAR et al., 2010; ALVIRA et al., 2010). A hidrólise enzimática é preferida na indústria de alimentos devido aos problemas associados à auto-hidrólise (AACHARY; PRAPULLA, 2009).

Na hidrólise enzimática, a complexidade estrutural da xilana faz com que enzimas com diferentes especificidades e modos de atuação realizem a degradação deste açúcar (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015). Dentre as enzimas xilanolíticas, duas merecem destaque: endoxilanase e exo-xilanase ( $\beta$ -xilosidases), onde a primeira está envolvida na hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e liberação de XOs e eventual xilose, enquanto a segunda atua na extremidade não redutora da xilobiose ou outros XOs, liberando xilose (SHALLOM; SHOHAM, 2003; SHENG et al., 2014). Assim, extratos xilanolíticos com baixa atividade de exo-xilanasas são desejados, pois atenuam a produção de xilose e aumentam o rendimento em oligômeros. Além de inibir a atividade de xilanasas, a xilose não deve estar presente em hidrolisados prebióticos, pois não promove o crescimento da microflora intestinal benéfica (FARYAR et al., 2014; REDDY; KRISHNAN, 2016). Somando-se a isso, a hidrólise enzimática pode ocorrer na presença de enzimas auxiliares ( $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\beta$ -glicuronidases, acetil xilana esterase,  $p$ -coumaroil e feruloil esterases), que atuam na remoção de grupamentos laterais da cadeia da xilanas ramificadas (ALOKIKA; SINGH, 2019).

A hidrólise enzimática, além de não resultar em produtos secundários indesejáveis e ser operada em condições amenas de temperatura e pressão, conta com a especificidade das enzimas e maiores rendimentos em XOs devido à menor liberação de monossacarídeos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; YANG et al., 2011). Contudo, o uso eficiente das enzimas depende das variáveis do processo, tais como temperatura, pH, tempo de reação, intensidade de agitação, concentração de enzima e substrato, além da presença de outras espécies químicas que podem inibir ou acelerar as taxas de reação. Para que a hidrólise enzimática seja conduzida de modo eficiente, a otimização das condições reacionais deve ser realizada (AZELEE et al., 2016; BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). A produção de XOs por hidrólise enzimática sob diferentes condições e substratos de reação é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** – Produção de XOs por hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.

<b>Fonte de xilana</b>	<b>Fonte de enzima</b>	<b>Condições de reação</b>	<b>XOs (g/L)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Referência</b>
Bagaço de cana	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2,6% substrato 60 U/g, pH 5,0, 50°C	5,8	37,1	BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, (2010)
Bagaço de cana	<i>Pichia stipits</i>	2% substrato, 25 U/g, pH 5,4, 50 °C	5,3	31,8	BIAN et al. (2013)
Bétula (madeira)	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	2% substrato, 0,05 U/g, pH 4,6, 50 °C	5,9	28,8	NIETO- DOMÍNGUEZ et al. (2017)
Casca de arroz	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	6% substrato, 133 U/g, pH 5,5, 60 °C	5,7	9,5	GUIDO (2016)
Cascas de noz de areca	<i>Trichoderma viridea</i>	2% substrato, 10 U/g, pH 4,0, 50 °C	7,0	35,2	SINGH et al. (2018)
Faia (madeira)	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3% substrato, 200 U/g, pH 5,3, 50 °C	9,2	30,6	GUIDO; SILVEIRA; KALIL (2019)
<i>Populus tomentosa</i> (madeira)	<i>Pichia stipits</i>	2% substrato, 25 U/g, pH 5,4, 50 °C	3,9	36,8	YANG et al. (2011)
Sabugo de milho	<i>Aspergillus foetidus</i>	2% substrato, 20 U/g, pH 5,3, 45°C	6,7	33,5	CHAPLA; PANDIT; SHAH (2012)
<i>Palmaria</i> sp. (alga vermelha)	<i>Aspergillus niger</i>	1% substrato, 54 U/g, pH 4,5, 50 °C	3,5	35	YAMAMOTO et al. (2019)

A produção de XOs por hidrólise enzimática tem sido realizada a partir da aplicação de extratos brutos (BIAN et al., 2013) e purificados (NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017) de xilanase obtidos a partir do cultivo utilizando micro-organismos selvagens (REDDY;

KRISHNAN, 2016) ou cepas recombinantes (LIU et al., 2018), ou de preparados enzimáticos comerciais (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019). Além disso, estudos envolvendo a produção de XOs pela ação conjunta de xilanases e enzimas auxiliares (por exemplo, arabinofuranosidases e feruloil esterases) (ÁVILA et al., 2020; GOLDBECK et al., 2016; PEREIRA et al., 2018) também são reportados na literatura. Materiais como sabugo de milho (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; LIU et al., 2018), palha de trigo (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017), palha de alho (KALLEL et al., 2015a), palha de arroz (MAZLAN et al., 2019), farelo de trigo (WANG et al., 2009), bagaço de cana (BIAN et al., 2013), entre outros, têm sido empregados como fonte de xilana para a produção de XOs por hidrólise enzimática.

Conforme exposto anteriormente, a produção de XOs por hidrólise enzimática requer o pré-tratamento da biomassa vegetal a fim de extrair a sua porção hemicelulósica (xilana) (JÖNSSON; MARTÍN, 2016), o que acrescenta mais uma etapa ao processo e encarece os custos de produção. Sendo assim, o uso de micro-organismos na desconstrução da biomassa lignocelulósica surge como alternativa promissora para produção de XOs, pois possibilita a obtenção de oligômeros em uma única etapa e conta com a especificidade do aparato enzimático secretado no meio extracelular (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019). O cultivo direto permite a produção de hidrolisados contendo grande quantidade de XOs e baixo teor de xilose, devido à preferência dos micro-organismos por açúcares prontamente disponíveis, que são primeiramente consumidos antes da degradação dos XOs (AMORIM et al., 2019a). Alguns estudos mencionam a produção conjunta de XOs e enzimas xilanolíticas no meio de cultivo (GAUTÉRIO et al., 2018; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; PEREIRA et al., 2018), visando a posterior separação dos biocompostos produzidos; enquanto outros estão voltados à obtenção de XOs propriamente dita (AMORIM et al., 2019b).

O uso de biomassas como farinha de trigo (REQUE et al., 2019) e dreche cervejeira (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019) no meio de cultivo, além de ferramentas da engenharia genética para melhoramento de espécies microbianas (AMORIM et al., 2018), fazem com que a obtenção de XOs por cultivo microbiano se destaque juntamente aos processos de hidrólise frente às demais tecnologias empregadas para este fim. Amorim, Silvério e Rodrigues (2019) avaliaram o potencial de produção de XOs por duas espécies de *Trichoderma* a partir de 13 resíduos lignocelulósicos da agroindústria. Após a seleção da espécie e do substrato, a produção de XOs em cultivo submerso foi otimizada. Sob as condições ótimas de cultivo (pH 7,0, 30 °C, 20 g/L de substrato no meio, 3 dias), a produção de XOs utilizando *Trichoderma reesei* e dreche cervejeira alcançou o valor de 38 mg/g (mg xilose equivalente/g substrato). Em estudo posterior, Amorim et al. (2019b) otimizaram a produção



de XOs por *Bacillus subtilis* 3610 geneticamente modificado (isto é, contendo o gene *xyn2* de *T. reesei*) em meio contendo xilana de madeira de faia. O máximo rendimento de produção (306 mg XOs/g xilana) foi obtido em cultivo submerso conduzido a pH 6,0, 42,5 °C e concentração de xilana de 2,5 g/L com acréscimo até 5 g/L em 3 h de fermentação.

### 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversos estudos voltados à produção de enzimas xilanolíticas por micro-organismos são mencionados na literatura científica. Contudo, o uso de leveduras para este fim ainda é pouco explorado, principalmente quanto à aplicabilidade de substratos agroindustriais como fonte de xilana no meio de cultivo. Os estudos envolvendo a maximização da produção de xilanases por leveduras utilizando substratos de baixo custo é de grande valia, permitindo obter a enzima de modo mais viável e econômico para posterior aplicações, particularmente na obtenção de XOs.

Os XOs têm recebido grande atenção por parte da comunidade científica devido aos inúmeros benefícios à saúde humana. Diversos trabalhos abordam a produção de XOs por hidrólise enzimática, no entanto, ainda são poucos os que exploram a maximização da sua produção. Logo, faz-se necessário o conhecimento aprofundado dos principais parâmetros que influenciam a produção de XOs, a fim de obter hidrolisados com características interessantes para futuras aplicações. Além disso, a obtenção de XOs por cultivo submerso ainda é pouco explorada, mas tem apresentado resultados promissores quanto à produção de oligômeros em única etapa. Avaliar a produção de XOs por mais de uma estratégia permite o conhecimento sobre qual a abordagem a ser empregada, em termos de rendimento e composição dos oligômeros, para posterior uso industrial.

Inúmeras são as propriedades biológicas dos XOs, no entanto, são escassos os estudos sobre a estrutura, atividade antioxidante e antimicrobiana de oligômeros obtidos por diferentes estratégias. Tratando-se dos XOs obtidos por hidrólise de xilanas utilizando xilanases de leveduras, bem como dos XOs produzidos em cultivo submerso, a avaliação das suas propriedades estruturais e biológicas contribui para o conhecimento aprofundado neste nicho científico.

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**



## DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

As atividades desta tese foram desenvolvidas, em sua maioria, no Laboratório de Microbiologia de Biosseparações pertencente à Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. As atividades antioxidantes e antimicrobianas mencionadas no Artigo 5 foram desenvolvidas no Laboratório de Fermentações do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Portugal). A presente tese foi dividida em cinco artigos intitulados como:

**Artigo 1:** Produção de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos por *Aureobasidium pullulans* em cultivo submerso;

**Artigo 2:** Maximização da produção de xilanases por *Aureobasidium pullulans* utilizando farelo de arroz como fonte de xilana;

**Artigo 3:** Caracterização do extrato de xilanase bruto e parcialmente purificado de *Aureobasidium pullulans* e aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos;

**Artigo 4:** Maximização da produção de xilo-oligossacarídeos utilizando xilanase bruta de *Aureobasidium pullulans*;

**Artigo 5:** Caracterização de hidrolisados contendo xilo-oligossacarídeos obtidos por diferentes estratégias de produção.



ARTIGO 1:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR  
*Aureobasidium pullulans* EM CULTIVO SUBMERSO

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; GONÇALVES, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V.  
L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by  
*Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and  
Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.



## RESUMO

As xilanases são enzimas produzidas majoritariamente por micro-organismos e capazes de converter a biomassa lignocelulósica em produtos de maior valor agregado de interesse biotecnológico, tais como os xilo-oligossacarídeos (XOs). Embora a produção de xilanases a partir de biomassa vegetal seja comumente estudada, existem poucos relatos que investigam a produção simultânea de enzimas xilanolíticas e XOs por espécies microbianas. No presente estudo, foi avaliada a produção conjunta de enzimas xilanolíticas e XOs por três cepas de *Aureobasidium pullulans* (CCT 7521, CCT 4154 e CCT 1261) em cultivo submerso. Ainda, foi verificado o uso de substratos agroindustriais (casca e farelo de arroz, casca de soja, casca de aveia, pergaminho de café e engaço de uva) com e sem pré-tratamento alcalino como fonte de xilana para a produção de xilanases. A cepa CCT 1261 apresentou a maior atividade enzimática (74,9 U/mL) e específica (158,7 U/mg) de xilanases, produtividade ( $P$ , 1,25 U/mL.h), velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\max}$ , 0,18 h<sup>-1</sup>) e concentração máxima de biomassa ( $X_{\max}$ , 4,1 g/L), além de baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase (0,10 U/mL). A produção máxima de XOs pela cepa CCT 1261 foi verificada nas primeiras 12 h de cultivo (1,68 mg/mL), sendo estes oligômeros compostos principalmente por xilobiose (0,72 mg/mL) e xilotriose (0,70 mg/mL). Dentre os substratos agroindustriais avaliados, o farelo de arroz sem pré-tratamento apresentou a maior quantidade de hemicelulose (29,6%) e baixo teor de lignina (12,2%), o que resultou em alta produção de xilanase (11,7 U/mL) quando utilizado como substrato no cultivo submerso. Isto indica que as xilanases podem ser produzidas por *A. pullulans* de modo mais econômico utilizando um material do beneficiamento de arroz, sob condições de cultivo submersos que podem ser futuramente maximizadas.

**Palavras-chave:** Farelo de arroz. Levedura. Oligossacarídeos. Substratos agroindustriais. Xilanases.





## 1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é um dos materiais renováveis mais abundante e amplamente distribuídos na natureza, sendo compreendida pelos subprodutos oriundos da agroindústria, culturas energéticas, resíduos urbanos e florestais (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Existem inúmeros substratos lignocelulósicos potencialmente utilizáveis na obtenção de produtos de alto valor agregado tais como biodiesel (PATEL et al., 2015), bioetanol (ALTHURI; GUJJALA; BANERJEE, 2017), biogás (LATTIEFF, 2016), filmes biodegradáveis (PEREIRA et al., 2017), xilitol (ABDUL MANAF et al., 2018), xilo-oligossacarídeos (CHANG et al., 2017) e enzimas (KHANAHMADI et al., 2018). Materiais como madeiras, bagaço de cana, sabugo de milho, torta de malte, palha, casca e farelo de cereais, entre outros, possuem a fração hemicelulósica constituída principalmente por xilana, heteropolissacarídeo formado por subunidades de xilose conectadas por ligações  $\beta$ -1,4 e cadeias laterais de arabinose, galactose, manose, glicose e ácidos urônicos (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; GULLÓN et al., 2010).

Devido à complexidade estrutural da xilana, a transformação da biomassa vegetal requer que um sistema de enzimas com distintas especificidades e modos de ação atue na quebra da cadeia deste polissacarídeo (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015). Duas enzimas pertencentes ao complexo xilanolítico merecem destaque: a endo-1,4- $\beta$ -xilanaase (CE 3.2.1.8) e a  $\beta$ -xilosidase (CE 3.2.1.37). As xilanases estão envolvidas diretamente na quebra das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e liberação de XOs e eventual xilose, enquanto  $\beta$ -xilosidasas atuam na extremidade não redutora da xilobiose ou de outros XOs, resultando em xilose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; SHALLOM; SHOHAM, 2003; SHENG et al., 2014). As xilanases são utilizadas na indústria de papel e celulose em substituição aos compostos clorados tóxicos (BORUAH et al., 2016); na indústria de panificação, em especial no melhoramento das propriedades reológicas da massa, e conseqüentemente, na qualidade dos pães (YEGIN; ALTINEL; TULUK, 2018); na indústria de bebidas, principalmente na extração e clarificação de sucos (SHAHRESTANI et al., 2016); na formulação de rações animais, aumentando a sua digestibilidade e valor nutricional (VANDEPLAS et al., 2010); entre outras.

Dentre as aplicações alimentícias, as xilanases têm sido extensivamente empregadas como biocatalisadores na produção de XOs a partir de materiais lignocelulósicos (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; CHANG et al., 2017; KALLEL et al., 2015a; REDDY; KRISHNAN, 2016), uma vez que as reações envolvidas contam com a especificidade enzimática, ocorrem em condições moderadas de temperatura e pressão, e não formam compostos indesejáveis ou tóxicos (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; YANG et al., 2011). Os XOs são oligômeros não digeríveis contendo entre duas a dez unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (IUPAC, 1982). Diversos estudos demonstram que os XOs exibem efeito

prebiótico devido à sua capacidade em estimular seletivamente o crescimento da microbiota do cólon (KALLEL et al., 2015a; LIN et al., 2016), melhoram o metabolismo lipídico (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015) e a estimulação da resposta imune (SUN et al., 2013), além de apresentarem ação antioxidante (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017; VALLS et al., 2018), antimicrobiana (YU et al., 2015) e anti-inflamatória (HANSEN et al., 2013). Os XOs possuem certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para uso em alimentos (GRN 458, FDA, 2013) e se mostram industrialmente promissores devido à estabilidade sob altas temperaturas e pH ácido (WANG et al., 2009), além de serem os únicos oligômeros no mercado obtidos a partir da biomassa vegetal (MONIZ et al., 2016).

Fungos filamentosos (AHMED et al., 2016) e bactérias (IRFAN et al., 2016) produzem altos níveis de xilanases no meio extracelular, porém algumas espécies também secretam celulases (ANG et al., 2013; REIS et al., 2013) e  $\beta$ -xilosidases (TERRASAN et al., 2013), as quais são indesejáveis para algumas aplicações industriais. As  $\beta$ -xilosidases, por exemplo, são responsáveis pelo acúmulo de xilose e possível inibição da atividade das xilanases (VÁZQUEZ et al., 2002). Por outro lado, diversas leveduras secretam xilanases livre de celulases (BANKEEREE et al., 2016; OTERO et al., 2015) e baixas quantidades de  $\beta$ -xilosidases (CHRISTOV et al., 1997; OTERO et al., 2015), o que implica na não formação de xilose residual, obtendo-se de extratos extracelulares mais homogêneos e maiores rendimentos em XOs quando aplicadas para este fim.

A levedura *Aureobasidium pullulans* tem sido reconhecida como produtora de diversas enzimas (LEATHERS et al., 2013; LEMES et al., 2019; RICH et al., 2013), incluindo xilanases (LEATHERS et al., 2013; YEGIN et al., 2017) com baixa atividade de  $\beta$ -xilosidases (CHRISTOV et al., 1997), até quando substratos agrícolas são utilizados como fonte de xilana (BANKEEREE et al., 2016; LEITE et al., 2007; YEGIN, 2016; YEGIN et al., 2017). Além disso, estudos demonstram que *A. pullulans* também produz o exopolissacarídeo pululana (AN et al., 2017), fruto-oligossacarídeos (DOMINGUEZ et al., 2012) e feruloil oligossacarídeos (YU; GU, 2014). Embora a produção de xilanases por leveduras seja comumente estudada, existem poucos relatos que investigam a produção conjunta de enzimas xilanolíticas e XOs por espécies microbianas, não sendo encontrados relatos que mencionem a produção de XOs por *A. pullulans* durante o cultivo submerso. Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de enzimas xilanolíticas e XOs por três cepas de *A. pullulans*, bem como o uso de substratos lignocelulósicos como fonte de xilana para a produção de xilanases.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

As cepas *Aureobasidium pullulans* CCT 7521, *Aureobasidium pullulans* CCT 4154 e *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* CCT 1261 foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil), e foram originalmente isoladas de suplementos militares deteriorados (CCT 7521), solo (CCT 4154) e madeira (CCT 1261). Os substratos agroindustriais – farelo e casca de arroz, casca de soja e de aveia, engaço de uva e pergaminho do café – foram cedidos gentilmente por indústrias de beneficiamento e processamento da região Sul do Rio Grande do Sul.

A xilana de madeira de faia, o substrato sintético  $\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPX), e os padrões de xilose, arabinose, glicose e celbiose foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (San Luis, Estados Unidos). A acetonitrila grau HPLC foi obtida da *J. T. Baker* (Avantors, Bridgewater Township, Estados Unidos). Os padrões de XOs (xilobiose, xilotriose, xilotetralose e xilopentose) foram adquiridos da *Megazyme* (Bray, Irlanda). As colunas cromatográficas para análise de XOs (Aminex HPX-42A, dimensão 300 mm  $\times$  7,8 mm) e de monossacarídeos (Zorbax Carbohydrates, dimensão 250 mm  $\times$  4,6 mm) foram adquiridas da *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, Estados Unidos) e da *Agilent* (Santa Clara, Estados Unidos), respectivamente. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Os substratos foram secos em estufa (50 °C por 24 h) e submetidos a redução de tamanho e peneiramento, até a obtenção de partículas menores que 0,5 mm (farelo e casca de arroz, casca de aveia e engaço de uva) ou 1,18 mm (casca de soja e pergaminho de café). Após, os substratos foram armazenados em sacos de polietileno a -18 °C até sua utilização.

O pré-tratamento dos substratos (10%, m/v) consistiu em submetê-los à solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2% (m/v) (SINDHU et al., 2017) e posterior autoclavagem (121 °C por 30 min) da mistura (GOYAL et al., 2008). Em seguida, o resíduo sólido foi lavado com água destilada até a neutralização, recuperado por filtração à vácuo em membrana *Whatman* n° 1 (Milipore, Burlington, Estados Unidos) e distribuído em placas de Petri de modo a formar uma camada fina e homogênea, onde foi seco em estufa (50 °C por 24 h). Após a secagem, o resíduo foi retirado das placas e triturado em moedor de bancada até a obtenção de um pó fino.

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

A composição proximal dos substratos agroindustriais sem pré-tratamento foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (2000), a saber: umidade (n° 935.29), proteínas (n° 920.87), lipídios (n° 920.85) e cinzas (923.03). Os carboidratos totais foram estimados por diferença.

Para determinar o conteúdo de hemicelulose, celulose e lignina, os substratos foram submetidos à hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 72% (m/m) na proporção 1:10 (m/v), mantidos em banho termostático a 30 °C com agitação vigorosa (bastão de vidro) durante 1 h. Em etapa pós-hidrólise, o ácido foi diluído a 4% (m/m) pela adição de água deionizada, e o conteúdo foi autoclavado a 121 °C por 1 h (SLUITER et al., 2008). O hidrolisado ácido foi filtrado em membrana *Whatman* n° 1 (Milipore, Burlington, Estados Unidos) previamente tarada, sendo o conteúdo retido (lignina insolúvel) seco em estufa a 80 °C até massa constante. O teor de lignina solúvel no filtrado foi determinado conforme Goldschmid (1971), pela leitura da absorvância em espectrofotômetro da amostra previamente diluída, nos comprimentos de onda 215 nm e 280 nm, e calculado conforme a Equação 1. O teor de lignina insolúvel foi calculado conforme a Equação 2. A lignina total foi obtida pela soma dos teores de lignina solúvel e insolúvel.

$$\text{Teor de lignina solúvel (\%)} = \frac{((4,538 \times A_{215}) - A_{280}) \times \text{FD}}{300 \times M_{i_{\text{amostra}}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Teor de lignina insolúvel (\%)} = \frac{M_{f_{\text{amostra}}}}{M_{i_{\text{amostra}}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde M<sub>i</sub> e M<sub>f</sub> são as massas inicial e final do resíduo sólido, respectivamente; FD é o fator de diluição; e A<sub>215</sub> e A<sub>280</sub> são as absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda de 215 nm e 280 nm, respectivamente.

Os açúcares contidos no filtrado foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme o item 2.6.3. As concentrações de glicose, arabinose, xilose e celobiose foram determinadas a partir de curvas de calibração previamente construídas dos respectivos açúcares. O teor de hemicelulose (xilose + arabinose) e celulose (glicose + celobiose) dos substratos foram calculados conforme as Equações 3 e 4, respectivamente, considerando os fatores de correção para pentoses (0,88), hexoses (0,90) e celobiose (0,95).

$$C_{\text{anidro}} = C_x \times CR_{\text{anidro}} \quad (3)$$

$$\text{Teor de hemicelulose ou celulose (\%)} = \frac{C_{\text{anidro}} \times V_{\text{filtrado}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}}}{M_i} \quad (4)$$

Onde  $C_x$  é a concentração dos monossacarídeos e dissacarídeo (mg/mL),  $CR_{\text{anidro}}$  é o fator de conversão para os açúcares,  $C_{\text{anidro}}$  é a concentração de hemicelulose ou de celulose corrigida (mg/mL),  $V_{\text{filtrado}}$  é o volume de filtrado (86,73 mL) e  $M_i$  a massa inicial do substrato.

As características microestruturais dos substratos foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM-6610LV, Jeol, Akishima, Japão) a partir do recobrimento das amostras com ouro (Sputter coater, Denton Vaccun, Moorestown, Estados Unidos), voltagem de 15 kV e magnificação de 1500x.

## 2.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

### 2.4.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo

Para a manutenção das cepas de *A. pullulans* foram realizados repiques periódicos para tubos contendo ágar batata dextrose inclinado, sendo estes mantidos a 24 °C em estufa por 72 h. O meio de pré-inóculo e inóculo foi composto (g/L) por xilose (10), base nitrogenada de levedura (6,7) suplementada com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (5), asparagina (2) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (5) (CHRISTOV et al., 1997). O meio isento de xilose foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min) e adicionado de uma solução concentrada de xilose previamente esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose (Milipore, Burlington, Estados Unidos) de 0,22 μm.

O pré-inóculo foi preparado através da transferência da massa celular (alçada) da superfície do ágar para tubos contendo meio estéril (5 mL), os quais foram incubados em estufa a 28 °C por 24 h. Para o preparo do inóculo, o volume do pré-inóculo (5 mL) foi vertido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o mesmo meio (45 mL), sendo mantidos a 28 °C e agitação orbital (150 rpm) por 24 h.

### 2.4.2 Seleção da levedura para produção de enzimas xilanolíticas e xilo-oligossacarídeos

Três cepas de *A. pullulans* foram avaliadas quanto à produção de enzimas xilanolíticas e XOs. Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo meio estéril (150 mL) composto por (g/L) xilana de madeira de faia (10),

extrato de levedura (1),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2) em pH 5,0 (YEGIN, 2017a). Os meios foram esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min). Os frascos foram inoculados com 2 % (v/v) de inóculo com densidade ótica (DO) de 0,8 a 620 nm (SUGUMARAN et al., 2013), sendo mantidos a 28 °C sob agitação orbital (150 rpm) por 96 h. Amostras (5 mL) foram coletadas assepticamente a cada 12 h e centrifugadas ( $21.380 \times g$ , 4°C, 10 min). O sobrenadante livre de células foi analisado quanto ao conteúdo de XOs (item 2.6.3), atividade enzimática (endo- $\beta$ -1,4-xilanase e  $\beta$ -xilosidase) (item 2.6.1), concentração de proteínas solúveis (item 2.6.2) e pH (item 2.6.2). O sedimento da centrifugação foi utilizado para a determinação de biomassa (item 2.6.2). Os cultivos foram realizados em triplicata. Ainda, um ensaio controle foi conduzido substituindo o volume de inóculo (2%, v/v) por meio estéril.

### 2.4.3 Seleção do substrato agroindustrial para a produção de xilanases

Os substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento foram utilizados como fonte de xilana para a produção de xilanases pela cepa *A. pullulans* CCT 1261 em cultivo submerso. Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer aletados conforme descrito no item 2.4.2, substituindo a xilana de faia pelo substrato agroindustrial (10 g/L) no meio de cultivo. Os frascos foram mantidos a 28 °C e sob agitação orbital (150 rpm) durante 96 h (substratos não tratados) ou 240 h (substratos pré-tratados). Amostras (5 mL) foram coletadas assepticamente a cada 24 h e centrifugadas ( $21.380 \times g$ , 4°C, 10 min). O sobrenadante livre de células foi analisado quanto à atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (item 2.6.1), concentração de proteínas solúveis (item 2.6.2) e pH (item 2.6.2). Os cultivos foram realizados em triplicata.

## 2.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DE CULTIVO

Os parâmetros cinéticos foram determinados a partir da curva de crescimento de cada uma das cepas de *A. pullulans* (Apêndice 1). Os valores de biomassa ( $X$ ) e a regressão exponencial foram utilizados para calcular a velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ,  $\text{h}^{-1}$ ) durante a fase logarítmica (BAILEY; OLLIS, 1986). A máxima concentração de biomassa foi designada como  $X_{\text{max}}$  (g/L). A produtividade ( $P$ ) no ponto de máxima produção de xilanase foi calculada conforme a Equação 5, onde  $A_t$  é a atividade de xilanase (U/mL) no tempo  $t_t$  (h), enquanto  $A_0$  é a atividade de xilanase (U/mL) no tempo inicial de cultivo ( $t_0$ ).

$$P = \frac{A_t - A_0}{t_t - t_0} \quad (5)$$

## 2.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.6.1 Atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase e de $\beta$ -xilosidase

A atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase foi determinada conforme Bailey, Biely e Poutanen (1992) utilizando como substrato a xilana de madeira de faia 1% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3. A mistura reacional, composta por 0,9 mL de substrato e 0,1 mL de extrato enzimático, foi incubada a 50 °C por 5 min. Após, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). A quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana foi realizada conforme Miller (1959), correlacionando com a curva padrão de xilose a 540 nm (Apêndice 1). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de xilose por minuto, sob as condições descritas do ensaio.

A atividade enzimática de  $\beta$ -xilosidase foi determinada conforme Tan, Mayers e Saddler (1987) utilizando como substrato o *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPX) 0,2% (m/v) preparado em tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 4,8. A mistura reacional, composta por 0,8 mL de substrato e 0,2 mL do extrato enzimático, foi incubada a 50 °C por 30 min. Após, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 10% (m/v). O *p*-nitrofenol (pNP) liberado pela ação da  $\beta$ -xilosidase foi quantificado a 410 nm, correlacionando com sua curva padrão (Apêndice 1). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de pNP por minuto, sob as condições de ensaio.

A atividade específica (U/mg) foi determinada como a razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas solúveis (mg/mL).

### 2.6.2 Biomassa, pH e proteínas solúveis

A concentração de biomassa (g/L) foi estimada pela medida da densidade óptica a 620 nm e conversão à biomassa seca a partir da curva de calibração (Apêndice 1). Para a construção da curva, a biomassa foi separada do meio de cultivo por centrifugação ( $4757 \times g$ , 30 min, 4 °C), lavada e ressuspensa em água destilada para leitura da absorvância. A biomassa seca foi obtida pela lavagem das células com água destilada e secagem à 105 °C até massa constante (GALIOTOU-PANAYOTOU; KALANTZI; AGGELIS, 1998).

A concentração de proteína solúvel foi determinada conforme Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão (Apêndice 1). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital de acordo com a AOAC n° 972.44 (AOAC, 2000).



### 2.6.3 Análises de carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os sobrenadantes livre de células oriundo dos cultivos microbianos (item 2.4.2), bem como as frações líquidas obtidas da hidrólise ácida (item 2.3), foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore, Burlington, Estados Unidos) e analisados em cromatógrafo líquido (Prominence®, Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A), injetor automático (SIL-20AHT) e forno de colunas (CTO-20A). Em ambas as análises por CLAE, o controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution®.

Na quantificação de XOs, alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  da amostra foram injetadas e eluídas a 0,4 mL/min utilizando água ultrapura como fase móvel (Milli-Q, Milipore, Burlington, Estados Unidos) da coluna Aminex HPX-42A. A coluna foi utilizada à 50 °C e o tempo de corrida foi de 40 min. A identificação dos oligômeros foi realizada pelos tempos de retenção, enquanto as concentrações de XOs e xilose foram determinadas pelas curvas de calibração construídas com o *pool* de padrões (1 a 10 mg/mL).

Na quantificação de monossacarídeos (glicose, xilose, arabinose) e dissacarídeos (celobiose), alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  da amostra foram injetadas e eluídas a 0,7 mL/min utilizando uma mistura composta por acetonitrila e água ultrapura na proporção 65:35 (v/v), respectivamente, como fase móvel da coluna Zorbax Carbohydrates. A coluna foi utilizada a 30 °C e o tempo de corrida foi de 20 min. A identificação dos açúcares foi realizada a partir dos seus tempos de retenção, e os seus teores foram determinados através das curvas de calibração construídas com o *pool* dos padrões (0,1 a 18 mg/mL).

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os ensaios realizados com réplicas e único fator foram submetidos ao teste *t* ou Análise de Variância Univariável (*One-way* ANOVA) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Em todas as análises estatísticas, os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos foram previamente verificados. O software utilizado para o tratamento estatístico dos dados foi o *Statistica* 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos).

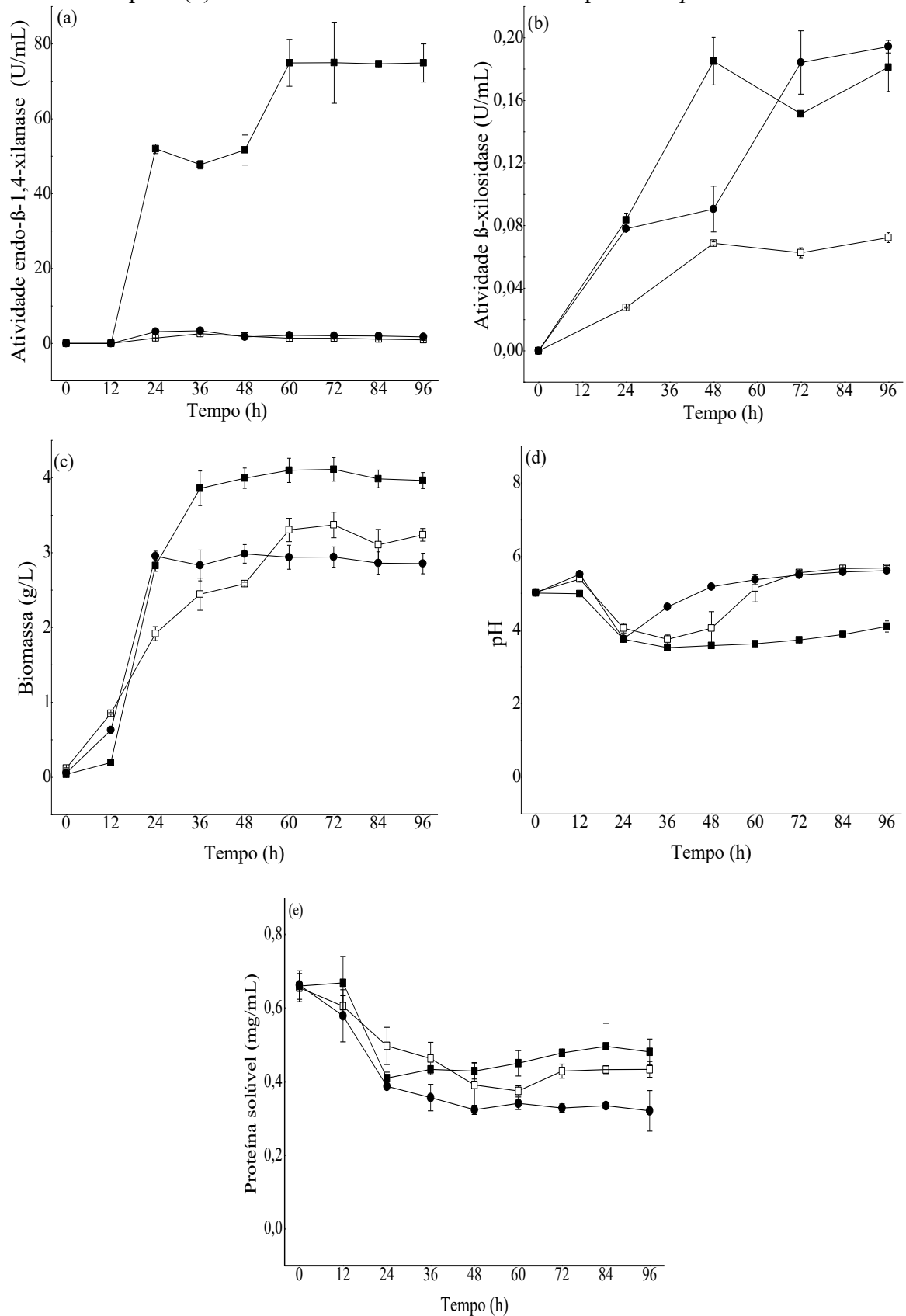
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS XILANOLÍTICAS E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

A Figura 1a e a Tabela 1 apresentam a cinética de produção de xilanases e os valores de atividade enzimática para as três cepas de *A. pullulans*, respectivamente. Dentre as cepas em estudo, a CCT 1261 apresentou a maior atividade de xilanase (74,9 U/mL, Tabela 1), a qual foi alcançada em 60 h e permaneceu constante até 96 h de cultivo (Figura 1a). Já as cepas CCT 7521 (2,6 U/mL) e CCT 4154 (3,4 U/mL) alcançaram a máxima atividade de xilanase (Tabela 1) em 36 h de cultivo. Para o mesmo tempo de cultivo (36 h), a cepa CCT 1261 já havia produzido xilanases com atividade de  $47,2 \pm 1,1$  U/mL. A produção de xilanase alcançada por CCT 7521 e CCT 4154 foi similar à reportada por Nasr et al. (2013) para a cepa *A. pullulans* SN090, a qual apresentou atividade enzimática máxima de 2,7 U/mL em 48 h de cultivo. Em contraste, a produção de xilanase por CCT 1251 foi similar à de algumas espécies de *A. pullulans* isoladas por Manitchotpisit et al. (2009), as quais foram capazes de secretar altos níveis da enzima (45,4 a 152,4 U/mL).

Yegin (2017a) observou que a cinética de produção de xilanase variou entre as quatro cepas de *A. pullulans* (DMS 2404, NRRL Y-2311-1, P56 e NRRL Y12, 974) cultivadas em meio contendo xilana de faia. Enquanto a cepa NRRL Y-2311-1 apresentou a máxima atividade de xilanase ( $\sim 140$  U/mL) em 96 h, as cepas NRRL Y12, 974 ( $\sim 40$  U/mL) e DMS 2404 ( $\sim 15$  U/mL) alcançaram o valor máximo de atividade em 48 h, sendo esta constante até o término do cultivo (168 h). Estudos taxonômicos demonstram que cepas de *A. pullulans* isoladas de regiões tropicais e subtropicais, também conhecidas como “variantes de cor”, são produtoras promitentes de xilanases quando comparadas às cepas tipicamente pigmentadas, indicando que a produção de xilanases pela levedura varia entre as diferentes espécies (LEATHERS, 1986; MANITCHOTPISIT et al., 2009). Além disso, a produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 (74,9 U/mL) foi superior aos níveis alcançados por alguns fungos filamentosos e leveduras cultivados em meio contendo xilana de faia, tais como *Penicillium oxalicum* (70,0 U/mL) (LIAO et al., 2012), *Penicillium janczewskii* (30,4 U/mL) (TERRASAN et al., 2010), *Penicillium glabrum* (25,4 U/mL) (KNOB et al., 2013), *Thermomyces lanuginosus* (62,7 U/mL) (KHUCHAROENPHAISAN; TOKUYAMA; KITPREECHAVANICH, 2010), *Thielaviopsis basicola* ( $\sim 45$  U/mL) (RANI et al., 2014), *Cryptococcus sp.* (11,3 U/mL) (LOPES et al., 2011) e *Cryptococcus laurentii* (2,7 U/mL) (OTERO et al., 2015).

**Figura 1** – Acompanhamento da atividade (a) de endo- $\beta$ -1,4-xilanases, (b)  $\beta$ -xilosidase, (c) pH e (d) biomassa durante o cultivo de três cepas de *A. pullulans*.



Média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Legenda:  $\square$  CCT 7521,  $\bullet$  CCT 4154 e  $\blacksquare$  CCT1261.

Uma vez que a concentração de proteínas diminuiu durante o cultivo das três cepas de *A. pullulans* (Figura 1e), a atividade específica aumentou conforme o incremento ou a constância nos valores de atividade enzimática de xilanase. As máximas atividades específicas para CCT 7521 e CCT 4154 foram obtidas no ponto de máxima atividade de xilanasas (Tabela 1) e diminuíram ao longo do cultivo devido à redução da produção da enzima. Por outro lado, a CCT 1261 apresentou a maior atividade específica (Tabela 1) comparada às demais cepas em estudo, e seu valor manteve-se constante até as 96 h de cultivo. A cepa CCT 1261 também apresentou a maior produtividade (*P*) (Tabela 1) em termos de xilanase, o que é importante para futuras aplicações industriais. Em 36 h de cultivo, a cepa CCT 1261 alcançou *P* de  $1,33 \pm 0,33$  U/mL.h, a qual foi 19 e 14 vezes superior às obtidas por CCT 7521 ( $0,07 \pm < 0,01$  U/mL.h) e CCT 4154 ( $0,09 \pm < 0,01$  U/mL.h), respectivamente.

**Tabela 1** – Atividades enzimáticas de xilanase (MX) e  $\beta$ -xilosidase (MBX), atividade específica de xilanase (AEX), produtividade enzimática (*P*) e parâmetros cinéticos de produção obtidos durante o cultivo de cepas de *A. pullulans* em meio contendo xilana de faia.

Cepa	MX (U/mL)	AEX (U/mg)	<i>P</i> (U/mL.h)	MBX (U/mL)	$X_{max}$ (g/L)	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
<b>CCT 7521</b>	$2,6 \pm 0,1^c$ (36 h)	$5,6 \pm 0,4^c$ (36 h)	$0,07 \pm < 0,01^c$ (36 h)	$0,07 \pm < 0,01^b$ (48 h)	$3,3 \pm 0,2^b$ (60h)	$0,12 \pm 0,01^b$
<b>CCT 4154</b>	$3,4 \pm 0,2^b$ (36 h)	$9,5 \pm 0,9^b$ (36 h)	$0,09 \pm < 0,01^b$ (36 h)	$0,19 \pm < 0,01^a$ (96 h)	$2,9 \pm 0,1^b$ (24 h)	$0,17 \pm 0,01^a$
<b>CCT 1261</b>	$74,9 \pm 0,8^a$ (60 h)	$158,7 \pm 10,7^a$ (60 h)	$1,25 \pm 0,01^a$ (60 h)	$0,19 \pm 0,01^a$ (48 h)	$4,1 \pm 0,2^a$ (60 h)	$0,18 \pm 0,01^a$

Média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey (p>0,05).

A baixa produção de  $\beta$ -xilosidase foi observada para todas as cepas investigadas (Tabela 1). Conforme exposto na Figura 1b, a atividade de  $\beta$ -xilosidase aumentou ligeiramente durante o cultivo microbiano. Diversos estudos demonstram que cepas de *A. pullulans* produzem  $\beta$ -xilosidases intra (BANKEEREE et al., 2018; CHRISTOV et al., 1999; HAYASHI et al., 2001; OHTA et al., 2010) ou extracelulares (CHRISTOV et al., 1997; DOBBERSTEIN; EMEIS, 1991), no entanto, o presente estudo avaliou apenas a produção da enzima extracelularmente. Além disso, as atividades de  $\beta$ -xilosidase apresentadas por CCT 4154 e CCT 1261 foram similares à reportada por Christov et al. (1997) para a enzima extracelular (0,20 U/mL) de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1. Embora as três cepas tenham apresentado baixos níveis de  $\beta$ -xilosidase, a relação  $\beta$ -xilosidase/xilanase foi menor para CCT 1261. Extratos

enzimáticos com baixa relação  $\beta$ -xilosidase/xilanase são preferíveis para a síntese de XOs, pois atenuam a produção de xilose que pode inibir a atividade de xilanase (VÁZQUEZ et al., 2002) e resultar em misturas de XOs impuras e com baixas propriedades prebióticas (ESCARNOT; AGUEDO; PAQUOT, 2012). Com base nos níveis de xilanase e  $\beta$ -xilosidase observados neste estudo, a cepa CCT 1261 se mostrou a mais indicada para posterior aplicação na produção de XOs por reações de hidrólise.

Conforme mostra a Figura 1c, as cepas de *A. pullulans* apresentaram diferentes perfis de crescimento celular. As cepas CCT 7521 e CCT 4154 alcançaram  $X_{\max}$  em 60 h e 24 h (Tabela 1), respectivamente, a qual permaneceu constante até 96 h de cultivo. Além disso, ambas as cepas secretaram mais xilanases durante a fase de crescimento exponencial, e conseqüentemente, o pico de atividade máxima não coincidiu com o pico de produção máxima de biomassa. Em contraste, a cepa CCT 1261 apresentou  $X_{\max}$  e máxima atividade de xilanase em 60 h, e valores constantes foram observados para ambos até as 96 h de cultivo. Leathers (1986) menciona que a cepa *A. pullulans* Y-2567 tipicamente pigmentada secreta xilanases apenas durante o seu crescimento exponencial em meio contendo xilana, enquanto a cepa variante de cor Y-2311-1 produz xilanases a uma taxa constante até um dia após a fase estacionária. Comportamento análogo de crescimento celular foi reportado por Li et al. (2007b) durante a produção de glicoamilases por *A. pullulans* N13d. Os autores observaram que as maiores produções da enzima foram alcançadas quando o crescimento celular atingiu a fase estacionária. Ainda, Priem et al. (1991) mencionam a existência de uma conexão estrita entre o crescimento celular e a produção de xilanases por *A. pullulans* CBS 58475, onde tanto a produção de biomassa quanto a da enzima aumentaram até às 30 h de cultivo e permaneceram constantes durante a fase estacionária.

A Tabela 1 também mostra que valores similares de  $\mu_{\max}$  foram obtidos para todas as cepas investigadas, os quais foram superiores ao observado durante o crescimento de *A. pullulans* CBS 58475 em meio contendo xilose/glicose para a produção de xilanases (0,097 1/h) (PRIEM; DOBBERSTEIN; EMEIS, 1991), e de *A. pullulans* 201253 em meio contendo sacarose para a produção de pululana (AN et al., 2017). Armando et al. (2014) relatam que baixos valores de  $\mu_{\max}$  indicam que o crescimento celular e a produção enzimática estão relacionados, a fim de degradar o substrato presente no meio de cultura. Ainda, os valores de  $\mu_{\max}$  obtidos no presente estudo foram similares aos de Otero et al. (2015) para *Cryptococcus laurentii* (0,13 h<sup>-1</sup>) durante a produção de xilanase em meio contendo xilana de faia.

Em relação ao pH (Figura 1d), todas as cepas apresentaram diminuição no seu valor inicial (5,0) até 3,7 em 24 h de cultivo. A partir deste ponto, o pH aumentou para CCT 7521 e

CCT 4154, alcançando os valores máximos de 5,7 e 5,6, respectivamente, em 96 h de cultivo. Yegin et al. (2017) observaram comportamento semelhante durante a produção de xilanases por *A. pullulans* Y-2311-1, onde o pH diminuiu do valor inicial (4,6) para 3,8 em 24 h conforme o aumento na produção da enzima, e voltou a aumentar ao longo do cultivo. Os autores mencionam que a diminuição do pH ocorre devido ao rápido consumo de carboidratos solúveis facilmente metabolizáveis, resultando na síntese de metabólitos ácidos. Por outro lado, a cepa CCT 1261 apresentou menor variação do pH após 24 h, o qual se manteve entre 3,5 (36 h) e 3,9 (84 h), e alcançou o valor máximo de 4,1 ao término do cultivo (96 h). Uma vez que a cepa CCT 1261 apresentou maior atividade de xilanase, é esperado que mais carboidratos solúveis facilmente metabolizáveis estejam disponíveis no meio de cultura para serem consumidos pelo micro-organismo. Conforme estes carboidratos são consumidos, mais metabólitos ácidos são gerados no meio extracelular, e conseqüentemente, o pH do meio permanece baixo.

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à produção de XOs pelas três cepas de *A. pullulans* em meio contendo xilana de faia. Todas as cepas apresentaram conteúdo de XOs significativamente superior ao obtido no ensaio controle (sem adição da levedura). A produção de XOs em maiores concentrações para todas as cepas foi observada em 12 h de cultivo. A presença de xilose (1,65 mg/mL), xilobiose (0,13 mg/mL) e xilotriose (0,07 mg/mL) após 24 h de cultivo, bem como de xilose após 36 h (0,57 mg/mL), 48 h (0,08 mg/mL), 60 h (0,06 mg/mL) e 72 h (0,07 mg/mL), foi observada para a cepa CCT 7521. Xilobiose (0,05 mg/mL), xilotriose (0,05 mg/mL) e xilose (0,07 mg/mL) foram quantificadas em 24 h de cultivo para a cepa CCT 4154. De modo similar, a presença de xilotriose (0,06 mg/mL) e xilose (0,34 mg/mL) foi constatada em 24 h de cultivo para a cepa CCT 1261. A presença de XOs e xilose em 36, 48, 60, 72, 84 e 96 h de cultivo para as cepas CCT 4154 e CCT 1261 não foi observada.

As cepas CCT 1261 e CCT 4154 apresentaram menor conteúdo de XOs às 12 h de cultivo comparado à CCT 7521 (Tabela 2). Além disso, estas cepas apresentaram maior atividade da xilanase e concentração de biomassa em relação à CCT 7521 em 24 h de cultivo. Com base nisso, é possível supor que *A. pullulans* utilize os oligossacarídeos produzidos como fonte de carbono para seu crescimento e para a produção de xilanase. Especialmente no caso de CCT 1261, que se destacou devido à alta atividade da xilanase e à concentração de biomassa, a ausência de XOs nas últimas horas de cultivo foi observada. Comportamento similar foi relatado por Menezes et al. (2017) durante a produção de xilanases e XOs por *Aspergillus brasiliensis* BLf1 em cultivo em estado sólido. Os autores perceberam que a maior concentração de XOs ocorreu em 48 h e que apenas a xilose foi detectada ao final do cultivo (216 h).

**Tabela 2** – Produção de XOs pelas três cepas de *A. pullulans* em 12 h de cultivo em meio contendo xilana de faia.

Açúcar	T <sub>r</sub>	Concentração (mg/mL)			
		Controle	12 h		
			CCT	CCT	CCT
			7521	4154	1261
Xilose (X1)	26,3-26,9	0,23 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,31 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,66 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,03 <sup>a</sup>
Xilobiose (X2)	23,6-24,2	0,10 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,04 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,72 ± 0,01 <sup>c</sup>
Xilotriose (X3)	21,5-22,1	0,10 ± < 0,01 <sup>d</sup>	0,57 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>c</sup>	0,70 ± 0,02 <sup>a</sup>
Xilotetraose (X4)	19,8-20,3	0,07 ± < 0,01 <sup>b</sup>	0,09 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,02 <sup>a</sup>
Xilopentose (X5)	18,5-18,9	nd	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± < 0,01 <sup>a</sup>	0,09 ± < 0,01 <sup>a</sup>
<b>XOs totais (X2-X5)</b>		0,27 ± 0,02 <sup>d</sup>	1,80 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,68 ± 0,02 <sup>b</sup>
<b>XOs totais (mg/g xilana)</b>		27 ± 2 <sup>d</sup>	180 ± 5 <sup>a</sup>	131 ± 4 <sup>c</sup>	168 ± 2 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey (p>0,05). nd – Não detectado; T<sub>r</sub> – Tempo de retenção.

Conforme mostra a Tabela 2, os XOs produzidos pelas cepas de *A. pullulans* foram majoritariamente compostos por xilobiose e xilotriose. Como mencionado por Van Craeyveld et al. (2008), o efeito prebiótico da XOs varia de acordo com o grau de polimerização (GP) dos oligômeros. XOs com GP igual ou inferior a cinco unidades induzem o crescimento de bifidobactérias importantes para a manutenção da microflora intestinal saudável; enquanto XOs com cadeias longas não estimulam o desenvolvimento da microbiota benéfica. Assim, XOs com GP entre 2 e 5 são desejáveis para aplicações alimentares com alegação prebiótica. Embora a comparação desses resultados seja difícil devido à ausência de relatos sobre a produção de XOs por *A. pullulans*, a concentração de XOs obtida neste estudo se mostrou promissora. Além disso, uma vez que a cepa CCT 1261 produziu altos níveis de xilanase com baixa atividade de β-xilosidase, o extrato livre de células obtido no cultivo submerso pode ser aplicado na síntese de XOs por reações de hidrólise.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

Devido à recalcitrância de alguns substratos agroindustriais, pré-tratamentos são aplicados para modificar a estrutura organizacional de matrizes complexas e expor as frações lignocelulósicas, facilitando assim o acesso microbiano. Dentre os tratamentos aplicados aos

materiais lignocelulósicos, o uso de agentes alcalinos se destaca devido à eficiência na remoção de lignina sem afetar os demais carboidratos presentes na biomassa. Neste estudo, a escolha do agente alcalino e sua respectiva concentração – NaOH 2 % (m/v) – foram baseadas nos resultados obtidos em trabalhos anteriores (BANDIKARI; POONDLA; OBULAM, 2014; GOYAL et al., 2008; SINDHU et al., 2017) frente à produção de xilanases microbianas a partir de substratos agroindustriais pré-tratados.

A composição proximal e o conteúdo lignocelulósico dos substratos agrícolas estão apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente. Os valores obtidos neste estudo estão de acordo com outros autores (BALLESTEROS; TEIXEIRA; MUSSATTO, 2014; BEKALO; REINHARDT, 2010; DÍAZ et al., 2014; HICKERT et al., 2013; KUPSKI et al., 2015; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; MUSSATTO et al., 2011; SPIGNO; PIZZORNO; FAVERI, 2008), e algumas variações são aceitáveis devido à metodologia utilizada e às características do substrato (por exemplo, tipo de cultivar, maturidade na colheita, sazonalidade e condições climáticas durante o cultivo da espécie agrícola).

**Tabela 3** – Composição proximal dos substratos agroindustriais.

<b>Substratos agroindustrial</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Lipídios<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Proteína<sup>12</sup> (%)</b>	<b>Cinzas<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Carboidratos<sup>1</sup> (%)</b>
Farelo de arroz	9,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	22,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,4 <sup>a</sup>	12,6 ± < 0,1 <sup>b</sup>	44,6 ± 0,1
Casca de arroz	10,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,7 ± < 0,1 <sup>d</sup>	5,0 ± 0,3 <sup>bc</sup>	16,5 ± < 0,1 <sup>a</sup>	66,0 ± 0,2
Casca de soja	8,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	2,4 ± < 0,1 <sup>c</sup>	12,3 ± 1,4 <sup>a</sup>	5,3 ± < 0,1 <sup>e</sup>	71,4 ± 1,4
Engaço de uva	7,2 ± 0,1 <sup>e</sup>	1,6 ± < 0,1 <sup>d</sup>	3,6 ± 0,3 <sup>cd</sup>	8,1 ± < 0,1 <sup>c</sup>	79,5 ± 0,3
Pergaminho de café	4,7 ± 0,1 <sup>f</sup>	3,8 ± < 0,1 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	9,6 ± < 0,1 <sup>d</sup>	75,6 ± 0,3
Casca de aveia	8,2 ± 0,2 <sup>d</sup>	0,6 ± < 0,1 <sup>e</sup>	3,3 ± < 0,1 <sup>d</sup>	4,2 ± < 0,1 <sup>f</sup>	83,9 ± < 0,1

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística ao nível de 5% de significância pelo teste *Tukey* (p<0,05). <sup>1</sup>Base seca. <sup>2</sup>Fator de conversão de proteína: 5,96 (Farelo e casca de arroz); 5,71 (casca de soja); 6,25 (engaço de uva e pergaminho de café); 5,83 (Casca de aveia) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 1986)

Dentre os substratos avaliados neste estudo, o farelo de arroz apresentou a maior quantidade de lipídios (22,4%), proteínas (14,0%) e hemicelulose (29,6%) e baixo teor de lignina (12,2%), o que o torna uma fonte potencial de xilana para a produção de xilanases. Altos níveis de proteínas também foram observados na casca de soja (12,3%), as quais também apresentaram o menor teor de lignina (5,1%). O engaço de uva, o pergaminho do café e as cascas de arroz e aveia apresentaram os menores teores em termos de lipídios e proteínas. Além



disso, a alta quantidade de lignina (entre 22,1 a 33,5%) torna estes substratos mais recalcitrantes para posterior produção de xilanases.

**Tabela 4** – Composição lignocelulósica de substratos agroindustriais.

Substratos agroindustriais		Hemicelulose <sup>1</sup>	Celulose <sup>1</sup>	Lignina <sup>1</sup>
		(%)	(%)	(%)
<b>Farelo de arroz</b>	Não tratado	29,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	27,3 ± 2,3 <sup>a</sup>	12,2 ± 0,8 <sup>b</sup>
	Pré-tratado	18,4 ± 1,4 <sup>b</sup>	28,6 ± 1,4 <sup>a</sup>	19,4 ± 1,2 <sup>a</sup>
<b>Casca de arroz</b>	Não tratado	14,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	28,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	33,5 ± 1,0 <sup>a</sup>
	Pré-tratado	22,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	38,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	18,7 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>Casca de soja</b>	Não tratado	16,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	29,5 ± 0,9 <sup>b</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
	Pré-tratado	16,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	50,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	5,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
<b>Engaço de uva</b>	Não tratado	17,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	23,4 ± 1,2 <sup>b</sup>	32,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
	Pré-tratado	21,2 ± 0,4 <sup>a</sup>	34,8 ± 0,6 <sup>a</sup>	22,5 ± 1,7 <sup>b</sup>
<b>Pergaminho do café</b>	Não tratado	12,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	20,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	31,5 ± 0,5 <sup>a</sup>
	Pré-tratado	18,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	43,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	26,4 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>Casca de aveia</b>	Não tratado	27,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	22,7 ± 0,1 <sup>b</sup>	22,1 ± 0,4 <sup>a</sup>
	Pré-tratado	37,2 ± 3,9 <sup>a</sup>	46,0 ± 4,4 <sup>a</sup>	6,8 ± 0,2 <sup>b</sup>

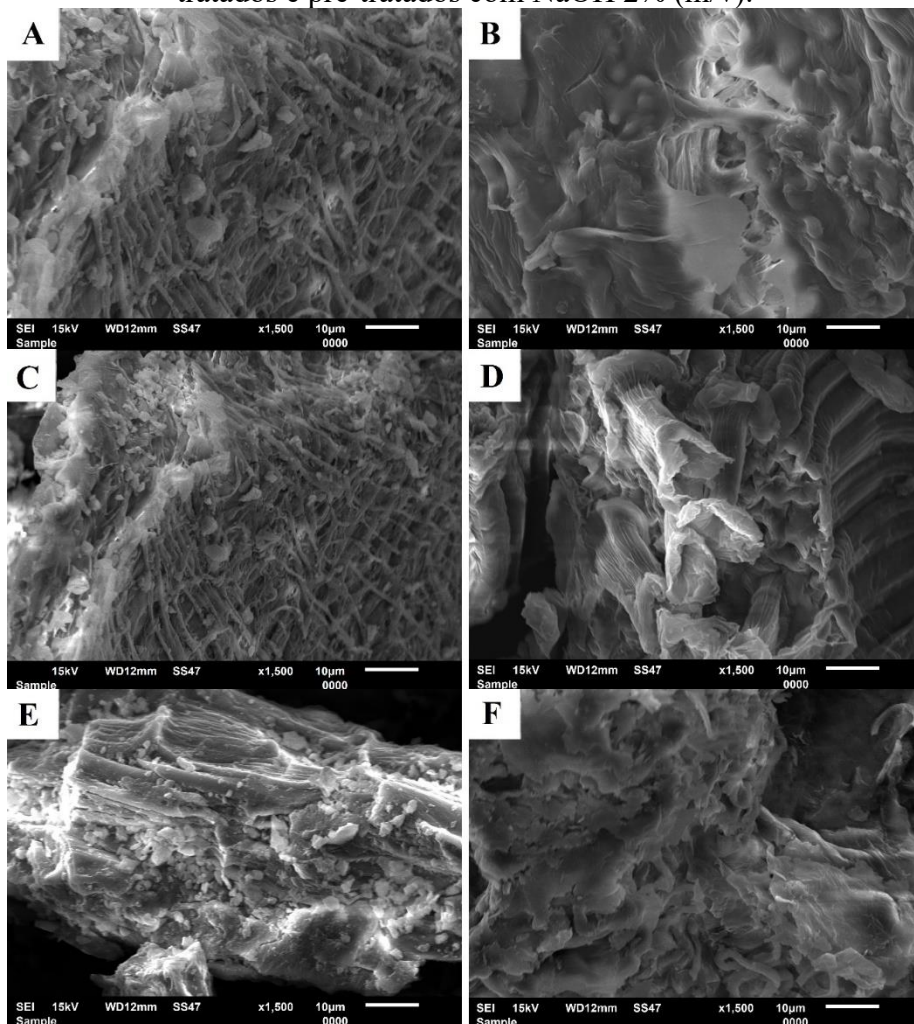
Média ± desvio padrão (n = 3). Letras iguais entre cada substrato (não tratado e pré-tratado) na mesma coluna indicam que não há diferença estatística ao nível de 5% de significância pelo teste *t* (p>0,05). <sup>1</sup>Base seca.

Após o pré-tratamento alcalino, a composição lignocelulósica de todos os substratos mudou consideravelmente. Os níveis de lignina de casca de arroz, casca de aveia, engaço de uva e pergaminho de café reduziram entre 1,2 a 3,3 vezes, enquanto o conteúdo de lignina na casca da soja não diminuiu após o pré-tratamento. O teor de hemicelulose e celulose da casca de arroz, casca de aveia, engaço de uva e pergaminho de café aumentou entre 1,2, e 1,6 vezes e 1,3 e 2,1 vezes, respectivamente, após o pré-tratamento alcalino. Embora não tenham sido observadas alterações nos níveis de hemicelulose para a casca de soja após o pré-tratamento, o teor de celulose aumentou em 1,7 vezes. Por outro lado, o pré-tratamento alcalino do farelo de arroz implicou no aumento da lignina e na redução da hemicelulose em 1,6 vezes, e nenhuma modificação considerável no teor de celulose. Kim, Lee e Kim (2016) mencionam que o pré-tratamento alcalino cliva as ligações éter e éster entre lignina e hemicelulose, o que leva à

dissolução da lignina, alteração no GP dos componentes da biomassa lignocelulósica e mudanças nas propriedades físicas (ou seja, aumento da área superficial interna, porosidade e cristalinidade). No entanto, o grau de modificação na biomassa lignocelulósica varia entre os diferentes substratos.

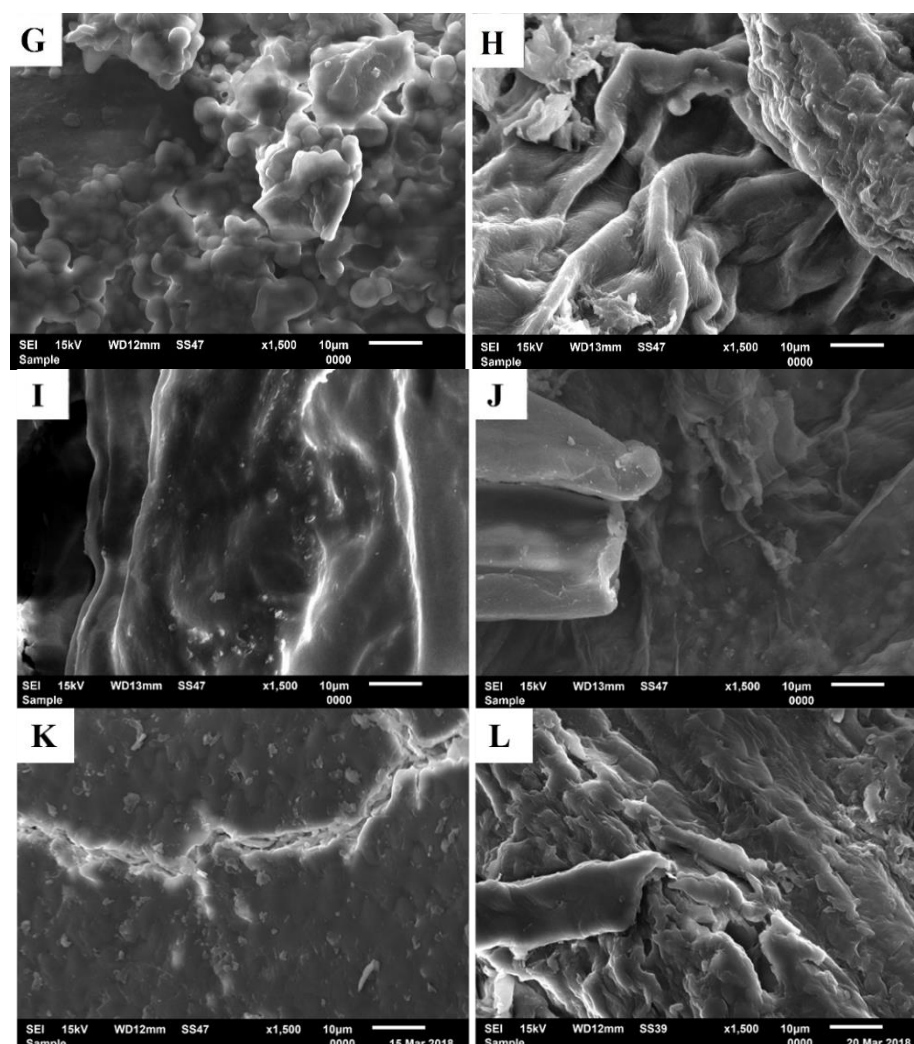
Para elucidar as mudanças estruturais que ocorreram após o pré-tratamento alcalino, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos substratos foi realizada, conforme mostra a Figura 2. Substratos agrícolas não tratados apresentaram estrutura composta por fibrilas rígidas e bem ordenadas, enquanto os substratos pré-tratados com NaOH mostraram uma estrutura rompida, desigual e desordenada.

**Figura 2** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos agroindustriais não tratados e pré-tratados com NaOH 2% (m/v).



Legenda: Casca de arroz não tratada (A) e pré-tratada (B); Casca de soja não tratada (C) e pré-tratada (D); Engaço de uva não tratado (E) e pré-tratado (F);

**Figura 2** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos substratos agroindustriais não tratados e pré-tratados com NaOH 2% (m/v) (continuação).

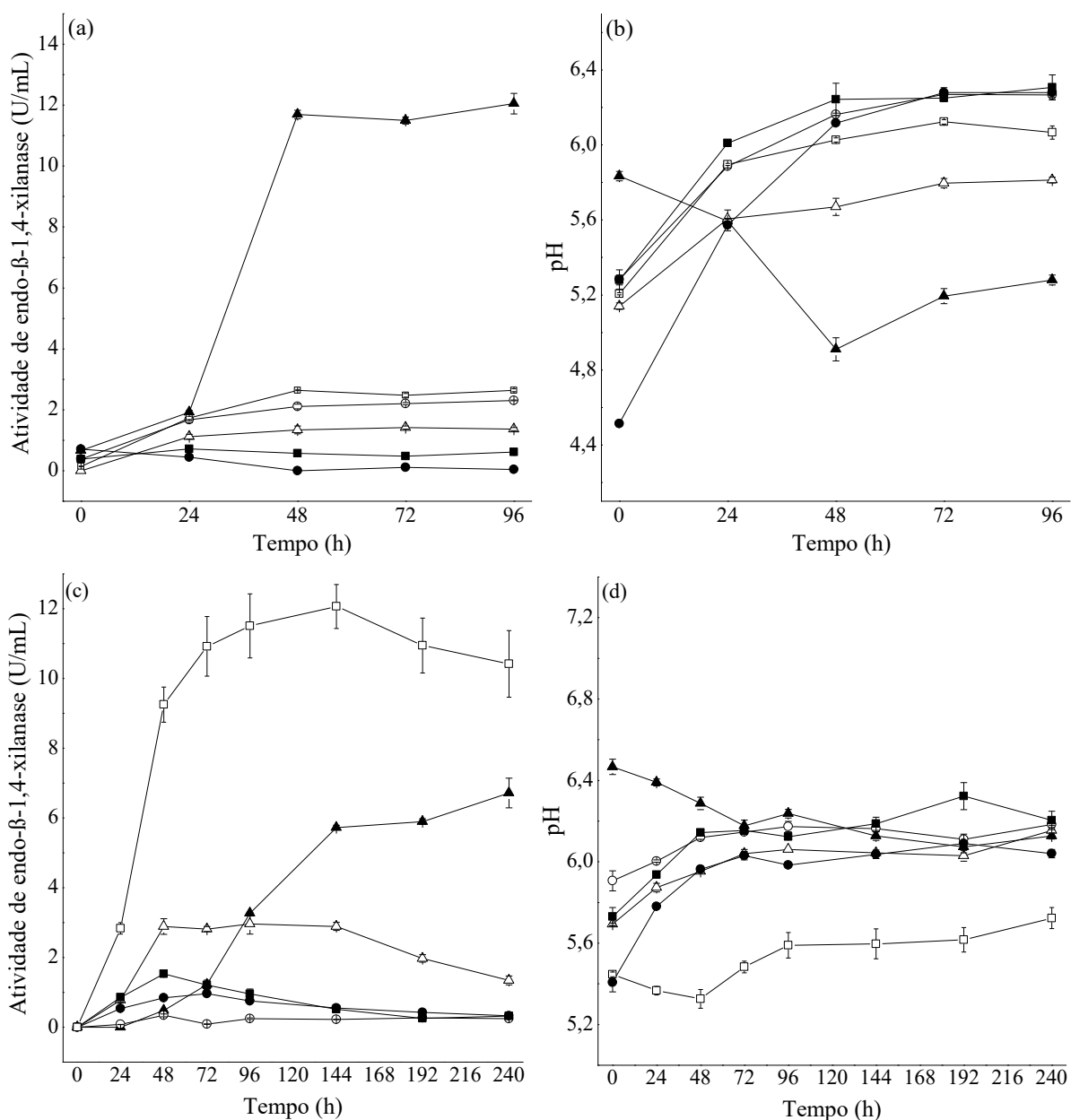


Legenda: Farelo de arroz não tratado (G) e pré-tratado (H); Pergaminho de café não tratado (I) e pré-tratado (J); Casca de aveia não tratada (K) e pré-tratada (L).

### 3.3 USO DE SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS NA PRODUÇÃO DE XILANASES

A produção industrial de xilanases microbianas é limitada pelo elevado custo dos substratos necessários às espécies microbianas. No entanto, a produção econômica de xilanase em grandes quantidades pode ser parcialmente alcançada a partir do uso de substratos agrícolas como fontes de xilana. A Figura 3 mostra a produção de xilanase durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 em substratos agroindustriais não tratados (a) e pré-tratados com NaOH (c). Os cultivos submersos com substratos pré-tratados foram realizados além de 96 h, devido às modificações que o agente alcalino causa na biomassa lignocelulósica, o que poderia modificar a cinética da produção de enzimas.

**Figura 3** – Atividade de xilanase e pH durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 em meio com substratos agroindustriais não tratados (a,b) e pré-tratados (c,d) com NaOH 2% (m/v).



Média  $\pm$  desvio padrão (n = 3). Legenda:  $\circ$  Casca de soja  $\square$  Casca de aveia  $\Delta$  Casca de arroz  $\blacktriangle$  Farelo de arroz  $\bullet$  Engaço de uva  $\blacksquare$  Pergaminho do café

O farelo de arroz não tratado se destacou na produção de xilanase em relação aos demais substratos avaliados para este fim, sendo observada atividade enzimática de  $11,7 \pm 0,1$  U/mL e  $P$  de  $0,24 \pm < 0,01$  U/mL.h em 48 h de cultivo, e comportamento estável quanto à produção da enzima após este período (Figura 3a). Quando o pré-tratamento alcalino foi aplicado ao farelo de arroz, a produção de xilanases diminuiu consideravelmente (Figura 3c), sendo observada atividade enzimática de  $5,7 \pm < 0,1$  U/mL e  $P$  de  $0,04 \pm < 0,01$  U/mL.h em 144 h de cultivo. As atividades de xilanase e  $P$  para farelo de arroz apresentaram diferença

significativa pelo teste  $t$  ( $p < 0,05$ ), concluindo assim que o uso deste substrato sem tratamento prévio colaborou para maior produção da enzima. Este resultado é benéfico pensando na obtenção da enzima em larga escala, pois dispensa o uso de etapas de pré-tratamento do substrato, tornando o processo de produção enzimática mais sustentável e energeticamente favorável. Conforme mostra a Tabela 4, o teor de hemicelulose diminuiu e o de lignina aumentou após o tratamento alcalino, o que pode ter contribuído para a diminuição da produção enzimática. Aliado a isto, a microscopia eletrônica (Figura 2) mostrou que o tratamento alcalino modificou a estrutura do farelo de arroz. Apesar dos altos níveis de produção de xilanase obtidos com o uso de farelo de arroz não tratado, a atividade específica apresentada pelo farelo de arroz pré-tratado ( $19,3 \pm 0,4$  U/mg, 144h) foi maior que a apresentada pelo uso do substrato não tratado ( $14,5 \pm 0,5$  U/mg, 48 h) devido à remoção considerável de proteínas durante o pré-tratamento alcalino (dados não mostrados).

Conforme o estudo realizado por Li et al. (2000), a levedura *A. pullulans* prefere xilanas com cadeias longas e é eficaz na hidrólise de substituintes, uma vez que altas quantidades de xilanase foram alcançados sob essa condição. A xilana presente no farelo de arroz possui estrutura altamente substituída, sendo composta por unidades de xilose ligadas em  $\beta$ -1,4 na cadeia principal e resíduos de arabinose, acetil e ácido glicurônico (PALANIAPPAN et al., 2017), o que torna este substrato favorável para a produção de xilanase. Além disso, vários estudos têm demonstrado que o farelo de trigo, cuja estrutura hemicelulósica também é altamente substituída, como potencial indutor da produção microbiana de xilanases (KALLEL et al., 2016; KHANAHMADI et al., 2018; YEGIN; ALTINEL; TULUK, 2018). Curiosamente, estudos demonstraram que a produção de xilanases também diminuiu quando o farelo de trigo foi pré-tratado com agentes alcalinos (DAS; RAY, 2016).

Bajaj, Sharma e Sharma (2011) observaram semelhanças na produção de xilanases por *Penicillium* sp. quando farelo de trigo (21,8 U/mL) e farelo de arroz (20,6 U/mL) foram utilizados como substratos. Da mesma forma, Kavva e Padmavathi (2009) constataram produção equivalente de xilanase ( $\sim 10$  U/mL) por *Aspergillus niger* utilizando ambos os farelos como substratos. No presente estudo, cabe mencionar que a menor produção de xilanase por *A. pullulans* em meio contendo farelo de arroz (11,7 U/mL) era esperada, quando comparado à enzima produzida em meio contendo xilana de faia (74,9 U/mL). Isto porque o farelo de arroz contém apenas 29,6% de hemicelulose, o que implica em menos xilana disponível para a produção da enzima.

De modo semelhante, a casca de soja não tratada apresentou maior atividade de xilanase ( $2,1 \pm < 0,1$  U/mL) e *P* ( $0,04 \pm < 0,01$  U/mL.h) comparada à casca de soja pré-tratada

( $0,3 \pm < 0,1$  U/mL e  $< 0,01$  U/mL.h), ambas alcançadas em 48 h de cultivo e estatisticamente diferentes pelo teste  $t$  ( $p < 0,05$ ). As atividades específicas para casca de soja não tratada e pré-tratada foram de  $4,3 \pm 0,2$  U/mg (48 h) e  $2,5 \pm 0,3$  U/mg (48 h), respectivamente. Apesar de não ter sido observadas modificações nos teores de hemicelulose e lignina para a casca de soja (Tabela 4), o teor de celulose aumentou após o pré-tratamento, o que pode ter resultado na menor produção da enzima para a casca de soja pré-tratada. A modificação estrutural da casca de soja, após o pré-tratamento alcalino, é evidenciada na Figura 2.

Em contraste, o pré-tratamento alcalino da casca de aveia aumentou a produção de xilanase em 4,1 vezes (Figura 3c). Os valores de atividade enzimática e  $P$  para o substrato não tratado ( $2,6 \pm < 0,1$  U/mL e  $0,05 \pm < 0,01$  U/mL.h) e pré-tratado ( $10,9 \pm 0,8$  U/mL e  $0,15 \pm 0,01$  U/mL.h), obtidas em 48 h e 72 h, respectivamente, apresentaram diferença estatística pelo teste  $t$  ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, o pré-tratamento alcalino da casca de arroz favoreceu a produção da enzima (Figura 3c), uma vez que as atividades enzimáticas e  $P$  foram significativamente ( $p < 0,05$ , teste  $t$ ) maiores para o substrato pré-tratado ( $2,9 \pm 0,2$  U/mL e  $0,06 \pm < 0,01$  U/mL.h) em relação ao não tratado ( $1,3 \pm 0,1$  U/mL e  $0,03 \pm < 0,01$  U/mL.h), ambos alcançados em 48 h de cultivo. O pergaminho do café pré-tratado também apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ , teste  $t$ ) na atividade de xilanase ( $1,5 \pm < 0,1$  U/mL, 48 h) e de  $P$  ( $0,06 < 0,01$  U/mL.h, 48 h) comparado ao substrato não tratado ( $0,7 \pm < 0,1$  U/mL e  $0,03 \pm < 0,01$  U/mL.h, 24 h).

Valores irrisórios de atividade enzimática e  $P$  foram observados quando o engaço de uva não tratado foi utilizado em cultivo submerso. No entanto, o engaço de uva pré-tratado apresentou máxima atividade de xilanase ( $1,0 \pm < 0,1$  U/mL) e  $P$  ( $0,01 \pm < 0,01$  U/mL.h) em 72 h de cultivo. Para todos os quatro substratos mencionados, o teor de hemicelulose aumentou e o de lignina diminuiu após o pré-tratamento (Tabela 4), o que pode ter contribuído para o aumento nos níveis de produção de xilanase. A microscopia (Figura 2) destes substratos também mostra que o pré-tratamento causou modificações na estrutura lignocelulósica. Devido à remoção de proteínas após o pré-tratamento (verificada pela quantificação do teor de proteína solúveis), todos os seguintes substratos pré-tratados apresentaram atividades específicas superiores comparadas à obtida com o substrato não tratado: casca de arroz ( $3,2 \pm 0,4$  U/mg a  $16,0 \pm 0,9$  U/mg); casca de aveia ( $5,9 \pm 0,1$  U/mg a  $60,4 \pm 4,5$  U/mg); pergaminho de café ( $0,8 \pm < 0,1$  U/mg a  $7,5 \pm 0,3$  U/mg); e engaço de uva ( $0,3 \pm < 0,1$  U/mg a  $5,5 \pm < 0,1$  U/mg).

Segundo Haltrich et al. (1996), o pré-tratamento de substratos lignocelulósicos para produção de xilanases pode ser visto como um equilíbrio entre as vantagens de aumentar a acessibilidade da biomassa e as desvantagens de modificar uma biomassa facilmente degradável. O primeiro caso anteciparia o crescimento do organismo e, assim, aumentaria

produção enzimática; enquanto o segundo reduziria a produção de enzimas devido ao rápido consumo da fonte de carbono e liberação simultânea de açúcares monoméricos, os quais levariam à repressão na síntese enzimática de certos organismos. No caso específico do tratamento alcalino, Das e Ray (2016) mencionam que este aumenta o acesso à hemicelulose pela remoção da lignina. Por outro lado, se a biomassa se torna facilmente degradável, há um rápido consumo de substrato, o que leva à repressão metabólica da produção enzimática.

A Figura 3 também mostra o comportamento do pH durante o cultivo de *A. pullulans* utilizando substratos sem (b) e com (d) pré-tratamento alcalino. Em oposição a todos os substratos avaliados, o pH diminuiu no ponto de maior produção de xilanase (48 h) e permaneceu constante até 96 h durante o crescimento da levedura em farelo de arroz não tratado. Já nos ensaios utilizando casca de aveia pré-tratada, os valores de pH diminuíram após o aumento acentuado da produção de xilanase entre 24 e 48 h. Para o farelo de arroz pré-tratado, o pH diminuiu entre 48 h e 72 h de cultivo à medida que a atividade enzimática aumentava. Como mencionado anteriormente, a queda de pH está relacionada à alta produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261.

Neste estudo, a produção de xilanase variou conforme o substrato agroindustrial (com ou sem pré-tratamento) utilizado no meio de cultura. O farelo de arroz não tratado mostrou composição rica em termos de lipídios, proteínas e hemicelulose, o que resultou em altos níveis de atividade da xilanase. O baixo nível de lignina presente no farelo de arroz o torna um substrato pouco resistente e de fácil acesso ao micro-organismo. Por outro lado, quando o farelo de arroz foi pré-tratado com solução alcalina, os níveis de hemicelulose diminuíram e os níveis de lignina aumentaram, resultando em baixa produção de xilanase comparado ao uso do farelo de arroz não tratado como substrato. O pré-tratamento alcalino de cascas de aveia e de arroz, engaço de uva e pergaminho de café, resultou em maior produção da enzima quando comparado aos substratos não tratados, devido à menor recalcitrância dos substratos pré-tratados. O pré-tratamento em casca de soja não modificou o teor de hemicelulose e lignina, mas aumentou os níveis de celulose, o que pode ter afetado a produção da enzima.

Sendo assim, a produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 pode ser alcançada de maneira mais econômica utilizando farelo de arroz não tratado como fonte de xilana. A atividade de xilanase alcançada neste estudo foi semelhante a reportada em outros estudos (BAJAJ; SHARMA; SHARMA, 2011; KAVYA; PADMAVATHI, 2009); no entanto, a produção destas enzimas pode ser melhorada em ensaios posteriores de otimização das condições de cultivo.

## 4 CONCLUSÃO

Enzimas xilanolíticas e XOs foram produzidos simultaneamente por três cepas de *A. pullulans* em cultivo submerso. A cepa CCT 1261 apresentou a maior produção de xilanase (74,9 U/mL), apresentando atividade enzimática máxima em 60 h de cultivo, e menor relação  $\beta$ -xilosidase/endo- $\beta$ -1,4-xilanasas. A cepa também se destacou quanto ao crescimento celular (4,1 g/L), velocidade máxima específica de crescimento ( $0,18 \text{ h}^{-1}$ ) e produtividade máxima em termos de xilanase (1,25 U/mL.h). Os XOs produzidos por CCT 1261 alcançaram a máxima concentração nas primeiras 12 h de cultivo (1,68 mg/mL), e foram compostos majoritariamente por xilobiose (0,72 mg/mL) e xilotriose (0,70 mg/mL).

O pré-tratamento alcalino causou mudanças estruturais consideráveis nos substratos agrícolas, que variaram entre as diferentes biomassas utilizadas e influenciaram os níveis de produção de xilanase. O farelo de arroz não tratado apresentou a maior quantidade de hemicelulose (29,6%) e baixo teor de lignina (12,2%), o que implicou na maior produção de xilanase (11,7 U/mL) quando utilizado como substrato no meio de cultivo. A produção de xilanase por *A. pullulans* pode ser realizada de modo mais econômico a partir do uso de um material do beneficiamento do arroz como fonte de xilana, podendo a produção ser melhorada em ensaios posteriores de otimização das condições de cultivo.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL MANAF, S. F.; MD JAHIM, J.; HARUN, S.; LUTHFI, A. A. I. Fractionation of oil palm fronds (OPF) hemicellulose using dilute nitric acid for fermentative production of xylitol. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 6–15, 2018.

AHMED, S. A.; SALEH, S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ATY, A. A. A.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 2016.

ALTHURI, A.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 530–539, 2017.

AN, C.; MA, S.; CHANG, F.; XUE, W. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 180–185, 2017.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y. A.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p.1293–1302, 2013.



ANTOV, M. G.; ĐORĐEVIĆ, T. R. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. **Food Chemistry**, v. 235, p. 175–180, 2017.

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

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, M.; SHARMA, S. Alkalistable endo- $\beta$ -1,4-xylanase production from a newly isolated alkalitolerant *Penicillium* sp. SS1 using agro-residues. **3 Biotech**, v. 1, n. 2, p. 83–90, 2011.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3493–3503, 2014.

BANDIKARI, R.; POONDLA, V.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. **3 Biotech**, v. 4, n. 6, p. 655–664, 2014.

BANKEEREE, W.; AKADA, R.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H.; PRASONGSUK, S. Enzymatic hydrolysis of black liquor xylan by a novel xylose-tolerant, thermostable  $\beta$ -xylosidase from a tropical strain of *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 919–934, 2018.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Enhanced production of cellulase-free thermoactive xylanase using corncob by a black yeast, *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 54, n. 6, p. 822–829, 2016.

BEKALO, S. A.; REINHARDT, H.-W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, v. 43, n. 8, p. 1049–1060, 2010.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BORUAH, P.; DOWARAH, P.; HAZARIKA, R.; YADAV, A.; BARKAKATI, P.; GOSWAMI, T. Xylanase from *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum* - a potential source for bamboo pulp bleaching. **Journal of Cleaner Production**, v. 116, p. 259–267, 2016.

CHANG, S.; GUO, Y.; WU, B.; HE, B. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 249–256, 2017.

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

p. 215–221, 2012.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; O'NEILL, F. H.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Modification of the carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 2, p. 196–200, 1999.

DAS, A.; RAY, L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp.S6 by solid state fermentation. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3343–3360, 2016.

DÍAZ, A. B.; BLANDINO, A.; BELLELI, C.; CARO, I. An effective process for pretreating rice husk to enhance enzyme hydrolysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 27, p. 10870–10875, 2014.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. Purification and characterization of  $\beta$ - xylosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology and Biotechnology**, v. 2, p. 210–215, 1991.

DOMINGUEZ, A.; NOBRE, C.; RODRIGUES, L. R.; PERES, A. M.; TORRES, D.; ROCHA, I.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1174–1179, 2012.

ESCARNOT, E.; AGUEDO, M.; PAQUOT, M. Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 2, p. 243–253, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual of food quality control 7. Food analysis: General techniques, additives, contaminants, and composition**. Roma: FAO, 1986.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 458**, 2013. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KALANTZI, O.; AGGELIS, G. Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 155–162, 1998.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Eds.). **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. Wiley Inte ed. New York: [s.n.]. p. 241–266, 1971.

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

GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 535–541, 2008.

GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A.; ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.

GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; HIRSCH, J.; EBRINGEROVÁ, A.; PARAJÓ, J. C. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3632–3641, 2010.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137–161, 1996.

HANSEN, C. H. F.; FROKIAER, H.; CHRISTENSEN, A. G.; BERGSTROM, A.; LICHT, T. R.; HANSEN, A. K.; METZDORFF, S. B. Dietary xylooligosaccharide downregulates IFN- $\gamma$  and the low-grade inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  systemically in mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 4, p. 533–540, 2013.

HAYASHI, S.; OHNO, T.; ITO, M.; YOKOI, H. Purification and properties of the cell-associated beta-xylosidase from *Aureobasidium*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 276–279, 2001.

HICKERT, L. R.; DA CUNHA-PEREIRA, F.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508–514, 2013.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139–147, 2016.

IUPAC, I. U. OF P. AND A. C. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains - Recommendations of Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). **Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, 1982.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.

KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015.

KAVYA, V.; PADMAVATHI, T. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Polish journal of microbiology/Polskie Towarzystwo Mikrobiologów The Polish Society of Microbiologists**, v. 58, n. 2, p. 125–30, 2009.

KHANAHMADI, M.; AREZI, I.; AMIRI, M.; MIRANZADEH, M. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid- state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 272–282, 2018.

KHUCHAROENPHAISAN, K.; TOKUYAMA, S.; KITPREECHAVANICH, V. Purification and characterization of a high-thermostable  $\beta$ -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. **Mycoscience**, v. 51, n. 6, p. 405–410, 2010.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; RAFAEL, C.; TERRASAN, F.; ALMEIDA, A. F. DE. Production, Purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KUPSKI, L.; DE CARVALHO SILVELLO, M. A.; FONTES, M. R. V.; LIMA, T. S.; TREICHEL, H.; BADIALE FURLONG, E. R. *oryzae* cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129–138, 2015.

LATTIEFF, F. A. A study of biogas production from date palm fruit wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 139, p. 1191–1195, 2016.

LEATHERS, T. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1026–1030, 1986.

LEATHERS, T. D.; RICH, J. O.; ANDERSON, A. M.; MANITCHOTPISIT, P. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 10, p. 1701–1706, 2013.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. D. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 281–288, 2007.

LEMES, A. C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, S.; RODRIGUES, L. R. Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. **Separation and Purification Technology**, v. 209, p. 409–418, 2019.

LI, H.; CHI, Z.; DUAN, X.; WANG, L.; SHENG, J.; WU, L. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 462–465, 2007b.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L.

Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 2000.

LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117–124, 2012.

LIN, S. H.; CHOU, L. M.; CHIEN, Y. W.; CHANG, J. S.; LIN, C. I. Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, p. 1–7, 2016.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C. C. P.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 03, n. 03, p. 36–42, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.

MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T. D.; PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P.; LI, X.-L.; EVELEIGH, D. E.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; DUNLAP, C. A.; VERMILLION, K. E.; PUNNAPAYAK, H. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research**, v. 113, n. 10, p. 1107–1120, 2009.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12, 2017.

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

MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, L. C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661–672, 2011.

NASR, S.; SOUDI, M. R.; HATEF SALMANIAN, A.; GHADAM, P. Partial optimization of endo-1,4-beta-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 12, p. 1245–1253, 2013.

OHTA, K.; FUJIMOTO, H.; FUJII, S.; WAKIYAMA, M. Cell-associated  $\beta$ -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.

OTERO, D. M.; CADAVAL, C. L.; TEIXEIRA, L. M.; ROSA, C. A.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase. **African**

**Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1961–1969, 2015.

PALANIAPPAN, A.; YUVARAJ, S. S.; SONAIMUTHU, S.; ANTONY, U. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 296–305, 2017.

PATEL, A.; SINDHU, D. K.; ARORA, N.; SINGH, R. P.; PRUTHI, V.; PRUTHI, P. A. Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 91–98, 2015.

PEREIRA, P. H. F.; WALDRON, K. W.; WILSON, D. R.; CUNHA, A. P.; BRITO, E. S. D.; RODRIGUES, T. H. S.; ROSA, M. F.; AZEREDO, H. M. C. Wheat straw hemicelluloses added with cellulose nanocrystals and citric acid. Effect on film physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 317–324, 2017.

PRIEM, B.; DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. C. Production of  $\beta$ -1,4-xylanase in continuous culture by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 3, p. 149–154, 1991.

RANI, G. B.; CHIRANJEEVI, T.; CHANDEL, A. K.; SATISH, T.; RADHIKA, K.; NARASU, M. L.; UMA, A. Optimization of selective production media for enhanced production of xylanases in submerged fermentation by *Thielaviopsis basicola* MTCC 1467 using L16 orthogonal array. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2508–2516, 2014.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P.S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G. C.; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597–603, 2013.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; BISCHOFF, K. M. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 33–37, 2013.

ROBLEDO, A.; AGUILAR, C. N.; BELMARES-CERDA, R. E.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; MONTAÑÉZ-SÁENZ; MONTAÑÉZ-SÁENZ, J. C. Kinetic and thermodynamic parameters of the thermostable xylanase production. **International Journal of Research In Agriculture and Food Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1–8, 2014.

SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2016.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

- SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, jul. 2014.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; GNANSOUNOU, E.; UMMALYMA, S. B.; THOMAS, L.; PANDEY, A. Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post harvest residue. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 146–151, 2017.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618.** [s.l: s.n.], 2008.
- SPIGNO, G.; PIZZORNO, T.; FAVERI, D. M. DE. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4329–4337, 2008.
- SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.
- SUN, Z.; LV, W.; YU, R.; LI, J.; LIU, H.; SUN, W.; WANG, Z.; LI, J.; ZHE, S.; QIN, Y. Effect of a straw-derived xylooligosaccharide on broiler growth performance, endocrine metabolism, and immune response. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 105–109, 2013.
- TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689–692, 1987.
- TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139–4143, 2010.
- TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA JÚNIOR, F. G.; CARMONA, E. C. Xylanase and  $\beta$ -Xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, physico-chemical properties, and application of the crude extract to pulp biobleaching. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 1292–1305, 2013.
- VALLS, C.; PASTOR, F. I. J.; VIDAL, T.; RONCERO, M. B.; DÍAZ, P.; MARTÍNEZ, J.; VALENZUELA, S. V. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 43–50, 2018.
- VAN CRAEYVELD, V.; SWENNEN, K.; DORNEZ, E.; VAN DE WIELE, T.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; DELAEDT, Y.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J.; DE KETELAERE, B.; BROEKAERT, W. F.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2348–2355, 2008.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; THONART, P.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y. Effect of the bacterial or fungal origin of exogenous xylanases supplemented to a wheat-based diet on performance of broiler chickens and nutrient digestibility of the diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 221–228, 2010.

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

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; WANG, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816–821, 2009.

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

YEGIN, S. Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization, and application in saccharification of lignocellulosic biomass. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 441–449, 2016.

YEGIN, S. *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerin belirlenmesi. **Gıda/The Journal of Food**, v. 42, p. 1–9, 2017a.

YEGIN, S.; ALTINEL, B.; TULUK, K. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 389–397, 2018.

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, 2017.

YU, X. HONG; GU, Z. XIN. Direct production of feruloyl oligosaccharides and hemicellulase inducement and distribution in a newly isolated *Aureobasidium pullulans* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 747–755, 2014.

YU, X.; YIN, J.; LI, L.; LUAN, C.; ZHANG, J.; ZHAO, C.; LI, S. Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from corn cobs and their in vitro antioxidant activity when combined with *Lactobacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1084–1092, 2015.





ARTIGO 2

MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE POR *AUREOBASIDIUM PULLULANS*  
utilizando farelo de arroz como fonte de xilana

GAUTÉRIO, G. V.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J.  
Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice  
grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. 75, p.  
296–305, 2020.



## RESUMO

As xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas da xilana, principal componente da fração hemicelulósica da biomassa vegetal, sendo que produção de xilanases em cultivos microbianos é a principal via de obtenção destas enzimas em quantidades satisfatórias para posteriores aplicações. A composição do meio e as condições de cultivo exercem papel crucial na secreção de xilanases por micro-organismos, e de modo a tornar a produção mais econômica, substratos agroindustriais ricos em xilana podem ser utilizados como indutores da produção enzimática. O objetivo deste estudo foi maximizar a produção de xilanase por *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 em cultivo submerso utilizando farelo de arroz como fonte de xilana. Para tal, dois delineamentos experimentais, além de experimentos univariáveis adicionais, foram realizados. A composição do meio e as condições de cultivo foram avaliadas por Delineamento Fatorial Fracionário  $2^{6-2}$  (DFF), enquanto o Delineamento Composto Central (DCC)  $2^3$  foi utilizado para modelar e maximizar a produção de xilanase. Sequencialmente, o modelo foi validado e cultivos adicionais foram realizados como estratégia para melhorar a produção de xilanase. A produção máxima de xilanase (82,2 U/mL) foi obtida utilizando 61,9 g/L de farelo de arroz, 3,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g/L de extrato de levedura, pH inicial igual a 7,0 e 28 °C. Após os delineamentos experimentais e cultivos adicionais, a atividade da xilanase foi aumentada em sete vezes em relação à obtida nas condições iniciais de cultivo. Além disso, o estudo permitiu o uso sustentável de um material do beneficiamento do arroz, contribuindo tanto para a mitigação do impacto ambiental causado pelo seu descarte inadequado na natureza quanto a redução parcial dos custos de produção de xilanase.

**Palavras-chave:** Biomassa lignocelulósica. Cultivo submerso Delineamento experimental. Hemicelulase. Levedura.



## 1 INTRODUÇÃO

As xilanases são hemicelulases capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 na estrutura da xilana, resultando em diferentes xilo-oligômeros (XOs) de cadeia curta e eventual xilose (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005; SHENG et al., 2014). Esta capacidade torna as xilanases aplicáveis em diversos segmentos industriais, que incluem a conversão de biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis (ASTOLFI et al., 2019) e XOs (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019; LIU et al., 2018; MAZLAN et al., 2019), o branqueamento de celulose *kraft* na indústria de papel (ADHYARU et al., 2017), e a desengomagem, biopurga e biopolimento de fibras no setor têxtil (ATY et al., 2018). Na indústria de alimentos e de rações, as xilanases têm sido utilizadas no melhoramento das características tecnológicas em processos de panificação e de produção de bebidas (LIU et al., 2017; SHAHRESTANI et al., 2016; WANG et al., 2016), bem como no aumento da digestibilidade e valor nutricional de rações animais (GHAYOUR-NAJAFABADI et al., 2018).

Xilanases extracelulares podem ser produzidas por uma variedade de organismos incluindo bactérias (KALLEL et al., 2016), fungos filamentosos (MARTINS et al., 2018) e leveduras (ANDRADE et al., 2015) em cultivo submerso (YARDIMCI; CEKMECELIOGLU, 2018) ou em estado sólido (DIAS et al., 2017). No entanto, o uso industrial de xilanases microbianas é limitado pelo alto custo da xilana comercial (ATY et al., 2018). Como alternativa, subprodutos e resíduos agrícolas, tais como sabugo de milho (DESAI; IYER, 2017), farelo de trigo (YEGIN et al., 2017), palha de arroz (RANI et al., 2014), bagaço de cana (ANDRADE et al., 2015), cascas de avelã (YARDIMCI; CEKMECELIOGLU, 2018), resíduo de soja (CUNHA et al., 2018) e biomassa de sorgo (DIAS et al., 2017), têm sido explorados como substratos ricos em xilana para a produção de xilanase.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das culturas mais produzidas mundialmente, cuja produção está estimada em 498,4 milhões de toneladas para a safra 2019/2020. O Brasil é o maior produtor de arroz entre os países não asiáticos e sua produção está estimada em 7,1 milhões de t para o mesmo período (USDA, 2019). O farelo de arroz, um material oriundo do beneficiamento de arroz, compreende 10% do peso do grão (ABAIDE et al., 2019b) e contém cerca de 28% de hemicelulose (xilana) (GUPTE; MADAMWAR, 1997), característica que o torna uma fonte em potencial, e ainda, de baixo custo para a produção de xilanases. Devido à grande quantidade de farelo resultante da moagem dos grãos (8-12%) (PODE, 2016) e à sua aplicação limitada, novas estratégias devem ser desenvolvidas para o aproveitamento racional deste material, por exemplo, o seu uso como substrato em cultivos microbianos.

Entre os micro-organismos produtores de xilanase destaca-se a levedura *Aureobasidium pullulans*, a qual permite o alcance de níveis elevados de produção da enzima até quando substratos agrícolas são utilizados no meio de cultura (BANKEEREE et al., 2016; YEGIN, 2016; YEGIN et al., 2017). Estudos anteriores realizados com a cepa *A. pullulans* CCT 1261 demonstraram sua capacidade em produzir xilanases a partir do uso do farelo de arroz como fonte de xilana (GAUTÉRIO et al., 2018). De modo a maximizar a produção da enzima utilizando um substrato de baixo custo e abundantemente disponível na natureza, a seleção das demais condições de cultivo (isto é, outros nutrientes do meio de cultura e parâmetros físicos) se faz necessária (WALIA et al., 2017).

A maximização da produção de xilanase tem sido realizada através de delineamentos experimentais (CUNHA et al., 2018; LEE, 2018; LONG et al., 2017; SHARMA; BAJAJ, 2018), pois possibilitam a análise de diversos parâmetros simultaneamente a partir de um número limitado de ensaios (DESAI; IYER, 2017). Enquanto os Delineamentos Fatoriais Fracionários (DFF) são adequados para a seleção das variáveis de maior impacto na resposta em estudo (GUNST; MASON, 2009; RODRIGUES; IEMMA, 2012), o Delineamento Composto Central (DCC) permite que os dados experimentais sejam ajustados a um modelo matemático através da técnica dos mínimos quadrados (BEZERRA et al., 2008).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi maximizar a produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 em cultivo submerso utilizando farelo de arroz como fonte de xilana. Para tal, a composição do meio e as condições de cultivo foram avaliadas por um DFF  $2^{6-2}$ . Posteriormente, um DCC  $2^3$  foi utilizado para modelar e maximizar a produção da enzima a partir das variáveis selecionadas no delineamento fracionário. Após a validação do modelo, cultivos adicionais foram realizados como estratégia para aumentar a produção da enzima.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

O micro-organismo *A. pullulans* CCT 1261 foi adquirido a partir da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). O farelo de arroz foi cedido gentilmente por indústria de beneficiamento de arroz da região Sul do Rio Grande do Sul. O preparo do farelo consistiu na secagem em estufa (50 °C, 24 h) e peneiramento (tamanho de partícula menor que 0,5 mm), sendo armazenado em sacos de polietileno a -18 °C até sua utilização. A xilana de madeira de faia foi adquirida da *Sigma-Aldrich* (San Luis, Estados Unidos). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.2 PRODUÇÃO DE XILANASES EM CULTIVO SUBMERSO

### 2.2.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo

A manutenção da cepa de *A. pullulans* CCT 1261 foi realizada através de repiques periódicos para tubos contendo ágar batata dextrose inclinado, os quais foram mantidos a 24 °C em estufa por 72 h. O meio de pré-inóculo e inóculo foi composto (g/L) por xilose (10), base nitrogenada de levedura (6,7) suplementada com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (5), asparagina (2) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (5) (CHRISTOV et al., 1997). O meio isento de xilose foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min) e adicionado de uma solução concentrada de xilose previamente esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose (Milipore, Burlington, Estados Unidos) de 0,22 µm.

O preparo do pré-inóculo consistiu na transferência da massa celular (alçada) da superfície do ágar para tubos contendo meio estéril (5 mL). Os tubos foram incubados em estufa a 28 °C por 24 h. O inóculo foi preparado a partir da transferência do volume do pré-inóculo (5 mL) para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o mesmo meio estéril (45 mL), os quais foram mantidos a 28 °C e agitação orbital (150 rpm) por 24 h.

### 2.2.2 Cultivo submerso

Os cultivos submersos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo meio previamente esterilizado em autoclave (121 °C, 15 min). Os frascos foram inoculados com 2% (v/v) de inóculo com densidade ótica (DO) de 0,8 a 620 nm (SUGUMARAN et al., 2013), e mantidos sob agitação orbital (150 rpm) por 96 h ou 120 h. Amostras (5 mL) foram coletadas assepticamente a cada 24 h e centrifugadas (21.380 × g, 4°C, 10 min). O sobrenadante livre de células foi analisado quanto à atividade de endo-β-1,4-xilanase (item 2.3.1), concentração de proteínas solúveis (item 2.3.2) e pH (item 2.3.2).

### 2.2.3 Planejamento experimental

Os efeitos do pH inicial, da temperatura e das concentrações de farelo de arroz, extrato de levedura, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> na produção de xilanase foram avaliados através do DFF 2<sup>6-2</sup> com três pontos centrais, resultando em 19 ensaios. As seis variáveis independentes e seus respectivos intervalos (Tabela 1) foram selecionados conforme a literatura como possíveis fatores que afetariam a produção de xilanase. Os efeitos principais foram estimados avaliando-se a diferença no desempenho do processo, passando do nível mais baixo (-1) para o mais alto



(+1) de cada variável. Em cada ensaio, a variável resposta do delineamento fracionário foi a atividade da xilanase (U/mL) em 96 h de cultivo.

**Tabela 1** – Valores reais e codificados utilizados nos delineamentos fatoriais.

Delineamento	Nível	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>4</sub> (°C)	X <sub>5</sub> (g/L)	X <sub>6</sub> (g/L)
DFF	-1	3	10	0,5	24	0	0
	0	5	30	1,0	28	2,5	2,5
	-1	7	50	1,5	32	5,0	5,0
DCC	-1	-	38,1	-	21,6	3,6	-
	0	-	50,0	-	24,0	6,0	-
	1	-	61,9	-	26,4	8,4	-

Legenda: X<sub>1</sub>: pH inicial; X<sub>2</sub>: Farelo de arroz; X<sub>3</sub>: Extrato de levedura; X<sub>4</sub>: Temperatura; X<sub>5</sub>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; X<sub>6</sub>: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Logo após, um DCC 2<sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central foi realizado a partir das variáveis selecionadas do delineamento fracionário, totalizando 12 ensaios. A concentração de extrato de levedura e o pH inicial do cultivo foram fixados em 1,5 g/L e 7,0, respectivamente, e os cultivos foram realizados sem a adição de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. O intervalo de cada variável independente (Tabela 1) foi selecionado de acordo com a literatura e com efeitos principais do DFF. Em todos os ensaios, a variável resposta do DCC foi a atividade da xilanase (U/mL) em 72 h de cultivo. Os dados experimentais obtidos no DCC foram ajustados a um modelo de primeira ordem conforme a Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

onde y é a variável dependente (resposta) a ser modelada, x são as variáveis independentes (fatores) e  $\beta$  são os coeficientes da regressão do modelo (RODRIGUES; IEMMA, 2012). A partir do modelo preditivo, as curvas de contorno foram construídas para ilustrar os efeitos individuais e de interação sobre a variável dependente. Os desvios relativos entre os valores reais e preditos da variável resposta foram calculados pela Equação 2:

$$RD (\%) = \frac{RO - RP}{RO} \times 100 \quad (2)$$

onde RO e RP são os valores observados e preditos da variável resposta, respectivamente. A validação do modelo consistiu na realização da produção enzimática em quadruplicata nas melhores condições previstas pelas curvas de contorno.

Após os delineamentos experimentais, alguns cultivos adicionais foram realizados com o intuito de aumentar a produção de xilanases, sendo conduzidos nas condições a seguir: a 28 °C e a 30 °C, mantendo as concentrações de farelo de arroz e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 61,9 g/L e 3,6 g/L, respectivamente; e a 28 °C, 61,9 g/L de farelo de arroz e 2 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Os cultivos submersos foram realizados em triplicata por 120 h.

## 2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.3.1 Atividade de endo-β-1,4-xilanase

A atividade de endo-β-1,4-xilanase foi determinada pela incubação (50 °C, 5 min) de 0,9 mL de xilana de faia 1% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3, e 0,1 de extrato enzimático (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Após, a reação foi interrompida pela adição de 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados pela hidrólise da xilana foram quantificados conforme Miller (1959), correlacionando com a curva padrão de xilose a 540 nm (Apêndice 1). Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose, sob as condições do ensaio.

A atividade específica (U/mg) foi determinada como a razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas solúveis (mg/mL). A produtividade enzimática (*P*) foi calculada conforme a Equação 3, onde *A<sub>t</sub>* é a atividade de xilanase (U/mL) no tempo *t<sub>t</sub>* (h), enquanto *A<sub>0</sub>* é a atividade de xilanase (U/mL) no tempo inicial de cultivo (*t<sub>0</sub>*).

$$P = \frac{A_t - A_0}{t_t - t_0} \quad (3)$$

### 2.3.2 Proteínas solúveis e pH

A concentração de proteína solúvel foi determinada segundo Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão (Apêndice 1). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital de acordo com a AOAC n° 972.44 (AOAC, 2000).

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a análise estatística do DFF, os efeitos principais e a significância das variáveis independentes (fatores) sobre a atividade da xilanase foram analisados sob os níveis de significância de 10% ( $p < 0,1$ ) e 15% ( $p < 0,15$ ); enquanto na avaliação do DCC, os efeitos principais e interativos, bem como os termos significativos, foram estimados à 5% de significância ( $p < 0,05$ ). Posteriormente, os dados do DCC foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) fatorial a  $p < 0,05$  com o intuito de avaliar a preditividade do modelo de primeira ordem. O ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e pelo  $R^2$  ajustado. As análises estatísticas do DFF e do DCC, bem como as curvas de contorno, foram realizadas no software *Protimiza Experimental Design* (Protimiza, Campinas, Brasil).

Para a análise estatística dos ensaios adicionais com réplicas e único fator, os dados foram submetidos à ANOVA univariável (*One-way ANOVA*) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando o software *Statistica 5.0* (Statsoft Inc., Tulsa, Estados Unidos). Em todas as análises estatísticas, os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos foram previamente verificados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 SELEÇÃO DE VARIÁVEIS ATRAVÉS DO DELINEAMENTO FRACIONÁRIO

Os delineamentos fracionários são aplicados para fins de triagem e permitem a distinguir os fatores significativos dos não significativos no estágio inicial da experimentação (GUNST; MASON, 2009; MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). Neste sentido, o DFF  $2^{6-2}$  foi utilizado para selecionar os principais fatores que influenciam na produção de xilanase. A Tabela 2 apresenta os valores reais e codificados para o DFF  $2^{6-2}$  e as atividades de xilanase em 96 h de cultivo. A cinética da produção de xilanase, o comportamento do pH e o conteúdo de proteínas solúveis durante o cultivo submerso são ilustrados na Figura 1.

De acordo com a Tabela 2, a produção de xilanase variou de  $< 0,01$  (ensaio 14) a 39,2 U/mL (ensaio 8). Esta ampla variação na atividade enzimática sugere que a composição do meio e as condições de cultura exercem influência na produção de xilanase. A reprodutibilidade dos ensaios foi verificada pelo baixo coeficiente de variação (5,4%) nos pontos centrais (ensaios 17 a 19). A maior produção de xilanase foi alcançada no ensaio 8 (39,2 U/mL), o que resultou em uma produtividade enzimática ( $P$ ) de 0,41 U/mL.h em 96 h de cultivo. No ensaio 8, a produção de xilanase aumentou gradualmente até 72 h e permaneceu

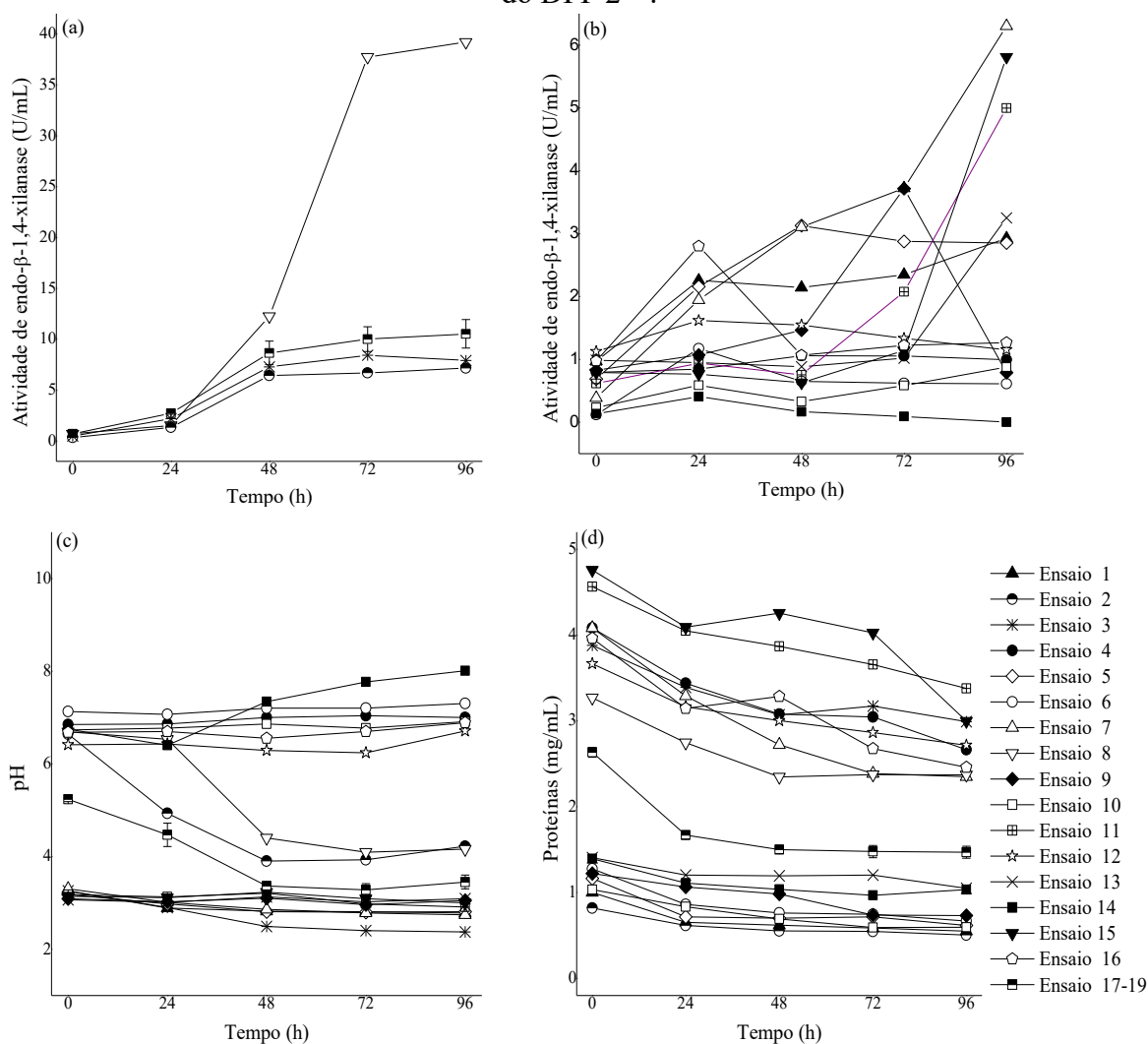
praticamente constante até 96 h de cultivo (Figura 1a). Além disso, o pH diminuiu do seu valor inicial (7,0) após a produção expressiva de xilanase (ou seja, entre 24 h e 48 h), alcançando o valor de 4,1 em 96 h de cultivo (Figura 1c). O ensaio 2 e os ensaios 17-19 (pontos centrais) apresentaram cinética de produção de xilanase e diminuição do pH semelhantes ao observado no ensaio 8. Ainda, estudos anteriores apresentaram cinética similar de produção de xilanase e queda do pH durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 em meio contendo farelo de arroz (GAUTÉRIO et al., 2018). Conforme mencionado por Yegin et al. (2017), a queda no valor do pH do meio de cultivo pode ser explicada pelo rápido consumo de carboidratos solúveis facilmente metabolizáveis, resultando na síntese de metabólitos ácidos.

**Tabela 2** – Valores reais e codificados (em parênteses) para o DFF 2<sup>6-2</sup> e atividade de xilanase (variável resposta) em 96 h de cultivo.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>4</sub> (°C)	X <sub>5</sub> (g/L)	X <sub>6</sub> (g/L)	AX (U/mL)
1	-1 (3)	-1 (10)	-1 (0,5)	-1 (24)	-1 (0)	-1 (0)	3,0
2	1 (7)	-1 (10)	-1 (0,5)	-1 (24)	1 (5)	-1 (0)	7,3
3	-1(3)	1 (50)	-1 (0,5)	-1 (24)	1 (5)	1 (5)	7,9
4	1 (7)	1 (50)	-1 (0,5)	-1 (24)	-1 (0)	1 (5)	1,0
5	-1 (3)	-1 (10)	1 (1,5)	-1 (24)	1 (5)	1 (5)	2,9
6	1 (7)	-1 (10)	1 (1,5)	-1 (24)	-1 (0)	1 (5)	0,7
7	-1 (3)	1 (50)	1 (1,5)	-1 (24)	-1 (0)	-1 (0)	6,3
8	1 (7)	1 (50)	1 (1,5)	-1 (24)	1 (5)	-1 (0)	39,2
9	-1 (3)	-1 (10)	-1 (0,5)	1 (32)	-1 (0)	1 (5)	0,8
10	1 (7)	-1 (10)	-1 (0,5)	1 (32)	1 (5)	1 (5)	0,9
11	-1 (3)	1 (50)	-1 (0,5)	1 (32)	1 (5)	-1 (0)	5,1
12	1 (7)	1 (50)	-1 (0,5)	1 (32)	-1 (0)	-1 (0)	1,2
13	-1 (3)	-1 (10)	1 (1,5)	1 (32)	1 (5)	-1 (0)	3,3
14	1 (7)	-1 (10)	1 (1,5)	1 (32)	-1 (0)	-1 (0)	<0,01
15	-1 (3)	1 (50)	1 (1,5)	1 (32)	-1 (0)	1 (5)	5,8
16	1 (7)	1 (50)	1 (1,5)	1 (32)	1 (5)	1 (5)	1,3
17	0 (5)	0 (30)	0 (1)	0 (28)	0 (2,5)	0 (2,5)	9,8
18	0 (5)	0 (30)	0 (1)	0 (28)	0 (2,5)	0 (2,5)	9,3
19	0 (5)	0 (30)	0 (1)	0 (28)	0 (2,5)	0 (2,5)	10,6

Legenda: X<sub>1</sub>: pH inicial; X<sub>2</sub>: Farelo de arroz; X<sub>3</sub>: Extrato de levedura; X<sub>4</sub>: Temperatura; X<sub>5</sub>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; X<sub>6</sub>:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; AX: Atividade de xilanase.

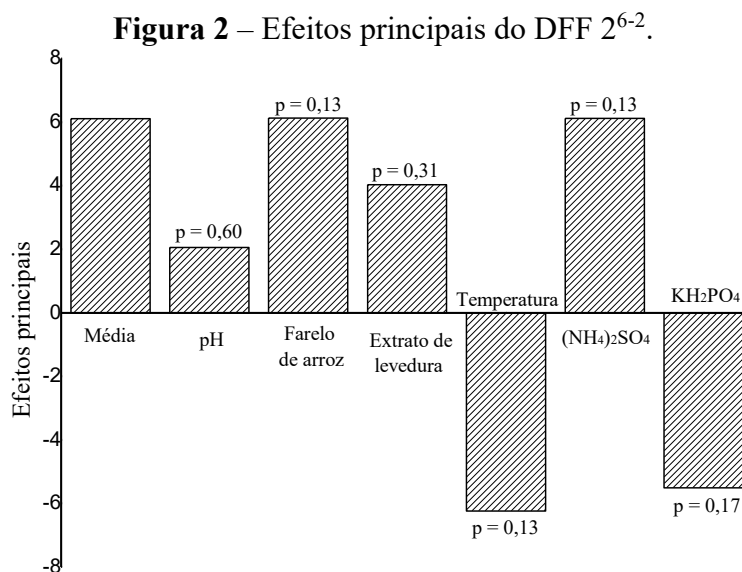
**Figura 1** – Cinética de produção de xilanase (a,b), comportamento do pH (c) e conteúdo de proteínas solúveis (d) durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 nas condições dos ensaios do DFF 2<sup>6-2</sup>.



No ensaio 14, nenhuma atividade enzimática foi detectada em 96 h de cultivo. Além disso, a produção de enzimas permaneceu na faixa de 0,4 a 0,1 U/mL entre 24 h e 72 h (Figura 1b), respectivamente. Neste ensaio, o pH aumentou do seu valor inicial (7,0) para 8,0 em 96 h de cultivo, o que pode indicar a não ocorrência da hidrólise da xilana e baixa produção da enzima. Os ensaios 7, 11, 13 e 15 apresentaram produção crescente de xilanase até 96 h de cultivo, no entanto, a atividade enzimática foi baixa (Figura 1b). Nos ensaios 7 e 11, o pH diminuiu levemente entre 48 e 96 h, enquanto nos ensaios 15 e 13 o pH permaneceu praticamente constante até o final do cultivo (Figura 1c). Em oposição, os ensaios 3 e 9 mostraram um aumento na produção de xilanase até 72 h e uma diminuição posterior em 96 h de cultivo (Figura 1a).

Conforme a Figura 1d, a concentração de proteína diminuiu em todos os ensaios, provavelmente devido ao seu consumo pela levedura. Ainda, o conteúdo inicial de proteína variou conforme a concentração de farelo de arroz no meio de cultura. A maior atividade específica (15,9 U/mg em 72 h de cultivo) foi obtida no ensaio 8, que também apresentou a maior produção de xilanase. Embora o experimento 2 tenha apresentado menor produção da enzima comparado à obtida nos pontos centrais, este apresentou maior atividade específica (12,2 U/mg) em 72 h de cultivo, a qual pode ser atribuída à baixa concentração de farelo de arroz. A atividade específica nos pontos centrais foi de  $6,3 \pm 0,2$  U/mg.

Durante a seleção de variáveis em planejamentos facionários, é mais adequado aceitar valores de  $p$  acima de 0,05 do que não selecionar algum fator importante para o processo (RODRIGUES; IEMMA, 2012), especialmente na área de bioprocessos como exemplificado por alguns estudos (BRAGA; GOMES; KALIL, 2012; SILVA et al., 2016; TREICHEL et al., 2009). Os efeitos principais do pH inicial, temperatura e concentrações de farelo de arroz, extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na produção de xilanase, são mostrados na Figura 2. Embora nenhuma das seis variáveis tenha apresentado significância estatística a 90% de confiança, os valores de  $p$  para a temperatura, concentração de farelo de arroz e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram próximos de 0,10 (Figura 2). Em 85% de confiança, as três variáveis foram estatisticamente significativas ( $p < 0,15$ ) na produção de xilanase. Isto é, uma mudança nas concentrações de farelo de arroz e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do menor (-1) para o maior (+1) nível leva ao aumento da produção de xilanase, enquanto o acréscimo da temperatura do menor (-1) para o maior (+1) nível resulta na sua diminuição.

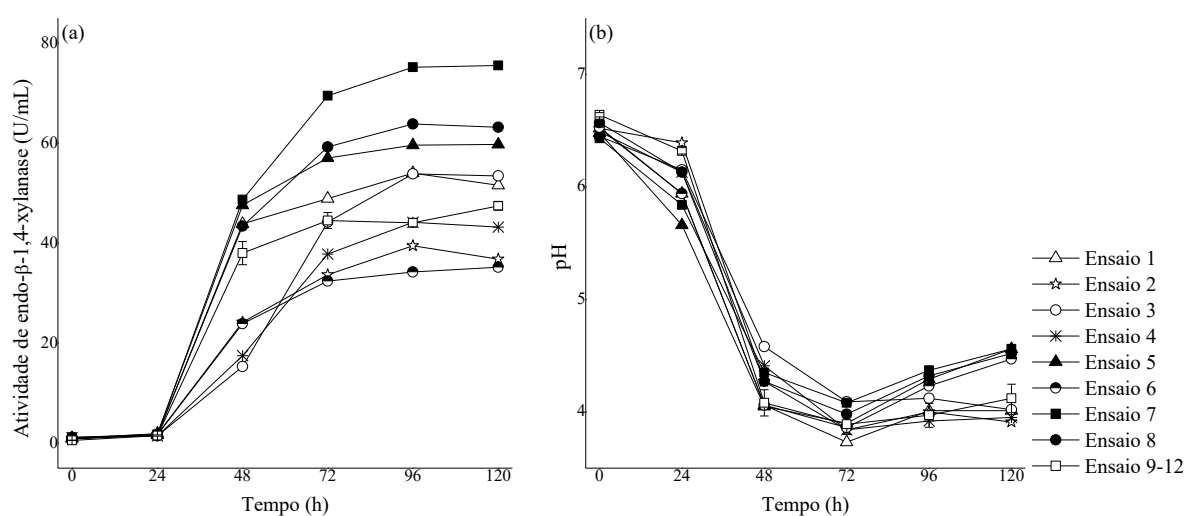


A partir destes resultados, os três fatores foram selecionados para os ensaios de maximização da produção de xilanase por DCC. Devido ao efeito positivo na produção de xilanase, o pH inicial de cultivo e a concentração do extrato de levedura foram fixados no nível mais alto (isto é, 7,0 e 1,5 g/L, respectivamente) para a realização do DCC. Uma vez que a ausência de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  foi avaliada no nível mais baixo (-1), esse fator foi removido da matriz do DCC devido ao seu efeito negativo na produção de xilanase. Assim, os próximos cultivos foram realizados sem a adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.2 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILANASE

Os delineamentos compostos centrais têm sido aplicados para maximizar a produção de xilanases microbianas (DESAI; IYER, 2017; SHARMA; BAJAJ, 2018). No presente estudo, o DCC  $2^3$  foi utilizado para maximizar a produção de xilanase, sendo este composto pelos fatores selecionados no DFF. Os intervalos de temperatura, concentração de farelo de arroz e concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foram ajustados conforme seus efeitos principais sobre a atividade da xilanase. A Tabela 3 apresenta os valores codificados e reais para o DCC  $2^3$  e as atividades de xilanase em 72 h de cultivo. A cinética da produção de xilanase e o comportamento do pH durante o cultivo são ilustrados na Figura 3.

**Figura 3** – Cinética de produção de xilanase (a) e comportamento do pH durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 nas condições dos ensaios do DCC  $2^3$ .



Conforme exposto na Tabela 3, as atividades enzimáticas variaram de 32,4 (ensaio 6) a 69,5 U/mL (ensaio 7) em função das condições de cultivo. Em todos os ensaios, a produção

de xilanase aumentou gradualmente até 72 h e permaneceu constante entre 72 e 96 h de cultivo (Figura 3a). Portanto, a variável resposta do DCC foi a atividade de xilanase em 72 h de cultivo, tempo no qual também foi observado alta produtividade enzimática. A maior produção de xilanase foi alcançada no ensaio 7 (69,5 U/mL) (Tabela 3), cuja atividade específica e *P* foram de 20,1 U/mg e 0,96 U/mL.h, respectivamente. Em todos os ensaios, o pH diminuiu do seu valor inicial (7,0) após a produção expressiva de xilanase, atingindo valores entre 4,1 e 4,6 em 48 h de cultivo (Figura 3b). Em 72 h, o pH se manteve entre 3,8 a 4,1, dependendo das condições experimentais, e retornou a aumentar entre 96 e 120 h de cultivo (Figura 3b).

**Tabela 3** – Valores reais e codificados (em parênteses) para o DCC 2<sup>3</sup>, atividade de xilanase em 72 h de cultivo (variável resposta), valores preditos pelo modelo e desvio relativo.

Ensaio	X <sub>1</sub> (g/L)	X <sub>2</sub> (g/L)	X <sub>3</sub> (°C)	AX (U/mL)	AXP (U/mL)	DR (%)
1	-1 (3,6)	-1 (38,1)	-1 (21,6)	48,9	50,1	-2,5
2	1 (8,4)	-1 (38,1)	-1 (21,6)	33,7	30,2	10,4
3	-1(3,6)	1 (61,9)	-1 (21,6)	44,8	44,5	0,7
4	1 (8,4)	1 (61,9)	-1 (21,6)	37,8	35,9	5,1
5	-1 (3,6)	-1 (38,1)	1 (26,4)	57,0	53,6	6,1
6	1 (8,4)	-1 (38,1)	1 (26,4)	32,4	33,6	-3,8
7	-1 (3,6)	1 (61,9)	1 (26,4)	69,5	67,5	2,8
8	1 (8,4)	1 (61,9)	1 (26,4)	59,2	58,9	0,6
9	0 (6)	0 (50)	0 (24)	46,6	46,8	-0,4
10	0 (6)	0 (50)	0 (24)	43,6	46,8	-7,4
11	0 (6)	0 (50)	0 (24)	43,1	46,8	-8,7
12	0 (6)	0 (50)	0 (24)	44,9	46,8	-4,3

Legenda: X<sub>1</sub>: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; X<sub>2</sub>: Farelo de arroz; X<sub>3</sub>: Temperatura; AX: Atividade de xilanase; AXP: Atividade de xilanase predita; DR: desvio relativo.

O baixo coeficiente de variação (3,6%) no ponto central (ensaios 9-12, 44,5 ± 1,6 U/mL) sugere boa reprodutibilidade dos ensaios. As variáveis significativas codificadas e a variável resposta do DCC foram utilizadas para calcular os coeficientes de regressão, erro padrão, valores de *p* e *t*, como mostra a Tabela 4. A interação entre o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a temperatura foi o único efeito não significativo (*p*>0,05), sendo este adicionado à falta de ajuste para o cálculo dos parâmetros da ANOVA.

Conforme mostra a Tabela 5, o teste F para regressão foi significativo (*p*<0,05), uma vez que o valor de *F*<sub>cal</sub> foi 5,2 vezes maior que *F*<sub>tab</sub>. Em outras palavras, o modelo foi



preditivo e pode explicar o efeito da temperatura e das concentrações de farelo de arroz e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na produção de xilanase por *A. pullulans* em cultivo submerso. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,95 indicou que apenas 5% da variação total da resposta não pode ser explicada pelo modelo (Tabela 5). O valor do coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  adj, 0,93) também foi alto o suficiente para indicar o bom ajuste modelo. Na Tabela 4, a baixa porcentagem de variação entre a resposta observada e a predita pelo modelo sugere a precisão do delineamento experimental dentro da faixa estudada.

**Tabela 4** – Coeficientes de regressão (CR), erro padrão (EP), valores de  $p$  e  $t$  obtidos no DCC  $2^3$  para a atividade de xilanase.

Fator	CR	EP	t(5)	p*
Média	46,78	0,85	55,16	<0,01
X <sub>1</sub>	-7,13	1,04	-6,86	<0,01
X <sub>2</sub>	4,91	1,04	4,73	<0,01
X <sub>3</sub>	6,62	1,04	6,37	<0,01
X <sub>1</sub> × X <sub>2</sub>	2,82	1,04	2,71	0,04
X <sub>1</sub> × X <sub>3</sub>	-1,58	1,04	-1,52	0,19
X <sub>2</sub> × X <sub>3</sub>	4,90	1,04	4,72	<0,01

\*Nível de significância de 0.05; Legenda: X<sub>1</sub>:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; X<sub>2</sub>: Farelo de arroz; X<sub>3</sub>: Temperatura.

**Tabela 5** – ANOVA fatorial do DCC para a atividade de xilanase.

Fonte de variação	SQ	GL	MQ	F <sub>cal</sub>	F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>adj</sub>
Regressão	1205,7	5	241,2	22,9	5,2	0,95	0,93
Resíduo	63,1	6	10,5				
Falta de ajuste	55,5	3	18,5	7,4			
Erro puro	7,5	3	2,5				
Total	1268,8	11					

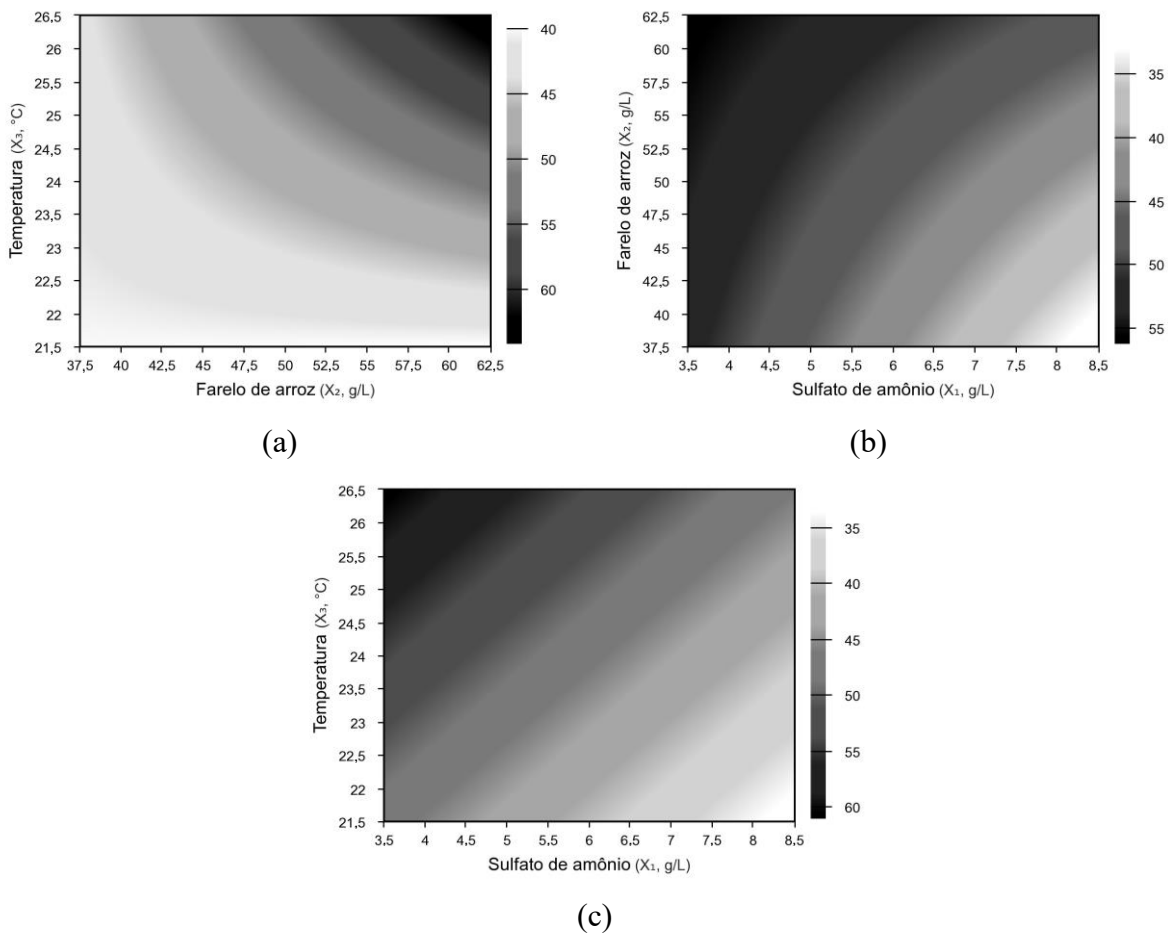
Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados; F<sub>tab</sub> ( $p < 0,05$ ) = 4,38.

A partir dos resultados da ANOVA fatorial e dos coeficientes de regressão, um modelo de primeira ordem (Equação 4) foi estabelecido a partir das variáveis codificadas, a fim de descrever o comportamento da atividade da xilanase em função da temperatura e concentrações de farelo de arroz e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , como segue:

$$\text{Atividade de xilanase (U/mL)} = 46,78 + (-7,13 \times X_1) + (4,90 \times X_2) + (6,61 \times X_3) + (2,82 \times X_1 \times X_2) + (4,89 \times X_2 \times X_3) \quad (4)$$

onde  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são os valores codificados que representam a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , concentração de farelo de arroz e temperatura, respectivamente. Entre os três fatores avaliados, a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  exerceu o maior impacto na produção de xilanases, uma vez que apresentou o maior valor absoluto de coeficiente de regressão (7,13). Simultaneamente, a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi a única variável independente com efeito negativo sobre a atividade da xilanase. A partir do modelo preditivo descrito na Equação 4, as curvas de contorno foram construídas, conforme ilustra as Figuras 4a-c.

**Figura 4** – Curvas de contorno para a atividade de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261.



As curvas de contorno foram plotadas com o intuito de compreender as interações entre as variáveis independentes e determinar seus valores para atingir a máxima produção de

xilanase. Além disso, as curvas de contorno foram construídas considerando as interações entre dois fatores e mantendo o terceiro fator no nível zero. A Figura 4a ilustra graficamente o efeito da variação da temperatura e da concentração de farelo de arroz na atividade da xilanase, mantendo a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fixa no ponto central. Esta sugere que a mudança do nível mais baixo (-1) para o mais alto (+1) de temperatura e concentração de farelo de arroz causa o aumento significativo na atividade da xilanase.

Em contraste, a Figura 4b ilustra que as concentrações de farelo de arroz e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  apresentaram efeitos opostos na atividade da xilanase, isto é, a concentração de farelo de arroz no nível mais alto (+1) e a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no nível mais baixo (-1) leva ao incremento na variável resposta. A Figura 4c demonstra que uma alta produção da enzima é alcançada mantendo a temperatura no nível mais alto (+1) e a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no nível mais baixo (-1). Baseado nas três curvas de contorno, as melhores condições para a produção de xilanase são as mesmas do ensaio 7, ou seja, 3,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 61,9 g/L de farelo de arroz e 26,4 °C, dentro da faixa avaliada. Para verificar a precisão do modelo, o ensaio de validação foi conduzido em quadruplicata nas condições do ensaio 7. A atividade da xilanase, a atividade específica e o *P* obtidos foram de  $70,9 \pm 1,2$  U/mL,  $21,4 \pm 0,5$  U/mg e  $0,98 \pm 0,2$  U/mL.h, respectivamente, em 72 h de cultivo. A boa concordância entre a resposta experimental e a predita ( $\text{DR} = 4,8\%$ ) confirmou a reprodutibilidade do modelo.

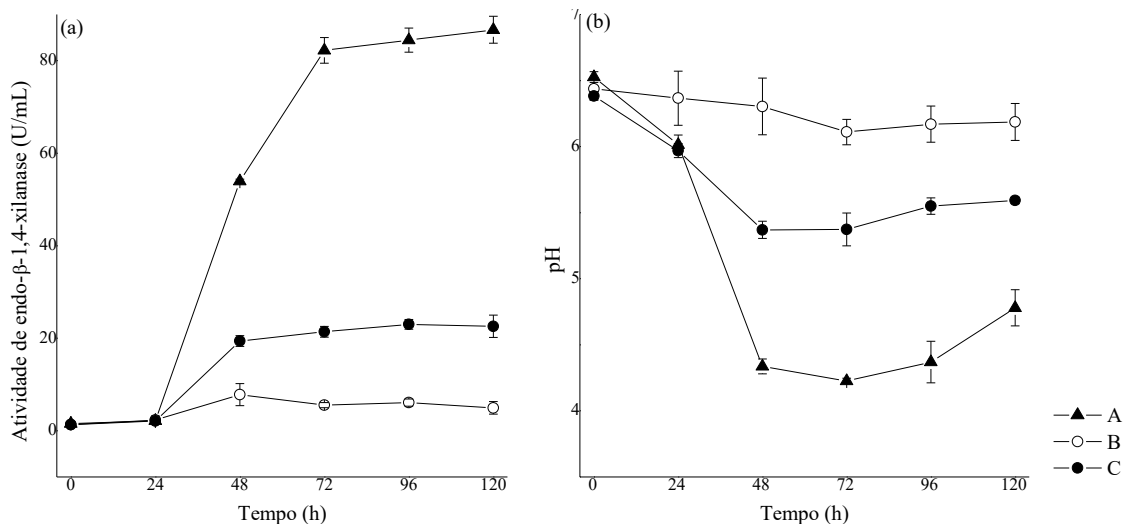
Com base nas curvas de contorno, que indicaram o favorecimento da produção enzimática com o aumento da temperatura, foram realizados cultivos adicionais utilizando a mesma formulação do meio do ensaio 7, porém a 28 °C (ensaio A) e a 30 °C (ensaio B), conforme disposto na Tabela 6. As atividades da xilanase foram 82,2 U/mL e 5,5 U/mL a 28 °C (ensaio A) e 30 °C (ensaio B), respectivamente. Isto indica que o aumento de temperatura até 28 °C é favorável para a produção de xilanase, mas acima deste valor, a produção de enzimas cai drasticamente. Em outras palavras, a produção da enzima se mostra sensível ao pequeno incremento de temperatura. A atividade da xilanase a 28 °C foi estatisticamente ( $p < 0,05$ ) maior que a obtida à 26,4 °C (Tabela 6).

Uma vez que baixas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  contribuíram para a produção de xilanase, outro cultivo foi realizado com 2g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 61,9 g/L de farelo de arroz e 28 °C (ensaio C). Nestas condições, a atividade máxima da xilanase foi de 21,4 U/mL, indicando que concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  inferiores a 3,6 g/L não são favoráveis na produção da enzima. A cinética da produção de xilanase e o comportamento do pH nos ensaios A-C são mostrados na Figura 5.

**Tabela 6** – Validação do DCC e cultivos adicionais.

Ensaio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Temperatura	Farelo	AX	<i>P</i>
	(g/L)	(°C)	(g/L)	(U/mL)	(U/mL.h)
Validação DCC	3,6	26,4	61,9	70,9 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,02 <sup>b</sup>
A	3,6	28	61,9	82,2 ± 2,8 <sup>a</sup>	1,18 ± 0,04 <sup>a</sup>
B	3,6	30	61,9	5,5 ± 0,6 <sup>d</sup>	0,08 ± < 0,01 <sup>d</sup>
C	2	28	61,9	21,4 ± 1,3 <sup>c</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>c</sup>

Média ± desvio padrão (n= 3). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey (p>0,05). Legenda: AX: Atividade de xilanase em 72 h de cultivo. *P*: produtividade enzimática.

**Figura 5** – Cinética de produção de xilanase e comportamento do pH durante o cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 nas condições dos ensaios A-C.

No ensaio A, a produção de xilanase aumentou gradualmente até 72 h e permaneceu praticamente constante entre 72 e 120 h de cultivo. Além disso, o pH diminuiu drasticamente do valor inicial (7,0) após a produção expressiva de xilanase, atingindo um valor de pH de 4,2 em 72 h de cultivo, comportamento este também observado na melhor condição do DCC. No ensaio C, a produção de xilanase aumentou entre 24 h e 48 h e permaneceu constante até o final do cultivo, e o pH diminuiu de modo menos drástico comparado ao ensaio A, alcançando o valor de pH de 5,4 em 72 h de cultivo. Por outro lado, o pH no ensaio B permaneceu praticamente constante durante todo o cultivo, o que é consistente com os resultados de baixa produção de enzimas relatada em estudos realizados anteriormente (GAUTÉRIO et al., 2018).

### 3.3 DISCUSSÃO

A produção microbiana de xilanases em cultivo submerso é grandemente influenciada por parâmetros físicos e nutricionais, como pH, temperatura, agitação/aeração, fonte de carbono, fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, entre outros (UDAY et al., 2016; WALIA et al., 2017). Mais especificamente, o presente estudo mostrou que a produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 foi favorecida com o incremento na concentração de farelo de arroz e na temperatura, mas diminuiu em temperaturas acima de 28 °C. Além disso, a produção da enzima diminuiu quando a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  excedeu 3,6 g/L.

Os subprodutos agrícolas contendo xilana podem ser usados como fonte de carbono para o crescimento microbiano e como indutores da produção de xilanase (MARTINS et al., 2018). Como mencionado por Palaniappan et al. (2017), a xilana do farelo de arroz possui estrutura altamente ramificada formada por ligações  $\beta$ -glicosídicas e  $\alpha$ -L-arabinofuranose com resíduos de acetil e ácido glicurônico, característica que a torna uma fonte adequada para a produção de xilanase. Estudos anteriores mostraram que o farelo de arroz contém 29,6% de hemicelulose (GAUTÉRIO et al., 2018), logo o aumento na concentração de farelo de arroz fornece maiores quantidades de xilana para a indução enzimática. Ainda, inúmeros estudos relataram que o incremento na concentração do substrato lignocelulósico favorece a produção de xilanase (KALLEL et al., 2016; KUMAR et al., 2012; SHARMA; BAJAJ, 2018).

Khurana et al. (2007) observaram que o incremento na concentração de farelo de trigo de 5 para 35 g/L aumentou a produção de xilanase por *Streptomyces* sp. No entanto, a produção de xilanase diminuiu quando altas concentrações de farelo de trigo (45 g/L) foram empregadas, o que pode ser explicado pela mistura inadequada do substrato nos frascos agitados ou pelo acúmulo de açúcares redutores no meio de cultivo. Yegin (2016) também observou que o aumento na concentração de haste de alcachofra de 10 para 50 g/L favoreceu a produção de xilanase por *A. pullulans* NRRL Y-2311-1. Contudo, devido à característica insolúvel deste substrato, concentrações acima de 50 g/L dificultaram o ajuste do pH inicial do meio. No presente estudo, concentrações de farelo de arroz acima de 61,9 g/L não foram avaliadas devido à difícil homogeneização do meio.

De acordo com os resultados do DFF  $2^{6-2}$ , o aumento na concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na faixa de 0 a 5 g/L demonstrou efeito positivo na produção de xilanase. Por outro lado, o incremento na concentração do sal no DCC de 3,6 g/L para 8,4 g/L causou a diminuição na produção da enzima. Ensaios adicionais utilizando 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  também resultaram em baixa secreção de xilanase. Com base nestes resultados, a ausência de fonte de nitrogênio

inorgânico no meio, bem como sua alta concentração, não foram favoráveis à indução enzimática. Conforme relatado anteriormente (GAUTÉRIO et al. 2018), o farelo de arroz contém 14% de proteína, o que o torna uma fonte de nitrogênio orgânico. O meio de cultura também contém 1,5 g/L de extrato de levedura, previamente estabelecido no delineamento fracionário. Além disso, o farelo de arroz e o extrato de levedura têm outros nutrientes, como vitaminas e sais minerais (GUL et al., 2015; MARTINS et al., 2018), que podem contribuir para o crescimento da levedura. Assim, o uso de altas concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pode levar ao excesso de nutrientes no meio, resultando em supressão metabólica e diminuição na produção de xilanase.

Na seleção de variáveis através do delineamento Plackett-Burman, Andrade et al. (2015) constataram o incremento na produção de xilanase por *Cryptococcus flavescens* quando a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aumentou de 0 para 2 g/L no meio de cultura. Por outro lado, a produção da enzima foi afetada negativamente pelo aumento da concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 1,32 para 4,68 g/L nos ensaios do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Os autores também utilizaram outras fontes de nitrogênio no meio, como extrato de levedura e peptona. Bankeeree et al. (2016) otimizaram a produção de xilanase por *A. pullulans* CBS 135684 através dos delineamentos Plackett-Burman e Box-Behnken. Nos dois desenhos experimentais, o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  causou efeito positivo na produção de xilanase, sendo o valor de 3 g/L considerado o ótimo para a indução da enzima.

A temperatura pode ser considerada um fator crítico na produção de xilanase, uma vez que regula a produção de enzimas por micro-organismos (WALIA et al., 2017). Embora as mudanças fisiológicas promovidas pela temperatura durante a produção de enzimas não sejam bem compreendidas, sabe-se que sob altas temperaturas os micro-organismos sintetizam apenas um número reduzido de proteínas essenciais para o crescimento e outros processos fisiológicos (PAL; KHANUM, 2010; UDAY et al., 2016). De acordo com os resultados do DFF, DCC e ensaios adicionais variando apenas a temperatura, a produção de xilanase foi favorecida até 28 °C, mas caiu drasticamente acima de 30 °C. Comportamento semelhante foi relatado por Yegin (2016) durante a produção de xilanase por *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 na faixa entre 26 °C e 30 °C. Da mesma forma, Nasr et al. (2013) observaram a maior produção de xilanase por *A. pullulans* SN090 a 27 °C e nenhuma atividade enzimática a 33 °C. A levedura *A. pullulans* é capaz de produzir diversas enzimas na faixa entre 24 a 32 °C (LEATHERS et al., 2013; LEITE et al., 2008; LI et al., 2007b; RICH et al., 2013; YEGIN et al., 2017), e frequentemente exhibe máxima produção enzimática a 28 °C (LI et al., 2007b; YEGIN, 2017a), dependendo das outras condições de cultivo.

Os cultivos realizados a 30 °C e 32 °C exibiram turvação ou formação de pigmento escuro no meio de cultura, o que não ocorreu nos demais ensaios. A turbidez foi observada nos ensaios conduzidos a 32 °C e com alta concentração de farelo de arroz (50 g/L). A turbidez pode ter ocorrido devido à baixa produção de xilanase e conseqüente alta concentração de polissacarídeos remanescentes (isto é, baixa hidrólise da xilana contida no farelo de arroz). Em relação à formação de pigmento escuro, alguns estudos mencionam que a levedura *A. pullulans* produz pigmento semelhante à melanina durante o desenvolvimento de clamidósporos na fase final de crescimento (CHI et al., 2009; HOOG; YURLOVA, 1994; LI et al., 2009). Devido à sua característica polimórfica, *A. pullulans* pode apresentar morfologia distinta, dependendo do seu ciclo de vida, que varia de formas unicelulares (isto é, pequenas células elípticas típicas de leveduras, blastosporos e clamidósporos) a filamentos alongados contendo septos e ramificações (CAMPBELL et al., 2004; RAMOS; GARCÍA-ACHA, 1975). Além disso, fatores ambientais como temperatura e pH, além da composição do meio de cultivo, podem influenciar a morfologia e conseqüente produção de pigmentos por cepas de *A. pullulans* (LI et al., 2009; MCNEIL; KRISTIANSEN, 1990; SIMON; CAYE-VAUGIEN; BOUCHONNEAU, 1993; WU et al., 2010). Até o momento, não foram encontrados relatos descrevendo a relação entre a morfologia de *A. pullulans* e a indução de xilanase, bem como a influência da formação de pigmento escuro na produção de enzimas.

Neste estudo, a produção de xilanase foi maximizada a partir do uso de dois delineamentos experimentais e cultivos adicionais. A atividade máxima da xilanase ( $82,2 \pm 2,8$  U/mL) foi obtida sob as seguintes condições de cultivo: 3,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g/L de extrato de levedura, 61,9 g/L de farelo de arroz, pH inicial de 7,0 e 28 °C. Após os ensaios experimentais, a atividade da xilanase foi 7 vezes maior do que a obtida nas condições iniciais de cultivo (11,7 U / mL) (GAUTÉRIO et al., 2018). Atividade semelhante de xilanase foi obtida por Yegin et al. (2017) (85,2 U/mL) sob condições otimizadas de cultivo de *A. pullulans* Y-2311-1 utilizando farelo de trigo como substrato. Por outro lado, a atividade da xilanase alcançada neste estudo foi maior do que a obtida no cultivo submerso de *A. pullulans* Y-2311-1 em meio contendo haste de alcachofra (66,5 U/mL) (YEGIN, 2016). A atividade de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 também foi superior a obtida por outros micro-organismos como *Aspergillus flavus* (61,2 U/mL) (MARTINS et al., 2018), *Thielaviopsis basicola* (59,6 U/mL) (RANI et al., 2014), *Bacillus mojavensis* (41,9 U/mL) (KALLEL et al., 2016) e co-culturas de *Bacillus subtilis* e *Kluyveromyces marxianus* (49,5 U/mL) (YARDIMCI; CEKMECELIOGLU, 2018), em cultivo submerso utilizando substratos agrícolas como fonte de xilana.

#### 4 CONCLUSÃO

A produção de xilanase por *A. pullulans* CCT 1261 foi maximizada a partir do uso de dois delineamentos experimentais e cultivos adicionais. A máxima produção de xilanase (82,2 U/mL) em foi obtida em 72 h de cultivo utilizando 3,6 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 g/L de extrato de levedura, 61,9 g/L de farelo de arroz, pH inicial de 7,0 e 28 °C. Após a maximização, a atividade da xilanase foi 7 vezes maior do que a obtida nas condições iniciais de cultivo (11,7 U/mL). Sendo assim, o farelo de arroz demonstrou ser uma fonte potencial de xilana na indução de xilanase microbiana, contribuindo tanto para a redução parcial dos custos de produção, como na mitigação do impacto ambiental causado pelo seu descarte inadequado na natureza.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAIDE, E. R.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Reasons for processing of rice coproducts: Reality and expectations. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 240–256, 2019.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Cellulase-free-thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8 : Over-production through statistical approach , purification and bio-deinking/bio-bleaching potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 220–227, 2017.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma species*. **Food Chemistry**, v. 270, p. 86–94, 2019.

ANDRADE, C. C. P.; SANTOS, T. P.; FRANCO, S. F.; RODRIGUES, M. I.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F.; F, M. F. Optimization of xylanase production by *Cryptococcus flavescens* LEB-AY10 from steam exploded sugarcane bagasse. **Journal of Biochemical & Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 8–17, 2015.

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

ASTOLFI, V.; ASTOLFI, A. L.; MAZUTTI, M. A.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; CAMARGO, A. F.; DALASTRA, C.; KUBENECK, S.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 677–685, 2019.

ATY, A. A. A.; SALEH, S. A. A.; EID, B. M.; IBRAHIM, N. A.; MOSTAFA, F. A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129–137, 2018.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of



xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Enhanced production of cellulase-free thermoactive xylanase using corncob by a black yeast, *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 54, n. 6, p. 822–829, 2016.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for  $\beta$ -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1653–1663, 2012.

CAMPBELL, B. S.; SIDDIQUE, A. M.; MCDUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production? **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 225–228, 2004.

CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 793–804, 2009.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

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

CUNHA, L.; MARTARELLO, R.; SOUZA, P. M.; FREITAS, M. M.; BARROS, K. V. G.; FERREIRA FILHO, E. X.; HOMEM-DE-MELLO, M.; MAGALHÃES, P. O. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. **Enzyme Research**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

DESAI, D. I.; IYER, B. D. Utilization of corn cob waste for cellulase-free xylanase production by *Aspergillus niger* DX-23: medium optimization and strain improvement. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 1, p. 103–113, 2017.

DIAS, L. M.; SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; BAETA, B. E. L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 708–718, 2017.

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; GONÇALVES, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.

GHAYOUR-NAJAFABADI, P.; KHOSRAVINIA, H.; GHEISARI, A.; AZARFAR, A.; KHANAHMADI, M. Productive performance, nutrient digestibility and intestinal morphometry in broiler chickens fed corn or wheat-based diets supplemented with bacterial-

or fungal-originated xylanase. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 1, p. 165–174, 2018.

GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food – A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 2015.

GUNST, R. F.; MASON, R. L. Fractional factorial design. **WIRES Computational Statistics**, v. 1, p. 234–244, 2009.

GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 2, p. 166–169, 1997.

HOOG, G.; YURLOVA, N. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, p. 41–54, 1994.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.

KHURANA, S.; KAPOOR, M.; GUPTA, S.; KHUHAD, R. C. Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface methodology. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 144–152, 2007.

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

LEATHERS, T. D.; RICH, J. O.; ANDERSON, A. M.; MANITCHOTPISIT, P. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 10, p. 1701–1706, 2013.

LEE, N. K. Statistical optimization of medium and fermentation conditions of recombinant *Pichia pastoris* for the production of xylanase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2018.

LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.

LI, B.; ZHANG, N.; PENG, Q.; YIN, T.; GUAN, F.; WANG, G.; LI, Y. Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 293–300, 2009.

LI, H.; CHI, Z.; DUAN, X.; WANG, L.; SHENG, J.; WU, L. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the

enzyme. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 462–465, 2007b.

LIU, W.; BRENNAN, M. A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C. S. Effect of cellulase, xylanase and  $\alpha$ -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v. 234, p. 93–102, 2017.

LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.

LONG, C.; LIU, J.; GAN, L.; ZENG, B.; LONG, M. Optimization of xylanase production by *Trichoderma orientalis* using corn cobs and wheat bran via statistical strategy. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 5, p. 1277–1284, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.

MANDENIUS, C.F.; BRUNDIN, A. Bioprocess optimization, using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 6, p. 1191–1203, 2008.

MARTINS, M. D.; GUIMARÃES, M. W.; DE LIMA, V. A.; GAGLIOTI, A. L.; DA-SILVA, P. R.; KADOWAKI, M. K.; KNOB, A. Valorization of passion fruit peel by-product: Xylanase production and its potential as bleaching agent for kraft pulp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 172–180, 2018.

MAZLAN, N. A.; SAMAD, K. A.; YUSSOF, H. W.; SAUFI, S. M.; JAHIM, J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 575–584, 2019.

MCNEIL, B.; KRISTIENSEN, B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 521–526, 1990.

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

NASR, S.; SOUDI, M. R.; HATEF SALMANIAN, A.; GHADAM, P. Partial optimization of endo-1,4-beta-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 12, p. 1245–1253, 2013.

PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7563–7569, 2010.

PALANIAPPAN, A.; YUVARAJ, S. S.; SONAIMUTHU, S.; ANTONY, U. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 296–305, 2017.

PODE, R. Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 53, p. 1468–1485, 2016.

- RAMOS, S.; GARCÍA-ACHA, I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. **Transactions British Mycological Society**, v. 64, n. 1, p. 129–135, 1975.
- RANI, G. B.; CHIRANJEEVI, T.; CHANDEL, A. K.; SATISH, T.; RADHIKA, K.; NARASU, M. L.; UMA, A. Optimization of selective production media for enhanced production of xylanases in submerged fermentation by *Thielaviopsis basicola* MTCC 1467 using L16 orthogonal array. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2508–2516, 2014.
- RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; BISCHOFF, K. M. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 33–37, 2013.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2012.
- SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2016.
- SHARMA, S.; BAJAJ, B. K. Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 3, p. 1210–1219, 2018.
- SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.
- SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 489–496, 2016.
- SIMON, L.; CAYE-VAUGIEN, C.; BOUCHONNEAU, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 979–985, 1993.
- SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.
- TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 895–900, 2009.
- UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041–1054, 2016.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agriculture**

**Supply and Demand Estimates.** Disponível em:

<<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2019.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: A review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WANG, X.; LUO, H.; YU, W.; MA, R.; YOU, S.; LIU, W.; HOU, L.; ZHENG, F.; XIE, X.; YAO, B. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 516–523, 2016.

WU, S.; CHEN, H.; JIN, Z.; TONG, Q. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 1234, p. 737–741, 2010.

YARDIMCI, G. O.; CEKMECELIOGLU, D. Assessment and optimization of xylanase production using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Kluyveromyces marxianus*. **3 Biotech**, v. 8, n. 290, p. 1–10, 2018.

YEGIN, S. Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization, and application in saccharification of lignocellulosic biomass. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 441–449, 2016.

YEGIN, S. *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerin belirlenmesi. **Gıda/The Journal of Food**, v. 42, p. 1–9, 2017a.

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, 2017.

ARTIGO 3  
CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO DE XILANASE BRUTO E PARCIALMENTE  
PURIFICADO DE *Aureobasidium pullulans* E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE  
XILO-OLIGOSSACARÍDEOS



## RESUMO

Xilanases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 presentes na cadeia da xilana, e que têm sido extensivamente estudadas para produção de xilo-oligossacarídeos (XOs). Os XOs são oligômeros não digeríveis que se destacam pelo seu efeito prebiótico e diversas outras funções biológicas ao organismo humano. Para produção eficiente destes compostos por hidrólise enzimática, faz-se necessário o conhecimento das propriedades bioquímicas e termodinâmicas da enzima a ser aplicada. O presente estudo teve como objetivo a caracterização de extratos de xilanase bruto e parcialmente purificado de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, bem como sua aplicação na hidrólise de xilana de faixa para obtenção de XOs. A precipitação fracionada (0-30%/30-60%) com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) permitiu a purificação parcial das xilanases em 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,4%. Ambos os extratos exibiram temperatura e pH ótimos de 50 °C e 4,5, respectivamente, e maior estabilidade a 40 °C dentro da faixa estudada. Os parâmetros de termoestabilidade ( $k_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $\Delta H^*$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta S^*$ ) dos extratos indicaram que o incremento da temperatura entre 40 °C a 60 °C leva à desnaturação enzimática, sendo este processo endotérmico e que ocasiona o desdobramento da proteína em uma estrutura mais desordenada. Ainda, a enzima bruta apresentou menor valor da constante de Michaelis-Menten (25 mg/mL) para substrato xilana de faixa quando comparado à enzima purificada (50 mg/mL). Nas reações de hidrólise, os teores de XOs totais (7,7 mg/ml e 7,9 mg/ml) e as conversões de xilana em XOs (25,7% e 26,5%) foram estatisticamente iguais utilizando os extratos bruto ou purificado, diferindo-se apenas na quantidade de xilose produzida. Os hidrolisados obtidos apresentaram maior proporção de xilobiose e xilotriose, e menor conteúdo de XOs de maior grau de polimerização (GP).

**Palavras-chave:** Enzimas xilanolíticas. Parâmetros cinéticos. Precipitação salina. Termoestabilidade. Xilo-oligômeros.





## 1 INTRODUÇÃO

Xilanases (C.E. 3.2.1.8) são enzimas envolvidas na endo-hidrólise das ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 presentes na cadeia da xilana (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005) – principal polissacarídeo da fração hemicelulósica (GÍRIO et al., 2010) –, gerando xilo-oligossacarídeos (XOs) com diferentes graus de polimerização (GP) e eventualmente xilose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Diversas aplicações são atribuídas às xilanases nas indústrias de papel e celulose (ADHYARU et al., 2017), têxtil (ATY et al., 2018), rações animais (ALOKIKA; SINGH; SINGH, 2018) e de biocombustíveis (SHARMA; BAJAJ, 2018). Na área alimentícia, as xilanases podem ser utilizadas na clarificação de sucos (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016), na extração de óleo a partir de plantas (MARASABESSY et al., 2011), no processo de panificação (PASSARINHO et al., 2019) e na produção de XOs a partir de biomassa lignocelulósica (LIU et al., 2018; MAZLAN et al., 2019), facilitando as operações industriais e melhorando as características tecnológicas e/ou nutricionais.

Xilanases são produzidas principalmente por bactérias (KHUSRO et al., 2016), fungos filamentosos (ADHYARU et al., 2016) e leveduras (GAUTÉRIO et al., 2018). Micro-organismos produtores de xilanase normalmente secretam outras enzimas junto a estas durante o seu cultivo submerso ou em estado sólido (MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017). Dependendo do uso final da xilanase, etapas de purificação são necessárias para obtenção de extratos mais puros. Tratando-se da posterior aplicação de xilanase na produção de XOs, a purificação de extratos xilanolíticos possibilita que enzimas como  $\beta$ -xilosidases – as quais atuam na produção de xilose a partir da hidrólise dos XOs – sejam removidas, colaborando na obtenção de hidrolisados com maior pureza (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012).

Técnicas como cromatografia de troca iônica, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico e precipitação salina tem sido utilizadas na purificação de xilanases microbianas (BHARDWAJ et al., 2019; KOCABAŞ; GÜDER; ZBEN, 2015). Dentre estas, a precipitação com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em um ou mais estágios têm sido empregada isoladamente (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017) ou na primeira etapa de purificação (CHEN et al., 2019; DING; LI; HU, 2018) de xilanases. A precipitação salina apresenta vantagens como possibilidade de aumento de larga escala, o uso de equipamentos relativamente simples e baixo custo comparado à outras técnicas de purificação (PESSOA-JR; KILIKIAN, 2005; ROE, 2001). Ainda, o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> é o sal mais utilizado na precipitação de proteínas por apresentar pouca variação de solubilidade em ampla faixa de temperatura e propriedades não desnaturantes para a maioria das proteínas (SCOPES, 1994; WALSH, 2014).

Os XOs compreendem uma mistura de oligômeros formados por resíduos de xilose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019), os quais podem conter em sua estrutura grupamentos laterais como  $\alpha$ -D-glicopiranosil ácido urônico ou seu derivado metilado,

grupos acetila e resíduos de arabinofuranosil (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Os XOs podem variar quanto ao grau de ramificação e quantidade de unidades monoméricas de xilose (SAMANTA et al., 2015), sendo considerados oligômeros não digeríveis devido à habilidade em passarem pelo trato gastrointestinal superior sem serem degradados (CARVALHO et al., 2013). Devido a isto, a principal propriedade dos XOs está relacionada ao seu efeito prebiótico, estimulando o crescimento da microflora benéfica ao intestino humano e inibindo o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (AMORIM et al., 2020; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017; SAJIB et al., 2018).

Os XOs se mostram mais promissores industrialmente frente a outros oligômeros não digeríveis, tais como fruto-oligossacarídeos (FOs) e galacto-oligossacarídeos (GOs), devido à sua estabilidade sob temperaturas elevadas e pH ácido (COURTIN et al., 2009; WANG et al., 2009) e, ainda, ao seu efeito benéfico à saúde em menores doses diárias (FINEGOLD et al., 2014), ao seu preço competitivo (AMORIM et al., 2019a) e à sua capacidade única de serem obtidos a partir de biomassas lignocelulósicas (MONIZ et al., 2016). O seu caráter atóxico e não carcinogênico (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015), além de diversas propriedades biológicas (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015; HANSEN et al., 2013; LIN et al., 2016; VALLS et al., 2018; YANG et al., 2015a), torna os XOs interessantes e aplicáveis na área de alimentos (AYYAPPAN et al., 2016; FERRÃO et al., 2018; ZHANG et al., 2018) e nutrição animal (ABASUBONG et al., 2018).

Processos como auto-hidrólise (SUREK; BUYUKKILECI, 2017), hidrólise química (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009), hidrólise enzimática (SUKRI; MIMI SAKINAH, 2018), fermentação microbiana (AMORIM et al., 2018), ou a combinação destes, são utilizados na produção de oligômeros de xilose. Contudo, a obtenção de XOs por hidrólise enzimática é preferível industrialmente devido aos problemas associados aos métodos químicos e de auto-hidrólise (AACHARY; PRAPULLA, 2009). Além disso, a hidrólise enzimática conta com a especificidades das xilanases e demais enzimas auxiliares ( $\alpha$ -arabinofuranosidases,  $\beta$ -glicuronidases, acetil xilana esterase, *p*-coumaroil e feruloil esterases) envolvidas no processo de desconstrução da xilana (JUTURU; WU, 2012), não formação de produtos tóxicos, baixa liberação de monossacarídeos e operação em condições brandas de temperatura e pressão (AACHARY; PRAPULLA, 2011; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012).

Para aplicação de xilanases na produção de XOs é necessário que estas sejam caracterizadas quanto suas propriedades bioquímicas e termodinâmicas, colaborando para que o processo de hidrólise seja conduzido de forma eficiente e que resulte na máxima conversão de produto possível. Além disso, a necessidade de purificação prévia das xilanases para sua aplicação também deve ser avaliada, principalmente quando estas são obtidas através de

cultivos microbianos. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo caracterizar os extratos de xilanase bruto e parcialmente purificado de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, e aplicá-los na hidrólise de xilana de faia para obtenção de XOs.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

O micro-organismo *A. pullulans* CCT 1261 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). O farelo de arroz foi cedido gentilmente por indústria de beneficiamento de arroz da região Sul do Rio Grande do Sul; posteriormente, este foi submetido à secagem em estufa (50 °C, 24 h) e ao peneiramento (tamanho de partícula menor que 0,5 mm) e armazenado em sacos de polietileno a -18 °C até sua utilização.

A xilana de madeira de faia, os substratos sintéticos p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (pNPX), p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosídeo (pNPAF) e p-nitrofenil- $\beta$ -D glicopiranosídeo (pNPG), e o padrão de xilose foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (San Luis, Estados Unidos). Os padrões de XOs (xilobiose, xilotriose, xilotetralose e xilopentose) foram obtidos da *Megazyme* (Bray, Irlanda). A coluna cromatográfica para análise de XOs (Aminex HPX-42A, dimensão 300 mm x 7,8 mm) foi adquirida da *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, Estados Unidos). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE XILANASE

#### 2.2.1 Manutenção do micro-organismo e preparo de pré-inóculo e inóculo

Para a manutenção da cepa de *A. pullulans* CCT 1261 foram realizados repiques periódicos para tubos contendo ágar batata dextrose inclinado, sendo estes mantidos a 24 °C em estufa por 72 h. O meio de pré-inóculo e inóculo foi composto (g/L) por xilose (10), base nitrogenada de levedura (6,7) suplementada com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>) (5), asparagina (2) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (5) (CHRISTOV et al., 1997). O meio ausente de xilose foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min), e adicionado de uma solução concentrada de xilose previamente esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose (Milipore, Burlington, Estados Unidos) de 0,22  $\mu$ m.

O pré-inóculo foi preparado através da transferência da massa celular (alçada) da superfície do ágar para tubos contendo meio estéril (5 mL), sendo estes incubados em estufa a 28 °C por 24 h. Para o preparo do inóculo, o volume correspondente ao pré-inóculo (5 mL) foi vertido para frascos Erlenmeyer

de 250 mL contendo o mesmo meio estéril (45 mL), sendo estes mantidos a 28 °C e 150 rpm (agitação orbital) por 24 h.

### 2.2.2 Cultivo submerso e obtenção do extrato enzimático bruto

A produção de xilanase foi conduzida em cultivo submerso em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo meio estéril (150 mL) com a seguinte composição (g/L): farelo de arroz (61,9), extrato de levedura (1,5) e (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> (3,6) (GAUTÉRIO et al., 2020). Após a esterilização do meio em autoclave (121 °C, 15 min), os frascos foram inoculados com 2% (v/v) de inóculo com densidade óptica (DO) de 0,8 a 620 nm (SUGUMARAN et al., 2013) e mantidos a 28 °C e 150 rpm (agitação orbital) por 72 h.

Após o cultivo, o meio foi centrifugado ( $4757 \times g$  a 4°C por 30 min), e o sobrenadante foi filtrado à vácuo em membrana *Whatman* n° 1 (Milipore, Burlington, Estados Unidos) para remoção de partículas suspensas de farelo, obtendo-se assim o extrato enzimático bruto. Previamente à sua utilização, o extrato foi analisado quanto à atividade de endo-β-1,4-xilanase (item 2.7.1), teor de proteínas solúveis (item 2.7.2) e pH (item 2.7.2).

### 2.3 PURIFICAÇÃO PARCIAL DO EXTRATO BRUTO

A purificação parcial do extrato enzimático bruto foi realizada por precipitação fracionada com sulfato de amônio conforme Pal e Khanum (2011) com modificações. O extrato bruto (50 mL) foi tratado com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sólido até alcançar a saturação de 30% (m/v) conforme Scopes (1994). A adição de sal foi realizada de modo gradativo durante 30 min, mantendo o extrato sob agitação constante e em banho de gelo. Em seguida, o extrato foi mantido em repouso a 4 °C por 2 h. Após este período, o extrato foi centrifugado ( $4757 \times g$ , 4 °C, 30 min) e as proteínas precipitadas foram descartadas. A fração líquida foi tratada novamente com (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> até atingir a saturação de 60% (m/v) (SCOPES, 1994), do mesmo modo que citado anteriormente, sendo também mantida em repouso a 4 °C por 2 h. Posteriormente, uma nova centrifugação ( $4757 \times g$ , 4 °C, 30 min) foi realizada, onde o precipitado foi separado e ressuspensionado (razão igual a 0,5) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3.

Para a remoção do sal, a fração foi dialisada *overnight* e a 4 °C contra o mesmo tampão de ressuspensão. A diálise foi realizada em sacos de 25 mm × 16 mm (INLAB, São Paulo, Brasil) e monitorada pela adição do reagente de Nessler na solução tamponante. A

atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (item 2.7.1) e a concentração de proteínas solúveis (item 2.7.2) foram determinadas nas frações inicial e dialisada. O processo de purificação foi realizado em quadruplicata.

A eficiência do processo de purificação foi avaliada através do fator de purificação (FP) e recuperação enzimática (REC, %), os quais foram calculados conforme as Equações 1 e 2, respectivamente:

$$FP = \frac{A_{aef}}{A_{aei}} \quad (1)$$

$$REC (\%) = \frac{A_f \times V_f}{A_i \times V_i} \quad (2)$$

onde  $A_{aef}$  e  $A_{aei}$  são as respectivas atividades específicas (U/mg) das frações final e inicial;  $A_f$  e  $A_i$  são as respectivas atividades enzimáticas (U/mL) das frações final e inicial; e  $V_f$  e  $V_i$  (mL) são os volumes das frações final e inicial, respectivamente.

## 2.4 COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Os extratos bruto e parcialmente purificado foram analisados quanto ao conteúdo de enzimas xilanolíticas e celulases totais. Para tal, as atividades de endo- $\beta$ -1,4-xilanase,  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -glicosidases e celulases totais foram determinadas conforma o item 2.7.1. A composição enzimática foi realizada com o intuito de entender a capacidade hidrolítica dos extratos quando aplicados na hidrólise da xilana de faixa. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata.

## 2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS

### 2.5.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade de xilanase

A temperatura ótima da xilanase bruta e parcialmente purificada foi determinada através do ensaio de atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (item 2.7.1) na faixa de 35 a 70 °C, com intervalos de 5 °C, mantendo o pH fixo em 5,3 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L). O pH ótimo foi estabelecido através do ensaio da atividade enzimática a 50 °C e na faixa de pH entre 3,5 a 7,0 (tampão citrato de sódio 50 mmol/L) e 7,5 a 8,0 (tampão fosfato de sódio 50 mmol/L).

A atividade relativa (%) foi expressa como a atividade da xilanase que permaneceu após a incubação em cada temperatura ou pH em comparação com a atividade máxima observada. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

### 2.5.2 Determinação da termoestabilidade de xilanase e parâmetros termodinâmicos

A estabilidade térmica da xilanase bruta e parcialmente purificada foi investigada pela incubação dos extratos (pH original de cultivo e do tampão de ressuspensão, respectivamente) na faixa de 40 a 60 °C com intervalo de 5 °C. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar fechados para evitar as alterações de volumes causadas pela evaporação, e incubados em banho termostático na temperatura específica de estudo. Amostras foram retiradas dos frascos em períodos predeterminados, resfriadas em banho de gelo, e utilizadas na determinação da atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase (item 2.7.1). O ensaio foi conduzido até que a enzima perdesse 50% da sua atividade inicial.

A constante de desnaturação térmica ( $k_d$ , 1/s) para cada temperatura foi determinada a partir do coeficiente angular do gráfico  $-\ln(A/A_0)$  versus o tempo de incubação, em que  $A$  é a atividade de xilanase em cada tempo de amostragem e  $A_0$  é a atividade de xilanase no tempo inicial ( $t = 0$ ). A meia vida da enzima ( $t_{1/2}$ , h) foi calculada conforme a Equação 3, sendo definida como o tempo em que a atividade enzimática atinge 50% do seu valor inicial.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (3)$$

Os parâmetros termodinâmicos de desnaturação térmica da xilanase foram determinados através da equação de Arrhenius e do rearranjo da equação absoluta de Eyring, conforme as Equações 4 e 5, respectivamente:

$$\ln k_d = \ln A - \frac{\ln E_d}{RT} \quad (4)$$

$$k_d = \left(\frac{k_B T}{h}\right) e^{\left(\frac{-\Delta H^*}{RT}\right)} e^{\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)} \quad (5)$$

Onde  $k_d$  é a constante de desnaturação térmica (1/s),  $A$  é a constante de Arrhenius,  $E_d$  é a energia de ativação para desnaturação enzimática (kJ/mol),  $R$  é a constante universal dos

gases ( $8,315 \times 10^{-3}$  kJ/mol.K),  $T$  é a temperatura absoluta (K),  $k_B$  é a constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K),  $h$  é a constante de Planck ( $6,63 \times 10^{-34}$  J/s),  $\Delta H^*$  é a variação de entalpia (kJ/mol) e  $\Delta S^*$  é a variação de entropia.

Para o cálculo dos parâmetros  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$ , a Equação 5 foi rearranjada para a Equação 6, conforme segue:

$$\ln \left( \frac{k_d}{T} \right) = - \left( \frac{\Delta H^*}{R} \right) \left( \frac{1}{T} \right) + \ln \left( \frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^*}{R} \quad (6)$$

A variação da energia livre ( $\Delta G^*$ , kJ/mol) para desnaturação da xilanase foi calculada de acordo com a Equação 7:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (7)$$

O valor  $D$  (min), que corresponde ao tempo de redução decimal ou o tempo necessário para reduzir a atividade enzimática em 90% em certa temperatura, foi calculado conforme a Equação 8. O valor  $z$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), que corresponde ao intervalo de temperatura requerido para reduzir o valor  $D$  em um ciclo logarítmico, foi calculado através do coeficiente angular do gráfico  $\log D$  versus temperatura.

$$D = \frac{2,3026}{k_d} \quad (8)$$

### 2.5.3 Determinação dos parâmetros cinéticos de reação

Os parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten (Equação 9) foram estimados utilizando xilana de faia como substrato. Para tal, a atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase foi determinada conforme o item 2.7.1 em diferentes concentrações de xilana de faia (6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 mg/mL). A interferência da xilana no meio reacional, principalmente nas concentrações mais elevadas, foi corrigida através da medição de “brancos de substrato”. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ , mg/mL) e a velocidade máxima de reação ( $V_{max}$ , U/mL) foram calculadas através do gráfico duplo-recíproco ( $1/v$  versus  $1/S$ ) conforme Lineweaver e Burk (1934) e exposto na Equação 10, onde  $[S]$  e  $v$  são a concentração de substrato e a atividade enzimática, respectivamente.



$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (10)$$

## 2.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Os XOs foram produzidos por hidrólise enzimática de xilana de faia utilizando os extratos enzimáticos bruto e parcialmente purificado. Para tal, a solução de xilana 3 % (m/v) foi preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3 e mantida *overnight* sob agitação magnética para sua completa solubilização. As hidrólises foram conduzidas em reatores encamisados contendo 75 mL do meio reacional composto por xilana de faixa 3% (m/v) e extrato enzimático (200 U/g de substrato) (AACHARY; PRAPULLA, 2009). As reações enzimáticas foram mantidas a 180 rpm (agitação mecânica), 40 °C por 32 h. Aliquotas de 3 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos e aquecidas a 100 °C por 5 min para inativação enzimática. As amostras foram centrifugação (10.000 × g a 4°C por 10 min) e os sobrenadantes foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nas condições descritas no item 2.7.3.

As concentrações de XOs e xilose nas amostras foram determinadas a partir das curvas de calibração dos padrões analíticos. O rendimento (%) foi expresso em termos de conversão de xilana em XOs, o qual foi calculado pela relação entre a massa de XOs gerados pela massa inicial de xilana nos reatores, multiplicado por cem. Todas as hidrólises foram realizadas em duplicata.

## 2.7 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.7.1 Atividades enzimáticas

A atividade de endo-β-1,4-xilanase foi determinada pela incubação (50 °C, 5 min) de 0,9 mL de xilana de faia 1% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3, e 0,1 de extrato enzimático (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Já a atividade de celulases totais foi determinada pela incubação (50 °C, 1 h) de 50 mg de papel filtro *Whatman* n° 1 (1,0 cm × 6.0 cm), 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 4,8 e 0,5 mL de extrato

enzimático (GHOSE, 1987). Ambas as reações enzimáticas foram interrompidas pela adição de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Os açúcares redutores liberados pela hidrólise da xilana ou do papel filtro foram quantificados conforme Miller (1959), correlacionando com a curva padrão de xilose ou glicose (Apêndice 1), respectivamente, a 540 nm. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de xilose ou 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por min, sob as condições do ensaio.

As atividades enzimáticas de  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -glicosidase foram determinadas pela incubação (50 °C, 3 min) de 0,2 mL de extrato enzimático e 0,8 mL de 2% (m/v) de pNPX, 2% (m/v) de pNPG ou 1% (m/v) de pNPAF, respectivamente, preparados em tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 4.8. As reações foram interrompidas pela adição de 2 mL de carbonato de sódio 20% (m/v). A quantidade de p-nitrofenol (pNP) liberada na reação foi quantificada em espectrofotômetro a 410 nm e correlacionada com a respectiva curva padrão (Apêndice 1) (TAN; MAYERS; SADDLER, 1987). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de pNP por min nas condições de ensaio.

A atividade específica (U/mg) foi determinada como a razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas solúveis (mg/mL).

### **2.7.2 Proteínas solúveis e pH**

A concentração de proteína solúvel foi determinada segundo Lowry et al. (1951) utilizando albumina de soro bovino como padrão (APÊNDICE 1). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital conforme AOAC n° 972.44 (AOAC, 2000).

### **2.7.3 Análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência**

Os sobrenadantes oriundo das reações de hidrólise foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore, Burlington, Estados Unidos), e posteriormente analisados em cromatógrafo líquido (Prominence®, Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de colunas (CTO-20A). As alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram injetadas automaticamente (SIL-20AHT) e eluídas utilizando água ultrapura (Milli-Q, Milipore, Burlington, Estados Unidos) como fase móvel de uma coluna para separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos). A coluna foi operada a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min, 50 °C durante 40 min (tempo total de corrida). A identificação e a quantificação dos XOs e xilose foram

realizadas utilizando os tempos de retenção e as curvas de calibração previamente construídas com o *pool* de padrões (1 a 10 mg/mL), respectivamente. O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution® (Shimadzu, Quioto, Japão).

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os ensaios com réplicas e único fator foram submetidos ao teste *t* ou Análise de Variância Univariável (*One-way* ANOVA) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas atendendo aos pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos. O software utilizado para o tratamento estatístico dos resultados foi o *Statistica* 5.0 (Statsoft Inc., Estados Unidos).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 PURIFICAÇÃO DE XILANASE E COMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA DOS EXTRATOS

Dentre as técnicas aplicadas para a purificação de enzimas, a precipitação salina tem sido extensivamente utilizada na obtenção de xilanases parcialmente purificadas (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017; BHARDWAJ et al., 2019; DING; LI; HU, 2018; GOLUGURI et al., 2016; PAL; KHANUM, 2011). Em geral, a precipitação de xilanases com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  é aplicada em único (WU et al., 2018a; ZHANG et al., 2012) ou em dois (CHEN et al., 2019) estágios na faixa de 20 a 90% de saturação. No presente estudo, a saturação de 60% foi empregada no segundo estágio de precipitação devido aos resultados promissores obtidos em outros estudos envolvendo a purificação de xilanases (CHEN et al., 2019; DING; LI; HU, 2018; PAL; KHANUM, 2011). Além disso, a precipitação fracionada foi utilizada na purificação de xilanases *A. pullulans* CCT 1261, uma vez que em ensaios preliminares o seu desempenho foi mais satisfatório em comparação à precipitação direta (dados não mostrados).

Durante a purificação de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261, apenas as proteínas contaminantes foram precipitadas no primeiro estágio de fracionamento (0-30%). Já no segundo estágio (30-60%), a enzima de interesse foi precipitada sem que ocorresse sua perda expressiva para a fração sobrenadante. Esta constatação foi feita através da medição da atividade de xilanase no sobrenadante e no precipitado de cada estágio (dados não mostrados). A Tabela 1 mostra os parâmetros de eficiência do processo de purificação obtidos após a precipitação fracionada e diálise da xilanase. A precipitação salina resultou em FP de 6,8 vezes e REC de 69,4%, valores superiores aos encontrados na maioria dos estudos envolvendo a

purificação parcial de xilanase com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017; BHARDWAJ et al., 2019; CHEN et al., 2019; GOLUGURI et al., 2016; WU et al., 2018a). Uma vez que atividade total da xilanase no sobrenadante do segundo estágio atingiu apenas 0,6% da atividade total inicial, uma possível desnaturação da enzima pela presença de sal pode ter ocorrido, justificando o rendimento alcançado ao final do processo.

**Tabela 1** – Purificação parcial de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-30%/30-60%).

Extrato	Atividade	Proteínas	Atividade	FP	REC (%)
	enzimática (U/mL)		específica (U/mg)		
Bruto	87,4 ± 1,5	3,4 ± < 0,1	26,8 ± 0,5	1	100
Purificado	127,9 ± 2,3	0,7 ± < 0,1	182,4 ± 4,3	6,8 ± 0,2	69,4 ± 2,0

Média ± desvio padrão (n =4). Legenda: FP – Fator de purificação; REC – Recuperação enzimática.

Chen et al. (2019) utilizaram a precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (40-60%) na primeira etapa de purificação de xilanase de *Aspergillus flavus*, alcançando FP e REC de 2,7 vezes e 46,7%, respectivamente. Na purificação de xilanase de *Aspergillus niger* DFR-5, Pal e Khanum (2011) alcançaram FP e REC de 3,8 vezes e 81,9%, nesta ordem, ao utilizarem  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (30-65%) como agente precipitante. Já Ding, Li e Hu (2018) utilizaram a precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (20-60%) como uma das técnicas de purificação de xilanase de *Pichia stipitis*, obtendo na etapa FP de 11,7 vezes e REC de 88,2%. No processo de purificação de xilanases de *Aureobasidium pullulans* CBS 135684, Bankeeree et al. (2014) fizeram o uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como agente precipitante (50-80%), e alcançaram FP e REC de 1,8 vezes e 50,3%, respectivamente. Após o uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na precipitação fracionada (30-70%) de xilanases de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, Chapla, Pandit e Shah (2012) alcançaram FP de 1,7 vezes e REC acima de 50%. Com base nos estudos acima e nos resultados obtidos no presente trabalho, a eficiência do processo de purificação por precipitação salina pode variar consideravelmente, fato este relacionado com o tipo de extrato a ser purificado (por exemplo, micro-organismo produtor, meio de produção e quantidade de contaminantes presentes no extrato) e com a faixa de saturação empregada.

Por outro lado, a precipitação salina foi suficiente para aumentar a atividade específica de xilanase (Tabela 1) e remover outras proteínas com atividade biológica presentes no extrato enzimático, especialmente as  $\beta$ -xilosidases (Tabela 2). As endo-1,4- $\beta$ -xilanases

hidrolisam as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 da cadeia principal da xilana, gerando XOs com baixo ou alto GP e eventualmente xilose, dependendo da família na qual a enzima pertence e região que atua no esqueleto do polissacarídeo (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016); enquanto as  $\beta$ -xilosidases atuam na extremidade não redutora dos XOs e geram xilose (SHENG et al., 2014). Deste modo, extratos enzimáticos ausentes de  $\beta$ -xilosidases são preferíveis na produção de XOs por hidrólise enzimática, pois atenuam a formação de xilose residual e colaboram na obtenção de hidrolisados com alta concentração de oligômeros (REDDY; KRISHNAN, 2016). Chapla, Pandit e Shah (2012) observaram que a purificação parcial de xilanases de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 por precipitação salina foi suficiente na obtenção de um extrato enzimático livre de  $\beta$ -xilosidases, contribuindo assim para a produção de XOs isentos de xilose. De acordo com a Tabela 2, ambos os extratos (bruto e purificado) apresentaram alta relação entre xilanases/ $\beta$ -xilosidase, o que evidencia o potencial destes na hidrólise de xilana de faia para produção de XOs com mínima liberação de xilose.

**Tabela 2** – Composição enzimática dos extratos de *A. pullulans* CCT 1261.  
Atividade enzimática (U/mL)

	Bruto	Parcialmente purificado
Endo- $\beta$ -1,4-xilanase	87,38 $\pm$ 1,47	127,94 $\pm$ 2,32
$\beta$ -xilosidase	0,02 $\pm$ < 0,01	< 0,01
$\alpha$ -L-arabinofuranosidase	0,04 $\pm$ < 0,01	0,03 $\pm$ < 0,01
$\beta$ -glicosidase	0,08 $\pm$ < 0,01	0,02 $\pm$ < 0,01
Celulases totais	0,05 $\pm$ 0,10	0,02 $\pm$ 0,10

Média  $\pm$  desvio padrão (n =4).

Enzimas como  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\alpha$ -D-glicuronidases, acetil xilana esterases, feruloil e  $p$ -coumaroil esterases, são responsáveis pela remoção de grupamentos laterais da cadeia da xilana (ALOKIKA; SINGH, 2019; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Dependendo da complexidade e grau de ramificação da cadeia polissacarídica, existe a necessidade destas enzimas atuarem juntamente com as xilanases nas reações de hidrólise para produção de oligômeros. No caso específico das  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, além de atuarem na remoção das cadeias laterais de L-arabinofuranose (CHÁVEZ; BULL; EYZAGUIRRE, 2006), estas preparam a estrutura da xilana para ação subsequente das xilanases (AZELEE et al., 2016), aliviando o impedimento estérico anteriormente causando pela presença das ramificações (SHI et al., 2013). O uso de substratos lignocelulósicos complexos na produção de XOs também

requer a presença de enzimas celulolíticas para degradação de celulose, facilitando o acesso à xilana. Como mencionado por Binod et al. (2019), estas enzimas incluem endoglucanases (endocelulases), celohidrolases (exocelulases) e  $\beta$ -glicosidases

De acordo com a Tabela 2, as atividades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -glicosidases e celulasas totais foram detectadas no extrato enzimático bruto, o que era esperado considerando o substrato utilizado para o crescimento da levedura *A. pullulans* CCT 1261. Segundo Palaniappan et al. (2017), a estrutura da xilana do farelo de arroz é ramificada, contendo resíduos de  $\alpha$ -L-arabinofuranose, acetil e ácido glicurônico ligados na cadeia principal de  $\beta$ -D-1,4-xilopirranose. Ainda, estudos anteriores verificaram que o farelo de arroz possui 27,3% de celulose (GAUTÉRIO et al., 2018). Logo, a produção de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, celulasas e xilanases durante o cultivo microbiano ocorre simultaneamente, já que o farelo de arroz pode atuar como indutor da secreção enzimática pela levedura.

A quantidade de xilanases foi consideravelmente superior às demais enzimas presentes no extrato enzimático bruto, conforme pode ser visto na Tabela 2, o que é justificável visto que as condições de cultivo foram otimizadas para a produção destas enzimas. Estudos realizados por Ajijolakewu et al. (2017), Guido, Silveira e Kalil (2019), Menezes, Rossi e Ayub (2017) e Terrasan et al. (2010) também observaram níveis mais baixos de enzimas auxiliares e celulasas em relação às xilanases; contudo, avaliar a presença destas enzimas nos extratos enzimáticos é de suma importância, pois mesmo em baixas quantidades estas podem exercer suas atividades catalíticas.

Após a precipitação fracionada, o aumento da atividade específica de xilanases e a diminuição das quantidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -glicosidases e celulasas totais foi observado. Em termos de pureza, a obtenção de um extrato rico em xilanases e carente de enzimas acessórias é interessante, principalmente em certas aplicações industriais. Para aplicação na indústria de papel e celulose, por exemplo, Adhyaru et al. (2017) mencionam que o uso de extratos enzimáticos livres de celulasas é essencial. Por outro lado, no caso específico da produção de XOs por hidrólise enzimática, a ausência de enzimas atuantes nas cadeias laterais da xilana pode levar a obtenção de hidrolisados com perfis de carboidratos distintos comparado ao hidrolisado obtido na presença destas (AZELEE et al., 2016; PEREIRA et al., 2018). Ainda, estudos reportam o aumento na produção em XOs quando xilanases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases agem sinergicamente na hidrólise de xilanas (PEREIRA et al., 2018; SHI et al., 2013).

Com base no exposto, faz-se importante o uso de ambos os extratos, bruto e purificado, na hidrólise da xilana, de modo a avaliar os perfis de XOs e xilose liberados nos

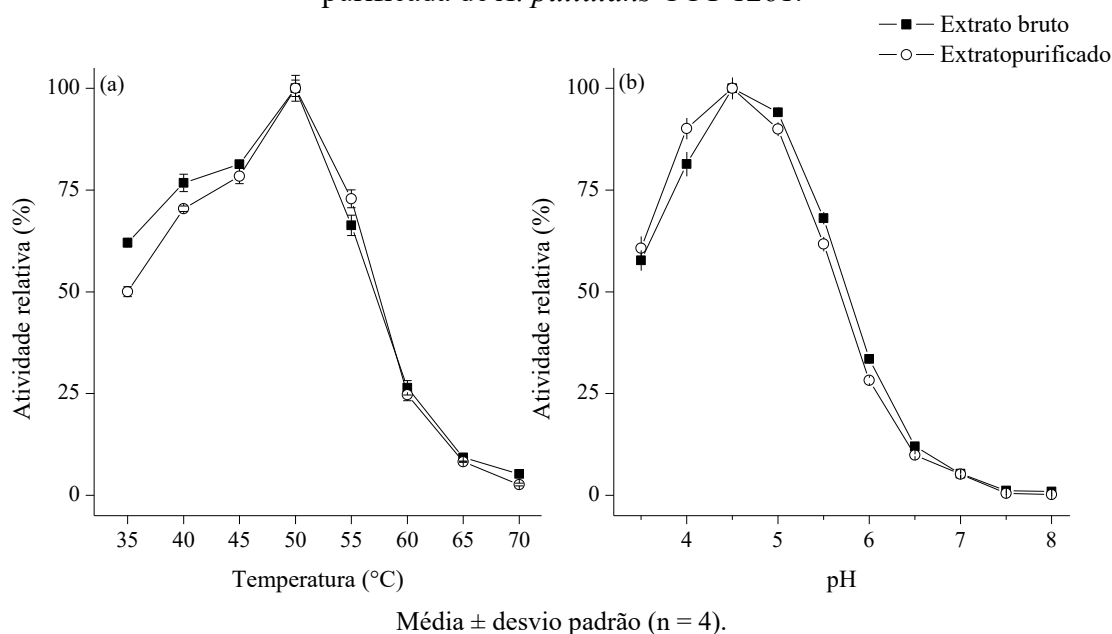
hidrolisados, bem como o rendimento de oligômeros obtidos. No entanto, para a aplicação dos extratos na produção de XOs, é necessário o conhecimento das propriedades bioquímicas das xilanases, em especial seu pH e temperatura ótima de atuação, estabilidade térmica, parâmetros cinéticos e termodinâmicos.

## 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO

### 3.2.1 Temperatura e pH ótimo de atuação das xilanases

A Figura 1 apresenta o efeito da temperatura e do pH na atividade de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. Os extratos bruto e purificado apresentaram perfil semelhante frente à temperatura e ao pH, isto é, curva típica em forma de sino, alcançando atividade ótima à 50 °C e em pH 4,5. Entre 35 e 45 °C, a atividade enzimática dos extratos correspondeu a 62 e 81% (extrato bruto) e 50 e 81% (extrato purificado) do valor máximo de atividade de xilanase. No entanto, a atividade catalítica dos extratos caiu consideravelmente em temperaturas acima de 50 °C, sendo o seu valor quase negligenciável a 70 °C, indicando uma desnaturação acelerada. Quanto ao pH, os extratos apresentaram atividade relativa acima de 60% entre 3,5 e 4,0, acima de 89% em pH 5,0 e entre 62 a 68% em pH 5,5. Contudo, atividades relativas abaixo de 1% foram observadas nos valores de pH entre 7,5 e 8,0. Diante deste cenário, é possível dizer que as xilanases produzidas por *A. pullulans* CCT 1261 são mesofílicas e acidófilas (PAËS; BERRIN; BEAUGRAND, 2012).

**Figura 1** – Efeito da (a) temperatura e do (b) pH na atividade de xilanase bruta e parcialmente purificada de *A. pullulans* CCT 1261.



Na caracterização de xilanase bruta de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1, Yegin (2016) observou que a enzima apresentou temperatura e pH ótimos entre 30 e 50 °C e 4,0, respectivamente. Ainda, a xilanase produzida pela mesma cepa, na sua forma purificada, apresentou temperatura e pH ótimos de 50 °C e 4,0, nesta ordem (YEGIN, 2017b). Em contraste, Bankeeree et al. (2014) constataram que a atividade ótima de xilanase purificada de *A. pullulans* CBS 135684 ocorreu a 70 °C e pH 6,0. Em relação ao presente estudo, a xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 apresentou temperatura ótima igual à encontrada para as xilanases de *Pichia stipitis* (DING; LI; HU, 2018), *Trichoderma asperellum* (AJIJOLAKEWU et al., 2017), *Trichoderma inhamatum* (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015), *Tuber maculatum* (BEDADE et al., 2017) e *Aspergillus flavus* (ARCHANA; AMIT; DHARM, 2017).

Além disso, xilanases de *Penicillium oxalicum* (LIAO et al., 2012), *Trichoderma stromaticum* (CARVALHO et al., 2017), *Thielaviopsis basicola* (GOLUGURI et al., 2016), *Trichoderma reesei* (ASTOLFI et al., 2019), *Aspergillus terreus* (KAUSHIK; MALIK, 2016), entre outras (AJIJOLAKEWU et al., 2017; BEDADE et al., 2017; YEGIN, 2017b), também apresentaram máxima atividade em valores de pH entre 4,0 a 5,5. Assim como neste estudo, a diminuição brusca da atividade de xilanase em valores de pH entre 7,0 a 8,0 foi observada por Yegin (2016), Bedade et al. (2017) e Silva, Terrasan e Carmona (2015).

### 3.2.2 Parâmetros cinéticos de reação: $K_m$ e $V_{max}$

Para compreender a cinética da reação catalisada pelas xilanases bruta e purificada, os parâmetros  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados. O  $K_m$  foi determinado medindo a atividade de xilanase na faixa de 6 a 30 mg/mL do substrato xilana de faia, intervalo este suficiente para que nos últimos pontos de análise a atividade enzimática tendesse a constância. No entanto, cabe salientar que nas concentrações mais elevadas de substrato, houve maior interferência deste no meio reacional devido à turbidez, o que também foi relatado por Yegin (2017).

Ambas as xilanases bruta e purificada exibiram o comportamento cinético proposto por Michaelis-Menten ( $R^2 = 0,99$  do gráfico duplo recíproco). A xilanase bruta apresentou menor  $K_m$  (25 mg/mL) em relação à enzima purificada (50 mg/mL), diferença que está relacionada com a pureza dos extratos, conforme relatado por Souza et al. (2018). Uma vez que o  $K_m$  é inversamente proporcional à afinidade da enzima pelo substrato, valores baixos da constante indicam que menores concentrações deste são necessárias para que se atinja a metade da velocidade máxima de reação ( $V_{máx}$ ) (NELSON; COX, 2011). A  $V_{max}$  encontrada para o

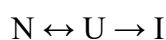


extrato bruto (303 U/mL) foi cerca de cinco vezes menor comparada a do extrato purificado (769 U/mL); por definição, a  $V_{\max}$  descreve o número máximo de moléculas de substrato que podem ser transformadas em produto em determinado intervalo de tempo quando todo sítio ativo da enzima está ocupado (NELSON; COX, 2011).

Apesar de ambos os extratos apresentarem  $K_m$  superiores aos reportados por outros autores (DING; LI; HU, 2018; LIU et al., 2018; MOHAMED et al., 2018), alguns estudos mencionam valores da constante na mesma grandeza para o substrato xilana de faia, os quais incluem: xilanase bruta de *Penicillium roqueforti* ( $K_m = 84,1$  mg/mL) (SOUZA et al., 2018), xilanase purificada de *A. pullulans* ( $K_m = 19,4$  mg/mL) (YEGIN, 2017b); e xilanase purificada de *Thermoascus aurantiacus* ( $K_m = 40,9$  mg/mL) (CHANWICHA et al., 2015). Ainda, os valores de  $K_m$  obtidos neste estudo foram inferiores ao obtido para xilanase purificada de *Streptomyces* sp. ( $K_m = 102,3$  mg/mL) (PRADEEP et al., 2013).

### 3.2.3 Estabilidade térmica e parâmetros termodinâmicos da xilanase

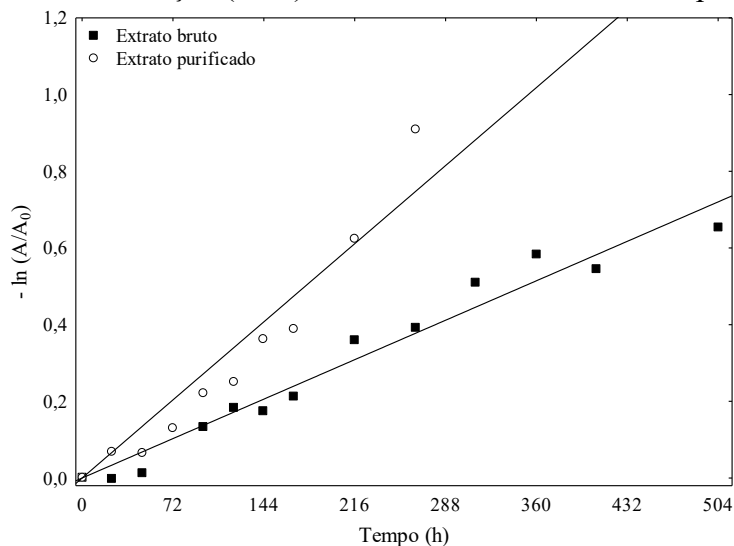
A desnaturação térmica compreende o processo no qual ocorre a perda das estruturas secundária, terciária e quaternária (caso presente) de uma proteína sem a quebra de ligações covalentes (DANIEL; DINES; PETACH, 1996). A estabilidade termodinâmica é definida como a resistência de uma proteína em se desdobrar reversivelmente, enquanto a estabilidade cinética compreende a resistência de uma proteína à desnaturação irreversível (POLIZZI et al., 2007). A relação proposta entre a desnaturação reversível e irreversível de proteínas pode ser descrita pelo mecanismo:



onde N é o estado nativo da proteína, U é estado desdobrado e I é o estado desnaturado irreversível (POLIZZI et al., 2007). A determinação dos parâmetros termodinâmicos ( $E_d$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$ ) e cinéticos ( $k_d$ ,  $t_{1/2}$ ,  $D$  e  $z$ ) de desnaturação térmica é essencial na compreensão da relação entre a estrutura proteica e a estabilidade enzimática (SANT'ANNA et al., 2010). Além disso, a estimativa destes parâmetros auxilia na compreensão do provável mecanismo de desnaturação, o qual é muito importante em processos enzimáticos (YEGIN; GOKSUNGUR; FERNANDEZ-LAHORE, 2012), em especial àqueles que envolvem a aplicação de enzimas sob temperatura controlada.

A Figura 2 apresenta a curva linearizada da cinética de desnaturação térmica da xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 a 40 °C. O procedimento foi realizado igualmente para todas as temperaturas e extratos (bruto ou purificado) avaliados, permitindo assim a determinação dos valores de  $k_d$  e  $t_{1/2}$  em cada condição experimental. As curvas de  $-\ln(A/A_0)$  versus o tempo de incubação para ambos os extratos foram lineares, isto é, coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superior a 0,90, indicando que a inativação térmica pode ser expressa como uma cinética de primeira ordem dentro da faixa de temperatura avaliada.

**Figura 2** – Linearização da cinética de desnaturação à 40 °C da xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. (■) Extrato bruto,  $R^2 = 0,96$  (○) Extrato purificado,  $R^2 = 0,92$ .  $A_0$  é a atividade enzimática antes da incubação ( $t = 0$ ) e  $A$  é a atividade enzimática após a incubação.



Os parâmetros cinéticos de desnaturação térmica –  $k_d$ ,  $t_{1/2}$  e valores  $D$  e  $z$  – para a xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 estão apresentados na Tabela 3. Para ambos os extratos de xilanase, os valores de  $k_d$  foram inversamente proporcionais a  $t_{1/2}$ , indicando que a enzima é sensível a altas temperaturas. Maior estabilidade térmica foi observada em 40 °C, onde nesta temperatura os extratos bruto e purificado apresentaram  $t_{1/2}$  de 20 e 10 d, respectivamente. Além disso, o extrato bruto se mostrou mais estável termicamente comparado ao extrato purificado, fator este que pode estar relacionado à presença de compostos oriundos do meio de cultivo (ex. sais, açúcares) que contribuem para a estabilidade da enzima.

Xilanase bruta de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 apresentou  $t_{1/2}$  de 770,16 min (12,83 h) e 126,03 min (2,10 h) em 55 °C e 60 °C (YEGIN, 2016), respectivamente; enquanto xilanase purificada de *A. pullulans* CBS 135684 apresentou  $t_{1/2}$  de 231 min (3,85 h), 173 min (2,88 min) e 116 min (1,93 min) em 50 °C, 55 °C e 60 °C (BANKEEREE et al., 2014), nesta ordem. Comparado aos resultados obtidos no presente estudo, a xilanase de *A. pullulans* CCT

1261 se mostrou menos estável termicamente. Por outro lado, uma das xilanases purificadas de *Trichoderma inhamatum* exibiram  $t_{1/2}$  de 4 min a 50 °C e de 40 s a 60 °C (SILVA; TERRASAN; CARMONA, 2015), valores estes inferiores aos apresentados por ambos os extratos bruto e purificado. Xilanase bruta de *Aspergillus carneus* M34 apresentou  $t_{1/2}$  de 101,2 min e 1,5 min a 50 °C e 60 °C, respectivamente (FANG et al., 2007), sendo estes valores na mesma grandeza ao do extrato bruto de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261.

**Tabela 3** – Valores de  $z$ ,  $D$ ,  $K_d$  e meia vida ( $t_{1/2}$ ) obtidos a partir da desnaturação térmica de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 bruta e parcialmente purificada.

Extrato	T (°C)	D (min)	z (°C)	$k_d$ (1/s)	$t_{1/2}$ (h)
Bruto	40	98682,9	4,9	$3,9 \times 10^{-7}$	495,11
	45	5273,1		$7,3 \times 10^{-6}$	26,46
	50	255,7		$1,5 \times 10^{-4}$	1,28
	55	45,9		$8,4 \times 10^{-4}$	0,23
	60	8,3		$4,6 \times 10^{-3}$	0,04
Parcialmente purificado	40	49341,4	4,7	$7,8 \times 10^{-7}$	247,55
	45	2933,2		$1,3 \times 10^{-5}$	14,75
	50	141,9		$2,7 \times 10^{-4}$	0,71
	55	10,7		$3,6 \times 10^{-3}$	0,05
	60	4,6		$8,4 \times 10^{-3}$	0,02

A alta estabilidade dos extratos bruto e purificado a 40 °C é uma característica positiva quanto à aplicabilidade destes em processos industriais, tais como na clarificação de sucos (40 °C) (ADIGUZEL et al., 2019; KALLEL et al., 2016) e preparo de massas para pães (25 a 36 °C) (ADIGÜZEL; TUNÇER, 2016; BAJAJ; MANHAS, 2012; YEGIN; ALTINEL; TULUK, 2018). Ainda, na produção de XOs por hidrólise enzimática, a qual normalmente é realizada na faixa de 40 °C a 50 °C e por tempo prolongado (AKPINAR et al., 2010; AZELEE et al., 2016; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012), a estabilidade dos extratos a 40 °C os torna promissores para esta aplicação. Comparado à outras xilanases microbianas, os extratos de *A. pullulans* CCT 1261 se mostraram mais estáveis a 40 °C que as xilanases de *Cellulomonas uda* CDBB-1960 expressas em *Pichia pastoris* ( $t_{1/2} = 35$  h) (CAYETANO-CRUZ et al., 2016); e que as xilanases de *Sphingobacterium* sp. HP455 purificadas e expressas em *Escherichia coli* ( $t_{1/2} = 5,3$  h) (SHENG et al., 2014).

Para fins industriais, especialmente em aplicações alimentícias, é comum expressar a desnaturação térmica de enzimas em termos de valor  $D$  e  $z$ . Conforme exposto na Tabela 3,

os valores  $D$  variaram de 98682,9 min (40 °C) a 8,3 min (60 °C) para o extrato bruto; e de 49341,4 min (40 °C) a 4,6 min (60 °C) para o extrato purificado. Em outras palavras, o valor  $D$  diminuiu consideravelmente com o aumento da temperatura e teve seu maior valor a 40 °C para ambos os extratos de xilanase. Ainda, o extrato bruto apresentou maiores valores  $D$  comparado ao extrato purificado em uma mesma temperatura, indicando que um maior tempo de incubação é requerido para que a enzima bruta reduza 90% da sua atividade inicial (um ciclo logarítmico).

O valor  $z$  obtido para os extratos bruto e purificado foi de 4,9 °C e 4,7 °C (Tabela 3), respectivamente, o qual corresponde à diferença de temperatura necessária para modificar o valor  $D$  em um ciclo logarítmico. Valores baixos de  $z$  estão relacionados à sensibilidade da enzima ao incremento de temperatura (BARRETT; GRANDISON; LEWIS, 1999). Em estudo realizado por Pal e Khanum (2011), xilanase purificada de *Aspergillus niger* DFR-5 apresentou menor valor  $D$  a 45 °C (1535 min) quando comparado aos obtidos para as xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 (Tabela 3), indicando que estas últimas são mais resistentes à permanência nesta temperatura. No entanto, o valor  $z$  obtido pelos autores foi igual a 36,6 °C, mostrando que a enzima é menos sensível ao incremento de temperatura em contraste às xilanases do presente estudo.

Os parâmetros termodinâmicos –  $E_d$ ,  $\Delta G^*$ ,  $\Delta H^*$  e  $\Delta S^*$  – para a xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 estão apresentados na Tabela 4. Para ambos os extratos, os valores de  $\Delta G^*$  diminuíram com o aumento da temperatura, indicando a ocorrência da desnaturação enzimática de caráter endergônico ( $\Delta G^* > 0$ ). Valores positivos de  $\Delta H^*$  encontrados para os extratos bruto (406 kJ/mol) e purificado (418,1 kJ/mol) indicam que o processo de inativação enzimática possui caráter endotérmico. Ainda, o valor mais elevado de  $\Delta H^*$  para o extrato purificado indica que mais ligações não covalentes, além de interações hidrofóbicas, foram rompidas durante a desnaturação da enzima. Os valores positivos de  $\Delta S^*$  para os extratos sugerem o desdobramento da proteína em uma estrutura mais aleatória, sendo este efeito mais pronunciado no extrato purificado (975,9 J/mol.K) comparado ao bruto (931,6 J/mol.K). Segundo Ustok, Tari e Harsa (2010), o valor positivo e elevado de  $\Delta S^*$  sugere que a inativação enzimática é acompanhada pelo desdobramento da cadeia polipeptídica em uma estrutura menos ordenada. Os autores ainda mencionam que o aumento em  $\Delta S^*$  indica maior número de moléculas proteicas no estágio de transição ativado, resultando em valores mais baixos de  $\Delta G^*$ . Esta observação está de acordo com o presente estudo, já que o extrato purificado além de exibir maior  $\Delta S^*$  também apresentou menores  $\Delta G^*$  comparado ao extrato bruto.

Ao determinar os parâmetros termodinâmicos de xilanases purificadas de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1, Yegin (2017) observaram diminuição nos valores de  $\Delta G^*$

(97,5 kJ/mol para 93,7 kJ/mol) e valores positivos de  $\Delta S^*$  (360-367 J/mol.K) para o intervalo entre 55 °C a 65 °C. Para as xilanases brutas produzidas pela mesma cepa, a diminuição nos valores de  $\Delta G^*$  (99,7 kJ/mol para 95,8 kJ/mol) e valores positivos de  $\Delta S^*$  (246-252 J/mol.K) também foi observada, no intervalo de temperatura entre 55 °C a 70 °C (YEGIN, 2016). Assim como no presente estudo, as xilanases brutas de *A. pullulans* NRRL Y-2311-1 apresentaram maiores valores de  $\Delta G^*$  e menores de  $\Delta S^*$  comparado às xilanases purificadas, indicando que as primeiras são mais estáveis e com estrutura menos desordenada pelo efeito do desdobramento. Contrariamente, xilanases purificadas de *A. pullulans* CBS 135684 exibiram aumento nos valores de  $\Delta G^*$  (105,9 kJ/mol para 109,6 kJ/mol) e valores negativos de  $\Delta S^*$  (-0,07 J/mol.K) na faixa de 50 °C a 70 °C, indicando que estas enzimas são estáveis termicamente e que apresentam estrutura mais ordenada, provavelmente pela agregação proteica devido à formação de ligações inter e/ou intramoleculares (BANKEEREE et al., 2014)

**Tabela 4** – Parâmetros termodinâmicos de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 bruta e parcialmente purificada.

Extrato	T (°C)	E <sub>d</sub> (KJ/mol)	$\Delta G^*$ (KJ/mol)	$\Delta H^*$ (KJ/mol)	$\Delta S^*$ (J/mol.K)
Bruto	40	408,6	114,2	406,0	931,6
	45		109,6		
	50		104,9		
	55		100,2		
	60		95,6		
Purificado	40	420,8	112,5	418,1	975,9
	45		107,6		
	50		102,8		
	55		97,9		
	60		93,0		

Os valores E<sub>d</sub> médios foram obtidos em função da temperatura e corresponderam a 408,6 kJ/mol e 420,8 kJ/mol para os extratos bruto e purificado, respectivamente, na faixa de temperatura entre 40 a 60 °C. Quanto maiores os valores de E<sub>d</sub>, maior é a energia necessária para a desnaturação enzimática, indicando maior estabilidade da biomolécula. No entanto, com base nos valores de k<sub>d</sub> e  $\Delta G^*$ , o extrato bruto apresenta maior estabilidade térmica em relação ao purificado, contrariando o valor de E<sub>d</sub> médio. Comportamento semelhante foi observado por Borba et al. (2018) ao caracterizar protease de *Bacillus* sp P45 ativa em solventes orgânicos e

líquidos iônicos. Segundo Kazan e Erarslan (1997), os valores de  $k_d$  ou o aumento nos valores de  $\Delta G^*$  são critérios mais confiáveis para avaliar a estabilidade da biomolécula, quando comparado ao alto valor de  $E_d$ .

Uma vez que as xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 apresentaram maior estabilidade térmica a 40 °C, os ensaios de hidrólise para produção de XOs foram conduzidos nesta temperatura, permitindo a comparação dos rendimentos sem que houvesse a desnaturação da enzima em ambos os extratos ao longo da reação.

### 3.3 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As Tabelas 5 e 6 apresentam a produção de XOs e xilose e o percentual de conversão de xilana em XOs obtidos nas reações de hidrólise conduzidas a 40 °C utilizando os extratos bruto e purificado de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. Para ambos os extratos enzimáticos, é possível perceber a ocorrência de hidrólise parcial dos XOs de maior GP em xilobiose, bem como o aumento no teor de xilose, ao longo do tempo de reação. Ainda, tanto nas hidrólises conduzidas com o extrato bruto quanto com o purificado, o maior teor de XOs (mg/mL) foi constatado em 32 h, o qual não diferiu estaticamente ( $p > 0,05$ ) do conteúdo obtido em 24 h e 28 h de reação.

**Tabela 5** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faixa utilizando xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261.

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	XOs totais		
2	4,9	35,1	38,6	21,4	95,1	5,9 ± 0,3 <sup>e</sup>	19,5 ± 1,0 <sup>e</sup>
4	6,4	40,5	38,1	15,1	93,6	6,4 ± 0,1 <sup>d</sup>	21,4 ± 0,1 <sup>de</sup>
6	7,7	43,4	37,3	11,5	92,3	6,8 ± 0,1 <sup>cd</sup>	22,7 ± 0,3 <sup>cd</sup>
8	8,8	45,3	36,6	9,5	91,2	7,0 ± 0,2 <sup>bc</sup>	23,3 ± 0,4 <sup>bcd</sup>
10	10,1	46,6	35,5	7,8	89,9	7,1 ± 0,2 <sup>bc</sup>	23,7 ± 0,4 <sup>abc</sup>
12	11,2	47,5	34,6	6,8	88,9	7,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	23,9 ± 0,3 <sup>abc</sup>
24	13,9	50,9	30,9	4,3	86,1	7,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	25,7 ± 0,6 <sup>a</sup>
28	16,2	50,1	29,7	4,0	83,8	7,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	25,2 ± 0,2 <sup>ab</sup>
32	18,3	49,7	28,5	3,5	81,7	7,4 ± 0,2 <sup>a</sup>	24,8 ± 0,8 <sup>abc</sup>

Média ± erro padrão (n=2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

**Tabela 6** – Produção de XOs e xilose percentual de conversão a partir de xilana de faixa utilizando xilanase parcialmente purificada de *A. pullulans* CCT 1261.

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	XOs totais		
2	4,1	35,7	39,1	21,2	95,9 ± 0,1	6,0 ± 0,1 <sup>e</sup>	20,0 ± 0,2 <sup>e</sup>
4	5,1	41,3	38,9	14,8	94,9 ± 0,2	6,7 ± 0,1 <sup>d</sup>	22,3 ± 0,3 <sup>d</sup>
6	5,9	44,5	38,2	11,4	94,1 ± 0,2	7,0 ± 0,1 <sup>cd</sup>	23,3 ± 0,3 <sup>cd</sup>
8	6,6	46,7	37,5	9,2	93,4 ± 0,2	7,2 ± 0,1 <sup>bc</sup>	24,0 ± 0,3 <sup>bc</sup>
10	6,9	48,5	36,9	7,7	93,0 ± 0,4	7,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	24,5 ± 0,3 <sup>b</sup>
12	7,7	49,7	36,2	6,5	92,3 ± 0,2	7,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	24,9 ± 0,3 <sup>b</sup>
24	9,8	53,8	32,8	3,7	90,2 ± 0,3	7,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	26,5 ± 0,3 <sup>a</sup>
28	10,3	54,5	31,7	3,5	89,7 ± 0,4	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	26,9 ± 0,3 <sup>a</sup>
32	10,8	55,0	31,0	3,1	89,2 ± 0,5	8,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	27,0 ± 0,2 <sup>a</sup>

Média ± erro padrão (n=2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

A conversão de xilana em XOs alcançou valor máximo em 24 h (25,7%) e 32 h (27,0%) de reação para os extratos bruto e purificado, respectivamente. No caso das hidrólises utilizando o extrato bruto de xilanase, a conversão de xilana em XOs aumentou até 10 h de reação, manteve-se constante até 24 h e sofreu queda pouco acentuada entre as 28 h e 32 h, contudo, seus valores não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Já nas hidrólises utilizando o extrato purificado, a conversão de xilana em XOs exibiu comportamento crescente até o término da reação, apesar dos seus valores entre 24 h e 32 h não serem estatisticamente distintos ( $p > 0,05$ ). As conversões de xilana em XOs obtidas em 24 h de hidrólise utilizando os extratos bruto (25,7%) e purificado (26,5%) não apresentaram diferença estatística entre seus valores pelo teste  $t$  ( $p > 0,05$ ).

Na hidrólise enzimática de bagaço de cana utilizando extrato de xilanase bruto de *Pichia stipitis*, a máxima conversão de xilana em XOs foi de 31,8% em 12 h de reação (BIAN et al., 2013); enquanto que na hidrólise de xilana de palha de alho utilizando xilanase purificada de *Bacillus mojavensis* UEB-FK, o rendimento máximo de XOs foi de 29% em 8 h, permanecendo este valor inalterado até o término da reação (24 h) (KALLEL et al., 2015a). Após 10 h de reação, Nieto-Domínguez et al. (2017) alcançaram um rendimento máximo de 28,8% em XOs durante a hidrólise enzimática de xilana de bétula com o uso de xilanase purificada de *Talaromyces amestolkiae*. Os autores observaram o decréscimo no rendimento em XOs (28,8% para 27,2%) quando a reação prosseguiu até 24 h. Conforme mencionado por

Akpinar et al., (2010), o decréscimo e/ou a estagnação do rendimento em XOs pode ocorrer devido à redução do número de sítios acessíveis na estrutura do substrato. Ainda, o decréscimo no rendimento em XOs (Tabela 5) também pode estar associado à hidrólise dos oligômeros em xilose, uma vez que o extrato bruto contém  $\beta$ -xilosidases, mesmo que em baixa quantidade.

Em relação ao perfil de carboidratos, os hidrolisados obtidos com o uso dos extratos bruto e purificado, em 24 h de reação, apresentaram maior percentual de xilobiose (50,9% e 53,8%), seguido de xilotriose (30,9% e 32,8%) e XOs de maior GP (4,3% e 3,7%). O hidrolisado obtido pelo uso do extrato purificado exibiu maior percentual de XOs totais (90,2%) comparado ao hidrolisado oriundo do uso da enzima bruta (86,1%), em 24 h de reação. Ainda, ao atingir as 32 h, o hidrolisado obtido pelo uso da xilanase purificada apresentou diminuição de 1% no teor de XOs totais, enquanto esta queda correspondeu a 4% para o hidrolisado obtido a partir da enzima bruta. Conforme Singh, Banerjee e Arora (2015), XOs de baixo GP (xilobiose e xilotriose) são preferíveis na indústria de alimentos devido a sua alta capacidade prebiótica.

A Figura 3 apresenta a produção de XOs totais e xilose a partir da hidrólise da xilana de faia utilizando extratos bruto e purificado de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 em 24 h de reação. Uma vez que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre a quantidade de XOs produzidos em 24 h, 28 h e 32 h de reação para cada extrato, o tempo de 24 h foi escolhido para comparação da eficiência das enzimas bruta e purificada. Conforme ilustra a Figura 3, a concentração de XOs nos hidrolisados oriundos do uso da enzima bruta e purificada foi estatisticamente igual ( $p>0,05$ ), diferindo apenas na quantidade de xilose remanescente. Uma vez que o extrato bruto contém maior quantidade de enzimas acessórias em sua composição, especialmente  $\beta$ -xilosidases e  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, era esperado que a quantidade de xilose no hidrolisado fosse mais alta.

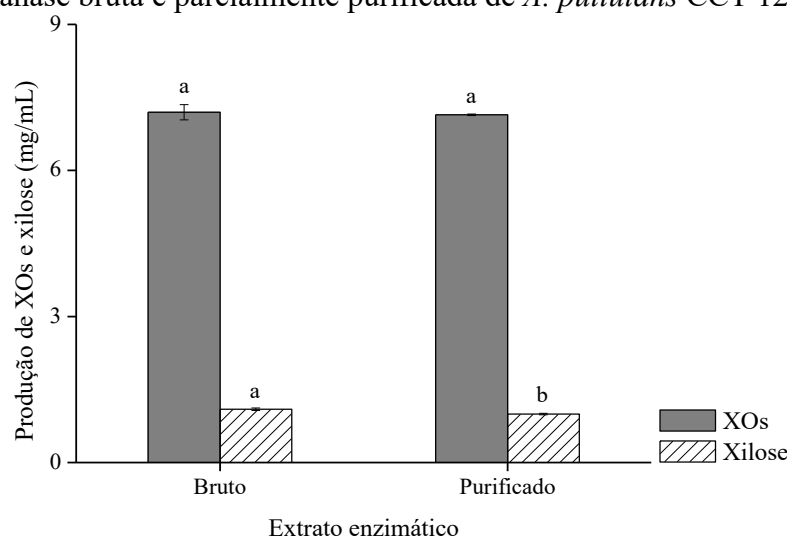
Conforme mencionado por Shi et al. (2013), a quantidade de xilose liberada pelas xilanases de *Paenibacillus* sp. aumentou na presença de arabinofuranosidases produzidas pela mesma cepa microbiana. Da mesma forma, Pereira et al. (2018) observaram que o uso combinado de xilanases e arabinofuranosidases contribuiu para maior formação de xilose no hidrolisado, uma vez que a remoção das ramificações de arabinose permite que as xilanases atuem sobre a cadeia principal da xilana mais facilmente, aumentando a liberação de xilose e diminuindo o GP dos outros XOs. Os autores ainda mencionam que a presença concomitante de  $\beta$ -xilosidases no extrato bruto também ocasionou o aumento de xilose, principalmente pela sua atuação na xilobiose formada.

No presente estudo, embora o extrato bruto apresentasse maior quantidade de arabinofuranosidases – o que poderia contribuir na produção de XOs –, este também continha



maior teor de  $\beta$ -xilosidases em relação ao extrato purificado, o que resultou no aumento de xilose no meio hidrolisado sem que houvesse maior produção de XOs. Além disso, na reação conduzida com o extrato bruto de xilanase, a liberação de xilose aumentou entre 24 h e 32 h de reação, enquanto a produção de XOs diminuiu no mesmo período. Isto demonstra a possível ação das  $\beta$ -xilosidases sobre a xilobiose, já que a quantidade deste oligômero também decresceu entre 28 e 32 h de hidrólise. Por outro lado, este comportamento não foi observado na hidrólise enzimática da xilana utilizando o extrato purificado de xilanase.

**Figura 3** – Produção de XOs totais e xilose em 24 h de hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase bruta e parcialmente purificada de *A. pullulans* CCT 1261.



Média  $\pm$  erro padrão (n = 2). Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste *t* ( $p > 0,05$ ).

Bian et al. (2013) avaliaram a obtenção de XOs a partir da hidrólise de xilana de bagaço de cana utilizando xilanase bruta de *Pichia stipitis*, alcançando a produção máxima de 5,29 mg/mL em 12 h de reação. Os autores ainda mencionam que os XOs produzidos eram compostos majoritariamente por xilobiose (29,8%), xilotriose (47,1%) e xilotetraose (18,4%), além de traços de xilopentose e xilohexose. Xilanases brutas de *Pichia stipitis* também foram utilizadas na hidrólise de xilana de *Populus tomentosa*, onde foi possível obter um hidrolisado contendo 95% (3,95 mg/mL) de XOs compostos por xilobiose, xilotriose e xilotetraose (YANG et al., 2011). Na hidrólise enzimática de xilana de sabugo de milho utilizando xilanase parcialmente purificada de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, Chapla, Pandit e Shah (2012) obtiveram 6,73 mg/mL de XOs totais em 8 h de reação, sendo estes isentos de xilose e compostos por xilobiose, xilotriose, xilotetraose e xilopentose em proporções similares. Nieto-Domínguez et al. (2017) utilizaram xilanase purificada de *Talaromyces purpurogenum* na

hidrólise de xilana de bétula, e obtiveram 5,95 mg/mL de XOs compostos em sua maioria por xilobiose (1,49 mg/mL), xilotriose (2,01 mg/mL) e xilotetraose (1,39 mg/mL).

Com base nos estudos acima mencionados, é possível dizer que a produção de XOs por hidrólise de xilana de faia utilizando xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 se mostrou promissora, principalmente quanto ao conteúdo e composição dos oligômeros obtidos. Uma vez que o teor de XOs totais não diferiu estaticamente ( $p > 0,05$ ) com o uso da enzima bruta e purificada, e que o acúmulo de xilose no meio pode ser controlado mediante o estudo dos demais parâmetros reacionais, o extrato bruto foi o escolhido para a continuidade do trabalho. A eliminação da purificação da enzima reduz o número de etapas envolvidas na produção de XOs, permitindo que estes sejam obtidos de forma mais econômica.

#### 4 CONCLUSÃO

Os extratos bruto e purificado de xilanases de *A. pullulans* CCT 1261 foram caracterizados e aplicados na hidrólise enzimática de xilana de faia para produção de XOs. A precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-30%/30-60%) permitiu a purificação parcial das xilanases em 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,4%. Os extratos bruto e purificado apresentaram temperatura e pH ótimos iguais a 50 °C e 4,5, respectivamente, e maior estabilidade à 40 °C ( $t_{1/2}$  igual a 20 e 10 d, respectivamente) dentro da faixa estudada. Com base nos parâmetros de termoestabilidade dos extratos, o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C levou à desnaturação enzimática, sendo este processo endotérmico e que resulta no desdobramento da cadeia proteica em uma estrutura mais aleatória. Além disso, a xilanase bruta apresentou menor  $K_m$  (25 mg/mL) comparado à enzima purificada (50 mg/mL).

O conteúdo de XOs totais (7,7 mg/mL e 7,9 mg/mL) e a conversão de xilana em XOs (25,7% e 26,5%), em 24 h de reação, não apresentou diferença estatística pela aplicação dos extratos bruto e purificado na hidrólise enzimática. No entanto, a produção de xilose foi significativamente menor pelo uso do extrato purificado. Quanto ao perfil de carboidratos, os hidrolisados exibiram maior percentual de xilobiose (50,9% e 53,8%), seguido de xilotriose (30,9% e 32,8%) e XOs de maior GP (4,3% e 3,7%).

Com base no conteúdo de oligômeros e no perfil de carboidratos dos hidrolisados, a hidrólise enzimática de xilana de faia se mostrou promissora para obtenção de XOs. Uma vez que o acúmulo de xilose no meio pode ser controlado através do estudo dos demais parâmetros reacionais, o extrato bruto foi indicado como o mais adequado para a produção de XOs. O uso

do extrato bruto de xilanase evita a inclusão da etapa de purificação ao processo de produção de XOs, permitindo que estes sejam obtidos de modo mais econômico.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.

ABASUBONG, K. P.; LIU, W. B.; ZHANG, D. D.; YUAN, X. Y.; XIA, S. L.; XU, C.; LI, X. F. Fishmeal replacement by rice protein concentrate with xylooligosaccharides supplement benefits the growth performance, antioxidant capability and immune responses against *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 78, p. 177–186, 2018.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51–57, 2016.

ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Cellulase-free-thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8 : Over-production through statistical approach , purification and bio- deinking/bio-bleaching potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 220–227, 2017.

ADIGÜZEL, A. O.; TUNÇER, M. Production, Characterization and Application of a xylanase from *Streptomyces* sp. AOA40 in fruit juice and bakery industries. **Food Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 189–218, 2016.

ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571–578, 2019.

AJIJOLAKEWU, K. A.; PENG, C.; KEONG, C.; ABDULLAH, W.; NADIAH, W. Characterization of novel *Trichoderma hemicellulase* and its use to enhance downstream processing of lignocellulosic biomass to simple fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 166–175, 2017.

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

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.

ALOKIKKA; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8763–8784, 2019.

ALOKIKKA; SINGH, D.; SINGH, B. Utility of acidic xylanase of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS250 in improving the nutritional value of poultry feed. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 1–7, 2018.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A. Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 546–554, 2018.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; 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. 0–1, 2019.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; CARDOSO, B. B.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.

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

ARCHANA, G.; AMIT, K.; DHARM, D. Production and characterization of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus* ARC-12 and its application in pre-bleaching of ethanol-soda pulp of *Eulaliopsis binata*. **Research Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 63–71, 2017.

ASTOLFI, V.; ASTOLFI, A. L.; MAZUTTI, M. A.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; CAMARGO, A. F.; DALASTRA, C.; KUBENECK, S.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 677–685, 2019.

ATY, A. A. A.; SALEH, S. A. A.; EID, B. M.; IBRAHIM, N. A.; MOSTAFA, F. A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129–137, 2018.

AYYAPPAN, P.; ABIRAMI, A.; ANBUVAHINI, N. A.; TAMIL KUMARAN, P. S.; NARESH, M.; MALATHI, D.; ANTONY, U. Physicochemical properties of cookies enriched with xylooligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 420–428, 2016.

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

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 330–337, 2012.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; CHAIAREEKIJ, S.; EVELEIGH, D. E.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

BARRETT, N. E.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Contribution of the lactoperoxidase system to the keeping quality of pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 1, p. 73–80, 1999.

BEDADE, D.; BEREZINA, O.; SINGHAL, R.; DESKA, J.; SHAMEKH, S. Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 288–293, 2017.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGARWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1191–1202, 2019.

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

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BINOD, P.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317–325, 2019.

BORBA, T. M.; MACHADO, T. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Thermal stability and catalytic properties of protease from *Bacillus* sp. P45 active in organic solvents and ionic liquid. **Biotechnology Progress**, v. 34, p. 1102–1108, 2018.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. DE O.; 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.

CARVALHO, E. A.; SANTOS GÓES, L. M.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, E. G. P.; RODRIGUES, L. B.; PIROVANI, C. P.; DA COSTA, A. M. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in bread making and manufacturing xylo-oligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

CAYETANO-CRUZ, M.; SANTOS, A. I. P.; GARCÍA-HUANTE, Y.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PAVÓN-OROZCO, P.; LÓPEZ Y LÓPEZ, V. E.; HIDALGO-LARA, M. E. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor

with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 161–169, 2016.

CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.

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

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.

CHEN, Z.; ZAKY, A. A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LIU, L.; LI, S.; JIA, Y. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. **Protein Expression and Purification**, v. 154, n. 11, p. 91–97, 2019.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

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

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

DANIEL, R. M.; DINES, M.; PETACH, H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. **Biochemical Journal**, v. 317, n. 1, p. 1–11, 1996.

DING, C.; LI, M.; HU, Y. High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 72–77, 2018.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1–4, p. 36–42, 2007.

FERRÃO, L. L.; FERREIRA, M. V. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, A. F. A.; PIMENTEL, T. C.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; FREITAS, M. Q.; MENEZES, J. C. V.; CABRAL, L. M.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; MATHIAS, S. P.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; CRUZ, A. G. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 137–147, 2018.

FINEGOLD, S. M.; LI, Z.; SUMMANEN, P. H.; DOWNES, J.; THAMES, G.; CORBETT, K.; DOWD, S.; KRAK, M.; HEBER, D. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food and Function**, v. 5, n. 3, p. 436–445, 2014.

- FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, p. 100184, 2019.
- GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; GONÇALVES, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.
- GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 823–829, 2016.
- GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A.; ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.
- 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.
- HANSEN, C. H. F.; FROKIAER, H.; CHRISTENSEN, A. G.; BERGSTROM, A.; LICHT, T. R.; HANSEN, A. K.; METZDORFF, S. B. Dietary xylooligosaccharide downregulates ifn- $\gamma$  and the low-grade inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  systemically in mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 4, p. 533–540, 2013.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Production and characterization of xylanases from fungal isolate *Aspergillus Terreus* and development of low cost fermentation media. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 15–18, 2016.
- KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by

polyethylene glycols against thermal inactivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 1997.

KHUSRO, A.; KALIYAN, B. K.; AL-DHABI, N. A.; ARASU, M. V.; AGASTIAN, P. Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 16–25, 2016.

KOCABAŞ, D. S.; GÜDER, S. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66–75, 2015.

LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117–124, 2012.

LIN, S. H.; CHOU, L. M.; CHIEN, Y. W.; CHANG, J. S.; LIN, C. I. Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, 2016.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 53, n. 3, p. 658–666, 1934.

LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.

MARASABESSY, A.; MOEIS, M. R.; SANDERS, J. P. M.; WEUSTHUIS, R. A. Enhancing *Jatropha* oil extraction yield from the kernels assisted by a xylan-degrading bacterium to preserve protein structure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 2027–2036, 2011.

MAZLAN, N. A.; SAMAD, K. A.; YUSSOF, H. W.; SAUFI, S. M.; JAHIM, J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 575–584, 2019.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12, 2017.

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

MOHAMED, M. A.; GHANEM, M. M. E.; ABD-ELAZIZ, A. M.; SHAMS-ELDIN, I. M. Purification and characterization of xylanase isoenzymes from red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 321–327, 2018.



MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, L. C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylooligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I. DE; 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.

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

PALANIAPPAN, A.; YUVARAJ, S. S.; SONAIMUTHU, S.; ANTONY, U. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 296–305, 2017.

PASSARINHO, A. T. P.; VENTORIM, R. Z.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE OLIVEIRA, E. B.; GUIMARÃES, V. M. Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 741–747, 2019.

PEREIRA, G. F.; BASTIANI, D. DE; GABARDO, S.; SQUINA, F.; AYUB, M. A. Z. Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 78–85, 2018.

POLIZZI, K. M.; BOMMARIUS, A. S.; BROERING, J. M.; CHAPARRO-RIGGERS, J. F. Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 220–225, 2007.

PRADEEP, G. C.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; SEONG, C. N.; CHO, S. S.; LEE, H. J.; YOO, J. C. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1188–1196, 2013.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

SAJIB, M.; FALCK, P.; SARDARI, R. R. R.; MATHEW, S.; GREY, C.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Valorization of brewer's spent grain to prebiotic oligosaccharide: Production, xylanase catalyzed hydrolysis, in-vitro evaluation with probiotic strains and in a batch human fecal fermentation model. **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 61–70, 2018.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–3152, 2010.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SHARMA, S.; BAJAJ, B. K. Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 3, p. 1210–1219, 2018.

SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.

SHI, P.; CHEN, X.; MENG, K.; HUANG, H.; BAI, Y.; LUO, H.; YANG, P.; YAO, B. Distinct actions by *Paenibacillus* sp. strain E18  $\alpha$ -larabinofuranosidases and xylanase in xylan degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1990–1995, 2013.

SILVA, L. A. O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307–313, 2015.

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

SOUZA, L. O.; BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FERRAZ, J. L. A. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 277–284, 2018.

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.

SUKRI, S. S. M.; MIMI SAKINAH, A. M. Production of high commercial value xylooligosaccharides from meranti wood sawdust using immobilised xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 278–290, 2018.

SUREK, E.; BUYUKKILECI, A. O. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 565–571, 2017.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689–692, 1987.

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; DUARTE, M. C. T.; CARMONA, E. C. Production of

xylanolytic enzymes by *Penicillium janczewskii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4139–4143, 2010.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114–1120, 2010.

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

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. [S.I.] ed. [s.l.]: John Wiley and Sons, 2014.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; WANG, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816–821, 2009.

WU, H.; CHENG, X.; ZHU, Y.; ZENG, W.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 46–51, 2018.

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

YANG, J.; SUMMANEN, P. H.; HENNING, S. M.; HSU, M.; LAM, H.; HUANG, J.; TSENG, C. H.; DOWD, S. E.; FINEGOLD, S. M.; HEBER, D.; LI, Z. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: A pilot study. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–11, 2015a.

YEGIN, S. Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization, and application in saccharification of lignocellulosic biomass. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 441–449, 2016.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67–75, 2017b.

YEGIN, S.; ALTINEL, B.; TULUK, K. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. **Food hydrocolloids**, v. 81, p. 389–397, 2018.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHOURE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1312–1319, 2012.

ZHANG, B.; HAO, G. JUAN; CAO, H. JUAN; TANG, H.; ZHANG, Y. YANG; DENG, S. GUI. The cryoprotectant effect of xylooligosaccharides on denaturation of peeled shrimp

(*Litopenaeus vannamei*) protein during frozen storage. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 228–237, 2018.

ZHANG, F.; HU, S. N.; CHEN, J. J.; LIN, L. B.; WEI, Y. L.; TANG, S. K.; XU, L. H.; LI, W. J. Purification and partial characterisation of a thermostable xylanase from salt-tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 225–228, 2012.



ARTIGO 4  
MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS UTILIZANDO  
XILANASE BRUTA DE *Aureobasidium pullulans*



## RESUMO

Xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros não digeríveis e fermentáveis que se destacam pelo caráter prebiótico, além de possuírem outras propriedades funcionais para a saúde humana. Dentre as estratégias adotadas para a produção de XOs, a hidrólise enzimática se sobressai pela especificidade das xilanases e operação em condições moderadas de reação, além de permitir a obtenção de oligossacarídeos com menor grau de polimerização ( $GP \leq 6$ ). O presente estudo teve como finalidade avaliar a influência dos parâmetros reacionais da hidrólise envolvendo xilana de faia e xilanase bruta de *Aureobasidium pullulans*, visando a maximização da produção de XOs. Parâmetros como temperatura (40-50 °C), tempo de reação (12-48 h), concentração de substrato (1-6%, m/v), relação enzima:substrato (100-300 U/g) e pH (4,0-6,0), foram avaliados na obtenção de hidrolisado rico em XOs e com conteúdo mínimo de xilose. Altas concentrações de XOs totais (10,1 mg/mL) e XOs de baixo GP (9,7 mg/mL), além de alto percentual de XOs (99,1%) no hidrolisado, foram obtidas nas seguintes condições reacionais: 6% (m/v) de xilana de faia, 260 U/g de xilanase bruta, pH 6,0, 180 rpm (agitação orbital), 40 °C por 24 h de reação. A maximização das condições de hidrólise permitiu aumentar tanto a produção de XOs totais em 1,5 vezes como o percentual de XOs em 9,4%, quando comparado às condições iniciais de hidrólise (6,7 mg/mL e 89,7%, respectivamente).

**Palavras-chave:** Hidrólise enzimática. Parâmetros reacionais. Xilo-oligômeros.





## 1 INTRODUÇÃO

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros não digeríveis contendo entre duas a dez unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (IUPAC, 1982). Estes oligômeros são produzidos a partir da hidrólise da xilana, principal polissacarídeo constituinte da fração hemicelulósica da parede vegetal (GÍRIO et al., 2010). Dependendo do grau de substituição da xilana, os XOs podem conter em sua estrutura grupamentos laterais como  $\alpha$ -D-glicopiranosil ácido urônico ou seu derivado, grupos acetila e resíduos de arabinofuranosil, os quais são responsáveis pela existência de XOs ramificados (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Os XOs estão naturalmente presentes em brotos de bambu, frutas, vegetais e mel, porém em baixas quantidades (SAMANTA et al., 2015), o que justifica a necessidade de estudos voltados à sua produção e posterior aumento de escala.

A principal propriedade dos XOs está relacionada ao seu efeito prebiótico e consequente promoção do crescimento de bactérias benéficas ao intestino humano (AMORIM et al., 2020; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017), podendo ser aplicado na formulação de adoçantes de baixa caloria (XIAO et al., 2013) e em alimentos com alegação funcional (BRASIL, 1999; ESFA, 2018). Os XOs com grau de polimerização (GP) igual ou inferior a cinco são rapidamente fermentados por bactérias probióticas, colaborando para manutenção da microflora intestinal, enquanto oligossacarídeos com GP maiores não estimulam o desenvolvimento bacteriano (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). Em baixas doses diárias (isto é, entre 1,4 a 2,8 g/dia) (FINEGOLD et al., 2014), os XOs promovem melhorias no metabolismo lipídico (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015), estimulação à resposta imune (SUN et al., 2013), ação antioxidante (VALLS et al., 2018), anti-inflamatória (HANSEN et al., 2013) e antimicrobiana (YU et al., 2015). Além do caráter atóxico e certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (FDA, 2013), os XOs são os únicos oligossacarídeos no mercado obtidos a partir de biomassa lignocelulósica (MONIZ et al., 2016)

Os XOs podem ser produzidos através de auto-hidrólise (SUREK; BUYUKKILECI, 2017), hidrólise química (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009), hidrólise enzimática (GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019; SUKRI; MIMI SAKINAH, 2018), cultivo microbiano (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019; REQUE et al., 2019), ou combinação destes processos. Dentre estas estratégias mencionadas, a hidrólise enzimática se destaca devido à especificidade das enzimas, não formação de produtos secundários indesejáveis e/ou tóxicos, e operação em condições brandas de reação (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; YANG et al., 2011). Além disso, a hidrólise enzimática permite obter XOs com menor grau de polimerização (GP, entre 2 a 6) (REDDY; KRISHNAN, 2016; SINGH et al., 2018) quando comparado a outros processos como a auto-hidrólise (GP > 6) (LI et al., 2018; SUREK;

BUYUKKILECI, 2017), sendo interessante para a indústria alimentícia, visto que XOs com baixo GP exibem alta capacidade prebiótica (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015).

Na hidrólise enzimática, a complexidade estrutural da xilana faz com que enzimas com distintas especificidades e modos de ação atuem na degradação deste açúcar (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015). Dentre as enzimas xilanolíticas, duas se destacam: endo-xilanase e exo-xilanase ( $\beta$ -xilosidases), onde a primeira hidrolisa as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e libera XOs, enquanto a segunda atua na extremidade não redutora da xilobiose ou outros XOs, resultando em xilose (SHALLOM; SHOHAM, 2003; SHENG et al., 2014). Assim, extratos xilanolíticos com baixa atividade de exo-xilanases são desejados, pois atenuam a produção de xilose e aumentam o rendimento em XOs. Além de inibir a atividade de xilanases, a xilose não deve estar presente em hidrolisados prebióticos, pois não promove o crescimento de bactérias benéficas ao cólon (FARYAR et al., 2014; REDDY; KRISHNAN, 2016). Estudos anteriores demonstraram que a levedura *Aureobasidium pullulans* é capaz de originar extratos enzimáticos ricos em xilanase e com baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase (GAUTÉRIO et al., 2018), até quando substratos agroindustriais são utilizados no meio de cultivo como fonte de xilana (GAUTÉRIO et al., 2020).

O uso eficiente das enzimas para a produção de XOs depende das variáveis do processo, tais como temperatura, pH, tempo de reação, intensidade de agitação, concentração de enzima e substrato, e presença de outras espécies químicas que podem inibir ou acelerar as taxas de reação. Para que a hidrólise enzimática seja realizada de modo eficiente, a maximização das condições reacionais é requerida (AZELEE et al., 2016; BRIENZO; CARVALHO; MILAGRES, 2010). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos parâmetros reacionais da hidrólise envolvendo xilana de faia e xilanase bruta de *Aureobasidium pullulans*, visando a maximização da produção de XOs.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

O micro-organismo *A. pullulans* CCT 1261 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). O farelo de arroz, cedido gentilmente por indústria de beneficiamento de arroz da região Sul do Rio Grande do Sul, foi seco em estufa (50 °C, 24 h), peneirado (partícula menor que 0,5 mm) e armazenado em sacos de polietileno a -18 °C até sua utilização.

A xilana de madeira de faia foi adquirida da *Apollo Scientific* (Bredbury, Reino Unido), enquanto os padrões de XOs (xilobiose, xilotriose, xilotetralose e xilopentose) foram adquiridos da

*Megazyme* (Bray, Irlanda). O padrão de xilose foi obtido da *Sigma-Aldrich* (San Luis, Estados Unidos). A coluna cromatográfica para análise de XOs (Aminex HPX-42A, dimensão 300 mm x 7,8 mm) foi adquirida da *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, Estados Unidos). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DE XILANASE

### 2.2.1 Manutenção do micro-organismo, pré-inóculo e inóculo

A manutenção da cepa *A. pullulans* CCT 1261 ocorreu através de repiques periódicos em ágar batata dextrose inclinado, sendo mantida a 24 °C em estufa por 72 h. O meio de pré-inóculo e inóculo foi composto por (g/L) xilose (10), base nitrogenada de levedura (6,7) suplementada com sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>) (5), asparagina (2) e fosfato de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (5) em pH 5,0 (CHRISTOV et al., 1997). O meio ausente de xilose foi esterilizado em autoclave (121 °C por 15 min), e adicionado de solução concentrada de xilose previamente esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose (Milipore, Burlington, Estados Unidos) de 0,22 µm.

O preparo do pré-inóculo consistiu na transferência da massa celular (alçada) da superfície do ágar para tubos contendo meio estéril (5 mL), os quais foram incubados em estufa a 28 °C por 24 h. Logo após, o volume de pré-inóculo (5 mL) foi vertido para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo o mesmo meio estéril (45 mL), os quais foram mantidos a 28°C e 150 rpm (agitação orbital) por 24 h.

### 2.2.2 Cultivo submerso e obtenção do extrato bruto

Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo meio estéril (150 mL) composto por (g/L) farelo de arroz (61,9), extrato de levedura (1,5) e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,6) em pH 7,0 (GAUTÉRIO et al., 2020). Os meios foram esterilizados em autoclave (121 °C, 15 min). Os frascos foram inoculados com 2% (v/v) de inóculo com densidade ótica (DO) de 0,8 a 620 nm (SUGUMARAN et al., 2013) e mantidos a 28 °C, 150 rpm (agitação orbital) por 72 h.

Ao término do cultivo, o meio foi centrifugado (4757 × g a 4°C por 30 min), e o sobrenadante foi filtrado à vácuo em membrana *Whatman* n° 1 (Milipore, Burlington, Estados Unidos) para a remoção de partículas suspensas de farelo, obtendo-se assim o extrato bruto de xilanase. Previamente à sua aplicação, o extrato foi submetido à determinação da atividade de

endo- $\beta$ -1,4-xilanase (item 2.4.1), concentração de proteínas solúveis (item 2.4.2) e medição do pH (item 2.4.2).

## 2.3 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

### 2.3.1 Efeito da temperatura na produção de xilo-oligossacarídeos

A produção de XOs por hidrólise enzimática foi avaliada em três temperaturas – 40, 45 e 50 °C –, escolhidas com base nos ensaios de caracterização enzimática (Artigo 3) e literatura referente aos estudos de produção dos xilo-oligômeros. As hidrólises foram realizadas em reatores de mistura encamisados mantidos a 180 rpm (agitação mecânica) por 24 h. O meio reacional foi composto por xilana (3%, m/v) em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3 (mantida *overnight* sob agitação para completa solubilização), e enzima (200 U/g), totalizando o volume de 75 mL (AACHARY; PRAPULLA, 2009). Alíquotas de 2 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos e a reação enzimática foi interrompida pelo aquecimento do meio a 100 °C por 5 min. Após, as amostras foram centrifugadas ( $10.000 \times g$  a 4°C por 10 min) e os sobrenadantes analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (item 2.4.3).

As concentrações de XOs e xilose nas amostras foram determinadas a partir das curvas de calibração dos padrões analíticos. O rendimento (%) foi expresso em termos de conversão de xilana em XOs, o qual foi calculado pela relação entre a massa de XOs gerados pela massa inicial de xilana nos reatores, multiplicado por cem. Os ensaios de hidrólise foram realizados em duplicata.

### 2.3.2 Cinética de produção de xilo-oligossacarídeos em agitador orbital

A partir da temperatura selecionada no item 2.3.1, as reações de hidrólises foram conduzidas sob agitação orbital (180 rpm) em reatores do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio reacional conforme descrito acima. Alíquotas de 2 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos e a reação enzimática foi interrompida pelo aquecimento do meio a 100 °C por 5 min. As amostras foram centrifugadas ( $10.000 \times g$  a 4°C por 10 min) e os sobrenadantes foram analisados por CLAE (item 2.4.3). Os ensaios de hidrólise foram realizados em triplicata. As concentrações de XOs e xilose nas amostras, bem como a conversão de xilana em XOs, foram determinadas conforme o item 2.3.1. Os resultados obtidos foram comparados com as hidrólises realizadas em reatores encamisados e agitação mecânica.

### 2.3.3 Maximização da produção de xilo-oligossacarídeos

A maximização da produção de XOs por hidrólise enzimática foi realizada através do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)  $2^3$  com três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios. Os fatores avaliados na produção de XOs foram a concentração de xilana (1 a 6%, m/v), pH (4,0 a 6,0) e relação enzima:substrato (100 a 300 U/g de xilana). As hidrólises foram conduzidas sob a temperatura selecionada no item 2.3.1 e agitação orbital (180 rpm) em reatores do tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio reacional. Aliquotas de 3 mL foram coletadas no ponto 0 h e em 24 h de hidrólise, e a reação enzimática foi interrompida pelo aquecimento do 100 °C por 5 min. Após a centrifugação ( $10.000 \times g$  a 4°C por 10 min), os sobrenadantes foram analisados por CLAE (item 2.4.3).

O intervalo de cada variável independente (Tabela 4) foi selecionado de acordo com a literatura, e as variáveis respostas analisadas foram a concentração de XOs totais (mg/mL), concentração de xilobiose e xilotriose ( $X_2$  e  $X_3$ , mg/mL) e o percentual de XOs (%) em 24 h de hidrólise. Os dados experimentais obtidos no DCCR foram ajustados ao modelo de segunda ordem conforme a Equação 1:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (1)$$

onde  $y$  é a variável dependente (resposta) a ser modelada,  $x$  são as variáveis independentes (fatores) e  $\beta$  são os coeficientes da regressão do modelo (RODRIGUES; IEMMA, 2012). A partir do modelo preditivo, as curvas de contorno foram construídas para ilustrar os efeitos individuais e de interação sobre as variáveis dependentes. Os desvios relativos entre os valores reais e preditos da variável resposta foram calculados pela Equação 2:

$$DR (\%) = \frac{RO - RP}{RO} \times 100 \quad (2)$$

onde RO e RP são os valores observados e preditos da variável resposta, respectivamente. A validação do modelo consistiu na realização de hidrólises adicionais em triplicata, nas condições reacionais onde tanto as concentrações de XOs totais (mg/mL) e  $X_2$  e  $X_3$  (mg/mL) como o percentual de XOs (%) nos hidrolisados foram favorecidas. O percentual de XOs foi calculado através da razão entre a quantidade de XOs totais pela quantidade de açúcares totais presentes no hidrolisado, multiplicado por cem.

## 2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### 2.4.1 Atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase

A atividade enzimática de endo- $\beta$ -1,4-xilanase foi determinada conforme Bailey, Biely e Poutanen (1992) utilizando como substrato a xilana de madeira de faia 1% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol/L pH 5,3. A mistura reacional, composta por 0,9 mL de solução de substrato e 0,1 mL de extrato enzimático, foi incubada a 50 °C por 5 min. Em seguida, 1,0 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado à mistura. A quantificação dos açúcares redutores liberados a partir da xilana foi realizada conforme Miller (1959), correlacionando com a curva padrão de xilose (Apêndice 1) a 540 nm . Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de xilose por minuto, sob as condições descritas do ensaio. A atividade específica (U/mg) foi determinada como a razão entre a atividade enzimática (U/mL) e o teor de proteínas solúveis (mg/mL).

### 2.4.2 Proteínas solúveis e pH

A concentração de proteína solúvel foi determinada segundo Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão (Apêndice 1). A determinação do pH foi realizada em potenciômetro digital conforme a AOAC n° 972.44 (AOAC, 2000).

### 2.4.3 Análise dos hidrolisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os sobrenadantes oriundo das hidrólises enzimáticas foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,22  $\mu$ m (Milipore, Burlington, Estados Unidos), e posteriormente analisados em cromatógrafo líquido (Prominence®, Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de colunas (CTO-20A). Alíquotas de 20  $\mu$ L foram injetadas automaticamente (SIL-20AHT) e eluídas a 0,4 mL/min com água ultrapura (Milli-Q, Milipore, Burlington, Estados Unidos) como fase móvel de uma coluna para separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos). A temperatura e o tempo total de corrida foram 50 °C e 40 min, respectivamente. A identificação dos açúcares foi realizada a partir dos seus tempos de retenção, enquanto a quantificação de XOs e xilose foram determinadas através das curvas de calibração previamente construídas com o *pool* de padrões (1 a 10 mg/mL). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution®.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os ensaios realizados com réplicas e único fator foram submetidos ao teste *t* ou Análise de Variância Univariável (*One-way ANOVA*) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas no software *Statistica* 5.0 (Statsoft Inc., Estados Unidos). Para a avaliação do DCCR, os dados foram submetidos à ANOVA fatorial considerando  $p < 0,05$  ou  $p < 0,10$ , conforme a variável resposta avaliada. O ajuste do modelo foi expresso pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e  $R^2$  ajustado. A análise estatística do DCCR e as curvas de contorno foram realizadas no software *Protimiza Experimental Design* (Protimiza, Campinas, Brasil). Em todas as análises estatísticas, os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos foram previamente verificados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Neste trabalho, os parâmetros reacionais foram estudados de modo a estabelecer as condições que conduzem a máxima produção de XOs e mínima liberação de xilose. A influência destes parâmetros sobre a produção de XOs totais foi avaliada utilizando o extrato enzimático bruto de xilanase ( $87,4 \pm 1,5$  U/mL e  $26,8 \pm 0,5$  U/mg de proteína) de *A. pullulans* CCT 1261, o qual possui baixa atividade de  $\beta$ -xilosidase ( $0,02 \pm <0,01$  U/mL, Artigo 3) e pH final após cultivo igual a  $4,2 \pm <0,1$ . As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam a produção de XOs e xilose e o percentual de conversão de xilana em XOs obtidos nas reações de hidrólise conduzidas entre 40 °C e 50 °C. A faixa de temperatura de estudo foi escolhida com base em estudos anteriores de produção de XOs e nos ensaios de estabilidade térmica da xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261 (Artigo 3). A amostragem nos ensaios de hidrólise a 50 °C foi realizada a cada 20 min nas primeiras 2 h de reação, pois apesar da xilanase bruta apresentar atividade ótima nesta temperatura, a sua meia vida nestas condições é de 1,28 h (Artigo 3).

Para as três temperaturas avaliadas, é possível perceber a ocorrência de hidrólise parcial dos XOs de maior GP em xilobiose, bem como o aumento no teor de xilose, ao longo do tempo de reação. Nas hidrólises realizadas a 40 °C e 45 °C, o maior conteúdo de XOs foi observado em 24 h de reação, o qual também se diferiu estatisticamente do teor obtido nos demais tempos de amostragem (Tabelas 1 e 2). Além disso, a conversão de xilana em XOs em ambos os ensaios aumentou significativamente ao longo da hidrólise, apresentando valores



máximos em 24 h de reação. Em relação ao perfil de carboidratos, os hidrolisados obtidos nas reações à 40 °C e 45 °C apresentaram, em 24 h de reação, maior percentual de xilobiose (46,7% e 45,7%), seguido de xilotriose (33,2% e 34,3%) e XOs de maior GP (6,7% e 7,7%).

**Tabela 1** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261. Condições de hidrólise: 40 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica).

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	XOs totais		
2	7,4	28,8	37,0	26,8	92,6	5,1 ± <0,1 <sup>e</sup>	17,1 ± 0,1 <sup>d</sup>
4	8,7	33,8	37,2	20,3	91,3	5,7 ± <0,1 <sup>d</sup>	19,1 ± 0,1 <sup>cd</sup>
6	9,3	36,9	37,4	16,3	90,7	6,0 ± <0,1 <sup>cd</sup>	19,9 ± <0,1 <sup>cd</sup>
8	10,5	39,7	38,3	11,6	89,5	6,0 ± <0,1 <sup>cd</sup>	19,9 ± 0,1 <sup>cd</sup>
10	11,6	40,7	35,4	10,9	87,0	6,3 ± 0,1 <sup>bc</sup>	21,1 ± 0,2 <sup>bc</sup>
12	12,5	42,5	35,7	9,4	87,5	6,4 ± <0,1 <sup>b</sup>	21,2 ± 0,1 <sup>b</sup>
24	13,2	46,9	33,2	6,7	86,8	7,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	23,9 ± 0,5 <sup>a</sup>

Média ± erro padrão (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey (p > 0,05). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

**Tabela 2** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faia utilizando xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261. Condições de hidrólise: 45 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica).

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	XOs totais		
2	8,4	31,7	38,2	21,8	91,6	5,0 ± <0,1 <sup>e</sup>	16,8 ± 0,2 <sup>e</sup>
4	9,3	35,7	37,9	17,1	90,7	5,7 ± <0,1 <sup>d</sup>	19,1 ± 0,1 <sup>d</sup>
6	10,5	38,3	37,2	14,0	89,5	6,0 ± <0,1 <sup>c</sup>	20,1 ± 0,2 <sup>c</sup>
8	11,3	40,7	36,7	11,4	88,7	6,1 ± <0,1 <sup>c</sup>	20,2 ± 0,1 <sup>c</sup>
10	10,8	42,3	36,5	10,4	89,2	6,2 ± 0,1 <sup>c</sup>	20,7 ± 0,2 <sup>c</sup>
12	10,6	42,7	36,5	10,2	89,4	6,6 ± <0,1 <sup>b</sup>	21,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
24	12,2	45,7	34,3	7,7	87,8	7,2 ± <0,1 <sup>a</sup>	23,8 ± 0,1 <sup>a</sup>

Média ± erro padrão (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey (p > 0,05). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

Por outro lado, na hidrólise realizada a 50 °C, o conteúdo de XOs totais em 24 h de reação não apresentou diferença significativa (p > 0,05) quando comparado ao teor observado

em menores tempos de reação, mantendo-se praticamente estável no intervalo de 1 a 24 h. Do mesmo modo, a conversão de xilana em XOs entre 1 e 24 h de reação não aumentou significativamente. Curiosamente, o percentual de xilose aumentou em 6,1% no mesmo período. Este comportamento pode estar relacionado tanto com a inativação parcial da xilanase devido à temperatura de hidrólise, como também pela possível atuação da  $\beta$ -xilosidase. Neste último caso, alguns estudos mencionam que as  $\beta$ -xilosidases podem apresentar temperatura ótima de 50 °C (KIM; YOON, 2010), e especialmente as enzimas produzidas por *A. pullulans* se mostram altamente estáveis entre 50 e 70 °C (BANKEEREE et al., 2018; DOBBERSTEIN; EMEIS, 1991; OHTA et al., 2010).

**Tabela 3** – Produção de XOs e xilose e percentual de conversão a partir de xilana de faixa utilizando xilanase bruta de *A. pullulans* CCT 1261. Condições de hidrólise: 50 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação mecânica).

Tempo (h)	Perfil de carboidratos (%)					XOs totais (mg/mL)	Conversão de xilana em XOs (%)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub>	XOs totais		
0,3	9,0	16,3	36,3	38,5	91,0	2,9 ± 0,1 <sup>c</sup>	9,8 ± 0,3 <sup>c</sup>
0,6	9,2	17,9	36,0	36,9	90,8	3,4 ± 0,1 <sup>bc</sup>	11,3 ± 0,3 <sup>bc</sup>
1	9,4	19,3	36,0	35,4	90,6	3,7 ± 0,10 <sup>ab</sup>	12,4 ± 0,4 <sup>ab</sup>
1,3	9,8	20,5	35,1	34,7	90,2	3,8 ± 0,2 <sup>ab</sup>	12,6 ± 0,6 <sup>ab</sup>
1,6	10,3	20,7	35,6	33,5	89,7	3,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>	13,1 ± 0,2 <sup>ab</sup>
2	11,3	20,9	36,1	31,7	88,7	4,1 ± <0,1 <sup>a</sup>	13,6 ± <0,1 <sup>a</sup>
4	12,2	21,1	35,7	31,0	87,8	4,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
6	13,4	21,1	35,5	30,0	86,6	4,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,9 ± 0,2 <sup>a</sup>
8	14,8	21,0	34,8	29,3	85,2	4,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	13,7 ± 0,2 <sup>a</sup>
10	16,2	21,3	33,7	28,8	83,8	4,0 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,3 ± 0,7 <sup>a</sup>
12	16,6	21,4	34,1	28,0	83,5	4,1 ± < 0,01 <sup>a</sup>	13,6 ± <0,1 <sup>a</sup>
24	15,5	23,7	33,3	27,6	84,5	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,17 ± 0,4 <sup>a</sup>

Média ± erro padrão (n = 2). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey (p > 0,05). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

Quanto ao perfil de carboidratos, o hidrolisado obtido nas reações a 50 °C, em 24 h de reação, apresentou maior teor de xilotriose (33,3%), seguido de XOs de maior GP (27,6%) e xilobiose (23,7%). Devido à possível inativação parcial da xilanase pelo aumento da

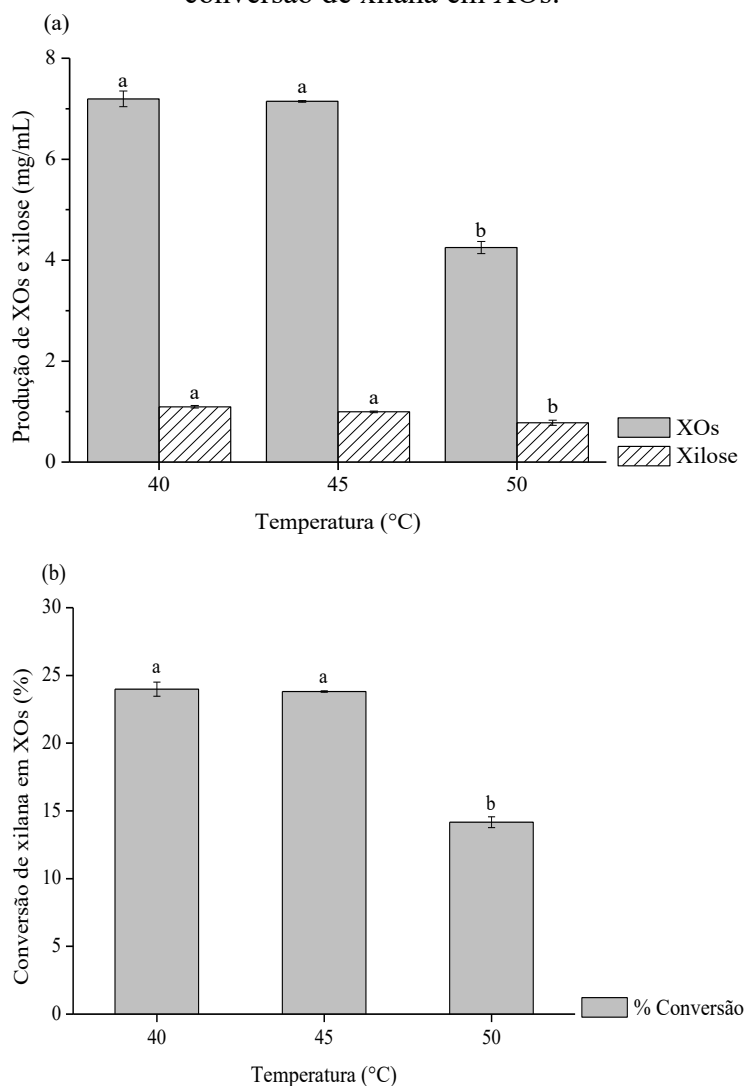
temperatura, é esperado que o hidrolisado obtido a 50 °C apresente maior proporção de xilotriose e de XOs de maior GP em relação à xilobiose.

A Figura 1 apresenta o efeito da temperatura de hidrólise na produção de XOs e xilose e na conversão de xilana em XOs. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na produção de XOs e xilose, bem como na conversão de xilana em XOs, entre os ensaios realizados a 40 °C e 45 °C. Apesar da atividade de xilanase ser favorecida a 45 °C, a mesma apresenta menor estabilidade térmica nesta temperatura ( $t_{1/2} = 26,46$  h) quando comparada à 40 °C ( $t_{1/2} = 495,11$  h), o que pode ter ocasionado a perda da sua capacidade catalítica ao longo da reação de hidrólise. Como resultado, não houve incremento na produção de XOs e conversão de xilana em XOs com o aumento da temperatura de hidrólise de 40 °C para 45 °C.

A Figura 1 também mostra que na reação a 50 °C tanto a produção de XOs como a conversão de xilana em XOs foram significativamente menores em relação aos demais ensaios. Apesar da temperatura de 50 °C ser a mais utilizadas para a produção de XOs (AACHARY; PRAPULLA, 2009; AKPINAR et al., 2010; KALLEL et al., 2015a; LIU et al., 2018; REDDY; KRISHNAN, 2016; SINGH et al., 2018), esta não foi a mais favorável no presente estudo devido à baixa estabilidade térmica da xilanase nesta condição. Ainda, alguns estudos mencionam que o aumento da temperatura pode favorecer a solubilização da xilana em meio líquido e, assim, facilitar o contato entre a enzima e o substrato (GUIDO, 2016); no entanto, é importante conhecer como a enzima se comporta frente às temperaturas mais elevadas, caso contrário a reação pode não ter o desempenho esperado.

Na hidrólise de espigas de milho pelo uso de xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898, Chapla, Pandit e Shah (2012) constataram que a produção de XOs foi máxima em 45 °C e retardada em 50 °C. Conforme os autores, tal comportamento está relacionado a menor estabilidade térmica da enzima à 50 °C, observada em estudos prévios. Azelee et al. (2016) também relataram maior produção de XOs a partir de material lignocelulósico à 40 °C e decréscimo à 50 °C, fato este relacionado à instabilidade térmica da xilanase empregada. Os autores também mencionam a temperatura como um dos principais fatores que afetam a produção de XOs, uma vez que interferem na taxa de hidrólise. No presente estudo, não foi observado incremento na produção de XOs com a elevação da temperatura, provavelmente pelas questões relacionadas à termoestabilidade da enzima aqui já discutidas. Portanto, com base nos resultados de produção de XOs e estabilidade térmica da xilanase, a temperatura de 40 °C foi a escolhida para a condução dos ensaios posteriores. A condução das hidrólises a 40 °C não apenas favoreceu a hidrólise enzimática da xilana, como também proporciona menor gasto energético durante a produção de XOs.

**Figura 1** – Efeito da temperatura de hidrólise na produção de (a) XOs totais e xilose e (b) conversão de xilana em XOs.



Média  $\pm$  erro padrão ( $n = 2$ ). Letras iguais em colunas da mesma cor indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

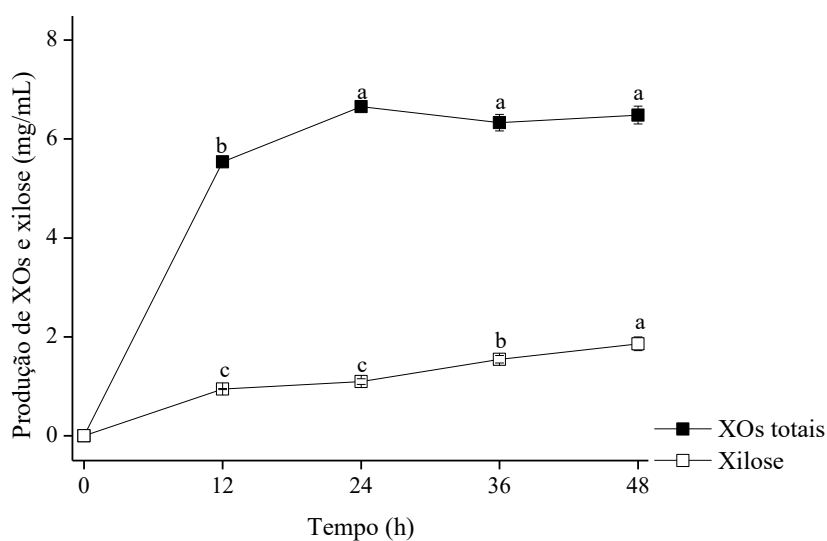
### 3.2 PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS EM AGITADOR ORBITAL

De modo a facilitar a posterior maximização da produção de XOs, as reações de hidrólise a 40 °C foram testadas em reatores do tipo Erlenmeyer com agitador orbital (180 rpm), e os resultados de produção foram comparados com os obtidos nas reações realizadas em reatores encamisados com agitação mecânica. Após 24 h de hidrólise, o conteúdo de XOs totais não diferiu estatisticamente ao nível de 5% de significância pelo teste  $t$  ( $7,20 \pm 0,2$  mg/mL sob agitação mecânica e  $6,7 \pm <0,1$  mg/mL em agitador orbital). No entanto, o teor de xilose foi significativamente menor sob agitação orbital ( $0,8 \pm <0,1$  mg/mL) comparado às reações sob agitação mecânica ( $1,1 \pm <0,1$  mg/mL).

O perfil de carboidratos nos hidrolisados foi semelhante e se caracterizou pelo maior teor de xilobiose ( $46,9 \pm 0,5\%$  sob agitação mecânica e  $48,4 \pm 0,7\%$  em agitador orbital), seguido de xilotriose ( $33,2 \pm 0,6\%$  sob agitação mecânica e  $34,9 \pm 0,12\%$  em agitador orbital) e de XOs de maior GP ( $6,7 \pm 0,4 \%$  sob agitação mecânica e  $6,4 \pm 0,2 \%$  em agitador orbital). A conversão de xilana em XOs também não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os hidrolisados ( $23,9 \pm 0,5 \%$  sob agitação mecânica e  $22,2 \pm 0,1 \%$  em agitador orbital). Baseado nos resultados acima, é possível dizer que as hidrólises em reator encamisado sob agitação mecânica foram reproduzidas em reatores do tipo Erlenmeyer sob agitação orbital, o que vem a facilitar a etapa de maximização da produção de XOs.

Uma vez que a maior produção de XOs por hidrólise enzimática de xilana de faia foi observada em 24 h de reação, a cinética de produção dos oligossacarídeos foi realizada, de modo a verificar a necessidade de prosseguir com a reação por um período mais longo. A Figura 2 apresenta o acompanhamento da produção de XOs e xilose durante a reação conduzida sob agitação orbital. O conteúdo de XOs totais se mostrou significativamente menor nas primeiras 12 h de reação, no entanto, não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre a quantidade obtida nos tempos de 24 h a 48 h. Em outras palavras, não foi observando aumento no teor de XOs totais conforme o tempo de hidrólise, sendo a produtividade em 48 h reduzida pela metade ( $0,14 \text{ mg/mL}$ ) quando comparada à obtida em 24 h de reação ( $0,28 \text{ mg/mL.h}$ ).

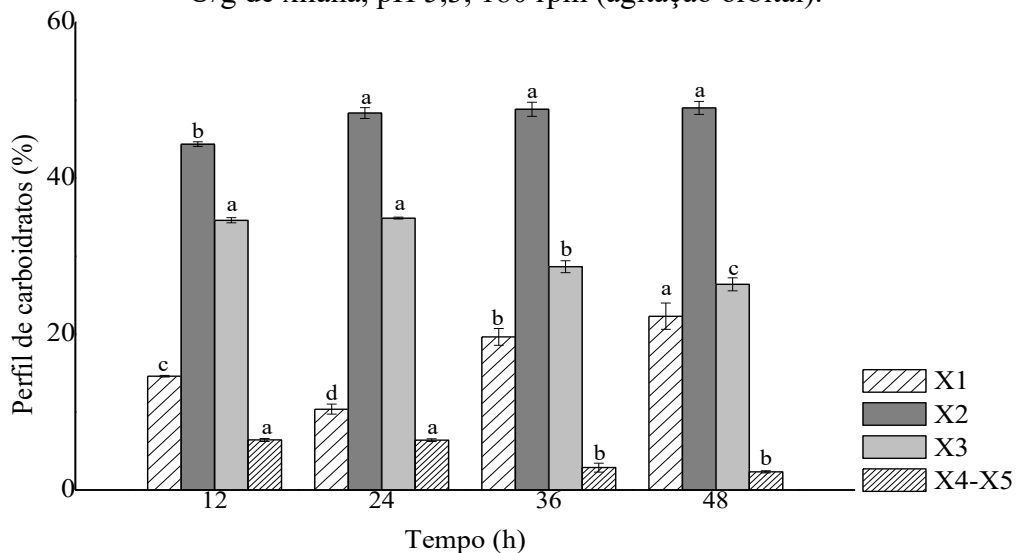
**Figura 2** – Cinética de produção de XOs e xilose a partir da hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. Condições de hidrólise:  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação orbital).



Média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ). Letras iguais na mesma curva indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ).

A Figura 3, a qual apresenta o perfil de carboidratos nos hidrolisados a cada 12 h de reação, mostra que o percentual de xilotriose e XOs de maior GP diminuiu ao longo do tempo. Além disso, o teor de xilobiose se manteve praticamente constante entre 12 h e 48 h de reação. Este perfil evidencia a preferência da enzima em hidrolisar os oligômeros formados frente à xilana como um todo, fato este que ocorre devido à dificuldade de acesso ao substrato que se modifica estruturalmente durante a reação. Já o teor de xilose aumentou de modo significativo ( $p < 0,05$ ) entre as 24 h e 48 h de reação. O acúmulo de xilose no meio também pode ter sido um dos fatores que levaram à diminuição da produtividade em XOs, causando a diminuição da eficiência enzimática pelo acúmulo do monômero no meio reacional, conforme evidenciado em outros estudos (AJIJOLAKEWU et al., 2017).

**Figura 3** – Perfil de carboidratos obtidos a partir da hidrólise de xilana de faixa utilizando xilanase de *A. pullulans* CCT 1261. Condições de hidrólise: 40 °C, 3% (m/v) de xilana, 200 U/g de xilana, pH 5,3, 180 rpm (agitação orbital).



Média  $\pm$  erro padrão (n = 3). Letras iguais em colunas da mesma padronagem indicam que não há diferença significativa entre as médias ao nível de 5% de significância pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda: X<sub>1</sub> – xilose; X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose; X<sub>4</sub> – xilotetraose; X<sub>5</sub> – xilopentose.

Akpınar et al. (2010) observaram que quando o período de hidrólise foi maior que 8 h, os teores de xilotetraose e xilopentose começaram a diminuir, enquanto as quantidades de xilobiose e xilose aumentaram. Deste modo, os autores reforçam que o tempo ótimo de hidrólise deve ser determinado conforme o perfil de carboidratos requeridos para o hidrolisado, e indicam um tempo reacional entre 8 h a 24 h. Após esse período, a hidrólise da xilana foi retardada, indicando a possível inibição da xilanase de *Aspergillus niger* por acúmulo de produto final e/ou redução do número de sítios facilmente acessíveis na estrutura da xilana.

Azelee et al. (2016) mencionam que, teoricamente, quanto maior o tempo de incubação da enzima com o seu substrato, maior será a quantidade de produto formada. No entanto, a taxa de formação de um produto biológico não é uma função linear simples do tempo de incubação. Os autores relatam que, após um certo período de incubação (48 a 96 h), a formação do produto pode ficar estável ou, eventualmente, diminuir, podendo este fenômeno estar relacionado à perda da atividade catalítica da enzima. Similarmente, Gowdhaman e Ponnusami (2015) ao estudarem a hidrólise de espiga de milho por xilanase de *Bacillus aerophilus*, observaram que o teor de açúcares redutores diminuiu após 12 h de reação, indicando a possível diminuição do acesso à xilana e/ou inibição da atividade enzimática pelo acúmulo do produto.

Ao estudar a hidrólise de xilana de faia utilizando xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus*, Guido (2016) constatou que apesar da máxima produção de XOs ter sido alcançada em 48 h de hidrólise, a produtividade de XOs diminuiu consideravelmente entre 24 h e 48 h, não sendo vantajosa a condução da reação por longo período. Com base na cinética de produção de XOs e xilose, bem como no perfil de carboidratos aqui apresentado, o tempo de 24 h de hidrólise se mostrou o mais adequado para se obter a máxima produção de oligômeros a partir de xilana de faia e xilanase de *A. pullulans*, além de evitar grande acúmulo de xilose no meio reacional.

### 3.3 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Conforme estabelecido nos itens anteriores, a maximização da produção de XOs foi realizada a 40 °C e em sistema de agitação orbital, através de um DCCR 2<sup>3</sup> com três pontos centrais. Uma vez que os hidrolisados eram compostos majoritariamente por xilobiose e xilotriose, estando a concentração dos XOs de maior GP em quantidades muito pequenas, a concentração destes açúcares em cada ensaio foi escolhida como uma das variáveis resposta, juntamente com a concentração de XOs totais. Além disso, dado que a presença de xilose nos hidrolisados é indesejável, o percentual de XOs também foi analisado como variável resposta. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento com os valores reais e codificados dos fatores em estudo, bem como as três variáveis resposta avaliadas.

Conforme mostra a Tabela 4, as concentrações de XOs totais e de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> variaram de 2,2 mg/mL (ensaio 9) a 11,2 mg/mL (ensaio 10) e de 1,9 mg/mL (ensaio 9) a 10,7 mg/mL (ensaio 10), respectivamente; enquanto o percentual de XOs variou entre 67,7% (ensaio 6) a

97,2% (ensaio 12). Esta ampla variação nas três variáveis resposta sugere que as condições de reação exercem influência na produção de XOs e na composição de XOs no hidrolisado.

Boa reprodutibilidade da produção de XOs foi verificada através do baixo coeficiente de variação dos pontos centrais (ensaios 15 a 17), para todas as variáveis respostas avaliadas – 2,5% para a concentração de XOs totais, 2,3% para a concentração de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>, e 0,3% para o percentual de XOs. As maiores concentrações de XOs totais e de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> foram observadas no ensaio 10 nas seguintes condições: 6% (m/v) de xilana, pH 5,0 e 200 U/g. Por outro lado, o maior percentual de XOs foi observado no ensaio 12 realizado a 3% (m/v) de xilana, pH 6,0 e 200 U/g. Isto indica a necessidade de estabelecer uma condição de produção de XOs onde se obtenha um hidrolisado com alta concentração de XOs totais e, conseqüentemente, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>, além de alto percentual de XOs.

As variáveis codificadas e as respostas do DCCR foram utilizadas para o cálculo dos coeficientes de regressão, erro padrão, valores de *p* e *t*, conforme mostra a Tabela 5. Tratando-se da concentração de XOs totais, apenas o termo concentração de xilana (L) foi significativo (*p*<0,05). Já para concentração de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> os termos concentração de xilana (L e Q), pH (L), relação enzima:substrato (L) e interação pH e relação enzima:substrato foram significativos (*p*<0,10); no entanto, apesar do termo pH (Q) apresentar *p* acima de 0,10, este foi mantido na construção do modelo por representar melhor o processo comparado à sua não inclusão. Para o percentual de XOs, os termos pH (L), concentração de xilana (L) e a relação enzima:substrato (Q) foram significativos (*p*<0,10).

Para o cálculo dos parâmetros da ANOVA fatorial, os termos não significativos foram adicionados à falta de ajuste, e os resultados estão apresentados na Tabela 6. O teste F para as regressões foi significativo para as três variáveis respostas em estudo, uma vez que os valores de *F*<sub>cal</sub> foram superiores aos valores de *F*<sub>tab</sub>. Em outras palavras, os modelos são preditivos e podem explicar a influência dos fatores significativos sobre as variáveis respostas em estudo. Os coeficientes de regressão (*R*<sup>2</sup>) iguais a 0,98, 0,97 e 0,83 indicam que 2%, 3% e 17% da variação total na resposta não pode ser explicada pelos modelos de concentração de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>, concentração de XOs totais e percentual de XOs, respectivamente. Ainda, os valores do coeficiente de determinação ajustado (*R*<sup>2</sup><sub>adj</sub>, Tabela 5) se mostraram elevados o suficiente para indicar o bom ajuste dos modelos.



**Tabela 4** – Valores codificados e reais (em parênteses) do DCCR 2<sup>3</sup>, concentração de XOs totais, concentração de xilobiose e xilotriose, percentual de XOs obtidos em 24 h de hidrólise enzimática de xilana de faia.

Ensaio	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	XOs totais	DR	Xilobiose e	DR	% XOs	DR
				(mg/mL)	(%)	Xilotriose (mg/mL)	(%)		(%)
1	-1 (2)	-1 (4,4)	-1 (140)	4,2	-1,7	4,1	-12,9	80,8	2,7
2	1 (5)	-1 (4,4)	-1 (140)	9,6	1,9	9,4	-3,3	76,3	3,3
3	-1(2)	1 (5,6)	-1 (140)	4,1	-4,1	3,4	-2,0	96,1	3,0
4	1 (5)	1 (5,6)	-1 (140)	8,2	-15,3	7,5	-14,0	85,5	-3,4
5	-1 (2)	-1 (4,4)	1 (260)	4,2	-2,1	4,1	9,7	73,9	-6,3
6	1 (5)	-1 (4,4)	1 (260)	9,3	-1,8	9,1	3,7	67,7	-9,0
7	-1 (2)	1 (5,6)	1 (260)	4,2	-2,9	3,8	2,7	86,4	-7,9
8	1 (5)	1 (5,6)	1 (260)	9,6	1,8	9,1	4,3	85,9	-3,0
9	-1,68 (1)	0 (5,0)	0 (200)	2,2	-15,2	1,9	0,8	84,5	0,0
10	+1,68 (6)	0 (5,0)	0 (200)	11,2	0,4	10,7	2,8	78,1	2,1
11	0 (3,5)	-1,68 (4,0)	0 (200)	6,9	1,0	6,8	-0,4	70,7	3,5
12	0 (3,5)	+1,68 (6)	0 (200)	6,9	1,0	6,1	5,2	97,2	4,6
13	0 (3,5)	0 (5,0)	-1,68 (100)	7,4	7,0	7,0	-2,4	90,8	1,9
14	0 (3,5)	0 (5,0)	+1,68 (300)	7,7	10,5	7,5	13,0	92,9	4,1
15	0 (3,5)	0 (5,0)	0 (200)	7,1	-3,3	6,7	-1,6	80,8	-2,4
16	0 (3,5)	0 (5,0)	0 (200)	6,9	2,7	6,6	-3,6	81,1	0,4
17	0 (3,5)	0 (5,0)	0 (200)	6,9	2,7	6,6	-3,6	80,7	0,8

Legenda: A<sub>1</sub>: Concentração de xilana (%); A<sub>2</sub>: pH; A<sub>3</sub>: Relação enzima:substrato (U/g de xilana); DR: Desvio relativo.

**Tabela 5** – Coeficientes da regressão (CR), erro padrão (EP) e valores de *t* e *p* obtidos no DCCR 2<sup>3</sup> para as três variáveis respostas avaliadas.

Fator	XOs totais (mg/mL)				Xilobiose e Xilotriose (mg/mL)				% XOs			
	CR	EP	t calc	p*	CR	EP	t calc	p*	CR	EP	t calc	p*
Média	6,99	0,23	30,96	<0,01	6,69	0,21	32,60	<0,01	81,13	2,49	32,62	<0,01
A <sub>1</sub>	2,56	0,11	24,16	<0,01	2,54	0,10	26,31	<0,01	-2,38	1,17	-2,03	0,08
A <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-0,17	0,12	-1,47	0,19	-0,20	0,11	-1,86	0,10	-0,83	1,29	-0,64	0,54
A <sub>2</sub>	-0,09	0,11	-0,84	0,43	-0,30	0,10	-3,07	0,01	7,30	1,17	6,25	<0,01
A <sub>2</sub> <sup>2</sup>	-0,10	0,12	-0,82	0,44	-0,15	0,11	-1,43	0,19	0,11	1,29	0,09	0,93
A <sub>3</sub>	0,12	0,11	1,10	0,30	0,19	0,10	1,92	0,09	-1,55	1,17	-1,33	0,23
A <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0,11	0,12	0,98	0,36	0,13	0,11	1,22	0,26	2,91	1,29	2,26	0,06
A <sub>1</sub> × A <sub>2</sub>	-0,12	0,14	-0,87	0,42	-0,11	0,13	-0,84	0,43	-0,06	1,53	-0,04	0,97
A <sub>1</sub> × A <sub>3</sub>	0,13	0,14	0,94	0,38	0,12	0,13	0,98	0,36	1,04	1,53	0,68	0,52
A <sub>2</sub> × A <sub>3</sub>	0,23	0,14	1,66	0,14	0,28	0,13	2,25	0,06	0,77	1,53	0,50	0,63

Legenda: A<sub>1</sub>: Concentração de xilana (%); A<sub>2</sub>: pH; A<sub>3</sub>: Relação enzima:substrato (U/g de xilana).

**Tabela 6** – ANOVA fatorial do DCCR para as três variáveis respostas avaliadas

<b>XOs totais (mg/mL)</b>									
<b>Fonte de variação</b>	SQ	GL	MQ	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab*</sub>	F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	
Regressão	89,6	1	89,6	479,9	4,5	105,7	0,97	0,97	
Resíduo	2,8	15	0,2						
Falta de ajuste	2,8	13	0,2	28,1					
Erro puro	0,0	2	0,0						
Total	92,4	16							
<b>Xilobiase e xilotriose (mg/mL)</b>									
<b>Fonte de variação</b>	SQ	GL	MQ	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab**</sub>	F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	
Regressão	91,0	6	15,2	117,6	2,5	47,4	0,98	0,97	
Resíduo	1,3	10	0,1						
Falta de ajuste	1,3	8	0,2	36,1					
Erro puro	0,0	2	0,0						
Total	92,3	16							
<b>XOs (%)</b>									
<b>Fonte de variação</b>	SQ	GL	MQ	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab**</sub>	F <sub>cal</sub> /F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>aj</sub>	
Regressão	927,2	3	309,1	21,6	2,6	8,3	0,83	0,79	
Resíduo	186,1	13	14,3						
Falta de ajuste	186,1	11	16,9	473,4					
Erro puro	0,1	2	0,0						
Total	1113,4	16							

Legenda: SQ: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MQ: Média dos quadrados. \*F<sub>tab</sub> considerando p<0,05; \*\*F<sub>tab</sub> considerando p<0,10.

Conforme mostra a Tabela 4, a baixa porcentagem de variação entre a resposta observada e a prevista para cada modelo sugere a precisão do desenho experimental na faixa empregada. A partir dos resultados obtidos na ANOVA fatorial e dos coeficientes de regressão, os seguintes modelos foram estabelecidos a partir das variáveis codificadas, a fim de descrever o comportamento das variáveis resposta em função dos fatores significativos, como seguem:

$$\text{XOs totais (mg/mL)} = 6,87 + (2,56 \times A_1) \quad (3)$$

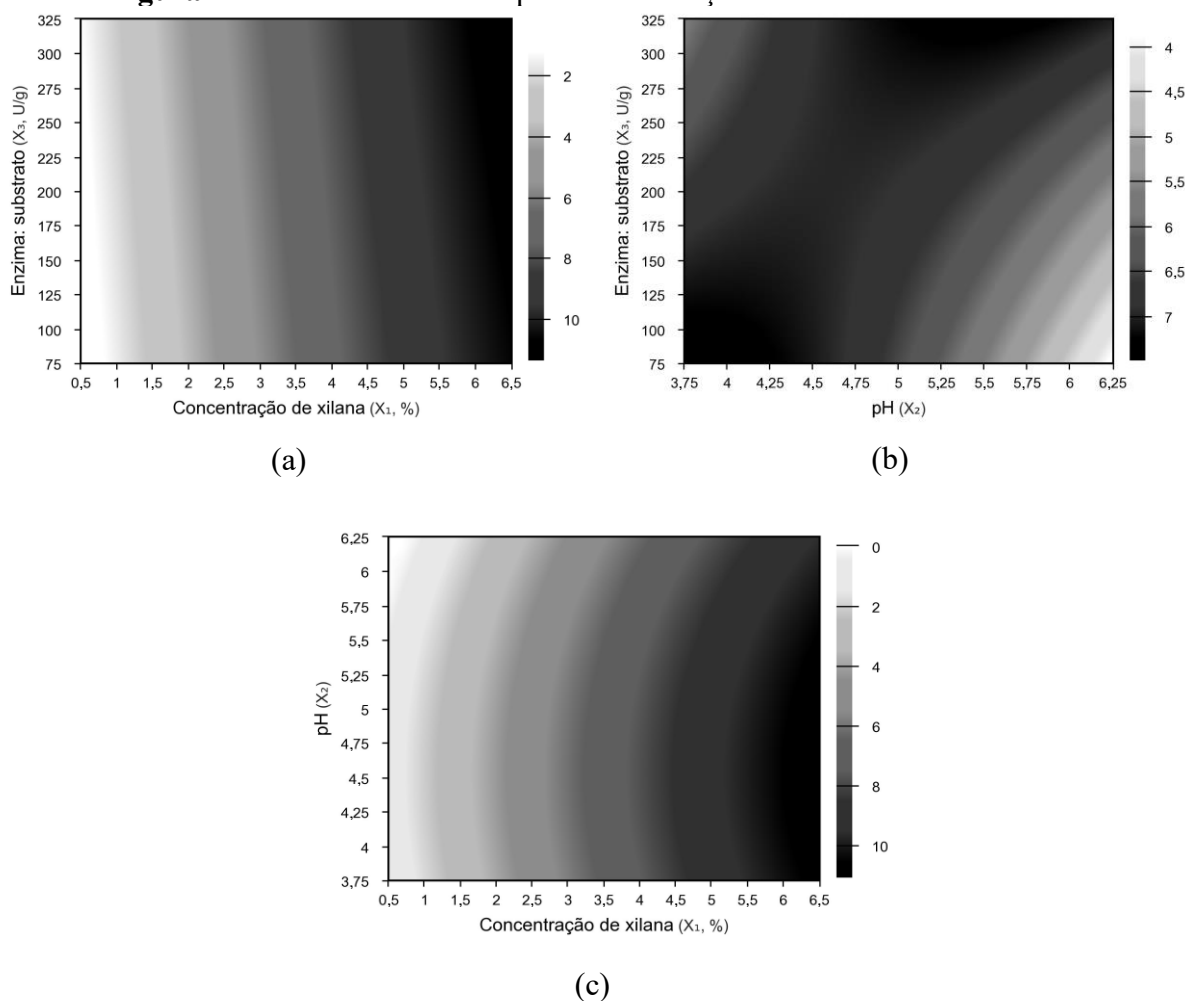
$$\text{Xilobiose e Xilotriose (mg/mL)} = 6,85 + (2,54 \times A_1) + (-0,24 \times A_1^2) + (-0,30 \times A_2) + (-0,19 \times A_2^2) + (-0,19 \times A_3) + (0,28 \times A_2 \times A_3) \quad (4)$$

$$\text{Percentual de XOs (\%)} = 80,43 + (-2,38 \times A_1) + (7,30 \times A_2) + (3,07 \times A_3^2) \quad (5)$$

onde  $A_1$ ,  $A_2$  e  $A_3$  são os valores codificados que representam a concentração de xilana, o pH e a relação enzima:substrato, respectivamente. As Figuras 4 e 5 apresentam as curvas de contorno geradas a partir dos modelos preditivos descritos nas Equações 4 e 5, respectivamente. As curvas de contorno foram plotadas com o intuito de compreender a interação entre os fatores e determinar os seus respectivos valores que permitem a obtenção dos valores máximos para as variáveis resposta em estudo. As curvas de contorno foram construídas considerando a interação entre dois fatores e mantendo o terceiro no nível zero. Apesar do modelo descrito na Equação 3 ter sido preditivo, não foram geradas curvas de contorno a partir do mesmo, uma vez que se trata de uma reta com um único fator. No entanto, o modelo da Equação 3 permite descrever que quanto maior a concentração de xilana no meio reacional, maior é a concentração de XOs totais no hidrolisado, dentro da faixa estudada. O aumento na produção de XOs em concentrações mais elevadas de substrato também foi observado por Guido (2016) e Achary e Prapulla (2009).

A Figura 4a ilustra graficamente o efeito da variação nos níveis de concentração de xilana e relação enzima:substrato sobre a concentração de  $X_2$  e  $X_3$  no hidrolisado, mantendo o pH fixo nível zero. Esta sugere que maiores concentrações de  $X_2$  e  $X_3$  são obtidas quando ambos os fatores estão nos níveis mais elevados. No entanto, a Figura 4b indica que o uso de pH mais ácido e menor relação enzima:substrato, ou uso combinado de pH ligeiramente ácido (entre 5,0 e 6,0) e maior relação enzima:substrato, proporcionam maior produção de  $X_2$  e  $X_3$ . Ainda, na Figura 4c, a maior produção de  $X_2$  e  $X_3$  é alcançada quando maiores concentrações de xilana e pH levemente ácido (entre 4,0 e 5,0) são utilizados no meio reacional.

Por outro lado, as Figuras 5a-c ilustram que o maior percentual de XOs é alcançado quando menores concentrações de xilana e pH mais elevado são utilizados na hidrólise, podendo ser aplicada a relação enzima:substrato nos níveis inferior ou superior. Uma vez que o uso de xilana em altas concentrações permite obter hidrolisados com alto teor de XOs totais e  $X_2$  e  $X_3$ , a diminuição da sua concentração não parece vantajosa. No entanto, o uso de pH mais elevado poderia contribuir na obtenção de hidrolisado com menor conteúdo de xilose residual.

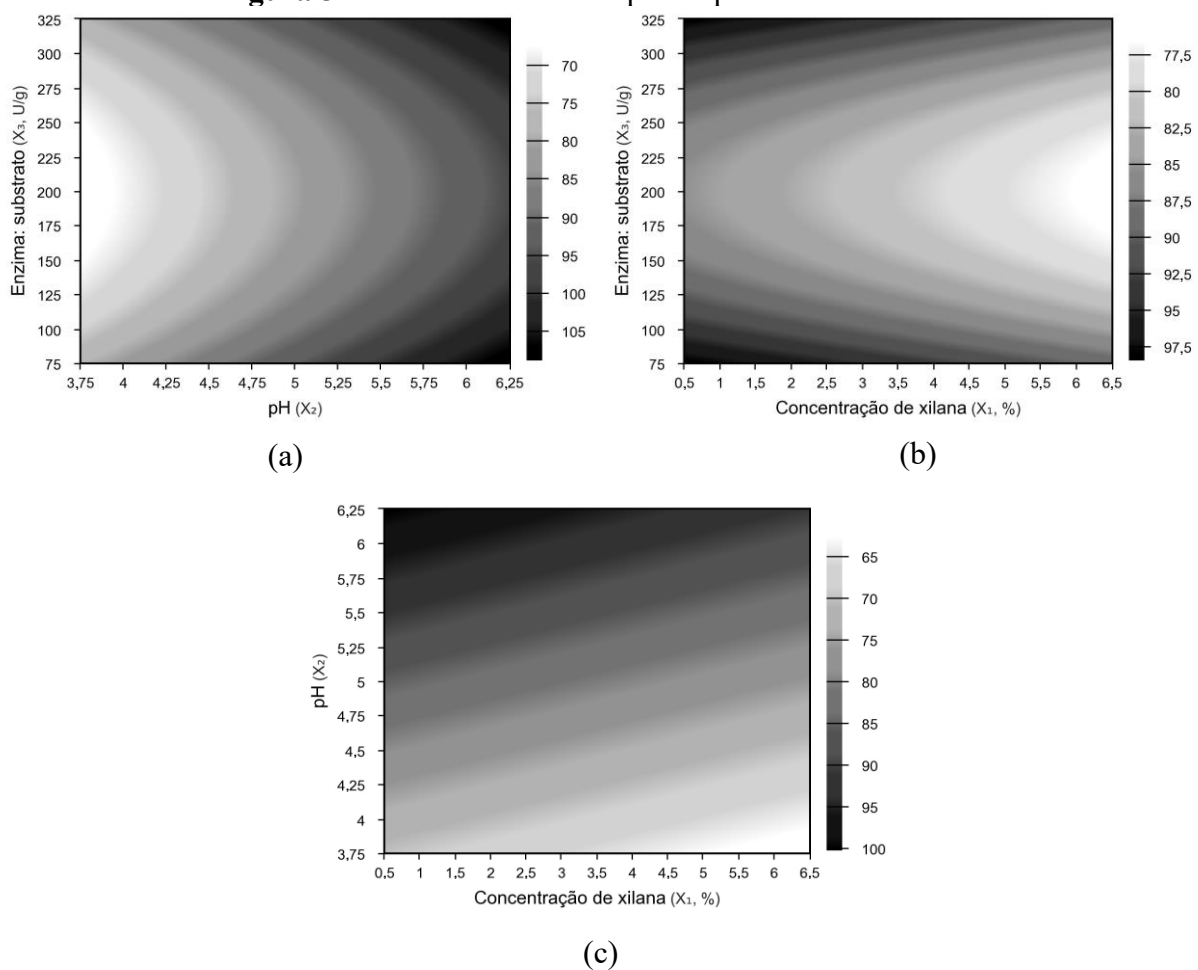
**Figura 4** – Curvas de contorno para concentração de xilobiose e xilotriose.

Baseado nos resultados obtidos pelas curvas de contorno, algumas condições foram ensaiadas a fim de validar os modelos obtidos para as três variáveis respostas: 6% (m/v) de xilana (+1,68), pH 6 (+1,68) e 100 U/g (-1,68); 6% (m/v) de xilana (+1,68), pH 6 (+1,68) e 300 U/g (+1,68); e 6% de xilana (+1,68), pH 6 (+1,68) e 260 U/g (+1). Ainda, visto que o ensaio 10 apresentou a maior produção de XOs e  $X_2$  e  $X_3$  comparado aos demais, uma nova hidrólise sob as mesmas condições reacionais foi realizada. Os resultados das validações estão apresentados na Tabela 7. Os menores desvios relativos entre os valores experimentais e preditos utilizando os três modelos foram observados nos ensaios B e D. Em contraste, desvios relativamente altos foram observados no ensaio C, o qual utilizou condições extremas de concentração de xilana (+1,68), pH (+1,68) e relação enzima:substrato (+1,68). No ensaio A, elevados desvios relativos foram observados para os modelos que descrevem a concentração de XOs totais e de  $X_2$  e  $X_3$ ; no entanto, para o modelo de percentual de XOs, o desvio foi baixo.

Conforme mostra a Tabela 7, o uso do pH 6,0 permitiu obter hidrolisados com maior percentual de XOs, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os ensaios A, B e

C. Por outro lado, os hidrolisados obtidos nos ensaios A, B e C se diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) quanto aos teores de XOs totais e de  $X_2$  e  $X_3$ , fato este provavelmente relacionado à carga da enzima utilizada. Apesar da Equação 3 descrever apenas a concentração de xilana como responsável pela alta concentração de XOs totais, a curva de contorno disposta na Figuras 4b indica o uso de cargas mais elevadas de enzima em situações em que o pH do meio reacional é ligeiramente ácido (entre 5,0 e 6,0), na produção de  $X_2$  e  $X_3$ . Portanto, a relação enzima:substrato parece influir indiretamente nos teores de XOs obtidos no hidrolisado final.

**Figura 5** – Curvas de contorno para o percentual de XOs.



O aumento da carga enzimática de 100 para 260 U/g proporcionou maior produção de XOs totais. No entanto, ao aumentar para 300 U/g, a quantidade produzida dos oligômeros diminuiu drasticamente. Isso pode ter ocorrido por sobrecarga de componentes no meio reacional, uma vez que tanto a concentração de xilana quanto a relação enzima:substrato estavam no maior nível. Com o aumento da viscosidade do meio reacional e, conseqüentemente, menos água disponível, a homogeneização deste se torna mais difícil, comprometendo a ação da xilanase e, portanto, a formação de produto.

**Tabela 7** – Ensaio de validação do DCCR (resultados obtidos em 24 h de hidrólise).

<b>Ensaio</b>	<b>Xilana (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Enzima:substrato (U/g xilana)</b>	<b>XOs totais (mg/mL)</b>	<b>DR (%)</b>	<b>X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> (mg/mL)</b>	<b>DR (%)</b>	<b>% XOs</b>	<b>DR (%)</b>
<b>A</b>	6	6	100	7,9 ± < 0,1 <sup>b</sup>	-41,6	7,1 ± < 0,1 <sup>b</sup>	-25,8	95,4 ± 2,9 <sup>a</sup>	-2,1
<b>B</b>	6	6	260	10,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	-10,4	9,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,2	99,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,4
<b>C</b>	6	6	300	6,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	-69,3	5,5 ± 0,8 <sup>c</sup>	-79,5	98,9 ± < 0,1 <sup>a</sup>	1,6
<b>D</b>	6	5	200	10,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	4,5	10,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	-1,4	80,9 ± 0,8 <sup>b</sup>	5,5

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey (p > 0,05). Legenda: X<sub>2</sub> – xilobiose; X<sub>3</sub> – xilotriose.

Este comportamento vem ao encontro do estudo de Kiran, Akpinar e Bakir (2013), os quais mencionam que a atividade da xilanase pode diminuir devido às limitações de transferência de massa causadas pelo aumento da concentração de sólidos no meio reacional. Outros estudos mencionam que a produção de XOs é favorecida com o aumento da carga enzimática, porém até certo nível em que a partir deste a produção de oligossacarídeos se mantém constante (GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013) ou decai consideravelmente (AZELEE et al., 2016; BOONCHUAY et al., 2014; SEESURIYACHAN; KAWEE-AI; CHAIYASO, 2017).

Além disso, o ensaio B permitiu obter hidrolisados com teores de XOs totais e de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub> significativamente iguais aos obtidos na condição do ensaio 10 (ensaio D), porém com menor quantidade de xilose residual. Assim, a condição do ensaio B se mostrou a mais apropriada para produção de XOs enriquecidos de X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>, bem como baixa formação de xilose. A maximização pelo DCCR permitiu aumentar a produção de XOs totais em 1,5 vezes comparado às condições iniciais de hidrólise em sistema de agitação orbital (6,7 mg/mL). Ainda, o percentual de XOs aumentou de 89,7% para 99,1%, possibilitando obter hidrolisados praticamente livres de xilose. O perfil de carboidratos do hidrolisado obtido pelo ensaio B consistiu em 62,4 ± 2,4% de xilobiose, 32,7 ± 1,9 % de xilotriose, 4,18 ± 0,9 % de XOs de maior GP e 0,9 ± < 0,1% de xilose.

Contudo, cabe ressaltar que a conversão de xilana em XOs diminuiu de 22,2% para 16,9% em relação à condição de hidrólise inicial, fato este atrelado ao aumento da concentração de substrato no meio reacional. A proporção de XOs por substrato para o processo estabelecido no ensaio B foi de 168,3 mg XOs/g de xilana. Conforme Yoon, Woodams e Hang (2006), a menor eficiência de conversão observada nas concentrações de substrato mais elevadas pode ocorrer devido a menor disponibilidade de água no meio, o que aumenta a sua viscosidade e pode reduzir a taxa de conversão na hidrólise. Outros autores também mencionam a diminuição da conversão de substrato em XOs ao avaliarem o efeito da sua concentração na produção de oligossacarídeos por hidrólise enzimática (AACHARY; PRAPULLA, 2009; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; MAZLAN et al., 2019; YAMAMOTO et al., 2019).

Chapla, Pandit e Shah (2012) investigaram os efeitos dos parâmetros reacionais de hidrólise como tempo de reação (2-48 h), concentração de enzima (20-100 U/g substrato), concentração de substrato (0,1-3,0%) e temperatura (40-50°C), sobre a produção de XOs a partir de xilana de sabugo de milho e xilanase de *Aspergillus foetidus* MTCC 4898. Os autores constataram que a máxima produção de XOs (6,7 mg/mL) foi obtida utilizando 20 U/g de



enzima, 2,0% (m/v) de xilana, 45 °C e 8 h de reação. Para a produção de XOs por hidrólise de xilana de sabugo de milho utilizando xilanase de *Bacillus aerophilus* KGJ2, Gowdhaman e Ponnusami (2015) avaliaram a influência do tempo de reação (6-24 h) e concentrações de enzima (5-25 U/g substrato) e de substrato (1-5%), mantendo a temperatura fixa em 70 °C. A produção máxima de XOs (5,7 mg/mL) foi obtida a partir do uso de 20 U/g de enzima, 5% (m/v) de xilana e 12 h de reação.

Yang et al. (2011) avaliaram a produção de XOs utilizando xilana de *Populus tomentosa* (2,0%, m/v) e xilanase de *Pichia stipitis*. Após avaliação de parâmetros reacionais como tempo de reação (2-24 h), concentração de enzima (15-45 U/g), temperatura (40-50 °C) e pH (3,6-6,0), os autores obtiveram a máxima produção de XOs (3,9 mg/mL) nas seguintes condições: 25 U/g, 50 °C, pH 5,4 e 8 h de reação. Os autores ainda mencionam que 37% da xilana foi convertida em XOs, representados principalmente por xilobiose, xilotriose e xilotetraose, os quais juntos totalizavam 95% do total dos oligossacarídeos liberados na reação. Boonchuay et al. (2014) otimizaram a produção de XOs a partir de sabugo de milho pré-tratado e xilanase *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948. Para tal, utilizaram um delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> para avaliar a influência de parâmetros reacionais como carga enzimática (82-168 U/g), pH (5,5-7,5) e temperatura (38-72 °C), mantendo a concentração de substrato fixa (15%, m/v). A máxima produção de XOs (162,9 mg de XOs/g de substrato) foi alcançada utilizando pH de 6,2, 129,4 U/g e 54,8 °C.

Na produção de XOs por hidrólise de xilana de sabugo de milho utilizando xilanase de *Aspergillus oryzae* MTCC 5154, Aachary e Prapulla (2009) avaliaram o efeito do tempo de reação (6-42 h), pH (4,0-6,0), temperatura (40-60 °C), concentrações de substrato (2-10%) e enzima (4-20 U/mL). A máxima produção de XOs (10,2 mg/mL) foi alcançada em pH 5,4, 50 °C, 6% (m/v) de xilana e 14 U/mL de enzima. Ainda, o perfil de carboidratos do hidrolisado produzido nas condições maximizadas de reação correspondeu a 81% de XOs totais, sendo este percentual composto majoritariamente por xilobiose (72,5%). Yamamoto et al. (2019) produziram XOs a partir de xilana de alga vermelha (*Palmaria* sp.) e extrato enzimático comercial Amano 90. Após avaliarem o efeito da carga enzimática (13,5- 54 U), concentração de substrato (10-30 mg/mL) e tempo de reação (2-36 h), mantendo a temperatura (50 °C) e pH (4,5) fixos, os autores obtiveram a máxima produção de XOs (3,5 mg/mL) nas seguintes condições: 10 mg/mL de xilana, 54 U de enzima e 24 h de reação.

Em comparação aos estudos acima mencionados, o ensaio B proporcionou a obtenção de um hidrolisado contendo 10,1 mg/mL de XOs totais, composto majoritariamente por xilobiose (62,4%) e xilotriose (32,7%), e baixa concentração de xilose residual (0,9%). Os

resultados obtidos se mostraram promissores frente aos estudos mencionados, seja pela quantidade de XOs totais ou pelo perfil de carboidratos no hidrolisado, destacando-se principalmente pela baixa concentração de xilose. Apesar da conversão de xilana em XOs ter sido baixa (168,3 mg XOs/g de xilana) na condição reacional maximizada, o resultado obtido se mostrou semelhante ao encontrado em outros estudos (BOONCHUAY et al., 2014).

#### 4 CONCLUSÃO

A avaliação da influência dos parâmetros reacionais de hidrólise possibilitou maximizar a produção de XOs totais com mínima geração de xilose, por hidrólise da xilana de faia com xilanase bruta de *A. pullulans*. A obtenção conjunta de altas concentrações de XOs totais (10,1 mg/mL) e XOs de baixo GP (9,7 mg/mL), além de alto percentual de XOs (99,1%) no hidrolisado, foram obtidas nas seguintes condições: 6% (m/v) de xilana de faia, 260 U/g de xilanase bruta, pH 6,0, 180 rpm (agitação orbital), 40°C por 24 h de reação. A maximização das condições reacionais permitiu aumentar tanto a produção de XOs totais em 1,5 vezes como o percentual de XOs em 9,4%, quando comparado às condições iniciais de hidrólise (6,7 mg/mL e 89,7%, respectivamente).

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging Prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.

AJIJOLAKEWU, K. A.; PENG, C.; KEONG, C.; ABDULLAH, W.; NADIAH, W. Characterization of novel *Trichoderma hemicellulase* and its use to enhance downstream processing of lignocellulosic biomass to simple fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 166–175, 2017.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; CARDOSO, B. B.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides

produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma species*. **Food Chemistry**, v. 270, p. 86–94, 2019.

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

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

BANKEEREE, W.; AKADA, R.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H.; PRASONGSUK, S. Enzymatic hydrolysis of black liquor xylan by a novel xylose-tolerant, thermostable  $\beta$ -xylosidase from a tropical strain of *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 919–934, 2018.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BOONCHUAY, P.; TECHAPUN, C.; SEESURIYACHAN, P.; CHAIYASO, T. Production of xylooligosaccharides from corncob using a crude thermostable endo-xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and prebiotic properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 1515–1523, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1999.

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

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

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology and Biotechnology**, v. 2, p. 210–215, 1991.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) - Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2018. **Safety of xylooligosaccharides (XOs) as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 2 de abril de 2020.

FARYAR, R.; LINARES-PASTÉN, J. A.; IMMERZEEL, P.; MAMO, G.; ANDERSSON, M.; STALBRAND, H.; MATTIASSON, B.; KARLSSON, E. N. Food and bioproducts processing production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 3, p. 1–10, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 458**, 2013. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

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

GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A.; ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.

GUIDO, E. S. **Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática de xilanas**. 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.

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.

HANSEN, C. H. F.; FROKIAER, H.; CHRISTENSEN, A. G.; BERGSTROM, A.; LICHT, T. R.; HANSEN, A. K.; METZDORFF, S. B. Dietary xylooligosaccharide downregulates ifn- $\gamma$  and the low-grade inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  systemically in mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 4, p. 533–540, 2013.

IUPAC, I. U. OF P. AND A. C. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains - Recommendations of Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). **Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, 1982.

KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015.

KIM, Y. A.; YOON, K. H. Characterization of a *Paenibacillus woosongensis*  $\beta$ -xylosidase/  $\alpha$ -arabinofuranosidase produced by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1711–1716, 2010.

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

LI, H. Y.; WANG, B.; WEN, J. L.; CAO, X. F.; SUN, S. N.; SUN, R. C. Availability of four energy crops assessing by the enzymatic hydrolysis and structural features of lignin before and after hydrothermal treatment. **Energy Conversion and Management**, v. 155, p. 58–67,

2018.

LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.

MAZLAN, N. A.; SAMAD, K. A.; YUSSOF, H. W.; SAUFI, S. M.; JAHIM, J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 575–584, 2019.

MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, L. C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylooligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I. DE; 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.

OHTA, K.; FUJIMOTO, H.; FUJII, S.; WAKIYAMA, M. Cell-associated  $\beta$ -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.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

REQUE, P. M.; PINILLA, C. M. B.; GAUTÉRIO, G. V.; KALIL, S. J.; BRANDELLI, A. Xylooligosaccharides production from wheat middlings bioprocessed with *Bacillus subtilis*. **Food Research International**, v. 126, p. 108673, 2019.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2012.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SEESURIYACHAN, P.; KAWEE-AI, A.; CHAIYASO, T. Green and chemical-free process of enzymatic xylooligosaccharide production from corncob: Enhancement of the yields using a strategy of lignocellulosic destructuration by ultra-high pressure pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 537–544, 2017.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of

endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; SASMAL, S.; MUIR, J.; ARORA, A. High xylan recovery using two stage alkali pre-treatment process from high lignin biomass and its valorisation to xylooligosaccharides of low degree of polymerisation. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 110–117, 2018.

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

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.

SUKRI, S. S. M.; MIMI SAKINAH, A. M. Production of High Commercial value xylooligosaccharides from meranti wood sawdust using immobilised xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 278–290, 2018.

SUN, Z.; LV, W.; YU, R.; LI, J.; LIU, H.; SUN, W.; WANG, Z.; LI, J.; ZHE, S.; QIN, Y. Effect of a straw-derived xylooligosaccharide on broiler growth performance, endocrine metabolism, and immune response. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 105–109, 2013.

SUREK, E.; BUYUKKILECI, A. O. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 565–571, 2017.

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

XIAO, X.; BIAN, J.; PENG, X.; XU, H.; XIAO, B.; SUN, R. Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 63–70, 2013.

YAMAMOTO, Y.; KISHIMURA, H.; KINOSHITA, Y.; SABURI, W.; KUMAGAI, Y.; YASUI, H.; OJIMA, T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulse (*Palmaria* sp.) wasted in Japan. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 117–122, 2019.

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

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

YU, X.; YIN, J.; LI, L.; LUAN, C.; ZHANG, J.; ZHAO, C.; LI, S. Prebiotic potential of

xylooligosaccharides derived from corn cobs and their in vitro antioxidant activity when combined with *Lactobacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1084–1092, 2015.

ARTIGO 5

CARACTERIZAÇÃO DE HIDROLISADOS CONTENDO XILO-OLIGOSSACARÍDEOS  
OBTIDOS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO





## RESUMO

Xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros não digeríveis e fermentáveis que apresentam inúmeras propriedades biológicas, as quais incluem potencial atividade prebiótica, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. Diferentes estratégias podem ser aplicadas à produção de XOs a partir de materiais ricos em xilana, no entanto, a hidrólise enzimática e o cultivo microbiano se encontram entre as mais promissoras devido às vantagens que apresentam. Dependendo da estratégia adotada, oligômeros com distintas estruturas e graus de polimerização (GP) poderão ser obtidos, o que refletirá nas propriedades biológicas. O presente estudo teve como objetivo a caracterização de hidrolisados contendo XOs – em termos de teor e composição de XOs, atividade antioxidante e antibacteriana – obtidos por diferentes estratégias de produção. Dois hidrolisados foram obtidos por hidrólise enzimática utilizando xilanase bruta de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, diferenciando-se quanto ao substrato – xilana de madeira de faia (XFH) ou xilana de casca de arroz (XAH) – e condições de reação. O terceiro hidrolisado (XFB), obtido a partir do cultivo submerso de *Bacillus subtilis* 3610 em meio contendo xilana de faia, foi fornecido pelo Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Os hidrolisados enzimáticos foram caracterizados quanto ao teor e composição de XOs. A atividade antioxidante dos três hidrolisados foi ensaiada por três metodologias – ABTS, DPPH e FRAP –, sendo também determinado o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais. Ainda, a atividade bacteriana dos três hidrolisados foi avaliada pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) frente às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Lactobacillus fructivorans*. Os maiores teores de XOs foram observados em XFH (10,3 mg/mL) e XAH (2,0 mg/mL), os quais apresentaram maior conteúdo de xilobiose e xilotriose em relação ao XFB. A maior atividade antioxidante foi observada por XFB, seguido de XAH e XFH, o que demonstra o potencial de aplicação dos hidrolisados em formulações alimentícias e em cosméticos. Do mesmo modo, XFB apresentou o maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, os quais podem estar relacionados em parte ao poder antioxidante deste hidrolisado. Embora os hidrolisados não tenham sido capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *P. fluorescens* e *L. fructivorans*, estudos futuros devem ser realizados de modo a investigar a atividade antimicrobiana destes frente a outras cepas bacterianas.

**Palavras-chave:** Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Cultivo microbiano. Hidrólise enzimática. Xilo-oligômeros.



## 1 INTRODUÇÃO

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros não digeríveis formados por monômeros de xilose unidos por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 (FREITAS; CARMONA; BRIENZO, 2019). A estrutura dos XOs pode apresentar entre 2 a 10 unidades de xilose (IUPAC, 1982), bem como grupamentos laterais conectados à cadeia principal ( $\alpha$ -D-glicopiranosil ácido urônico ou seu derivado, grupos acetila e resíduos de arabinofuranosil), os quais resultam em oligômeros ramificados (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Apesar dos XOs estarem naturalmente presentes em brotos de bambu, frutas, vegetais e mel, estes não se encontram em altas quantidades (SAMANTA et al., 2015), o que implica no estudo e desenvolvimento de estratégias para a produção destes oligômeros.

Dentre os processos aplicáveis à produção de XOs (ex. auto-hidrólise, hidrólise química, hidrólise enzimática, ou a combinação destes) (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009; GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019; HO et al., 2014; XIAO et al., 2013), a aplicação de xilanases se destaca industrialmente devido à sua especificidade na desconstrução da cadeia polissacarídica, operação em condições brandas de temperatura e pressão, não formação de produtos tóxicos e baixa liberação de monossacarídeos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Na produção de XOs por hidrólise enzimática, materiais como sabugo de milho (LIU et al., 2018), palha de trigo (ANTOV; ĐORĐEVIĆ, 2017), palha de alho (KALLEL et al., 2015a), palha de arroz (MAZLAN et al., 2019) e bagaço de cana (BIAN et al., 2013), têm sido empregados como fonte de xilana, o que além de reduzir os custos de processo, explora a característica dos XOs em serem os únicos oligômeros no mercado produzidos a partir de biomassa lignocelulósica (MONIZ et al., 2016).

Em geral, a produção de XOs por hidrólise enzimática requer o pré-tratamento da biomassa vegetal a fim de extrair a sua porção hemicelulósica (xilana) (JÖNSSON; MARTÍN, 2016), o que acrescenta mais uma etapa ao processo e encarece os custos de produção. Dentro desta perspectiva, a utilização da biomassa lignocelulósica por micro-organismos têm demonstrado notável potencial para produção de XOs, principalmente devido à simplicidade do processo (AMORIM et al., 2019a). Alguns estudos reportam a produção conjunta de XOs e enzimas xilanolíticas no meio de cultivo (GAUTÉRIO et al., 2018; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; PEREIRA et al., 2018), enquanto outros estão voltados à obtenção de XOs propriamente dita (AMORIM et al., 2019b). O uso de biomassas como farinha de trigo (REQUE et al., 2019) e dreche cervejeira (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019) como substrato, além de ferramentas da engenharia genética para melhoramento de espécies microbianas (AMORIM et al., 2018), fazem com que a obtenção de XOs por cultivo microbiano se destaque juntamente à hidrólise enzimática frente às demais tecnologias empregadas para este fim.

O interesse em estabelecer processos adequados de obtenção de XOs – isto é, que resultem em quantidade de oligômeros e conversão satisfatórias – existe devido às diversas propriedades biológicas que estes compostos apresentam. Os XOs são considerados compostos prebióticos devido à sua capacidade em estimular o crescimento da microflora intestinal benéfica ao intestino humano, bem como inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (AMORIM et al., 2020; NIETO-DOMÍNGUEZ et al., 2017; SAJIB et al., 2018). Estudos demonstram que os XOs também podem prevenir o desenvolvimento de diabetes (YANG et al., 2015a) e neurotoxicidade (KRISHNA et al., 2015), melhorar o metabolismo lipídico (GUERREIRO; OLIVA-TELES; ENES, 2015) e estimular a resposta imune (SUN et al., 2013), além de apresentar ação anti-inflamatória (HANSEN et al., 2013), antimicrobiana (YU et al., 2015) e antioxidante (ZHOU et al., 2018).

Os XOs apresentam caráter atóxico e não carcinogênico (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015), sendo capazes de apresentar seus efeitos benéficos mesmo em baixas doses diárias (FINEGOLD et al., 2014). Ainda, os XOs apresentam certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*) para uso em alimentos (GRN 458, FDA, 2013), sabor doce (SAMANTA et al., 2015), estabilidade frente a processos térmicos e condições ácidas de pH (WANG et al., 2009), bem como preço competitivo em relação a outros oligômeros (AMORIM et al., 2019a), tornando-os aplicáveis na formulação de produtos alimentícios (AYYAPPAN et al., 2016; FERRÃO et al., 2018) e rações animais (ABASUBONG et al., 2018).

Diferentes processos de obtenção de XOs podem resultar em oligômeros com distintas estruturas e graus de polimerização (GP) (AMORIM et al., 2018; REDDY; KRISHNAN, 2016; SINGH et al., 2018), o que reflete em suas propriedades biológicas (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). A escolha do processo mais adequado de produção dos XOs não depende apenas da quantidade produzida e conversão do substrato em produto, mas também das características que os oligômeros irão apresentar, e conseqüentemente, em suas possíveis aplicações industriais. Neste sentido, o presente estudo objetivou a caracterização de hidrolisados contendo XOs – termos de teor de XOs e composição, atividades antioxidante e antibacteriana – obtidos por diferentes estratégias de produção.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 Micro-organismos

A cepa de *Aureobasidium pullulans* CCT 1261, utilizada para a produção de xilanase em cultivo submerso, foi adquirida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil). A cepa selvagem de *Bacillus subtilis* 3610 contendo o gene de xilanase xyn2 de *Trichoderma reesei* (AMORIM et al., 2018) foi utilizada na produção de XOs em cultivo submerso. As cepas

*Escherichia coli* CECT 736, *Pseudomonas fluorescens* DSMZ 50090 e *Lactobacillus fructivorans* CECT 8288, utilizadas nos ensaios antibacterianos, foram fornecidas pela coleção de culturas do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho (Braga, Portugal).

### 2.1.2 Substratos agroindustriais

O farelo e a casca de arroz foram cedidos gentilmente por indústria de beneficiamento de arroz da região Sul do Rio Grande do Sul. Após secagem em estufa (50 °C, 24 h), os substratos foram submetidos à redução de tamanho (tamanho de partícula menor que 0,5 mm) e armazenado em sacos de polietileno a -18 °C até sua utilização.

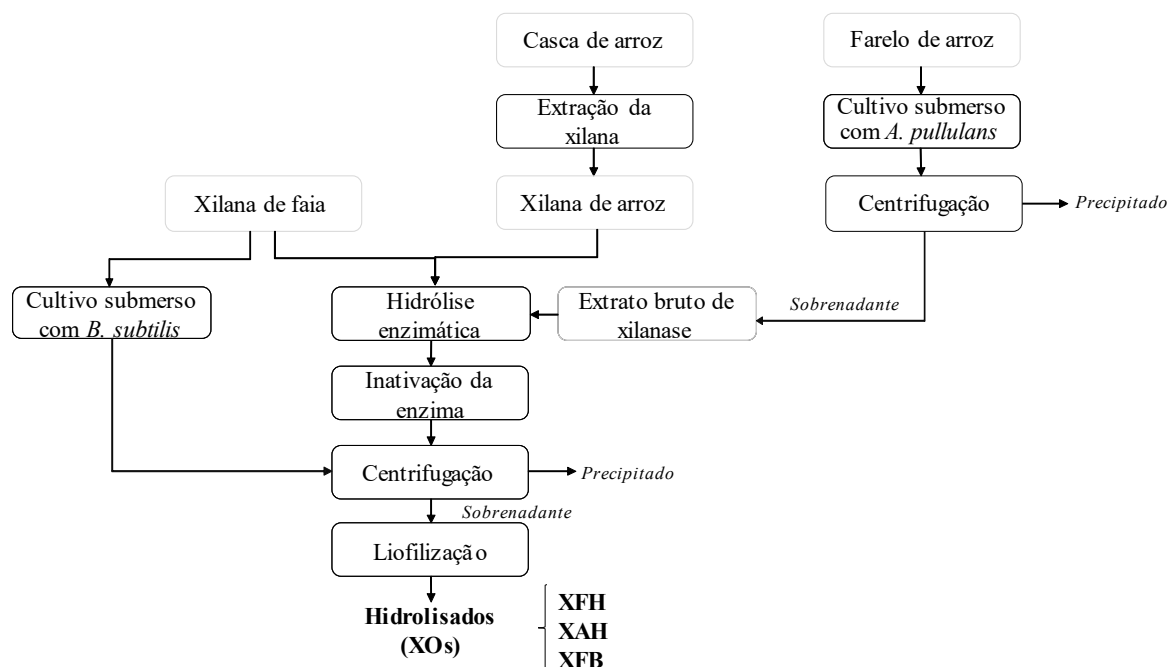
### 2.1.3 Demais reagentes

A xilana de madeira de faia foi adquirida da *Apollo Scientific* (Bredbury, Reino Unido), enquanto os padrões de XOs (xilobiose, xilotriose, xilotetralose, xilopentose e xilohexose) foram adquiridos da *Megazyme* (Bray, Irlanda). Os antioxidantes sintéticos BHT (butil hidroxitolueno) e BHA (butil hidroxianisol), os reagentes Folin Cicalteau, ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e TPTZ (2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina), os padrões de xilose, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), ácido gálico e quercitina, e os açúcares rafinose e lactulose foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (San Luis, Estados Unidos). A inulina solúvel foi adquirida da *Entelees* (Guadalajara, México). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

## 2.2 OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS POR DIFERENTES ESTRATÉGIAS

Figura 1 mostra o fluxograma geral de obtenção de XOs por diferentes estratégias de produção. A descrição dos processos de obtenção está apresentada nos subitens a seguir.

**Figura 1** – Fluxograma de obtenção de XOs por diferentes estratégias de produção. XFB – XOs obtidos a partir do cultivo submerso com *B. subtilis* 3610, XFH – XOs obtidos a partir da hidrólise enzimática da xilana de faia e XAH – XOs obtidos a partir da hidrólise enzimática da xilana de arroz.



### 2.2.1 Obtenção de xilo-oligossacarídeos por cultivo submerso

O hidrolisado contendo XOs, produzido por Amorim et al. (2019b) a partir do cultivo submerso de *B. subtilis* 3610 geneticamente modificado, foi fornecido na forma liofilizada pelo Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Este hidrolisado, caracterizado previamente por Amorim et al. (2019b) em termos de teor e composição de XOs e rendimento, foi utilizado na determinação de compostos fenólicos e flavonoides (item 2.4), atividades antioxidante (item 2.3) e atividade antibacteriana (item 2.5).

### 2.2.2 Obtenção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática

#### 2.2.2.1 Obtenção do extrato enzimático de xilanase

O extrato de xilanase foi obtido a partir do cultivo submerso de *A. pullulans* CCT 1261. Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL contendo 150 mL meio estéril (121 °C, 15 min) composto por 61,9 g/L de farelo de arroz, 1,5 g/L de extrato de levedura e 3,6 g/L de

sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em pH 7,0 (GAUTÉRIO et al., 2020). Os frascos foram inoculados com 2% (v/v) de inóculo da levedura (densidade óptica de 0,8 a 620 nm) (SUGUMARAN et al., 2013) e mantidos a 28 °C, 150 rpm (agitação orbital) por 72 h. Após, o meio foi centrifugado (4757 × g a 4 °C por 30 min), e o sobrenadante livre de células foi filtrado a vácuo em membrana *Whatman* n° 1 (Millipore, Burlington, Estados Unidos), obtendo-se assim o extrato enzimático bruto de xilanase.

#### 2.2.2.2 Extração de xilana de casca de arroz

A xilana da casca de arroz foi extraída conforme descrito por Hauli et al. (2013) com algumas modificações. Inicialmente, a casca de arroz (preparada conforme o item 2.1.2) foi adicionada de hidróxido de sódio (NaOH) 10% (m/v) na proporção de 1:10 (g casca: mL solução alcalina), sendo a mistura mantida a 50 °C sob agitação orbital (100 rpm) por 16 h. Após, a mistura foi submetida ao tratamento térmico a 100 °C em autoclave por 3 h. A mistura foi resfriada em banho de gelo e centrifugada (4757 × g a 4 °C por 30 min), e o sobrenadante foi acidificado com ácido clorídrico (HCl) 12 mol/L até pH 5,0. A precipitação da xilana foi alcançada pela adição de etanol 95% (v/v) (1,5 volume) à fração acidificada. O precipitado foi mantido na solução etanólica por 1 h a 25 °C e coletado por centrifugação (4757 × g, 4 °C, 30 min). Por fim, o precipitado foi seco em estufa a 55 °C por 24 h e moído em triturador de bancada até a obtenção de um pó fino.

#### 2.2.2.3 Hidrólise enzimática para produção de xilo-oligossacarídeos

Os XOs foram produzidos por hidrólise enzimática das xilanas utilizando o extrato bruto de xilanase. Para tal, as soluções de xilana foram preparadas em tampão citrato de sódio 50 mmol/L e mantida *overnight* sob agitação orbital (100 rpm) até sua completa solubilização. As hidrólises foram conduzidas a 40 °C e agitação orbital (180 rpm) por 24 h em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio reacional composto por xilana de arroz (3%, m/v) em pH 5,3 e extrato enzimático (200 U/g substrato) (AACHARY; PRAPULLA, 2009); ou xilana de faia (6%, m/v) em pH 6,0 e extrato enzimático (260 U/g substrato). Ao término da hidrólise, o meio foi aquecido a 100 °C por 5 min para inativação enzimática e centrifugado (4757 × g a 4 °C por 30 min), sendo o sobrenadante liofilizado para posteriores ensaios de caracterização.



## 2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 2.3.1 Capacidade de sequestro do radical ABTS

A capacidade de sequestro do radical ABTS foi determinada conforme Ballesteros et al. (2015) e Re et al. (1999) com modificações. O radical ABTS foi preparado através da mistura das soluções estoque de ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) (2,45 mmol/L), a qual foi agitada em *vórtex* por 2 min e sonicada em banho ultrassônico por 20 min. Em seguida, a mistura foi mantida no escuro a 4 °C por 16 h até alcançar um estado estável de oxidação. Após este período, o radical ABTS foi diluído em tampão acetato de sódio 20 mmol/L pH 4,5 até a absorvância de 0,7 a 734 nm.

Para cada hidrolisado, diluições foram preparadas em água de modo que a porcentagem de inibição do radical alcançasse o valor mínimo de 50% ( $IC_{50}$ ). Deste modo, soluções de XFH e XAH foram preparadas em água entre 4 a 30 mg/mL, enquanto para o XFB as concentrações foram de 2 a 8 mg/mL. Para as amostras de antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) e de prebióticos comerciais (lactulose, rafinose e inulina), as concentrações utilizadas foram de 1 mg/mL e 40 mg/mL preparadas em etanol e água, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos pela adição de 130  $\mu$ L de amostra e 3 mL do radical ABTS. A mistura foi mantida no escuro durante 30 min à temperatura ambiente, seguida de leitura da absorvância em espectrofotômetro a 734 nm. Um ensaio controle foi realizado substituindo o volume de amostra por água destilada. O percentual de inibição do radical para os três hidrolisados em cada concentração avaliada foi calculado conforme a Equação 1.

$$\text{Inibição (\%)} = \left(1 - \frac{A_s}{A_c}\right) \times 100 \quad (1)$$

Onde  $A_s$  é absorvância da mistura reacional contendo a amostra e  $A_c$  é a absorvância do ensaio controle, respectivamente. Uma curva padrão (Apêndice 1) foi construída com o padrão Trolox convenientemente diluído em etanol (50, 100, 200, 250, 300, 400 e 500  $\mu$ mol/L). Os  $IC_{50}$  de cada hidrolisado e do padrão foram obtidos através do coeficiente angular do gráfico percentual de inibição *versus* concentração. A capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de Trolox (TE) por g de hidrolisado ( $\mu$ mol TE/g hidrolisado). Os ensaios foram realizados em cinco réplicas.

### 2.3.2 Capacidade de sequestro do radical DPPH

A capacidade de sequestro do radical DPPH foi determinada conforme Ballesteros et al. (2015) e Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com modificações. Assim como no método ABTS, diluições

dos hidrolisados foram feitas de modo que a porcentagem de inibição do radical alcançasse o valor mínimo de 50% (IC<sub>50</sub>). Deste modo, as seguintes soluções foram preparadas em água: 4 a 50 mg/mL de XFH, 2 a 24 mg/mL de XAH e de 1 a 16 mg/mL de XFB. Os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) e os prebióticos comerciais (lactulose, rafinose e inulina) foram preparados em etanol e água nas concentrações de 1 mg/mL e 40 mg/mL, respectivamente. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços contendo 25 µL de amostra e 200 µL de solução de DPPH 150 µmol/L (dissolvido em metanol 80%, v/v, até a absorvância de 0,7 a 515 nm). As placas foram mantidas no escuro durante 1 h a temperatura ambiente, seguida de leitura da absorvância a 515 nm em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Cytation 3, Biotek, Winooski, Estados Unidos). Um ensaio controle foi realizado substituindo o volume de amostra por metanol 80% (v/v). O percentual de inibição do radical para os três hidrolisados em cada concentração avaliada foi calculado conforme a Equação 1 (item 2.4.1)

Uma curva padrão (Apêndice 1) foi construída com o padrão Trolox convenientemente diluído em metanol 80% (v/v) (40, 80, 100, 200, 300 e 400 µmol/L). Os IC<sub>50</sub> de cada hidrolisado e do padrão foram obtidos através do coeficiente angular do gráfico percentual de inibição *versus* concentração. A capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de Trolox (TE) por g de hidrolisado (µmol TE/g hidrolisado). Os ensaios foram realizados em cinco réplicas.

### 2.3.3 Capacidade de redução do ferro (FRAP)

A capacidade de redução do ferro como avaliação da atividade antioxidante foi determinada conforme Benzie e Strain (1996) com modificações. O reagente FRAP foi preparado pela mistura das soluções de TPTZ 10 mmol/L (solubilizado em HCl 40 mmol/L), cloreto de ferro (FeCl<sub>3</sub>) 20 mmol/L e tampão acetato 300 mmol/L pH 3,6, na proporção 1:1:10, respectivamente. Os hidrolisados e os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) foram preparados em água e etanol nas concentrações de 6 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente; e os prebióticos comerciais (lactulose, rafinose e inulina) na concentração de 40 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços contendo 10 µL de amostra e 290 µL do reagente FRAP. As placas foram mantidas no escuro durante 15 min e à 37 °C, seguida de leitura da absorvância a 593 nm em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Cytation 3, Biotek, Winooski, Estados Unidos). Um ensaio controle foi realizado substituindo o volume de amostra por água destilada.

Uma curva padrão (Apêndice 1) foi construída com solução aquosa de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (v/v) (200, 400, 600, 800 e 1000 µmol/L). A capacidade antioxidante foi expressa como equivalente de Fe (II) em µmol por g de hidrolisado (µmol Fe (II)/g hidrolisado). Os ensaios foram realizados em cinco réplicas.

## 2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

### 2.4.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método colorimétrico de Singleton e Rossi (1965) com modificações. Os hidrolisados foram preparados nas concentrações de 30 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços contendo 5 µL de amostra, 60 µL carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7,5% (m/v), 15 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 200 µL de água destilada. As placas foram mantidas no escuro sob aquecimento a 60 °C por 5 min. Após o resfriamento das placas até a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C), a leitura da absorvância a 700 nm foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Cytation 3, Biotek, Winooski, Estados Unidos). Um ensaio controle foi realizado substituindo o volume de amostra por água destilada.

Uma curva padrão (Apêndice 1) foi construída com solução de ácido gálico (200, 400, 600, 800, 100, 1200 3 1400 mg/L). O teor de compostos fenólicos totais foi expresso como equivalente de ácido gálico por g de hidrolisado (mg de GAE)/g hidrolisado). Os ensaios foram realizados em seis réplicas.

### 2.4.2 Determinação de flavonoides

A quantificação do conteúdo de flavonoides foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Chang et al. (2002) com modificações. Os hidrolisados foram preparados nas concentrações de 30 mg/mL. Os ensaios foram conduzidos em microplacas de 96 poços contendo 30 µL de amostra, 90 µL de metanol, 6 µL de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) 10% (m/v), 6 µL de acetato de potássio 1 mol/L e 170 µL de água destilada. As placas foram mantidas no escuro durante 30 min à temperatura ambiente, seguida de leitura da absorvância a 415 nm em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Cytation 3, Biotek, Winooski, Estados Unidos).

Um ensaio controle foi realizado substituindo o volume de amostra por água destilada. Uma curva padrão (Apêndice 1) foi construída com solução de quercitina (25, 50, 100, 150 e 200 mg/L). O conteúdo total de flavonoides foi expresso como equivalente de quercitina (QE) por g de hidrolisado (mg de QE)/g hidrolisado). Os ensaios foram realizados em seis réplicas.

## 2.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A capacidade antibacteriana dos hidrolisados foi avaliada pelo método da concentração inibitória mínima (CIM). Três bactérias foram selecionadas para os testes com base nos seus fatores de

deterioração nos alimentos e na saúde humana (Tabela 1). A manutenção das cepas bacterianas foi realizada seguindo as respectivas condições do meio de cultura e crescimento, e armazenada a - 80 °C.

**Tabela 1** – Condições de crescimento das cepas bacterianas utilizadas nos ensaios antibacterianos.

Bactéria	Gram	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Meio*	Referência
<i>Escherichia coli</i> CECT 736	-	37	24	MHB	NG et al. (2019)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DSMZ 50090	-	29	24	MHB	GUTIÉRREZ-LARRAÍN ZAR et al. (2013) TYAGI; MALIK (2010)
<i>Lactobacillus fructivorans</i> CECT 8288	+	29	24	MRS	INGLIN et al. (2015)

\*MHB: Caldo Mueller-Hinton; MRS: Caldo De Man, Rogosa e Sharpe

A determinação das CIMs foi realizada através do método de microdiluição descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). O valor da CIMs foi definido como sendo a menor concentração do hidrolisado que evita o crescimento visível da bactéria em estudo (BALLESTEROS et al., 2015). Para tal, soluções de 40 g/L dos hidrolisados foram preparadas utilizando o respectivo meio de cultura de cada bactéria (Tabela 1) como diluente. As soluções concentradas foram esterilizadas por filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 µm, sendo posteriormente diluídas em série duas vezes, de modo que as concentrações finais compreendessem a faixa de 8 g/L a 0,016 g/L. Além disso, a suspensão celular de cada bactéria foi diluída no respectivo meio de cultura para alcançar a concentração final de 0,5 McFarland (correspondente de  $1$  a  $3 \times 10^8$  UFC/mL e entre 0,08 a 0,1 de absorvância) a 600 nm.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços contendo 100 µL da suspensão celular (inóculo) e 100 µL de hidrolisado, fazendo com que a concentração final da amostra no poço compreendesse a faixa de 4 g/L a 0,008 g/L. Na mesma placa também foram adicionados os ensaios controle, que seguem: 100 µL de inóculo + 100 µL de meio de cultura (controle do crescimento bacteriano); 100 µL de meio de cultura + 100 µL de hidrolisado (controle de esterilidade 1); e 200 µL de meio de cultura (controle de esterilidade 2). Todo procedimento experimental foi realizado em câmara de fluxo laminar em condições de assepsia. As placas foram incubadas nas temperaturas mencionadas na

Tabela 1 durante 24 h. De modo a avaliar o crescimento bacteriano, as absorvâncias no início (ponto zero) e ao término da incubação foram lidas a 600 nm em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Cytation 3, Biotek, Winooski, Estados Unidos). Ainda, a análise visual do crescimento em cada poço das placas também foi realizada. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

## 2.6 ANÁLISES DOS HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Os hidrolisados foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando placas de alumínio com sílica gel (DC Alufolien Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária. Aliquotas de 6 µL na concentração de 4 mg/mL dos hidrolisados foram colocadas nas placas e submetidas à cromatografia ascendente utilizando como fase móvel uma mistura de butanol, ácido acético e água ultrapura na proporção 2:1:1 (v/v/v), respectivamente. Logo após, as bandas foram detectadas pela pulverização de solução corante contendo 1% (m/v) de difenilamina e 1% (v/v) de anilina em acetona, seguido pelo aquecimento da placa a 100 °C durante 15 min (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019). Um *pool* de XOs (1 mg/mL, alíquota de 3 µL) foi utilizada como padrão analítico.

## 2.7 ANÁLISES DOS HIDROLISADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Os hidrolisados obtidos nas reações enzimáticas foram filtrados em membrana de fluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Milipore, Burlington, Estados Unidos) e analisados em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Prominence®, Shimadzu, Quioto, Japão) equipado com detector de índice de refração (RID-10A) e forno de colunas (CTO-20A). Aliquotas de 20 µL foram injetadas em modo automático (SIL-20AHT) e eluídas a 0,4 mL/min com água ultrapura (Milli-Q, Milipore, Burlington, Estados Unidos) como fase móvel de uma coluna para separação de carboidratos (Aminex HPX-42A, Bio-Rad, Hercules, Estados Unidos). A temperatura e o tempo total de corrida foram 50 °C e 40 min, respectivamente. A identificação dos açúcares foi realizada a partir dos seus tempos de retenção, enquanto a quantificação de XOs e xilose foram determinadas através das curvas de calibração previamente construídas com o *pool* de padrões (1 a 10 mg/mL). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito pelo software LC Solution®.

## 2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

As respostas da análise antioxidante, flavonoides e compostos fenólicos totais, foram analisadas estatisticamente através da Análise de Variância Univariável (*One-way* ANOVA) seguido da comparação *post-hoc* Tukey, ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas atendendo aos pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade dos resíduos. O software utilizado para o tratamento estatístico dos resultados foi o *Statistica 5.0* (Statsoft Inc., Estados Unidos).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 COMPOSIÇÃO DOS HIDROLISADOS

Os hidrolisados XFH e XAH foram caracterizados quanto ao seu teor e composição em XOs e rendimento, e comparados com os resultados de XFB previamente obtidos por Amorim et al. (2019b), conforme mostra a Tabela 2. Os maiores teores de XOs foram observados para os hidrolisados XFH (10,3 mg/mL) e XAH (2,0 mg/mL), os quais apresentaram menor conversão de xilana em XOs em relação à XFB (306 g XOs/g xilana).

**Tabela 2** – Teor de XOs totais e rendimento para os hidrolisados obtidos por diferentes estratégias de produção.

Hidrolisado	XOs totais (mg/mL)	Rendimento (mg XOs/g xilana)	Referência
XFH	10,3 ± 0,2	170,8 ± 4,0	Este trabalho
XAH	2,0 ± < 0,1	65,5 ± 2,4	Este trabalho
XFB	1,5 ± < 0,1	306,0 ± 4,0	AMORIM et al. (2019b)

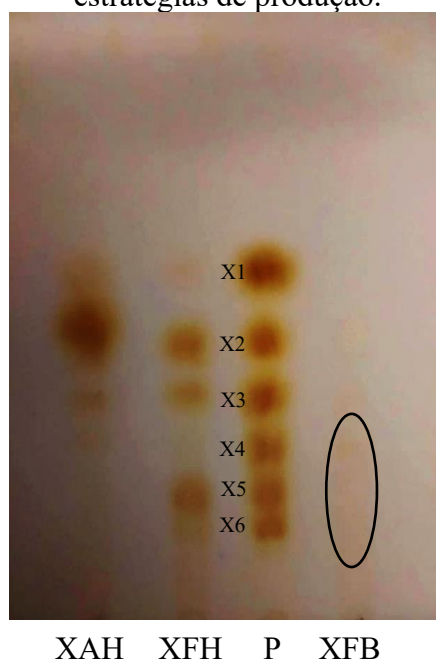
Média ± desvio padrão (n=3). Legenda: XFH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de faia; XAH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de arroz; XFB – Hidrolisado obtido a partir de cultivo microbiano em estado submerso.

Em termos de composição de XOs, ambos os hidrolisados XFH e XAH apresentaram majoritariamente xilobiose (5,6 ± 0,1 mg/mL para XFH e 0,9 ± < 0,1 mg/mL para XAH) e xilotriose (3,3 ± 0,1 mg/mL para XFH e 0,5 ± < 0,01 para XAH), estando os demais oligômeros em menores concentrações. Conforme determinado por Amorim et al. (2019b), os XOs presentes no XFB compreendem oligômeros com GP entre 4 e 6 (0,3 ± < 0,1 mg/mL de xilotetraose, 0,7 ± < 0,1 mg/mL de xilopentose e 0,5 ± < 0,1 mg/mL de xilohexose). Esta composição dos hidrolisados pode ser comprovada pela cromatografia em camada delgada, conforme mostra a Figura 2. Apesar de XFH e XFB utilizarem o

mesmo substrato para hidrólise (xilana de faia), os distintos processos de obtenção de XOs permitiram que os hidrolisados apresentassem oligômeros com GP diferentes.

A obtenção de XOs por hidrólise enzimática envolve o uso do extrato enzimático contendo xilanase (SAMANTA et al., 2015), do substrato rico em xilana e de condições reacionais controladas (temperatura, pH, agitação e relação enzima:substrato) (OTIENO; AHRING, 2012). Nas reações enzimáticas, as xilanases catalisam a hidrólise da cadeia principal da xilana, atuando nas ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e gerando XOs e eventual xilose (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016). Em geral, as reações prosseguem por longo tempo e tendem a favorecer a formação de XOs de baixo GP, em especial xilobiose e xilotriose (OTIENO; AHRING, 2012), uma vez que os oligômeros de maior GP tendem a ser hidrolisados no decorrer da reação (BIAN et al., 2013; GUIDO; SILVEIRA; KALIL, 2019; YANG et al., 2011). Isto explica o fato de XFH e XAH possuírem maior proporção de xilobiose e xilotriose em relação aos demais oligômeros contidos no hidrolisado.

**Figura 2** – Cromatografia em camada delgada dos hidrolisados obtidos por diferentes estratégias de produção.



Legenda: XAH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de arroz; XFH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de faia; XFB – Hidrolisado obtido a partir de cultivo microbiano em estado submerso; P – Padrão de XOs e xilose; X1 a X6 – xilose, xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose e xilohexose.

Já a obtenção dos XOs por cultivo submerso ocorre pela liberação dos oligômeros conforme o micro-organismo produz as enzimas necessárias à degradação do substrato, assim como exposto por diversos autores (AMORIM; SILVÉRIO; RODRIGUES, 2019; MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017; REQUE et al., 2019). XOs (65 mg/g de substrato) com GP entre 3 e 5

foram produzidos em 36 h de cultivo submerso de *Bacillus subtilis* FTC01 utilizando farinha de trigo como substrato (REQUE et al., 2019). De modo semelhante, XOs (463,4 mg/g de xilana) com GP entre 4 e 6 foram obtidos em 12 h de cultivo de *Bacillus subtilis* 3610 geneticamente modificado utilizando dreche cervejeira como substrato (AMORIM et al., 2018). Com base nisso, é compreensível que XFB apresente GP distinto dos demais hidrolisados deste estudo. Embora a xilana de faia tenha sido utilizada para a produção de XOs em ambos os processos – hidrólise enzimática e cultivo microbiano –, a xilanase envolvida na reação pode apresentar características distintas, hidrolisando a cadeia polissacarídica em diferentes regiões. Além disso, o micro-organismo também pode secretar outras enzimas que auxiliam no processo de degradação do substrato, influenciando na estrutura e GP dos XOs obtidos.

Na produção de XOs por cultivo microbiano, a composição e o rendimento dos oligômeros podem variar devido ao seu consumo pelo micro-organismo. Por exemplo, no cultivo de *A. pullulans* CCT 1261 utilizando xilana de faia como substrato, a maior concentração de XOs foi detectada em 12 h (168 mg/g de xilana), sendo esta quantidade composta principalmente por xilobiose (72 mg/g de xilana) e xilotriose (70 mg/g de xilana). No entanto, a ausência de XOs nas últimas horas de cultivo indicou seu consumo como substrato pela levedura (GAUTÉRIO et al., 2018). Nas primeiras 48 h de crescimento de *Aspergillus brasiliensis* BLf1 em meio contendo casca de arroz, Menezes, Rossi e Ayub (2017) obtiveram XOs (14,48 mg/g de substrato) com GP igual a 2, 4 e 5, os quais não foram detectados ao término do cultivo, indicando que os mesmos foram consumidos pela espécie fúngica. Por outro lado, Amorim, Silvério e Rodrigues (2019) mencionam que na produção de XOs durante o cultivo de *Trichoderma* utilizando dreche cervejeira como substrato, o não consumo dos XOs formados se deve à preferência das espécies microbianas em consumir os demais açúcares prontamente disponíveis no meio de cultivo.

Com base no exposto, o uso de diferentes estratégias de produção permite obter XOs com composição e GP distintos, o que pode levar a diferentes propriedades biológicas.

### 3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

A atividade antioxidante dos XOs não pode ser atribuída a um único mecanismo de reação, portanto diferentes métodos de quantificação (capacidade de sequestro dos radicais ABTS e DPPH e poder de redução do ferro) foram conduzidos a fim de avaliar esta propriedade nos hidrolisados em estudo, sendo



os resultados expostos na Tabela 4. A atividade antioxidante dos hidrolisados foi comparada a de dois antioxidantes sintéticos (BHI e BHA) e a de três prebióticos comerciais (rafinose, lactulose e inulina), devido aos XOs também serem conhecidos por esta propriedade funcional. Além disso, os valores de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para atingir o valor mínimo de 50% de inibição do radical) foram determinados para o ABTS e DPPH, e estão apresentados na Tabela 3.

A capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS se mostrou dependente da concentração para os três hidrolisados em estudo. No método ABTS, o aumento nos percentuais de inibição do radical foi proporcional a concentração dos hidrolisados, chegando à 65,7%, 76,5% e 62,6% nas concentrações de 30 mg/mL, 20 mg/mL e 8 mg/mL para XFH, XAH e XFB, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para XFH e XAH pelo método DPPH, onde os percentuais de inibição do radical alcançaram 65,5% a 50 mg/mL e 63,6% a 20 mg/mL, nesta ordem. No entanto, para o XFB, o percentual de inibição alcançou seu valor máximo (61,8%) em 8 mg/mL, diminuiu (51,9%) em 10 mg/mL e permaneceu constante em concentrações mais elevadas do hidrolisado (12 a 16 mg/mL), comportamento este também observado por outros autores (BIAN et al., 2013; JAGTAP et al., 2017; RASHAD et al., 2016).

**Tabela 3** – Valores de IC<sub>50</sub> obtidos nos ensaios de atividade antioxidante (DPPH e ABTS).

Hidrolisado	DPPH (mg/ml)	ABTS (mg/ml)
XFH	34,6	20,9
XAH	14,5	10,8
XFB	6,6	6,1

Legenda: XFH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de feijão; XAH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de arroz; XFB – Hidrolisado obtido a partir de cultivo microbiano em estado submerso.

XOs obtidos a partir da hidrólise de palha de trigo e xilanase bruta de *Aspergillus fumigatus* apresentaram 58% de inibição do radical DPPH quando utilizados na concentração de 4 mg/mL (JAGTAP et al., 2017). Similarmente, XOs comerciais (pureza acima de 90%) obtidos a partir da hidrólise enzimática de sabugo de milho mostraram 65,3% e 59,4% de inibição dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente, a 4 mg/mL (YU et al., 2015). Ainda, XOs obtidos a partir da hidrólise de xilana de bétula utilizando xilanase purificada de *Bacillus amyloliquifaciens* apresentaram cerca de 75% de inibição do radical DPPH a 4 mg/mL (RASHAD et al., 2016). Nesta mesma concentração, o XFB alcançou 31% de inibição dos radicais DPPH e ABTS, chegando a 62% a 8 mg/mL. Considerando que o XFB foi obtido a

partir de meio de fermentação e sem nenhuma etapa prévia de concentração ou purificação, o seu poder antioxidante se mostrou promissor frente aos estudos mencionados.

**Tabela 4** – Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides totais de hidrolisados contendo XOs, antioxidantes sintéticos e prebióticos comerciais.

<b>Hidrolisado</b>	<b>DPPH</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	<b>ABTS</b> ( $\mu\text{mol TE/g}$ )	<b>FRAP</b> ( $\mu\text{mol Fe II/g}$ )	<b>CFT</b> ( $\text{mg GAE/g}$ )	<b>FVT</b> ( $\text{mg QE/g}$ )
XFH	7,5 $\pm$ 0,3 <sup>c</sup>	13,4 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	28,8 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	8,0 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,2 $\pm$ <0,1 <sup>b</sup>
XAH	14,5 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	26,5 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	44,1 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>	9,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ <0,1 <sup>b</sup>
XFB	39,1 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	45,7 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>	79,9 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	14,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
BHA	445,9 $\pm$ 1,7	473,3 $\pm$ 4,5	13080,0 $\pm$ 48,1	ND	ND
BHT	447,9 $\pm$ 0,5	442,1 $\pm$ 2,7	4338,2 $\pm$ 241,5	ND	ND
Prebióticos*	nd	nd	nd	ND	ND

Média  $\pm$  desvio padrão (n = 5 ou 6). Letras minúsculas iguais na mesma coluna e entre os hidrolisados indicam não há diferença significativa entre as médias pelo teste Tukey (p>0,05). Legenda: XFH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de feijão; XAH – Hidrolisado obtido da hidrólise de xilana de arroz; XFB – Hidrolisado obtido a partir de cultivo microbiano em estado submerso; CFT – Compostos fenólicos totais; FVT – Flavonoides totais; BHT – Hidroxitolueno butilado; BHA – Hidroxianisol butilado; Prebióticos\* – Prebióticos comerciais (Lactulose, Rafinose e Inulina); ND – Não determinado; nd – não detectado.

Conforme mostra a Tabela 3, o IC<sub>50</sub> do XFB foi menor em relação aos demais hidrolisados, indicando que uma menor concentração deste é necessária para que a inibição dos radicais atinja o valor de 50%. Os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para XFH e XAH foram muito superiores comparados a outros XOs obtidos por hidrólise enzimática (IC<sub>50</sub> entre 1 a 3 mg/mL) (BIAN et al., 2013; GOWDHAMAN; PONNUSAMI, 2015; ZHANG et al., 2019; ZHOU et al., 2018). Contudo, é pertinente mencionar que diversos trabalhos voltados à capacidade antioxidante dos XOs analisam frações purificadas e/ou concentradas destes oligômeros (VALLS et al., 2018; VEENASHRI; MURALIKRISHNA, 2011), enquanto XFH e XAH consistem numa mistura de XOs e xilana não hidrolisada. A alta concentração de substrato no meio reacional – 6% (m/v, equivalente a 60 g/L) e 3% (m/v, equivalente a 30 g/L) para XFH e XAH, respectivamente – aliado à sua baixa conversão em XOs, pode ter contribuído para os altos valores de IC<sub>50</sub>, onde a xilana remanescente atuou como possível interferente na análise. No caso de XFB, além da conversão de xilana em XOs ser elevada, o substrato pode ter sido transformado de modo mais eficiente pela bactéria durante o cultivo submerso, fazendo com que menor quantidade de xilana não degradada estivesse presente no hidrolisado final. Adicionalmente, os valores da atividade antioxidante (Tabela 4) pelo método ABTS foram mais elevados comparados aos do método DPPH, para todos os hidrolisados

em estudo, indicando que o último método foi menos eficiente quanto à capacidade de sequestro dos radicais. Esta menor afinidade ao método DPPH em relação ao ABTS na atividade antioxidante de XOs também foi observado por Valls et al. (2018) e Zhang et al. (2019).

O poder de redução do ferro seguiu a mesma tendência observada nos métodos ABTS e DPPH, isto é, o XFB apresentou maior capacidade antioxidante em relação aos demais hidrolisados em estudo. No entanto, os valores obtidos no método FRAP foram inferiores aos observados por Rivas et al. (2013) para licor obtido a partir da auto hidrólise de casca de arroz ( $625 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ ), e aos mencionados por Lasrado e Gudipati (2014) para XOs a partir da hidrólise de farelo de trigo utilizando xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus* ( $71,44 \text{ mg Fe}^{+2}/100 \text{ mL}$ , o que equivale a  $256,96 \mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ ).

Em baixas concentrações ( $1 \text{ mg/mL}$ ), os antioxidantes sintéticos apresentaram capacidade antioxidante extremamente elevada (Tabela 4) comparado aos hidrolisados em estudo. Contudo, é importante lembrar que o BHT e o BHA são compostos puros e altamente reativos, tornando difícil a comparação com as amostras biológicas. Apesar do uso de BHT e BHA em alimentos ser regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2018b) e pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2019), estes antioxidantes estão conhecidos pelo seu efeito toxicológicos e carcinogênicos em certas concentrações, motivos que impulsionam o desenvolvimento de estudos voltados aos antioxidantes naturais (KUMAR et al., 2015). Os prebióticos comerciais rafinose, lactulose e inulina não apresentaram atividade antioxidante pelas três metodologias empregadas, (Tabela 4) mesmo quando concentrações elevadas destes açúcares foram utilizadas ( $40 \text{ mg/mL}$ ). Este resultado é interessante no que tange às demais atividades biológicas dos hidrolisados, uma vez que estes apresentaram atividade antioxidante e, devido à sua composição rica em XOs com GP entre 2 a 6, podem também apresentar atividade prebiótica.

Estudos demonstram que a atividade antioxidante dos XOs pode estar relacionada à sua concentração no hidrolisado, GP e presença de ramificações na sua estrutura (VALLS et al., 2018). No presente estudo, a maior capacidade antioxidante pelas três metodologias utilizadas foi observada para o hidrolisado XFB, seguido de XAH e XFH. Apesar de XFB apresentar menor conteúdo de XOs totais, os oligômeros neste hidrolisado possuem GP claramente maior comparado à XAH e XFH, característica que pode estar relacionada ao seu maior caráter antioxidante. Adicionalmente, Amorim et al. (2019b) constataram que XFB compreende uma mistura de XOs composta por cadeia linear de resíduos de xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,4, além da presença de ramificações, as quais contém arabinose e ácido glicurônico, podendo chegar até 5,3%. Valls et al. (2018) aplicaram xilanases de diferentes famílias (GH10 e GH30) na hidrólise de xilana de bétula e de xilana de faia, concluindo que os XOs obtidos a partir do uso de GH30 – isto é, que possuem GP elevado (5 a 8) – apresentaram maior atividade antioxidante comparado aos XOs oriundos de GH10 (GP entre 2 a 5). Os autores ainda mencionam que a quantidade

de XOs produzida a partir do uso de xilanases GH30 foi menor comparado aos XOs obtidos pelo uso de xilanases G10. Não menos importante, devido à secreção de diferentes enzimas pelo micro-organismo e sua ação sinérgica na degradação do substrato no meio de cultivo, a produção de outros compostos com atividade antioxidante pode ocorrer em conjunto à produção de XOs, conforme observado em estudos anteriores (MANDELLI et al., 2014; REDDY; KRISHNAN, 2013; REQUE et al., 2017, 2019), o que pode levar à obtenção de um hidrolisado com diversas propriedades biológicas.

Os compostos fenólicos são capazes de capturar espécies reativas de oxigênio devido a sua propriedade de doação de elétrons, e dentre eles, os mais difundidos e diversificados compreendem à classe dos flavonoides (PODSEDEK, 2007). Diversos trabalhos têm correlacionado o conteúdo de compostos fenólicos em oligossacarídeos com a atividade antioxidante (KAWEE-AI et al., 2016; RASHAD et al., 2016; VEENASHRI; MURALIKRISHNA, 2011). Conforme exposto na Tabela 3, o XFB apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides totais (FVT), o que também contribui para a maior capacidade antioxidante deste frente aos demais hidrolisados.

Valls et al. (2018) mencionam que a atividade antioxidante de XOs obtidos por hidrólise enzimática de xilana de faia pode ser atribuída à presença de resíduos de ácido metil glicurônico em sua estrutura. Neste sentido, Amorim et al. (2019b) verificaram que o XFB possui em sua composição resíduos de ácido glicurônico, arabinose e outros açúcares oriundos da composição original da xilana de faia. Por outro lado, compostos fenólicos solúveis e insolúveis presentes na casca de arroz, tais como ácido ferúlico, ácido  $\rho$ -cumárico, ácido  $\rho$ -hidroxibenzóico, ácido gálico e ácido vanílico, estão relacionados à atividade antioxidante desta biomassa (BUTSAT; WEERAPREEYAKUL; SIRIAMORNPNUN, 2009). Outros estudos relatam que a atividade antioxidante de XOs obtidos por hidrólise enzimática da casca de arroz se deve à presença de ácido  $\rho$ -cumárico, ácido ferúlico e ácido siríngico (VEENASHRI; MURALIKRISHNA, 2011).

No cultivo das espécies *Bacillus subtilis* FTC01 e *Bacillus* sp. P45 em meio contendo farinha de trigo, o teor de CFT contido no sobrenadante do cultivo correspondeu a 79,2 mg GAE/g e 64,2 mg GAE/g, respectivamente (REQUE et al., 2017). Os autores mencionam que a ação sinérgica de enzimas secretadas pela espécie de *Bacillus*, tais como xilanases e esterases, pode ter contribuído para a liberação de ácidos fenólicos a partir da degradação do substrato. Em outro estudo, os autores verificam a produção de XOs por *Bacillus subtilis* FTC01 no mesmo meio de cultivo (REQUE et al., 2019). Logo, no caso específico de XFB, a quantidade de CFT pode ser atribuída tanto pela liberação destes compostos durante a hidrólise da xilana pela ação de enzimas secretadas pela bactéria, como pelos XOs resultantes deste processo.

Rashad et al. (2016) analisaram o teor de compostos fenólicos totais produzidos a partir de xilana de bétula e xilanase purificada de *Bacillus amyloliquifaciens*, alcançando o valor de 182,88 mg

GAE/L (equivalente a 9,15 mg GAE/g de hidrolisado). Já para o hidrolisado obtido a partir da casca de arroz e xilanase bruta, os autores mencionam que conteúdo de CFT foi de aproximadamente 11 mg GAE/L (correspondente a 5,5 mg GAE/g de hidrolisado na concentração de 2 g/L) (RASHAD et al., 2016). Estes resultados se encontram na mesma ordem dos valores de CFT obtidos para os hidrolisados do presente estudo (Tabela 4). Por outro lado, valores superiores de CFT (53,5 mg GAE/g) foram observados em licor obtido a partir da auto hidrólise de casca de arroz (Rivas et al., 2013).

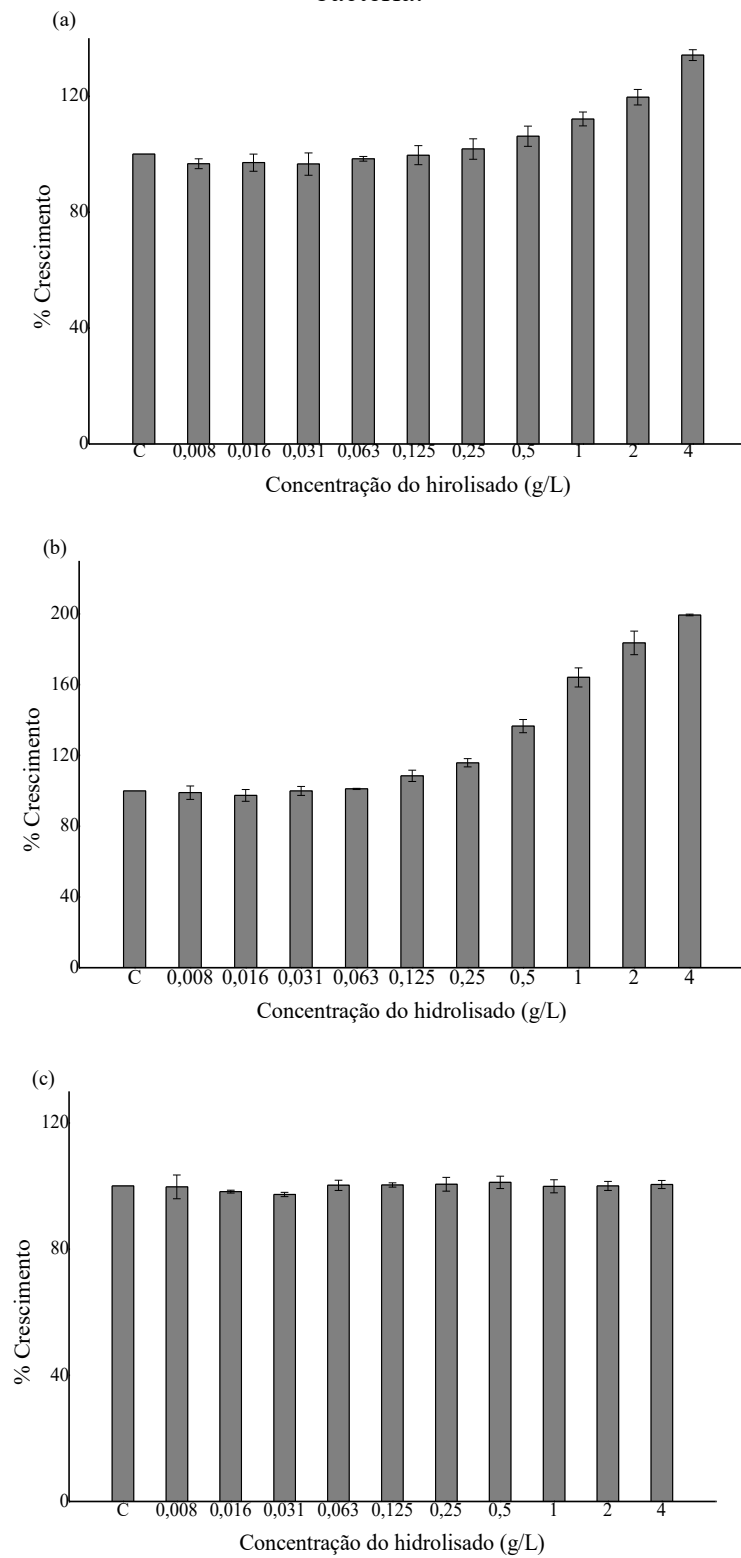
Hidrolisados contendo XOs obtidos por diferentes estratégias de produção apresentaram atividade antioxidante nas três metodologias empregadas. A existência desta propriedade demonstra o potencial de aplicação dos hidrolisados em formulações alimentícias e em cosméticos.

### 3.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos hidrolisados foi avaliada pelo método das CIMs para três bactérias – *E. coli*, *P. fluorescens* e *L. fructivorans* –, e os resultados estão apresentados nas Figuras 3, 4 a 5. A escolha destes micro-organismos para a atividade antibacteriana se deve ao fato de que serem indicadores de contaminação fecal (*E. coli*) ou relacionados à deterioração de alimentos (*P. fluorescens* e *L. fructivorans*). Dentro da faixa de concentração avaliada, os hidrolisados não inibiram o crescimento das três cepas microbianas em estudo, não exibindo assim atividade antibacteriana. Além disso, XFH e XAH estimularam o crescimento de *E. coli* conforme o aumento das suas concentrações, correspondendo a 134% e 200% em 4 g/L, nesta ordem, em relação ao controle (Figura 3). O mesmo estímulo foi observado para XFB e XAH em relação à *P. fluorescens* (Figura 4), porém em menor grau (115% e 102%, respectivamente, a 4 g/L), e para XFB em relação à *L. fructivorans* (111% a 4 g/L). Além disso, nenhum crescimento foi observado nos controles contendo apenas meio de cultura (MBH ou MRS) e meio de cultura + hidrolisado, indicando que não houve contaminação nos poços de ensaio (dados não mostrados).

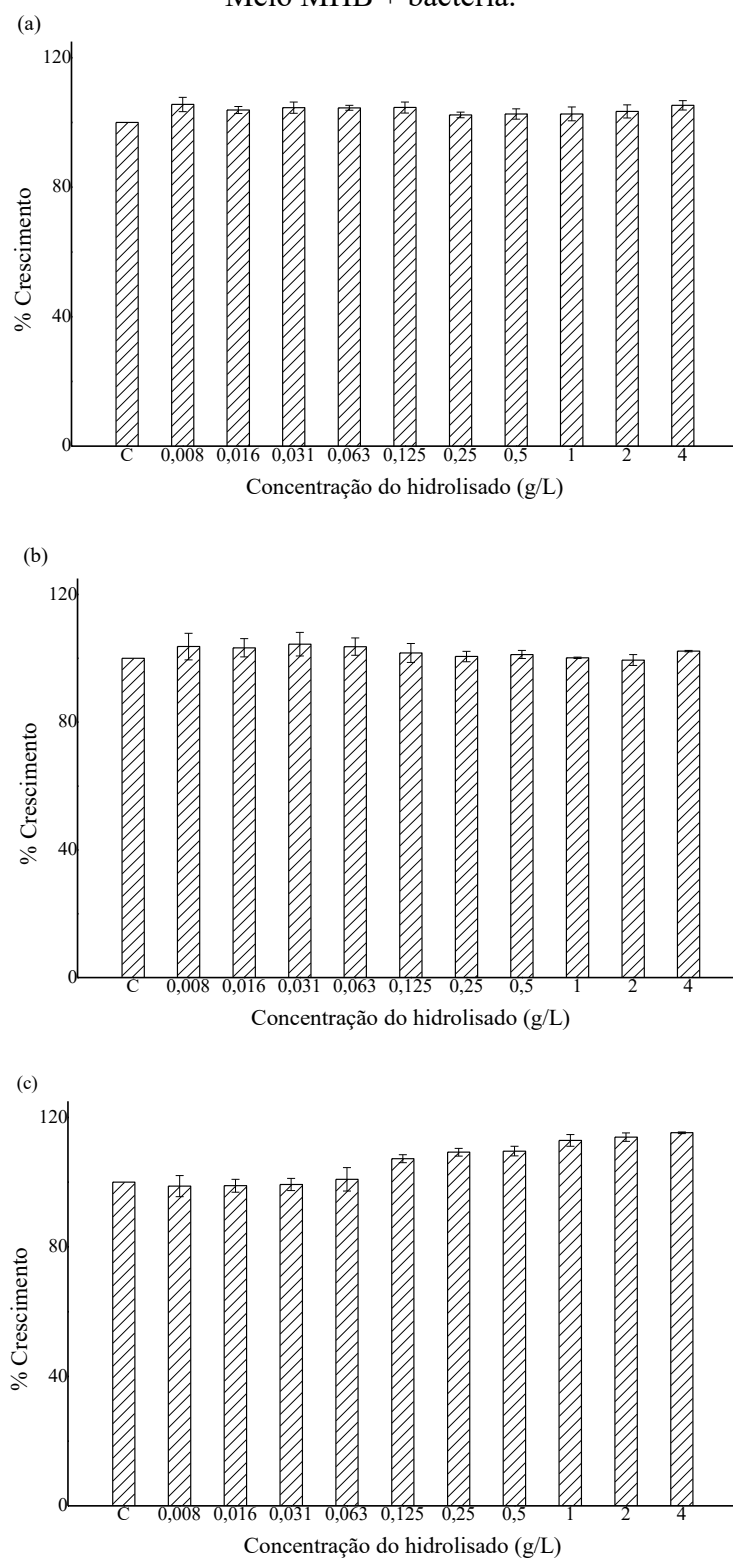
De modo a compreender se o estímulo de XFH e XAH ao crescimento de *E. coli*, bem como de XFB ao crescimento de *P. fluorescens*, foi causado pelo consumo dos XOs, as amostras das CIMs foram analisadas por cromatografia em camada delgada. Os hidrolisados na sua concentração máxima (4 g/L) e após o crescimento das bactérias, além do padrão de XOs e dos ensaios controle, foram aplicados às placas de alumínio, conforme mostra a Figura 6.

**Figura 3** – Crescimento de *E. coli* CECT 736 em meio MHB contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MHB + bactéria.



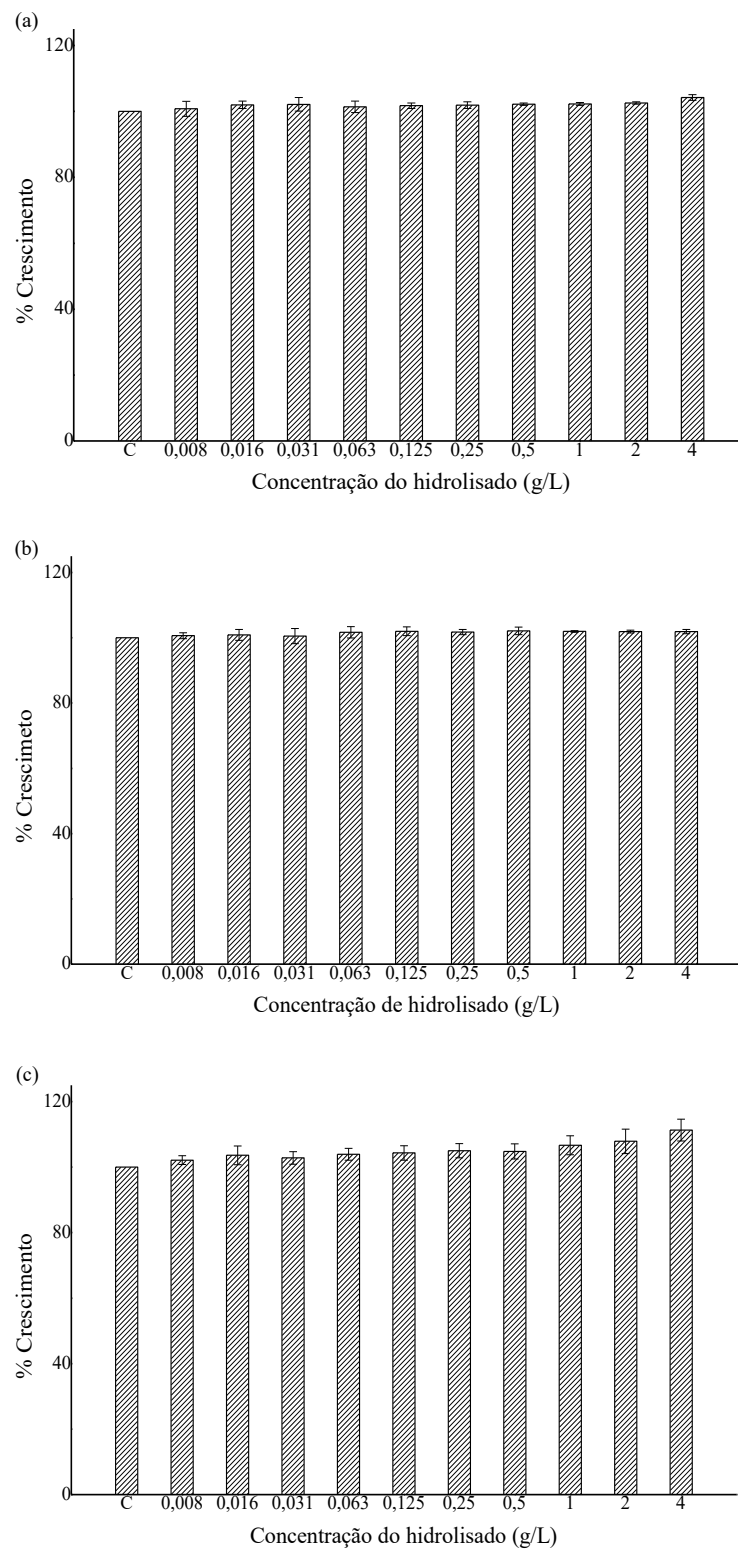
Média  $\pm$  desvio padrão (n = 2).

**Figura 4** – Crescimento de *P. fluorescens* DSMZ 50090 em meio MHB contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MHB + bactéria.



Média  $\pm$  desvio padrão (n = 2).

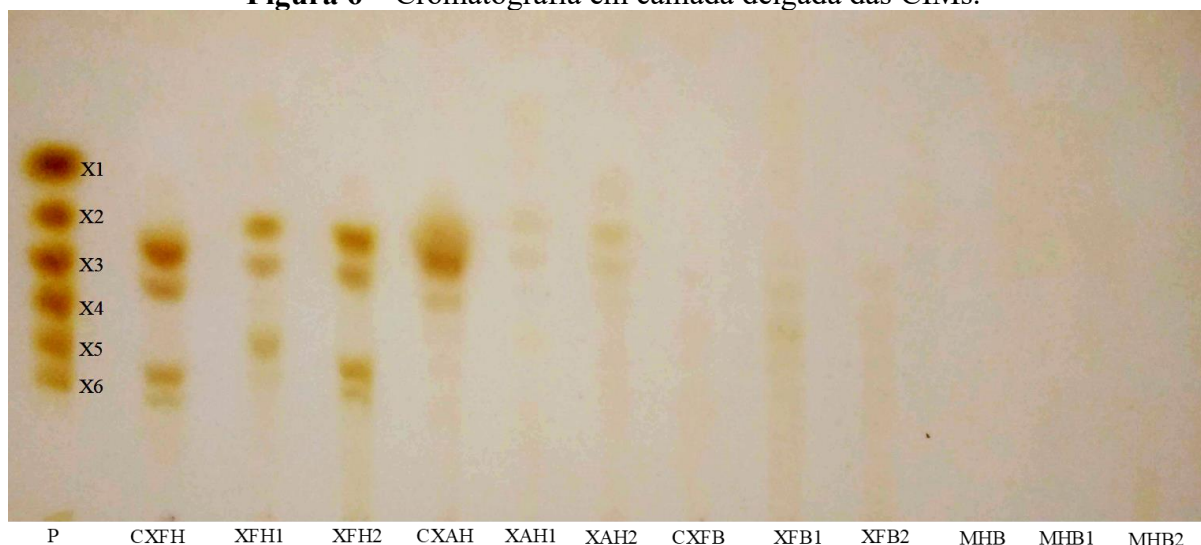
**Figura 5** – Crescimento de *L. fructivorans* CECT 8288 em meio MRS contendo hidrolisados em diferentes concentrações, onde a) XFH, b) XAH e c) XFB. C – Controle: Meio MRS + bactéria.



Média  $\pm$  desvio padrão (n = 2).



**Figura 6** – Cromatografia em camada delgada das CIMs.



Legenda: P – Padrão; CXFH – Controle de XFH a 4 g/L em meio MHB; XFH1 – XFH 4 g/L em meio MHB + *E. coli*; XFH2 – XFH 4 g/L em meio MHB + *P. fluorescens*; CXAH – Controle de XAH 4 g/L em MHB; XAH1 – XAH 4 g/L em meio MHB + *E. coli*; XAH2 – XAH 4 g/L em meio MHB + *P. fluorescens*; CXFB – Controle de XFB 4 g/L em meio MHB; XFLB1 – XFB 4 g/L em meio MHB + *E. coli*; XFB2 – XFB 4 g/L em meio MHB + *P. fluorescens*; MHB – Controle do meio MHB; MHB1 – MHB + *E. coli*; MHB2 – MHB + *P. fluorescens*.

O enfraquecimento das bandas em XFH1 e XAH1, quando comparado aos seus respectivos controles – XFH e XAH (somente o hidrolisado), MHB (somente o meio) e MHB + bactéria (bactéria crescida na ausência do hidrolisado) – indica o consumo de XOs por *E. coli*, comportamento este observado também em XAH2 e XFB2 para *P. fluorescens*. Este resultado se opõe a outros estudos envolvendo a utilização de XOs por espécies de *E. coli* (CRITTENDEN et al., 2002; FALCK et al., 2013), os quais indicam que a bactéria não é capaz de consumir os oligômeros. Por outro lado, não houve alteração na intensidade das bandas em XFH2 para *P. fluorescens* e XFB1 para *E. coli*, o que corrobora com os resultados apresentados nas Figuras 4a e 3c, respectivamente.

É importante salientar que concentrações acima de 4 g/L não foram avaliadas devido às seguintes razões: o uso de altas concentrações de hidrolisado poderia causar a inibição das bactérias pelo excesso de açúcar no meio, e não pelo possível efeito antibacteriano dos XOs; concentrações mais elevadas do hidrolisados estimularam o crescimento das bactérias em certas situações, não sendo conveniente o estudo de valores acima de 4 g/L. Cabe lembrar também que as concentrações empregadas se referem ao hidrolisado como um todo, contendo XOs e xilana não hidrolisada, enquanto outros estudos costumam avaliar o efeito antimicrobiano da fração purificada de oligômeros.

XOs parcialmente purificados e obtidos por hidrólise enzimática de xilana de palha de alho, na concentração de 20 g/L, foram capazes de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto,

não foi observada a inibição para *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (KALLEL et al., 2015b). Da mesma forma, XOs comerciais (pureza acima de 90%) obtidos a partir de sabugo de milho não apresentaram atividade antibacteriana para *E. coli*, *S. aureus*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* Typhi (PALANIAPPAN; BALASUBRAMANIAM; ANTONY, 2017). Em outro estudo, hidrolisados contendo XOs obtidos a partir do cultivo de espécies de *Bacillus* em meio agroindustrial inibiram o crescimento de *E. coli* apenas quando em concentrações muito elevadas (200 g/L) (REQUE et al., 2017). XOs ácidos produzidos a partir da hidrólise enzimática de xilana de bétula inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *Bacillus cereus* quando em baixas concentrações (0,5 a 1 g/L), porém o mesmo não ocorreu para *P. aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (CHRISTAKOPOULOS et al., 2003).

No presente estudo, a não inibição de *P. fluorescens* e *E. coli* pode estar relacionada à alta resistência de bactérias gram-negativas a agentes químicos (ex. antimicrobianos), uma vez que estas apresentam parede celular complexa, isto é, composta por camada fina de peptidoglicano circundada por uma membrana lipoproteica (TONDO; BARTZ, 2017). Por outro lado, a bactéria gram-positiva *L. fructivorans* também não foi inibida pela presença de XOs no meio de crescimento. Estudos reportam a capacidade dos XOs em serem utilizados por espécies de *Lactobacillus*, gerando ácido lático e acético (IMMERZEEL et al., 2014), o que poderia causar a inibição do crescimento devido à diminuição do pH do meio e produção de compostos inibidores. Por outro lado, conforme mencionado por Crittenden et al. (2002) algumas espécies de *Lactobacillus* não são capazes de utilizar os XOs como substrato. Ainda, a estrutura dos XOs (isto é, tipo de ligação existente, monômeros constituintes na estrutura e GP dos XOs), bem como a existência do aparato enzimático necessário para a hidrólise do oligômero pela bactéria, podem afetar a taxa de fermentação e, assim, determinar a velocidade na qual os potenciais metabólitos inibitórios são liberados (AACHARY; PRAPULLA, 2011). Compostos fenólicos também são reconhecidos como potenciais antimicrobianos (BACH et al., 2019; LEYVA-JIMENEZ et al., 2019), no entanto, estes se encontram em baixas quantidades nos hidrolisados para exercer tal propriedade.

Apesar dos hidrolisados contendo XOs não apresentaram atividade antibacteriana, estudos futuros com outras cepas bacterianas devem ser realizados, de modo a ampliar o espectro de ação dos hidrolisados como possíveis agentes antimicrobianos.

## 4 CONCLUSÃO

Hidrolisados contendo XOs foram caracterizados quanto ao seu teor e composição de XOs, atividade antioxidante e atividade antibacteriana. Os maiores teores de XOs foram observados em XFH (10,3 mg/mL) e XAH (2,0 mg/mL), os quais apresentaram maior conteúdo de xilobiose e xilotriose em relação ao XFB. A maior atividade antioxidante pelas três metodologias empregadas (ABTS, DPPH e FRAP) foi observada por XFB, seguido de XAH e XFH, o que demonstra o potencial de aplicação dos hidrolisados em formulações alimentícias e em cosméticos. Da mesma forma, XFB apresentou maior teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, os quais podem estar relacionados em parte ao poder antioxidante deste hidrolisado. Embora os hidrolisados não tenham sido capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *P. fluorescens* e *L. fructivorans*, estudos futuros devem ser realizados com o intuito de investigar a atividade antimicrobiana destes frente à outras cepas bacterianas.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009.
- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.
- ABASUBONG, K. P.; LIU, W. BIN; ZHANG, D. D.; YUAN, X. Y.; XIA, S. L.; XU, C.; LI, X. F. Fishmeal replacement by rice protein concentrate with xylooligosaccharides supplement benefits the growth performance, antioxidant capability and immune responses against *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 78, p. 177–186, 2018.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 5, p. 660–666, 2009.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A. Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 546–554, 2018.
- AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; 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. 0–1, 2019a.

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. Downscale fermentation for xylooligosaccharides production by recombinant *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 176–183, 2019b.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; CARDOSO, B. B.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma species*. **Food Chemistry**, v. 270, p. 86–94, 2019.

ANTOV, M. G.; ĐORĐEVIĆ, T. R. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. **Food Chemistry**, v. 235, p. 175–180, 2017.

AYYAPPAN, P.; ABIRAMI, A.; ANBUVAHINI, N. A.; TAMIL KUMARAN, P. S.; NARESH, M.; MALATHI, D.; ANTONY, U. Physicochemical properties of cookies enriched with xylooligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 420–428, 2016.

BACH, F.; ZIELINSKI, A. A. F.; HELM, C. V.; MACIEL, G. M.; PEDRO, A. C.; STAFUSSA, A. P.; ÁVILA, S.; HAMINIUK, C. W. I. Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. **LWT – Food Science and Technology**, v. 107, p. 214–220, 2019.

BALLESTEROS, L. F.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 347–354, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

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

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 239, de 26 de julho de 2018. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece os Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia Autorizados para Uso em Suplementos Alimentares. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2018b.

BUTSAT, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; SIRIAMORNPNUN, S. Changes in phenolic acids

and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4566–4571, 2009.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

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

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 4–5, p. 171–175, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. [s.l.: s.n.], 2012.

COELHO, E.; ROCHA, M. A. M.; MOREIRA, A. S. P.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A. Revisiting the structural features of arabinoxylans from brewers' spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 139, p. 167–176, 2016.

CRITTENDEN, R.; KARPPINEN, S.; OJANEN, S.; TENKANEN, M.; FAGERSTRM, R.; MTT, J.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 8, p. 781–789, 2002.

FALCK, P.; PRECHA-ATSAWANAN, S.; GREY, C.; IMMERZEEL, P.; STAĪŠLBRAND, H.; ADLERCREUTZ, P.; NORDBERG KARLSSON, E. Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7333–7340, 2013.

FERRÃO, L. L.; FERREIRA, M. V. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, A. F. A.; PIMENTEL, T. C.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; FREITAS, M. Q.; MENEZES, J. C. V.; CABRAL, L. M.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; MATHIAS, S. P.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; CRUZ, A. G. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 137–147, 2018.

FINEGOLD, S. M.; LI, Z.; SUMMANEN, P. H.; DOWNES, J.; THAMES, G.; CORBETT, K.; DOWD, S.; KRAK, M.; HEBER, D. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food and Function**, v. 5, n. 3, p. 436–445, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 458**, 2013. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations Title 21, Part 172:**

**Food Additives Permitted For Direct Addition To Food For Human Consumption, 2019.**  
**Disponível em:**

<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=172>>.  
 Acesso em: 8 abr. 2020.

FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, p. 100184, 2019.

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; GONÇALVES, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.

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

GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A.; ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.

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.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; RÚA, J.; DE ARRIAGA, D.; VALLE, P. DEL; GARCÍA-ARRESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 393–399, 2013.

HANSEN, C. H. F.; FROKIAER, H.; CHRISTENSEN, A. G.; BERGSTROM, A.; LICHT, T. R.; HANSEN, A. K.; METZDORFF, S. B. Dietary xylooligosaccharide downregulates IFN- $\gamma$  and the low-grade inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  systemically in mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 4, p. 533–540, 2013.

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

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

IMMERZEEL, P.; FALCK, P.; GALBE, M.; ADLERCREUTZ, P.; NORDBERG KARLSSON, E.; STÅLBRAND, H. Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 321–327, 2014.

INGLIN, R. C.; STEVENS, M. J. A.; MEILE, L.; LACROIX, C.; MEILE, L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 114, p. 26–29, 2015.

IUPAC, I. U. OF P. AND A. C. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains - Recommendations of Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). **Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, 1982.

JAGTAP, S.; DESHMUKH, R. A.; MENON, S.; DAS, S. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 283–288, 2017.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAABOUNI, S. E. Biological activities of xylooligosaccharides generated from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 950–964, 2014.

KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015.

KAWEE-AI, A.; SRISUWUN, A.; TANTIWA, N.; NONTAMAN, W.; BOONCHUAY, P.; KUNTIYA, A.; CHAIYASO, T.; SEESURIYACHAN, P. Eco-friendly processing in enzymatic xylooligosaccharides production from corncob: Influence of pretreatment with sonocatalytic-synergistic Fenton reaction and its antioxidant potentials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 184–192, 2016.

KRISHNA, G.; DIVYASHRI, G.; PRAPULLA, S. G.; MURALIDHARA. A Combination supplement of fructo- and xylo-oligosaccharides significantly abrogates oxidative impairments and neurotoxicity in maternal/fetal milieu following gestational exposure to acrylamide in rat. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 9, p. 1904–1918, 2015.

KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 796–812, 2015.

LASRADO, L. D.; GUDIPATI, M. Antioxidant property of synbiotic combination of *Lactobacillus* sp. and wheat bran xylo-oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4551–4557, 2014.

LEYVA-JIMENEZ, F. J.; LOZANO-SANCHEZ, J.; BORRAS-LINARES, I.; CADIZ-GURREA, M. DE LA L.; MAHMOODI-KHALEDI, E. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 101, p. 236–245, 2019.

LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.

MANDELLI, F.; BRENELLI, L. B.; ALMEIDA, R. F.; GOLDBECK, R.; WOLF, L. D.; HOFFMAM, Z. B.; RULLER, R.; ROCHA, G. J. M.; MERCADANTE, A. Z.; SQUINA, F. M. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 770–775, 2014.

MAZLAN, N. A.; SAMAD, K. A.; YUSSOF, H. W.; SAUFI, S. M.; JAHIM, J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 575–584, 2019.

MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12, 2017.

MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, L. C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylooligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.

NG, K. R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W. N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123–129, 2019.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I. DE; 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.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. The potential for oligosaccharide production from the hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). **Carbohydrate Research**, v. 360, p. 84–92, 2012.

PALANIAPPAN, A.; BALASUBRAMANIAM, V. G.; ANTONY, U. Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from finger millet seed coat. **Food Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 264–280, 2017.

PEREIRA, G. F.; BASTIANI, D. DE; GABARDO, S.; SQUINA, F.; AYUB, M. A. Z. Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 78–85, 2018.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2007.

RASHAD, M. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; MAHMOUD, H. A.; EL-TORKY, A. E. D. M. M.; KESHTA, A. T. Production of antioxidant xylooligosaccharides from lignocellulosic materials using *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 xylanase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 30–36, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-



EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Characterization of enzyme released antioxidant phenolic acids and xylooligosaccharides from different *Graminaceae* or *Poaceae* members. **Food Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 357–370, 2013.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

REQUE, P. M.; ORLANDINI WERNER, J. A.; BARRETO PINILLA, C. M.; FOLMER CORRÊA, A. P.; RODRIGUES, E.; BRANDELLI, A. Biological activities of wheat middlings bioprocessed with *Bacillus* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 525–531, 2017.

REQUE, P. M.; PINILLA, C. M. B.; GAUTÉRIO, G. V.; KALIL, S. J.; BRANDELLI, A. Xylooligosaccharides production from wheat middlings bioprocessed with *Bacillus subtilis*. **Food Research International**, v. 126, p. 08673, 2019.

RIVAS, S.; CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Characterization, refining and antioxidant activity of saccharides derived from hemicelluloses of wood and rice husks. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 495–502, 2013.

SAJIB, M.; FALCK, P.; SARDARI, R. R. R.; MATHEW, S.; GREY, C.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Valorization of brewer's spent grain to prebiotic oligosaccharide: Production, xylanase catalyzed hydrolysis, in-vitro evaluation with probiotic strains and in a batch human fecal fermentation model. **Journal of Biotechnology**, v. 268, 2017, p. 61–70, 2018.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; SASMAL, S.; MUIR, J.; ARORA, A. High xylan recovery using two stage alkali pre-treatment process from high lignin biomass and its valorisation to xylooligosaccharides of low degree of polymerisation. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 110–117, 2018.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.

SUN, Z.; LV, W.; YU, R.; LI, J.; LIU, H.; SUN, W.; WANG, Z.; LI, J.; ZHE, S.; QIN, Y. Effect of a straw-derived xylooligosaccharide on broiler growth performance, endocrine metabolism, and immune response. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 105–109, 2013.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. 1 ed. Porto Alegre: Sulina, 2017.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205–210, 2010.

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

VEENASHRI, B. R.; MURALIKRISHNA, G. In vitro anti-oxidant activity of xylooligosaccharides derived from cereal and millet brans - A comparative study. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1475–1481, 2011.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; WANG, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816–821, 2009.

XIAO, X.; BIAN, J.; PENG, X.; XU, H.; XIAO, B.; SUN, R. Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 63–70, 2013.

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

YANG, J.; SUMMANEN, P. H.; HENNING, S. M.; HSU, M.; LAM, H.; HUANG, J.; TSENG, C. H.; DOWD, S. E.; FINEGOLD, S. M.; HEBER, D.; LI, Z. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: A pilot study. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–11, 2015a.

YU, X.; YIN, J.; LI, L.; LUAN, C.; ZHANG, J.; ZHAO, C.; LI, S. Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from corn cobs and their in vitro antioxidant activity when combined with *Lactobacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1084–1092, 2015.

ZHANG, L.; ZENG, X.; QIU, J.; DU, J.; CAO, X.; TANG, X.; SUN, Y.; LI, S.; LEI, T.; LIU, S.; LIN, L. Spray-dried xylooligosaccharides carried by gum Arabic. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 330–343, 2019.

ZHOU, T.; XUE, Y.; REN, F.; DONG, Y. Antioxidant activity of xylooligosaccharides prepared from *Thermotoga maritima* using recombinant enzyme cocktail of  $\beta$ -xylanase and  $\alpha$ -glucuronidase. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 210–224, 2018.



**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL**



#### 4 CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo demonstrou a capacidade da levedura *Aureobasidium pullulans* em produzir simultaneamente xilanasas,  $\beta$ -xilosidases e xilo-oligossacarídeos (XOs) em cultivo submerso, utilizando xilana de madeira de faia como principal substrato. Dentre as cepas avaliadas para este fim, a maior produção de xilanase foi alcançada por *A. pullulans* CCT 1261 (74,9 U/mL), a qual também apresentou baixa secreção de  $\beta$ -xilosidase (0,10 U/mL), além de XOs (1,68 mg/mL) composto majoritariamente por xilobiose e xilotriose.

A produção de xilanasas por *A. pullulans* CCT 1261 também foi possível quando substratos agroindustriais com e sem pré-tratamento alcalino foram utilizados no meio de cultivo em substituição à xilana de faia. O farelo de arroz não tratado apresentou alta quantidade de hemicelulose (29,6%) e baixo teor de lignina (12,2%), o que resultou em alta secreção de xilanasas (11,7 U/mL) quando utilizado como fonte de xilana. A maximização da produção de xilanasas (82,2 U/mL) pela levedura foi obtida nas seguintes condições de cultivo: 3,6 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1,5 g/L de extrato de levedura, 61,9 g/L de farelo de arroz, pH 7,0 e 28 °C.

A precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0-30%/30-60%) se mostrou uma técnica eficaz na obtenção de xilanasas parcialmente purificadas, permitindo a purificação da enzima em 6,8 vezes e recuperação enzimática de 69,4%. As xilanasas bruta e purificada apresentaram temperatura e pH ótimos de atuação iguais a 50 °C e 4,5, respectivamente, e maior estabilidade à 40 °C dentro da faixa avaliada. Com base nos parâmetros de termoestabilidade dos extratos, o aumento da temperatura de 40 °C para 60 °C levou à desnaturação enzimática, sendo este processo endotérmico e que resulta no desdobramento da cadeia proteica em uma estrutura mais aleatória. Além disso, a xilanase bruta apresentou menor  $K_m$  (25 mg/mL) comparado à enzima purificada (50 mg/mL).

Os extratos de xilanase bruto e purificado foram capazes de catalisar a hidrólise da xilana de faia e consequente produção de XOs. O teor de XOs totais (7,7 mg/mL e 7,9 mg/mL) e a conversão de xilana em XOs (25,7% e 26,5%) foram estatisticamente iguais pela aplicação dos extratos bruto e purificado na hidrólise enzimática. Ainda, os hidrolisados apresentaram perfis de carboidratos semelhantes, sendo compostos majoritariamente por xilobiose (50,9% e 53,8%), seguido de xilotriose (30,9% e 32,8%) e XOs de maior GP (4,3% e 3,7%). Apesar da quantidade de xilose remanescente nos hidrolisados ser menor pelo uso do extrato purificado, esta não se mostrou baixa o suficiente para justificar a purificação enzimática, podendo o acúmulo de xilose ser contornado através de outros parâmetros reacionais.

A maximização da produção de XOs por hidrólise de xilana de faia utilizando o extrato bruto de xilanase de *A. pullulans* CCT 1261 foi alcançada avaliando-se a influência dos principais parâmetros reacionais. As altas concentrações de XOs totais (10,1 mg/mL) e XOs de baixo GP (9,7 mg/mL), além de alto percentual de XOs (99,1%) no hidrolisado, foram obtidas nas seguintes condições de reação: 6% (m/v) de xilana de faia, 260 U/g de xilanase bruta, pH 6,0, 180 rpm (agitação orbital), 40 °C por 24 h. O hidrolisado após a maximização apresentou aumento no teor de XOs totais e no percentual de XOs em 1,5 vezes e 9,4%, nesta ordem, comparado ao obtido nas condições iniciais de hidrólise (6,7 mg/mL e 89,7%, respectivamente).

Os maiores teores de XOs foram observados em XFH (10,3 mg/mL) e XAH (2,0 mg/mL), os quais apresentaram maior conteúdo de xilobiose e xilotriose em relação ao XFB. A maior atividade antioxidante foi observada por XFB, seguido de XAH e XFH. Embora os três hidrolisados não tenham sido capazes de inibir o crescimento de *E. coli*, *P. fluorescens* e *L. fructivorans*, estudos futuros devem ser realizados para investigar a atividade antimicrobiana destes frente à outras cepas bacterianas.

## 5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar o uso de estabilizantes enzimáticos a fim de ampliar o espectro de aplicação das xilanases de *A. pullulans*;
- Avaliar estabilidade térmica e ao pH, e as atividades antifúngicas e prebióticas dos hidrolisados contendo XOs obtidos por diferentes estratégias de produção;
- Realizar estudos adicionais de produção de XOs por hidrólise enzimática, a fim de aumentar a conversão de xilana em XOs;
- Avaliar o uso de xilanas obtidas de diferentes substratos agroindustriais na produção de XOs por hidrólise enzimática;
- Avaliar a aplicação dos hidrolisados em produtos alimentícios.





**CAPÍTULO V**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 991–995, 2009.
- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.
- AACHARY, A. A.; GOBINATH, D.; SRINIVASAN, K.; PRAPULLA, S. G. Protective effect of xylooligosaccharides from corncob on 1,2-dimethylhydrazine induced colon cancer in rats. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 2, p. 146–152, 2015.
- ABAIDE, E. R.; UGALDE, G.; DI, M.; MOREIRA, R. D. F. P. M.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Obtaining fermentable sugars and bioproducts from rice husks by subcritical water hydrolysis in a semi-continuous mode. **Bioresource Technology**, v. 272, p. 510–520, 2019a.
- ABAIDE, E. R.; TRES, M. V.; ZABOT, G. L.; MAZUTTI, M. A. Reasons for processing of rice coproducts: Reality and expectations. **Biomass and Bioenergy**, v. 120, p. 240–256, 2019b.
- ABASUBONG, K. P.; LIU, W. BIN; ZHANG, D. D.; YUAN, X. Y.; XIA, S. L.; XU, C.; LI, X. F. Fishmeal replacement by rice protein concentrate with xylooligosaccharides supplement benefits the growth performance, antioxidant capability and immune responses against *Aeromonas hydrophila* in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 78, p. 177–186, 2018.
- ABDUL MANAF, S. F.; MD JAHIM, J.; HARUN, S.; LUTHFI, A. A. I. Fractionation of oil palm fronds (OPF) hemicellulose using dilute nitric acid for fermentative production of xylitol. **Industrial Crops and Products**, v. 115, p. 6–15, 2018.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A. Optimization of upstream and downstream process parameters for cellulase-poor-thermo-solvent-stable xylanase production and extraction by *Aspergillus tubingensis* FDHN1. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 1–14, 2015.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Insight on xylanase from *Aspergillus tubingensis* FDHN1: Production, high yielding recovery optimization through statistical approach and application. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 51–57, 2016.
- ADHYARU, D. N.; BHATT, N. S.; MODI, H. A.; DIVECHA, J. Cellulase-free-thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8: Over-production through statistical approach, purification and bio-deinking/bio-bleaching potential. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 220–227, 2017.
- ADIGÜZEL, A. O.; TUNÇER, M. Production, characterization and application of a xylanase

from *Streptomyces* sp. AOA40 in fruit juice and bakery industries. **Food Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 189–218, 2016.

ADIGUZEL, G.; FAIZ, O.; SISECIOGLU, M.; SARI, B.; BALTACI, O.; AKBULUT, S.; GENÇ, B.; ADIGUZEL, A. A novel endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Pediococcus acidilactici* GC25; purification, characterization and application in clarification of fruit juices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 571–578, 2019.

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

AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.

AHMED, S. A.; SALEH, S. A. A.; MOSTAFA, F. A.; ATY, A. A. A.; AMMAR, H. A. M. Characterization and valuable applications of xylanase from endophytic fungus *Aspergillus terreus* KP900973 isolated from *Corchorus olitorius*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 134–144, 2016.

AJIJOLAKEWU, K. A.; PENG, C.; KEONG, C.; ABDULLAH, W.; NADIAH, W. Characterization of novel *Trichoderma* hemicellulase and its use to enhance downstream processing of lignocellulosic biomass to simple fermentable sugars. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 166–175, 2017.

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

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, 2010.

ALAYOUBI, R.; MEHMOOD, N.; HUSSON, E.; KOUZAYHA, A.; TABCHEH, M.; CHAVERIAT, L.; SARAZIN, C.; GOSSELIN, I. Low temperature ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass to enhance bioethanol yield. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1808–1816, 2020.

ALMEIDA, M. N.; GUIMARÃES, V. M.; FALKOSKI, D. L.; PAES, G. B. T.; RIBEIRO, J. I.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; PEREIRA, O. L.; DE REZENDE, S. T. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1332–1346, 2014.

ALOKIKA; SINGH, B. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 21–22, p. 8763–8784, 2019.

ALOKIKA; SINGH, D.; SINGH, B. Utility of acidic xylanase of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* JJBS250 in improving the nutritional value of poultry feed. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, p. 1–7, 2018.

ALTHURI, A.; GUJJALA, L. K. S.; BANERJEE, R. Partially consolidated bioprocessing of mixed lignocellulosic feedstocks for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 530–539, 2017.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

AMINI, N.; HARITOS, V. S.; TANKSALE, A. Microwave assisted pretreatment of eucalyptus sawdust enhances enzymatic saccharification and maximizes fermentable sugar yield. **Renewable Energy**, v. 127, p. 653–660, 2018.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; SILVA, S. P.; COELHO, E.; COIMBRA, M. A. Single-step production of arabino-xylooligosaccharides by recombinant *Bacillus subtilis* 3610 cultivated in brewers' spent grain. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 546–554, 2018.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; 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. 0–1, 2019a.

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. Downscale fermentation for xylooligosaccharides production by recombinant *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, p. 176–183, 2019b.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; CARDOSO, B. B.; ALVES, J. I.; PEREIRA, M. A.; RODRIGUES, L. R. In vitro assessment of prebiotic properties of xylooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* 3610. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, p. 115460, 2020.

AMORIM, C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, L. R. One-step process for producing prebiotic arabino-xylooligosaccharides from brewer's spent grain employing *Trichoderma species*. **Food Chemistry**, v. 270, p. 86–94, 2019.

AN, C.; MA, S.; CHANG, F.; XUE, W. Efficient production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* grown on mixtures of potato starch hydrolysate and sucrose. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 180–185, 2017.

ANAND, A.; KUMAR, V.; SATYANARAYANA, T. Characteristics of thermostable endoxylanase and  $\beta$ -xylosidase of the extremely thermophilic bacterium *Geobacillus thermodenitrificans* TSAA1 and its applicability in generating xylooligosaccharides and xylose from agro-residues. **Extremophiles**, v. 17, n. 3, p. 357–366, 2013.

ANDRADE, C. C. P. **Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris***. 2014. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, 2014.

ANDRADE, C. C. P.; SANTOS, T. P.; FRANCO, S. F.; RODRIGUES, M. I.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F.; F. M. F. Optimization of xylanase production by *Cryptococcus flavescens* LEB-AY10 from steam exploded sugarcane bagasse. **Journal of Biochemical & Microbial Technology**, v. 3, n. 2, p. 8–17, 2015.

ANG, S. K.; SHAZA, E. M.; ADIBAH, Y. A.; SURAINI, A. A.; MADIHAH, M. S.

Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293–1302, 2013.

ANTHONY, P.; HARISH, B. S.; JAMPALA, P.; RAMANUJAM, S.; UPPULURI, K. B. Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using *Prosopis juliflora*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, n. 1–2, p. 213–220, 2016.

ANTOV, M. G.; ĐORĐEVIĆ, T. R. Environmental-friendly technologies for the production of antioxidant xylooligosaccharides from wheat chaff. **Food Chemistry**, v. 235, p. 175–180, 2017.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014.

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

ARCHANA, G.; AMIT, K.; DHARM, D. Production and characterization of cellulase-free xylanase by *Aspergillus flavus* ARC-12 and its application in pre-bleaching of ethanol-soda pulp of *Eulaliopsis binata*. **Research Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 63–71, 2017.

ASTOLFI, V.; ASTOLFI, A. L.; MAZUTTI, M. A.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; CAMARGO, A. F.; DALASTRA, C.; KUBENECK, S.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 5, p. 677–685, 2019.

ATY, A.E.; A. A.; SALEH, S. A. A.; EID, B. M.; IBRAHIM, N. A.; MOSTAFA, F. A. Thermodynamics characterization and potential textile applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 xylanase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 129–137, 2018.

ÁVILA, P. F.; FRANCO CAIRO, J. P. L.; DAMASIO, A.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Xylooligosaccharides production from a sugarcane biomass mixture: Effects of commercial enzyme combinations on bagasse/straw hydrolysis pretreated using different strategies. **Food Research International**, v. 128, p. 108702, 2020.

AYOUB, A.; VENDITTI, R. A.; PAWLAK, J. J.; SADEGHIFAR, H.; SALAM, A. Development of an acetylation reaction of switchgrass hemicellulose in ionic liquid without catalyst. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 306–314, 2013.

AYYAPPAN, P.; ABIRAMI, A.; ANBUVAHINI, N. A.; TAMIL KUMARAN, P. S.; NARESH, M.; MALATHI, D.; ANTONY, U. Physicochemical properties of cookies enriched with xylooligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 420–428, 2016.

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

BACH, F.; ZIELINSKI, A. A. F.; HELM, C. V.; MACIEL, G. M.; PEDRO, A. C.; STAFUSSA, A. P.; ÁVILA, S.; HAMINIUK, C. W. I. Bio compounds of edible mushrooms: in vitro antioxidant and antimicrobial activities. **LWT - Food Science and Technology**, v. 107, p. 214–220, 2019.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Optimization of endoglucanase production from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 2, p. 305–316, 2018.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.

BAJAJ, B. K.; MANHAS, K. Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 330–337, 2012.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, M.; SHARMA, S. Alkalistable endo- $\beta$ -1,4-xylanase production from a newly isolated alkalitolerant *Penicillium* sp. SS1 using agro-residues. **3 Biotech**, v. 1, n. 2, p. 83–90, 2011.

BALLESTEROS, L. F.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Characterization of polysaccharides extracted from spent coffee grounds by alkali pretreatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 347–354, 2015.

BALLESTEROS, L. F.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 12, p. 3493–3503, 2014.

BANDIKARI, R.; POONDLA, V.; OBULAM, V. S. R. Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. **3 Biotech**, v. 4, n. 6, p. 655–664, 2014.

BANKEEREE, W.; AKADA, R.; LOTRAKUL, P.; PUNNAPAYAK, H.; PRASONGSUK, S. Enzymatic hydrolysis of black liquor xylan by a novel xylose-tolerant, thermostable  $\beta$ -xylosidase from a tropical strain of *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 3, p. 919–934, 2018.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; CHAIAREEKIJ, S.; EVELEIGH, D. E.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Effect of polyols on thermostability of xylanase from a tropical isolate of *Aureobasidium pullulans* and its application in prebleaching of rice straw pulp. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2014.

BANKEEREE, W.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; KIM, S. W.; PUNNAPAYAK, H. Enhanced production of cellulase-free thermoactive xylanase using corncob by a black yeast, *Aureobasidium pullulans* CBS 135684. **Korean Chemical Engineering Research**, v. 54, n. 6, p. 822–829, 2016.

BARRETT, N. E.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Contribution of the lactoperoxidase



system to the keeping quality of pasteurized milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 1, p. 73–80, 1999.

BATTAN, B.; DHIMAN, S. S.; AHLAWAT, S.; MAHAJAN, R.; SHARMA, J. Application of thermostable xylanase of *Bacillus pumilus* in textile processing. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 222–229, 2012.

BEDADE, D.; BEREZINA, O.; SINGHAL, R.; DESKA, J.; SHAMEKH, S. Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 288–293, 2017.

BEKALO, S. A.; REINHARDT, H.-W. Fibers of coffee husk and hulls for the production of particleboard. **Materials and Structures**, v. 43, n. 8, p. 1049–1060, 2010.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965–977, 2008.

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.

BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; AGARWAL, K.; CHATURVEDI, V.; VERMA, P. Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 1191–1202, 2019.

BHATIA, S. K.; JAGTAP, S. S.; BEDEKAR, A. A.; BHATIA, R. K.; PATEL, A. K.; PANT, D.; RAJESH BANU, J.; RAO, C. V.; KIM, Y.-G.; YANG, Y.-H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. **Bioresource Technology**, v. 300, p. 122724, 2020.

BHOWMICK, G. DE; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 1144–1154, 2018.

BHUTTO, A. W.; QURESHI, K.; HARIJAN, K.; ABRO, R.; ABBAS, T.; AHMED, A.; KARIM, S.; YU, G. Insight into progress in pre-treatment of lignocellulosic biomass. **Energy**, v. 122, p. 724–745, 2017.

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

BIBI, Z.; ANSARI, A.; ZOHRA, R. R.; AMAN, A.; UL QADER, S. A. Production of xylan degrading endo-1,4- $\beta$ -xylanase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* KIBGE-

IB29 . **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 478–485, 2014.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016.

BINOD, P.; GNANSOUNOU, E.; SINDHU, R.; PANDEY, A. Enzymes for second generation biofuels: Recent developments and future perspectives. **Bioresource Technology Reports**, v. 5, p. 317–325, 2019.

BONFIGLIO, F.; CAGNO, M.; REY, F.; TORRES, M.; BÖTHIG, S.; MENÉNDEZ, P.; MUSSATTO, S. I. Pretreatment of switchgrass by steam explosion in a semi-continuous pre-pilot reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 121, p. 41–47, 2019.

BOONCHUAY, P.; TECHAPUN, C.; SEESURIYACHAN, P.; CHAIYASO, T. Production of xylooligosaccharides from corncob using a crude thermostable endo-xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and prebiotic properties. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 1515–1523, 2014.

BOONCHUAY, P.; TAKENAKA, S.; KUNTIYA, A.; TECHAPUN, C.; LEKSAWASDI, N.; SEESURIYACHAN, P.; CHAIYASO, T. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 129, p. 61–68, 2016.

BOONCHUAY, P.; TECHAPUN, C.; LEKSAWASDI, N.; SEESURIYACHAN, P. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 399–407, 2018.

BORBA, T. M.; MACHADO, T. B.; BRANDELLI, A.; KALIL, S. J. Thermal stability and catalytic properties of protease from *Bacillus* sp. P45 active in organic solvents and ionic liquid. **Biotechnology Progress**, v. 34, p.1102–1108, 2018.

BORUAH, P.; DOWARAH, P.; HAZARIKA, R.; YADAV, A.; BARKAKATI, P.; GOSWAMI, T. Xylanase from *Penicillium meleagrinum* var. *viridiflavum* - a potential source for bamboo pulp bleaching. **Journal of Cleaner Production**, v. 116, p. 259–267, 2016.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for  $\beta$ -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 5, p. 1653–1663, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 81, de 19 de dezembro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade e os Procedimentos para uso na Alimentação Animal de Coprodutos da Indústria da Alimentação Humana e a Animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2018a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 239, de 26 de julho de 2018. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece os Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia Autorizados para Uso em Suplementos Alimentares. **Diário**

**Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2018b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1999.

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

BURUIANA, C.; GÓMEZ, B.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G. Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 449–459, 2017.

BUTSAT, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; SIRIAMORNPUN, S. Changes in phenolic acids and antioxidant activity in Thai rice husk at five growth stages during grain development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 4566–4571, 2009.

CAMPBELL, B. S.; SIDDIQUE, A. M.; MCDUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Which morphological forms of the fungus *Aureobasidium pullulans* are responsible for pullulan production? **FEMS Microbiology Letters**, v. 232, p. 225–228, 2004.

CANTERO, D. A.; MARTÍNEZ, C.; BERMEJO, M. D.; COCERO, M. J. Simultaneous and selective recovery of cellulose and hemicellulose fractions from wheat bran by supercritical water hydrolysis. **Green Chem.**, v. 17, n. 1, p. 610–618, 2015.

CARVALHO, A. F. A.; NETO, P. DE O.; SILVA, D. F.; PASTORE, G. M. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013.

CARVALHO, E. A.; SANTOS GÓES, L. M.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, E. G. P.; RODRIGUES, L. B.; PIROVANI, C. P.; COSTA, A. M. Thermoresistant xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in bread making and manufacturing xylooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1499–1506, 2017.

CASTRO, C. C.; NOBRE, C.; DUPREZ, M. E.; DE WEIRELD, G.; HANTSON, A. L. Screening and selection of potential carriers to immobilize *Aureobasidium pullulans* cells for fructo-oligosaccharides production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 82–90, 2017.

CAVKA, A.; JNSSON, L. J. Comparison of the growth of filamentous fungi and yeasts in lignocellulose-derived media. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 197–204, 2014.

CAYETANO-CRUZ, M.; SANTOS, A. I. P.; GARCÍA-HUANTE, Y.; SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A.; PAVÓN-OROZCO, P.; LÓPEZ Y LÓPEZ, V. E.; HIDALGO-LARA, M. E. High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 161–169, 2016.

- CERDA, A.; MEJÍAS, L.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1059–1068, 2017.
- CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178–182, 2002.
- CHANG, S.; GUO, Y.; WU, B.; HE, B. Extracellular expression of alkali tolerant xylanase from *Bacillus subtilis* Lucky9 in *E. coli* and application for xylooligosaccharides production from agro-industrial waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 249–256, 2017.
- CHANWICHA, N.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. **Mycoscience**, v. 56, n. 3, p. 309–318, 2015.
- CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 215–221, 2012.
- CHAUD, L. C. S.; SILVA, D. D. V.; MATTOS, R. T.; FELIPE, M. DAS G. A. Evaluation of oat hull hemicellulosic hydrolysate fermentability employing *Pichia stipitis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 771–777, 2012.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 4, p. 413–433, 2006.
- CHEN, M. H.; BOWMAN, M. J.; DIEN, B. S.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESÓN, M. E.; SINGH, V. Autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 359–365, 2014.
- CHEN, Z.; ZAKY, A. A.; LIU, Y.; CHEN, Y.; LIU, L.; LI, S.; JIA, Y. Purification and characterization of a new xylanase with excellent stability from *Aspergillus flavus* and its application in hydrolyzing pretreated corncobs. **Protein Expression and Purification**, v. 154, n. 11, p. 91–97, 2019.
- CHI, W. J.; LIM, J. H.; PARK, D. Y.; PARK, J. S.; HONG, S. K. Production and characterization of a thermostable endo-type  $\beta$ -xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 11, p. 1736–1743, 2013.
- CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L.; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 793–804, 2009.
- CHOUDHURY, A. R.; BHATTACHARYYA, M. S.; PRASAD, G. S. Application of response surface methodology to understand the interaction of media components during pullulan production by *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 232–237, 2012.

CHRISTAKOPOULOS, P.; KATAPODIS, P.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; STAMATIS, H.; SKALTSA, H. Antimicrobial activity of acidic xylo-oligosaccharides produced by family 10 and 11 endoxylanases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, n. 4–5, p. 171–175, 2003.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Hydrolysis of extracted and fibre-bound xylan with *Aureobasidium pullulans* enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 21–29, 1997.

CHRISTOV, L. P.; MYBURGH, J.; O'NEILL, F. H.; VAN TONDER, A.; PRIOR, B. A. Modification of the carbohydrate composition of sulfite pulp by purified and characterized  $\beta$ -xylanase and  $\beta$ -xylosidase of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 2, p. 196–200, 1999.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition**. [s.l: s.n.], 2012.

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

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, 2020. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 10 de jan. 2020.

CORTIVO, P. R. D.; HICKERT, L. R.; HECTOR, R.; AYUB, M. A. Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 10–18, 2018.

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

CRITTENDEN, R.; KARPPINEN, S.; OJANEN, S.; TENKANEN, M.; FAGERSTRM, R.; MTT, J.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, n. 8, p. 781–789, 2002.

CUNHA, L.; MARTARELLO, R.; SOUZA, P. M.; FREITAS, M. M.; BARROS, K. V. G.; FERREIRA FILHO, E. X.; HOMEM-DE-MELLO, M.; MAGALHÃES, P. O. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue. **Enzyme Research**, v. 2018, p. 1–7, 2018.

DANIEL, R. M.; DINES, M.; PETACH, H. H. The denaturation and degradation of stable enzymes at high temperatures. **Biochemical Journal**, v. 317, n. 1, p. 1–11, 1996.

DAS, A.; RAY, L. Production of crude xylanase using a isolated fungal strain *Aspergillus* sp.S6 by solid state fermentation. **Materials Today: Proceedings**, v. 3, n. 10, p. 3343–3360, 2016.

DESAI, D. I.; IYER, B. D. Utilization of corn cob waste for cellulase-free xylanase

production by *Aspergillus niger* DX-23: Medium optimization and strain improvement. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 1, p. 103–113, 2017.

DESHPANDE, M. S.; RALE, V. B.; LYNCH, J. M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 7, p. 514–527, 1992.

DIAS, L. M.; SANTOS, B. V.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; BAETA, B. E. L.; PASQUINI, D.; BAFFI, M. A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 708–718, 2017.

DÍAZ, A. B.; BLANDINO, A.; BELLELI, C.; CARO, I. An effective process for pretreating rice husk to enhance enzyme hydrolysis. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 27, p. 10870–10875, 2014.

DING, C.; LI, M.; HU, Y. High-activity production of xylanase by *Pichia stipitis*: Purification, characterization, kinetic evaluation and xylooligosaccharides production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 72–77, 2018.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology and Biotechnology**, v. 2, p. 210–215, 1991.

DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. C.  $\beta$ -Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Pharmacia**, v. 32, p. 262–268, 1989.

DOMINGUEZ, A.; NOBRE, C.; RODRIGUES, L. R.; PERES, A. M.; TORRES, D.; ROCHA, I.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 4, p. 1174–1179, 2012.

EGÜÉS, I.; SERRANO, L.; AMENDOLA, D.; DE FAVERI, D. M.; SPIGNO, G.; LABIDI, J. Fermentable sugars recovery from grape stalks for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 60, p. 553–558, 2013.

ERTAS, M.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H. MIN. Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 259–266, 2014.

ESCARNOT, E.; AGUEDO, M.; PAQUOT, M. Enzymatic hydrolysis of arabinoxylans from spelt bran and hull. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 2, p. 243–253, 2012.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) - Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2018. **Safety of xylooligosaccharides (XOs) as a novel food pursuant to regulation (EU) 2015/2283**. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/>>. Acesso em: 2 de abril de 2020.

FALCK, P.; PRECHA-ATSAWANAN, S.; GREY, C.; IMMERZEEL, P.; STAÏŠLBRAND, H.; ADLERCREUTZ, P.; NORDBERG KARLSSON, E. Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Agricultural and Food**

**Chemistry**, v. 61, n. 30, p. 7333–7340, 2013.

FANG, H. Y.; CHANG, S. M.; HSIEH, M. C.; FANG, T. J. Production, optimization growth conditions and properties of the xylanase from *Aspergillus carneus* M34. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 49, n. 1–4, p. 36–42, 2007.

FARYAR, R.; LINARES-PASTÉN, J. A.; IMMERZEEL, P.; MAMO, G.; ANDERSSON, M.; STALBRAND, H.; MATTIASSON, B.; KARLSSON, E. N. Food and bioproducts processing production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 3, p. 1–10, 2014.

FERRÃO, L. L.; FERREIRA, M. V. S.; CAVALCANTI, R. N.; CARVALHO, A. F. A.; PIMENTEL, T. C.; SILVA, R.; ESMERINO, E. A.; NETO, R. P. C.; TAVARES, M. I. B.; FREITAS, M. Q.; MENEZES, J. C. V.; CABRAL, L. M.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; MATHIAS, S. P.; RAICES, R. S. L.; PASTORE, G. M.; CRUZ, A. G. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, p. 137–147, 2018.

FINEGOLD, S. M.; LI, Z.; SUMMANEN, P. H.; DOWNES, J.; THAMES, G.; CORBETT, K.; DOWD, S.; KRAK, M.; HEBER, D. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food and Function**, v. 5, n. 3, p. 436–445, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 816**, 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 458**, 2013. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Generally Recognized as Safe (GRAS) - GRN 99**, 2002. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 28 out. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of Federal Regulations Title 21, Part 172: Food Additives Permitted For Direct Addition To Food For Human Consumption, 2019. Disponível em:** <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=172>>. Acesso em: 8 abr. 2020

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Manual of food quality control 7. Food analysis: General techniques, additives, contaminants, and composition**. Roma: FAO, 1986.

FREITAS, C.; CARMONA, E.; BRIENZO, M. Xylooligosaccharides production process from lignocellulosic biomass and bioactive effects. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 18, p. 100184, 2019.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic

materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012.

GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KALANTZI, O.; AGGELIS, G. Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans*ATHUM 2915. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 155–162, 1998.

GAUR, R.; SINGH, R.; GUPTA, M.; GAUR, M. K. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 7989–7997, 2010.

GAUTÉRIO, G. V.; VIEIRA, M. C.; GONÇALVES, L. G. G.; HÜBNER, T.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Production of xylanolytic enzymes and xylooligosaccharides by *Aureobasidium pullulans* CCT 1261 in submerged cultivation. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 335–345, 2018.

GAUTÉRIO, G. V.; SILVA, L. G. G.; HÜBNER, T.; DA ROSA RIBEIRO, T.; KALIL, S. J. Maximization of xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using a by-product of rice grain milling as xylan source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101511, 2020.

GHAYOUR-NAJAFABADI, P.; KHOSRAVINIA, H.; GHEISARI, A.; AZARFAR, A.; KHANAHMADI, M. Productive performance, nutrient digestibility and intestinal morphometry in broiler chickens fed corn or wheat-based diets supplemented with bacterial- or fungal-originated xylanase. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 1, p. 165–174, 2018.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GHOSH, A.; SUTRADHAR, S.; BAISHYA, D. Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 1–18, 2019.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GOLDBECK, R.; GONÇALVES, T. A.; DAMÁSIO, A. R. L.; BRENELLI, L. B.; WOLF, L. D.; PAIXÃO, D. A. A.; ROCHA, G. J. M.; SQUINA, F. M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 36–46, 2016.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. (Eds.). **Lignins: Occurrence, formation, structure and reactions**. Wiley Inte ed. New York: [s.n.], p. 241–266, 1971.



- GOLUGURI, B. R.; THULLURI, C.; ADDEPALLY, U.; SHETTY, P. R. Novel alkali-thermostable xylanase from *Thielaviopsis basicola* (MTCC 1467): Purification and kinetic characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 823–829, 2016.
- GOMEZ-TOVAR, F.; CELIS, L. B.; RAZO-FLORES, E.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 372–378, 2012.
- GOSTINČAR, C.; OHM, R. A.; KOGEJ, T.; SONJAK, S.; TURK, M.; ZAJC, J.; ZALAR, P.; GRUBE, M.; SUN, H.; HAN, J.; SHARMA, A.; CHINIQUY, J.; NGAN, C. Y.; LIPZEN, A.; BARRY, K.; GRIGORIEV, I. V.; GUNDE-CIMERMAN, N. Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: Biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–28, 2014.
- GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production and optimization of xylooligosaccharides from corncob by *Bacillus aerophilus* KGJ2 xylanase and its antioxidant potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 595–600, 2015.
- GOYAL, M.; KALRA, K. L.; SAREEN, V. K.; SONI, G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 535–541, 2008.
- GUERREIRO, I.; OLIVA-TELES, A.; ENES, P. Improved glucose and lipid metabolism in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed short-chain fructooligosaccharides and xylooligosaccharides. **Aquaculture**, v. 441, p. 57–63, 2015.
- GUIDO, E. S. **Produção de xilo-oligossacarídeos por hidrólise enzimática de xilanas**. 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.
- 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.
- GUL, K.; YOUSUF, B.; SINGH, A. K.; SINGH, P.; WANI, A. A. Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food – A review. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 6, n. 1, p. 24–30, 2015.
- GULLÓN, P.; MOURA, P.; ESTEVES, M. P.; GIRIO, F. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7482–7487, 2008.
- GULLÓN, P.; GONZÁLEZ-MUÑOZ, M. J.; VAN GOOL, M. P.; SCHOLS, H. A.; HIRSCH, J.; EBRINGEROVÁ, A.; PARAJÓ, J. C. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3632–3641, 2010.
- GUNST, R. F.; MASON, R. L. Fractional factorial design. **WIREs Computacional Statistics**, v. 1, p. 234–244, 2009.
- GUO, X.; SHU, S.; ZHANG, W.; WANG, E.; HAO, J. Synergetic degradation of corn cob

with inorganic salt (or hydrogen peroxide) and electron beam irradiation. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 4, n. 3, p. 1099–1105, 2016.

GUPTA, N. K.; PRAKASH, P.; KALAICHELVI, P.; SHEEBA, K. N. The effect of temperature and hemicellulose-lignin, cellulose-lignin, and cellulose-hemicellulose on char yield from the slow pyrolysis of rice husk. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 38, n. 10, p. 1428–1434, 2016.

GUPTE, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 2, p. 166–169, 1997.

GUTIÉRREZ-LARRAÍNZA, M.; RÚA, J.; DE ARRIAGA, D.; VALLE, P. DEL; GARCÍA-ARMESTO, M. R. In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 393–399, 2013.

HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; STEINER, W.; ŽUPANČIČ, S. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 2, p. 137–161, 1996.

HANSEN, C. H. F.; FROKIAER, H.; CHRISTENSEN, A. G.; BERGSTROM, A.; LICHT, T. R.; HANSEN, A. K.; METZDORFF, S. B. Dietary xylooligosaccharide downregulates IFN- $\gamma$  and the low-grade inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  systemically in mice. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 4, p. 533–540, 2013.

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

HAYASHI, S.; OHNO, T.; ITO, M.; YOKOI, H. Purification and properties of the cell-associated beta-xylosidase from *Aureobasidium*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 276–279, 2001.

HICKERT, L. R.; DA CUNHA-PEREIRA, F.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 508–514, 2013.

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

HOOG, G.; YURLOVA, N. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, p. 41–54, 1994.

HORN, S.; VAAJE-KOLSTAD, G.; WESTERENG, B.; EIJSINK, V. G. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 45, 2012.

HU, J.; SADDLER, J. N. Why does GH10 xylanase have better performance than GH11

xylanase for the deconstruction of pretreated biomass? **Biomass and Bioenergy**, v. 110, p. 13–16, 2018.

IMMERZEEL, P.; FALCK, P.; GALBE, M.; ADLERCREUTZ, P.; NORDBERG KARLSSON, E.; STÅLBRAND, H. Extraction of water-soluble xylan from wheat bran and utilization of enzymatically produced xylooligosaccharides by *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Weissella* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 321–327, 2014.

INGLIN, R. C.; STEVENS, M. J. A.; MEILE, L.; LACROIX, C.; MEILE, L. High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. **Journal of Microbiological Methods**, v. 114, p. 26–29, 2015.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: An overview. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 3157–3176, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <<http://ftp.ibge.gov.br/>> Acesso em: 20 de nov. 2019.

IRFAN, M.; NADEEM, M.; SYED, Q. One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride* -IR05 in solid-state fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 3, p. 317–326, 2014.

IRFAN, M.; ASGHAR, U.; NADEEM, M.; NELOFER, R.; SYED, Q. Optimization of process parameters for xylanase production by *Bacillus* sp. in submerged fermentation. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 9, n. 2, p. 139–147, 2016.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015.

IUPAC, I. U. OF P. AND A. C. Abbreviated terminology of oligosaccharide chains - Recommendations of Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). **Biological Chemistry**, v. 257, n. 7, 1982.

JAGTAP, S.; DESHMUKH, R. A.; MENON, S.; DAS, S. Xylooligosaccharides production by crude microbial enzymes from agricultural waste without prior treatment and their potential application as nutraceuticals. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 283–288, 2017.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

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

KABEL, M. A.; KORTENOEVER, L.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, A. G. J. In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6205–6210, 2002.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; ZOUARI-ELLOUZI, S.; CHAABOUNI, M.;

- GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 1–10, 2016.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; BOUAZIZ, F.; NEIFER, M.; GHORBEL, R.; ELLOUZ CHAABOUNI, S. Production of xylooligosaccharides from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK and their in vitro evaluation as prebiotics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 536–546, 2015a.
- KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAABOUNI, S. E.; GHORBEL, R. Biological activities of xylooligosaccharides generated from garlic straw xylan by purified xylanase from *Bacillus mojavensis* UEB-FK. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 2, p. 950–964, 2015b.
- KARNI, M.; DEOPURKAR, R. L.; RALE, V. B.  $\beta$ -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars agricultural residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 476–478, 1993.
- KAUR, P.; BHARDWAJ, N. K.; SHARMA, J. Process optimization for hyper production of xylanase via statistical methodology from isolated *Bacillus pumilus* 3GAH using lignocellulosic waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 159–167, 2016.
- KAUSHIK, P.; MALIK, A. Production and characterization of xylanases from fungal isolate *Aspergillus Terreus* and development of low cost fermentation media. **Journal of Medical and Bioengineering**, v. 5, n. 1, p. 15–18, 2016.
- KAVYA, V.; PADMAVATHI, T. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Polish journal of microbiology/Polskie Towarzystwo Mikrobiologów The Polish Society of Microbiologists**, v. 58, n. 2, p. 125–30, 2009.
- KAWEE-AI, A.; SRISUWUN, A.; TANTIWA, N.; NONTAMAN, W.; BOONCHUAY, P.; KUNTIYA, A.; CHAIYASO, T.; SEESURIYACHAN, P. Eco-friendly processing in enzymatic xylooligosaccharides production from corncob: Influence of pretreatment with sonocatalytic-synergistic Fenton reaction and its antioxidant potentials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 184–192, 2016.
- KAZAN, D.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase by polyethylene glycols against thermal inactivation. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 62, n. 1, p. 1–13, 1997.
- KHANAHMADI, M.; AREZI, I.; AMIRI, M.; MIRANZADEH, M. Bioprocessing of agro-industrial residues for optimization of xylanase production by solid-state fermentation in flask and tray bioreactor. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 272–282, 2018.
- KHUCHAROENPHAISAN, K.; TOKUYAMA, S.; KITPREECHAVANICH, V. Purification and characterization of a high-thermostable  $\beta$ -xylanase from newly isolated *Thermomyces lanuginosus* THKU-49. **Mycoscience**, v. 51, n. 6, p. 405–410, 2010.
- KHURANA, S.; KAPOOR, M.; GUPTA, S.; KHUHAD, R. C. Statistical optimization of alkaline xylanase production from *Streptomyces violaceoruber* under submerged fermentation using response surface methodology. **Indian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 144–152,

2007.

KHUSRO, A.; KALIYAN, B. K.; AL-DHABI, N. A.; ARASU, M. V.; AGASTIAN, P. Statistical optimization of thermo-alkali stable xylanase production from *Bacillus tequilensis* strain ARMATI. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 16–25, 2016.

KIM, J. S.; LEE, Y. Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42–48, 2016.

KIM, Y. A.; YOON, K. H. Characterization of a *Paenibacillus woosongensis*  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -arabinofuranosidase produced by recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1711–1716, 2010.

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

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KNOB, A.; BEITEL, S. M.; FORTKAMP, D.; RAFAEL, C.; TERRASAN, F.; ALMEIDA, A. F. DE. Production, purification, and characterization of a major *Penicillium glabrum* xylanase using brewer's spent grain as substrate. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KOCABAŞ, D. S.; GÜDER, S.; ÖZBEN, N. Purification strategies and properties of a low-molecular weight xylanase and its application in agricultural waste biomass hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 66–75, 2015.

KRISHNA, G.; DIVYASHRI, G.; PRAPULLA, S. G.; MURALIDHARA. A Combination supplement of fructo- and xylo-oligosaccharides significantly abrogates oxidative impairments and neurotoxicity in maternal/fetal milieu following gestational exposure to acrylamide in rat. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 9, p. 1904–1918, 2015.

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

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 7, p. 1–19, 2017.

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

KUMAR, V.; CHHABRA, D.; SHUKLA, P. Xylanase production from *Thermomyces lanuginosus* VAPS-24 using low cost agro-industrial residues via hybrid optimization tools and its potential use for saccharification. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1009–1019, 2017.

- KUMAR, V.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 226–235, 2018.
- KUMAR, V.; MARÍN-NAVARRO, J.; SHUKLA, P. Thermostable microbial xylanases for pulp and paper industries: trends, applications and further perspectives. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 2, p. 1–10, 2016.
- KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 796–812, 2015.
- KUPSKI, L.; DE CARVALHO SILVELLO, M. A.; FONTES, M. R. V.; LIMA, T. S.; TREICHEL, H.; BADIALE FURLONG, E. *R. oryzae* cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 129–138, abr. 2015.
- LARA, C. A.; SANTOS, R. O.; CADETE, R. M.; FERREIRA, C.; MARQUES, S.; GÍRIO, F.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; FONSECA, C. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1107–1119, 2014.
- LASRADO, L. D.; GUDIPATI, M. Antioxidant property of synbiotic combination of *Lactobacillus* sp. and wheat bran xylo-oligosaccharides. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4551–4557, 2014.
- LATTIEFF, F. A. A study of biogas production from date palm fruit wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 139, p. 1191–1195, 2016.
- LEATHERS, T. D. Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce xylanase with extremely high specific activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1026–1030, 1986.
- LEATHERS, T. D.; RICH, J. O.; ANDERSON, A. M.; MANITCHOTPISIT, P. Lipase production by diverse phylogenetic clades of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 10, p. 1701–1706, 2013.
- LEE, N. K. Statistical optimization of medium and fermentation conditions of recombinant *pichia pastoris* for the production of xylanase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2018.
- LEITE, P.; MANUEL, J.; VENÂNCIO, A.; MANUEL, J.; BELO, I. Ultrasounds pretreatment of olive pomace to improve xylanase and cellulase production by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 737–746, 2016.
- LEITE, R. S. R.; ALVES-PRADO, H. F.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, F. C.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude  $\beta$ -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 6, p. 391–395, 2008.
- LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. D. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pulluans* on

solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 281–288, 2007.

LEMES, A. C.; SILVÉRIO, S. C.; RODRIGUES, S.; RODRIGUES, L. R. Integrated strategy for purification of esterase from *Aureobasidium pullulans*. **Separation and Purification Technology**, v. 209, p. 409–418, 2019.

LEYVA-JIMENEZ, F. J.; LOZANO-SANCHEZ, J.; BORRAS-LINARES, I.; CADIZ-GURREA, M. DE LA L.; MAHMOODI-KHALEDI, E. Potential antimicrobial activity of honey phenolic compounds against Gram positive and Gram negative bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, v. 101, p. 236–245, 2019.

LI, B.; ZHANG, N.; PENG, Q.; YIN, T.; GUAN, F.; WANG, G.; LI, Y. Production of pigment-free pullulan by swollen cell in *Aureobasidium pullulans* NG which cell differentiation was affected by pH and nutrition. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 293–300, 2009.

LI, H.; CHI, Z.; WANG, X.; MA, C. Amylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d. **Journal of Ocean University of China**, v. 6, n. 1, p. 60–65, 2007a.

LI, H.; CHI, Z.; DUAN, X.; WANG, L.; SHENG, J.; WU, L. Glucoamylase production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* N13d and hydrolysis of potato starch granules by the enzyme. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 462–465, 2007b.

LI, H. Y.; WANG, B.; WEN, J. L.; CAO, X. F.; SUN, S. N.; SUN, R. C. Availability of four energy crops assessing by the enzymatic hydrolysis and structural features of lignin before and after hydrothermal treatment. **Energy Conversion and Management**, v. 155, p. 58–67, 2018.

LI, J.; HOU, G. G.; CHEN, Z.; GEHRING, K. Effects of endoxylanases, vital wheat gluten, and gum Arabic on the rheological properties, water mobility, and baking quality of whole-wheat saltine cracker dough. **Journal of Cereal Science**, v. 58, n. 3, p. 437–445, 2013.

LI, K.; AZADI, P.; COLLINS, R.; TOLAN, J.; KIM, J. S.; ERIKSSON, K. E. L. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1–2, p. 89–94, 2000.

LIAO, H.; XU, C.; TAN, S.; WEI, Z.; LING, N.; YU, G.; RAZA, W.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; XU, Y. Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 117–124, 2012.

LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 13–20, 2016.

LIN, S. H.; CHOU, L. M.; CHIEN, Y. W.; CHANG, J. S.; LIN, C. I. Prebiotic effects of xylooligosaccharides on the improvement of microbiota balance in human subjects. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2016, 2016.

LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 53, n. 3, p. 658–666, 1934.

LIU, W.; BRENNAN, M. A.; SERVENTI, L.; BRENNAN, C. S. Effect of cellulase, xylanase and  $\alpha$ -amylase combinations on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. **Food Chemistry**, v. 234, p. 93–102, 2017.

LIU, X.; LIU, Y.; JIANG, Z.; LIU, H.; YANG, S.; YAN, Q. Biochemical characterization of a novel xylanase from *Paenibacillus barengoltzii* and its application in xylooligosaccharides production from corncobs. **Food Chemistry**, v. 264, p. 310–318, 2018.

LONG, C.; LIU, J.; GAN, L.; ZENG, B.; LONG, M. Optimization of xylanase production by *Trichoderma orientalis* using corn cobs and wheat bran via statistical strategy. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 5, p. 1277–1284, 2017.

LOPES, A. M.; VALERI, D.; PESSOA-JÚNIOR, A. Comparison of kinetic characteristics of xylanases from *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. with pH and temperature baking process parameters. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 19, p. 2640–2645, 2013.

LOPES, F.; MOTTA, F.; ANDRADE, C. C. P.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI-FILHO, F. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 03, n. 03, p. 36–42, 2011.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 93, p. 265–275, 1951.

MA, J. FENG; YANG, H. YAN; KUN, W.; LIU, X. E. Structural modification of hemicelluloses and lignin based on the biorefinery process with white-rot fungal. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 7–13, 2016.

MAALEJ, I.; BELHAJ, I.; MASMOUDI, N. F.; BELGHITH, H. Highly thermostable xylanase of the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*: Purification and characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, n. 1, p. 200–212, 2009.

MAMMAN, A. S.; LEE, J.-M.; KIM, Y.-C.; HWANG, I. T.; PARK, N.-J.; HWANG, Y. K.; CHANG, J.-S.; HWANG, J.-S. Furfural: Hemicellulose/xylose-derived biochemical. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 5, p. 438–454, 2008.

MANDELLI, F.; BRENELLI, L. B.; ALMEIDA, R. F.; GOLDBECK, R.; WOLF, L. D.; HOFFMAM, Z. B.; RULLER, R.; ROCHA, G. J. M.; MERCADANTE, A. Z.; SQUINA, F. M. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 770–775, 2014.

MANDENIUS, C.-F.; BRUNDIN, A. REVIEW : BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN, Bioprocess optimization, using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 6, p. 1191–1203, 2008.

MANITCHOTPISIT, P.; LEATHERS, T. D.; PETERSON, S. W.; KURTZMAN, C. P.; LI, X.-L.; EVELEIGH, D. E.; LOTRAKUL, P.; PRASONGSUK, S.; DUNLAP, C. A.; VERMILLION, K. E.; PUNNAPAYAK, H. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. **Mycological Research**, v. 113, n. 10, p. 1107–1120, 2009.



- MARASABESSY, A.; MOEIS, M. R.; SANDERS, J. P. M.; WEUSTHUIS, R. A. Enhancing *Jatropha* oil extraction yield from the kernels assisted by a xylan-degrading bacterium to preserve protein structure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 2027–2036, 2011.
- MARTINS, M. D.; GUIMARÃES, M. W.; DE LIMA, V. A.; GAGLIOTI, A. L.; DA-SILVA, P. R.; KADOWAKI, M. K.; KNOB, A. Valorization of passion fruit peel by-product: Xylanase production and its potential as bleaching agent for kraft pulp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 172–180, 2018.
- MATHEWS, S. L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A. M. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 7, p. 2939–2954, 2015.
- MAZLAN, N. A.; SAMAD, K. A.; YUSSOF, H. W.; SAUFI, S. M.; JAHIM, J. Xylooligosaccharides from potential agricultural waste: Characterization and screening on the enzymatic hydrolysis factors. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 575–584, 2019.
- MCNEIL, B.; KRISTIENSEN, B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 521–526, 1990.
- MENEGOL, D.; SCHOLL, A. L.; DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Influence of different chemical pretreatments of elephant grass (*Pennisetum purpureum*, Schum.) used as a substrate for cellulase and xylanase production in submerged cultivation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 1455–1464, 2016.
- MENEZES, B. S.; ROSSI, D. M.; AYUB, M. A. Z. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 1–12, 2017.
- MIELENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532–3539, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MOHAMED, M. A.; GHANEM, M. M. E.; ABD-ELAZIZ, A. M.; SHAMS-ELDIN, I. M. Purification and characterization of xylanase isoenzymes from red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 321–327, 2018.
- MONIZ, P.; HO, A. L.; DUARTE, L. C.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A.; PEREIRA, H.; CARVALHEIRO, F. Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylooligosaccharides obtained from corn straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 466–473, 2016.
- MORAIS, C. G.; CADETE, R. M.; UETANABARO, A. P. T.; ROSA, L. H.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. **Fungal Genetics and Biology**, v. 60, p.

19–28, 2013.

MURTHY, P. S.; MADHAVA NAIDU, M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45–58, 2012.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J. A. Production composition, and application of coffee and its industrial residues. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 661–672, 2011

MYBURGH, J.; PRIOR, B. A.; KILIAN, S. G. The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobasidium pullulans* NRRL Y 2311-1. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 6, p. 343–348, 1991.

NASR, S.; SOUDI, M. R.; HATEF SALMANIAN, A.; GHADAM, P. Partial optimization of endo-1,4-beta-xylanase production by *Aureobasidium pullulans* using agro-industrial residues. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 16, n. 12, p. 1245–1253, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninguer**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NG, K. R.; LYU, X.; MARK, R.; CHEN, W. N. Antimicrobial and antioxidant activities of phenolic metabolites from flavonoid-producing yeast: Potential as natural food preservatives. **Food Chemistry**, v. 270, p. 123–129, 2019.

NIETO-DOMÍNGUEZ, M.; EUGENIO, L. I. DE; 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.

NINAWA, S.; KAPOOR, M.; KUHAD, R. C. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1252–1258, 2008.

OHTA, K.; MORIYAMA, S.; TANAKA, H.; SHIGE, T.; AKIMOTO, H. Purification and characterization of an acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* var. *melanigenum* and sequence analysis of the encoding gene. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 3, p. 262–270, 2001.

OHTA, K.; FUJIMOTO, H.; FUJII, S.; WAKIYAMA, M. Cell-associated  $\beta$ -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.

OLIVEIRA, J. P. DE; BRUNI, G. P.; LIMA, K. O.; EL HALLAL, S. L. M.; ROSA, G. S. DA; DIAS, A. R. G.; ZAVAREZE, E. DA R. Cellulose fibers extracted from rice and oat husks and their application in hydrogel. **Food Chemistry**, v. 221, p. 153–160, 2017.

OTERO, D. M.; CADAVAL, C. L.; TEIXEIRA, L. M.; ROSA, C. A.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Screening of yeasts capable of producing cellulase-free xylanase. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 23, p. 1961–1969, 2015.

OTIENO, D. O.; AHRING, B. K. The potential for oligosaccharide production from the

- hemicellulose fraction of biomasses through pretreatment processes: Xylooligosaccharides (XOS), arabinooligosaccharides (AOS), and mannoooligosaccharides (MOS). **Carbohydrate Research**, v. 360, p. 84–92, 2012.
- PAËS, G.; BERRIN, J. G.; BEAUGRAND, J. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 564–592, 2012.
- PAL, A.; KHANUM, F. Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7563–7569, 2010.
- PAL, A.; KHANUM, F. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 4, p. 879–887, 2011.
- PALANIAPPAN, A.; YUVARAJ, S. S.; SONAIMUTHU, S.; ANTONY, U. Characterization of xylan from rice bran and finger millet seed coat for functional food applications. **Journal of Cereal Science**, v. 75, p. 296–305, 2017.
- PALANIAPPAN, A.; BALASUBRAMANIAM, V. G.; ANTONY, U. Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from finger millet seed coat. **Food Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 264–280, 2017.
- PALUMBO, M.; AVELLANEDA, J.; LACASTA, A. M. Availability of crop by-products in Spain: New raw materials for natural thermal insulation. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 99, p. 1–6, 2015.
- PANOUILLE, M.; RALET, M. C.; BONNIN, E.; THIBAUT, J. F. Recovery and reuse of trimmings and pulps from fruit and vegetable processing. In: **Handbook of Waste Management and Co-product Recovery in Food Processing** [s.l.] Woodhead Publishing Limited, 2007.
- PANWAR, D.; SRIVASTAVA, K. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 118–125, 2014.
- PANWAR, D.; SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Production, extraction and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus* sp. PKD-9 with potential for poultry feed. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 118–125, 2014.
- PARACHIN, N. S.; SIQUEIRA, S.; DE FARIA, F. P.; TORRES, F. A. G.; DE MORAES, L. M. P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1–3, p. 52–57, 2009.
- PASSARINHO, A. T. P.; VENTORIM, R. Z.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; DE OLIVEIRA, E. B.; GUIMARÃES, V. M. Engineered GH11 xylanases from *Orpinomyces* sp. PC-2 improve techno-functional properties of bread dough. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 2, p. 741–747, 2019.
- PATEL, A.; SINDHU, D. K.; ARORA, N.; SINGH, R. P.; PRUTHI, V.; PRUTHI, P. A. Biodiesel production from non-edible lignocellulosic biomass of *Cassia fistula* L. fruit pulp

using oleaginous yeast *Rhodospiridium kratochvilovae* HIMPA1. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 91–98, 2015.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 879–903, 2012.

PENG, P.; SHE, D. Isolation, structural characterization, and potential applications of hemicelluloses from bamboo: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 701–720, 2014.

PEREIRA, G. F.; BASTIANI, D. DE; GABARDO, S.; SQUINA, F.; AYUB, M. A. Z. Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase, arabinofuranosidase, and xylooligosaccharides from soybean fibre. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 78–85, 2018.

PEREIRA, P. H. F.; WALDRON, K. W.; WILSON, D. R.; CUNHA, A. P.; BRITO, E. S. D.; RODRIGUES, T. H. S.; ROSA, M. F.; AZEREDO, H. M. C. Wheat straw hemicelluloses added with cellulose nanocrystals and citric acid. Effect on film physical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 164, p. 317–324, 2017.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, J.; TÉLLEZ-JURADO, A.; ÁLVAREZ-CERVANTES, J.; IBARRA-GARCÍA, J. A.; JARAMILLO-LORANCA, B. E.; ANDUCHO-REYES, M. A.; MERCADO-FLORES, Y. Study of the intracellular xylanolytic activity of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. **Mycoscience**, v. 61, n. 2, p. 76–84, 2019.

PESSOA-JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Editora Manole, 2005.

PING, L.; BROSSE, N.; SANNIGRAHI, P.; RAGAUSKAS, A. Evaluation of grape stalks as a bioresource. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 200–204, 2011.

PODE, R. Potential applications of rice husk ash waste from rice husk biomass power plant. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 53, p. 1468–1485, 2016.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica vegetables*: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2007.

POLIZZI, K. M.; BOMMARIUS, A. S.; BROERING, J. M.; CHAPARRO-RIGGERS, J. F. Stability of biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 2, p. 220–225, 2007.

PRADEEP, G. C.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; SEONG, C. N.; CHO, S. S.; LEE, H. J.; YOO, J. C. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1188–1196, 2013.

PRIEM, B.; DOBBERSTEIN, J.; EMEIS, C. C. Production of  $\beta$ -1,4-xylanase in continuous culture by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 3, p. 149–154, 1991.

PROZIL, S. O.; COSTA, E. V.; EVTUGUIN, D. V.; CRUZ LOPES, L. P.; DOMINGUES, M. R. M. Structural characterization of polysaccharides isolated from grape stalks of *Vitis vinifera* L. **Carbohydrate Research**, v. 356, p. 252–259, 2012.

RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. **Fuel**, v. 136, p. 349–357, 2014.

RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K. L. Production of prebiotic-xylooligosaccharides from alkali pretreated mahogany and mango wood sawdust by using purified xylanase of *Clostridium strain* BOH3. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 158–166, 2017.

RAMOS, S.; GARCÍA-ACHA, I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. **Transactions British Mycological Society**, v. 64, n. 1, p. 129–135, 1975.

RANI, G. B.; CHIRANJEEVI, T.; CHANDEL, A. K.; SATISH, T.; RADHIKA, K.; NARASU, M. L.; UMA, A. Optimization of selective production media for enhanced production of xylanases in submerged fermentation by *Thielaviopsis basicola* MTCC 1467 using L16 orthogonal array. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 10, p. 2508–2516, 2014.

RASHAD, M. M.; MAHMOUD, A. E.; NOOMAN, M. U.; MAHMOUD, H. A.; EL-TORKY, A. E. D. M. M.; KESHITA, A. T. Production of antioxidant xylooligosaccharides from lignocellulosic materials using *Bacillus amyloliquifaciens* NRRL B-14393 xylanase. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 30–36, 2016.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, 2016.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Characterization of enzyme released antioxidant phenolic acids and xylooligosaccharides from different *Graminaceae* or *Poaceae* members. **Food Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 357–370, 2013.

REDDY, S. S.; KRISHNAN, C. Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 237–245, 2016.

REIS, L.; FONTANA, R. C.; DELABONA, P. S.; LIMA, D. J. S.; CAMASSOLA, M.; PRADELLA, J. G.C; DILLON, A. J. P. Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 597–603, 2013.

REQUE, P. M.; ORLANDINI WERNER, J. A.; BARRETO PINILLA, C. M.; FOLMER CORRÊA, A. P.; RODRIGUES, E.; BRANDELLI, A. Biological activities of wheat middlings bioprocessed with *Bacillus* spp. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 525–531, 2017.

REQUE, P. M.; PINILLA, C. M. B.; GAUTÉRIO, G. V.; KALIL, S. J.; BRANDELLI, A. Xylooligosaccharides production from wheat middlings bioprocessed with *Bacillus subtilis*. **Food Research International**, v. 126, p. 108673, 2019.

- REZENDE, C.; DE LIMA, M.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 54, 2011.
- RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; ANDERSON, A. M.; BISCHOFF, K. M. Laccases from *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 1, p. 33–37, 2013.
- RIVAS, S.; CONDE, E.; MOURE, A.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Characterization, refining and antioxidant activity of saccharides derived from hemicelluloses of wood and rice husks. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 495–502, 2013.
- ROBLEDO, A.; AGUILAR, C. N.; BELMARES-CERDA, R. E.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; CRUZ-HERNÁNDEZ, M. A.; MONTAÑEZ-SÁENZ; MONTAÑEZ-SÁENZ, J. C. Kinetic and thermodynamic parameters of the thermostable xylanase production. **International Journal of Research In Agriculture and Food Sciences**, v. 1, n. 6, p. 1–8, 2014.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2012.
- ROE, S. **Protein Purification Techniques**. New York: Oxford University Press, 2001.
- ROSMINE, E.; SAINJAN, N. C.; SILVESTER, R.; ALIKKUNJU, A.; VARGHESE, S. A. Statistical optimisation of xylanase production by estuarine *Streptomyces* sp. and its application in clarification of fruit juice. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 393–401, 2017.
- SAJIB, M.; FALCK, P.; SARDARI, R. R. R.; MATHEW, S.; GREY, C.; KARLSSON, E. N.; ADLERCREUTZ, P. Valorization of brewer's spent grain to prebiotic oligosaccharide: Production, xylanase catalyzed hydrolysis, in-vitro evaluation with probiotic strains and in a batch human fecal fermentation model. **Journal of Biotechnology**, v. 268, p. 61–70, 2018.
- SALOMÃO, G. S. B.; AGNEZI, J. C.; BASTOS, L. P.; HENCKER, L. B.; LIRA, T. S. DE; TARDIOLI, P. W.; PINOTTI, L. M. Production of cellulases by solid state fermentation using natural and pretreated sugarcane bagasse with different fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 1–6, 2019.
- SAMALA, A.; SRINIVASAN, R.; YADAV, M. Comparison of xylo-oligosaccharides production by autohydrolysis of fibers separated from ground corn flour and DDGS. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 354–364, 2015.
- SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; JAYARAM, C.; ROY, S.; KOLTE, A. P.; SENANI, S.; SRIDHAR, M. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.
- SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Kinetic modeling of the thermal inactivation of bacteriocin-like inhibitory substance P34. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 3147–3152, 2010.
- SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994.

SEEMAKRAM, W.; BOONRUNG, S.; KATEKAEW, S.; AIMI, T.; BOONLUE, S. Purification and characterization of low molecular weight alkaline xylanase from *Neosartorya tatenoi* KKU-CLB-3-2-4-1. **Mycoscience**, v. 57, n. 5, p. 326–333, 2016.

SEESURIYACHAN, P.; KAWEE-AI, A.; CHAIYASO, T. Green and chemical-free process of enzymatic xylooligosaccharide production from corncob: Enhancement of the yields using a strategy of lignocellulosic destructuration by ultra-high pressure pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 537–544, 2017.

SEIDL, P. R.; GOULART, A. K. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2, p. 48–53, 2016.

SHAHRESTANI, H.; TAHERI-KAFRANI, A.; SOOZANIPOUR, A.; TAVAKOLI, O. Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1,3,5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 109, p. 51–58, 2016.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 219–228, 2003.

SHARMA, S.; BAJAJ, B. K. Xylanase production from a new strain of *Aspergillus terreus* S9 and its application for saccharification of rice straw using combinatorial approach. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 37, n. 3, p. 1210–1219, 2018.

SHENG, P.; XU, J.; SACCONI, G.; LI, K.; ZHANG, H. Discovery and characterization of endo-xylanase and  $\beta$ -xylosidase from a highly xylanolytic bacterium in the hindgut of *Holotrichia parallela* larvae. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 33–40, 2014.

SHI, P.; CHEN, X.; MENG, K.; HUANG, H.; BAI, Y.; LUO, H.; YANG, P.; YAO, B. Distinct actions by *Paenibacillus* sp. strain E18  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases and xylanase in xylan degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1990–1995, 2013.

SILVA, C. M.; DE BORBA, T. DE M.; KALIL, S. J.; DE BURKERT, J. F. M. Raw glycerol and parboiled rice effluent for carotenoid production: Effect of the composition of culture medium and initial pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 489–496, 2016.

SILVA, L. A. DE O.; TERRASAN, C. R. F.; CARMONA, E. C. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307–313, 2015.

SILVA, P. O.; DE ALENCAR GUIMARÃES, N. C.; SERPA, J. D. M.; MASUI, D. C.; MARCHETTI, C. R.; VERBISCK, N. V.; ZANOELO, F. F.; RULLER, R.; GIANNESI, G. C. Application of an endo-xylanase from *Aspergillus japonicus* in the fruit juice clarification and fruit peel waste hydrolysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p.

101312, 2019.

SIMON, L.; CAYE-VAUGIEN, C.; BOUCHONNEAU, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 979–985, 1993.

SINDHU, R.; BINOD, P.; MATHEW, A. K.; ABRAHAM, A.; GNANSOUNOU, E.; UMMALYMA, S. B.; THOMAS, L.; PANDEY, A. Development of a novel ultrasound-assisted alkali pretreatment strategy for the production of bioethanol and xylanases from chili post harvest residue. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 146–151, 2017.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; SASMAL, S.; MUIR, J.; ARORA, A. High xylan recovery using two stage alkali pre-treatment process from high lignin biomass and its valorisation to xylooligosaccharides of low degree of polymerisation. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 110–117, 2018.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SKIBA, E. A.; BAIBAKOVA, O. V.; BUDAIEVA, V. V.; PAVLOV, I. N.; VASILISHIN, M. S.; MAKAROVA, E. I.; SAKOVICH, G. V.; OVCHINNIKOVA, E. V.; BANZARAKTSAEVA, S. P.; VERNIKOVSKAYA, N. V.; CHUMACHENKO, V. A. Pilot technology of ethanol production from oat hulls for subsequent conversion to ethylene. **Chemical Engineering Journal**, v. 329, p. 178–186, 2017.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618.** [s.l.: s.n.], 2008.

SOUZA, L. O.; BRITO, A. R.; BONOMO, R. C. F.; SANTANA, N. B.; FERRAZ, J. L. A. A.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; FERNANDES, A. G. A.; FERREIRA, M. L. O.; OLIVEIRA, J. R.; FRANCO, M. Comparison of the biochemical properties between the xylanases of *Thermomyces lanuginosus* (Sigma®) and excreted by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 during the solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 277–284, 2018.

SPIGNO, G.; PIZZORNO, T.; FAVERI, D. M. DE. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4329–4337, 2008.

SUBHEDAR, P. B.; RAY, P.; GOGATE, P. R. Ultrasonics Sonochemistry Intensification of delignification and subsequent hydrolysis for the fermentable sugar production from lignocellulosic biomass using ultrasonic irradiation. **Ultrasonics - Sonochemistry**, v. 40, p. 140–150, 2018.

SUGUMARAN, K. R.; GOWTHAMI, E.; SWATHI, B.; ELAKKIYA, S.; SRIVASTAVA, S. N.; RAVIKUMAR, R.; GOWDHAMAN, D.; PONNUSAMI, V. Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from Asian palm kernel: A novel substrate. **Carbohydrate**



**Polymers**, v. 92, n. 1, p. 697–703, 2013.

SUKRI, S. S. M.; MIMI SAKINAH, A. M. Production of high commercial value xylooligosaccharides from meranti wood sawdust using immobilised xylanase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 278–290, 2018.

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, n. 7, 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.

SUN, Z.; LV, W.; YU, R.; LI, J.; LIU, H.; SUN, W.; WANG, Z.; LI, J.; ZHE, S.; QIN, Y. Effect of a straw-derived xylooligosaccharide on broiler growth performance, endocrine metabolism, and immune response. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 2, p. 105–109, 2013.

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

SUREK, E.; BUYUKKILECI, A. O. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 565–571, 2017.

TAHA, M.; FODA, M.; SHAHSAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; ADETUTU, E.; BALL, A. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 190–197, 2016.

TAN, L. U. L.; MAYERS, P.; SADDLER, J. N. Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 8, p. 689–692, 1987.

TANAKA, H.; MUGURUMA, M.; OHTA, K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 2, p. 202–211, 2006.

TERÁN HILARES, R.; ORSI, C. A.; AHMED, M. A.; MARCELINO, P. F.; MENEGATTI, C. R.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C. Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 76–81, 2017.

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

TERRASAN, C. R. F.; TEMER, B.; SARTO, C.; SILVA JÚNIOR, F. G.; CARMONA, E. C. Xylanase and  $\beta$ -xylosidase from *Penicillium janczewskii*: Production, physico-chemical properties, and application of the crude extract to pulp biobleaching. **BioResources**, v. 8, n. 1, p. 1292–1305, 2013.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. 1 ed. Porto Alegre: Sulina, 2017.

TOPPING, D. L.; CLIFTON, P. M. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1031–1064, 2001.

TRACHE, D.; HUSSIN, M. H.; HUI CHUIN, C. T.; SABAR, S.; FAZITA, M. R. N.; TAIWO, O. F. A.; HASSAN, T. M.; HAAFIZ, M. K. M. Microcrystalline cellulose: Isolation, characterization and bio-composites application—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 789–804, 2016.

TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Use of a sequential strategy of experimental design to optimize the inulinase production in a batch bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 7, p. 895–900, 2009.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 205–210, 2010.

UDAY, U. S. P.; CHOUDHURY, P.; BANDYOPADHYAY, T. K.; BHUNIA, B. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 1041–1054, 2016.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **World Agriculture Supply and Demand Estimates**. Disponível em:

<<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2019.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114–1120, 2010.

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

VAN CRAEYVELD, V.; SWENNEN, K.; DORNEZ, E.; VAN DE WIELE, T.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; DELAEDT, Y.; ONAGBESAN, O.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J.; DE KETELAERE, B.; BROEKAERT, W. F.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2348–2355, 2008.

VAN DYK, J. S.; GAMA, R.; MORRISON, D.; SWART, S.; PLETSCHKE, B. I. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 26, p. 521–531, 2013.

VANDEPLAS, S.; DAUPHIN, R. D.; THONART, P.; THÉWIS, A.; BECKERS, Y. Effect of the bacterial or fungal origin of exogenous xylanases supplemented to a wheat-based diet on performance of broiler chickens and nutrient digestibility of the diet. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 90, n. 2, p. 221–228, 2010.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v. 153, n. 3, p. 895–905, 2010.

VARANASI, P.; SINGH, P.; AUER, M.; ADAMS, P. D.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Survey of renewable chemicals produced from lignocellulosic biomass during ionic liquid pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 14, p. 1–9, 2013.

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

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

VEENASHRI, B. R.; MURALIKRISHNA, G. In vitro anti-oxidant activity of xylooligosaccharides derived from cereal and millet brans - A comparative study. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1475–1481, 2011.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: A review. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. [S.I] ed. [s.l.]: John Wiley and Sons, 2014.

WANG, J.; SUN, B.; CAO, Y.; TIAN, Y.; WANG, C. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 4, p. 816–821, 2009.

WANG, X.; LUO, H.; YU, W.; MA, R.; YOU, S.; LIU, W.; HOU, L.; ZHENG, F.; XIE, X.; YAO, B. A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. **Food Chemistry**, v. 199, p. 516–523, 2016.

WANG, Z.; HE, X.; YAN, L.; WANG, J.; HU, X.; SUN, Q.; ZHANG, H. Enhancing enzymatic hydrolysis of corn stover by twin-screw extrusion pretreatment. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111960, 2020.

WU, H.; CHENG, X.; ZHU, Y.; ZENG, W.; CHEN, G.; LIANG, Z. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 1, p. 46–51, 2018a.

WU, J.; ELLISTON, A.; LE GALL, G.; COLQUHOUN, I. J.; COLLINS, S. R. A.; WOOD, I. P.; DICKS, J.; ROBERTS, I. N.; WALDRON, K. W. Optimising conditions for bioethanol production from rice husk and rice straw: Effects of pre-treatment on liquor composition and fermentation inhibitors. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018b.

WU, S.; CHEN, H.; JIN, Z.; TONG, Q. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 1234, p. 737–741, 2010.

- WU, S.; LU, M.; CHEN, J.; FANG, Y.; WU, L.; XU, Y.; WANG, S. Production of pullulan from raw potato starch hydrolysates by a new strain of *Aureobasidium pullulans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 740–743, 2016.
- XIAO, X.; BIAN, J.; PENG, X.; XU, H.; XIAO, B.; SUN, R. Autohydrolysis of bamboo (*Dendrocalamus giganteus* Munro) culm for the production of xylo-oligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 63–70, 2013.
- XIE, C.; GONG, W.; YANG, Q.; ZHU, Z.; YAN, L.; HU, Z.; PENG, Y. White-rot fungi pretreatment combined with alkaline/oxidative pretreatment to improve enzymatic saccharification of industrial hemp. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 188–195, 2017.
- YAMAMOTO, Y.; KISHIMURA, H.; KINOSHITA, Y.; SABURI, W.; KUMAGAI, Y.; YASUI, H.; OJIMA, T. Enzymatic production of xylooligosaccharides from red alga dulse (*Palmaria* sp.) wasted in Japan. **Process Biochemistry**, v. 82, p. 117–122, 2019.
- YANG, H.; WANG, K.; SONG, X.; XU, F. Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7171–7176, 2011.
- YANG, J.; SUMMANEN, P. H.; HENNING, S. M.; HSU, M.; LAM, H.; HUANG, J.; TSENG, C. H.; DOWD, S. E.; FINEGOLD, S. M.; HEBER, D.; LI, Z. Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: A pilot study. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 1–11, 2015a.
- YANG, M.; ZHANG, J.; KUITTINEN, S.; VEPSÄLÄINEN, J.; SOININEN, P.; KEINÄNEN, M.; PAPPINEN, A. Enhanced sugar production from pretreated barley straw by additive xylanase and surfactants in enzymatic hydrolysis for acetone–butanol–ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 131–137, 2015b.
- YARDIMCI, G. O.; CEKMECELIOGLU, D. Assessment and optimization of xylanase production using co-cultures of *Bacillus subtilis* and *Kluyveromyces marxianus*. **3 Biotech**, v. 8, n. 290, p. 1–10, 2018.
- YEGIN, S. Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* on globe artichoke stem: Bioprocess optimization, enzyme characterization, and application in saccharification of lignocellulosic biomass. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 441–449, 2016.
- YEGIN, S. *Aureobasidium pullulans* ile ksilanaz üretimine etki eden biyoproses parametrelerin belirlenmesi. **Gıda/The Journal of Food**, v. 42, p. 1–9, 2017a.
- YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. **Food Chemistry**, v. 221, p. 67–75, 2017b.
- YEGIN, S.; ALTINEL, B.; TULUK, K. A novel extremophilic xylanase produced on wheat bran from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1: Effects on dough rheology and bread quality. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 389–397, 2018.
- 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, 2017.

YEGIN, S.; GOKSUNGUR, Y.; FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1312–1319, 2012.

YIN, Y.; WANG, J. Enhancement of enzymatic hydrolysis of wheat straw by gamma irradiation-alkaline pretreatment. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 123, p. 63–67, 2016.

YOO, J.; ALAVI, S.; VADLANI, P.; AMANOR-BOADU, V. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7583–7590, 2011.

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

YU, X. HONG; GU, Z. XIN. Direct production of feruloyl oligosaccharides and hemicellulase inducement and distribution in a newly isolated *Aureobasidium pullulans* strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 2, p. 747–755, 2014.

YU, X.; YIN, J.; LI, L.; LUAN, C.; ZHANG, J.; ZHAO, C.; LI, S. Prebiotic potential of xylooligosaccharides derived from corn cobs and their in vitro antioxidant activity when combined with *Lactobacillus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 1084–1092, 2015.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZALAR, P.; GOSTINČAR, C.; DE HOOG, G. S.; URŠIČ, V.; SUDHADHAM, M.; GUNDE-CIMERMAN, N. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 21–38, 2008.

ZHANG, B.; HAO, G. JUAN; CAO, H. JUAN; TANG, H.; ZHANG, Y. YANG; DENG, S. GUI. The cryoprotectant effect of xylooligosaccharides on denaturation of peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) protein during frozen storage. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 228–237, 2018.

ZHANG, F.; HU, S. N.; CHEN, J. J.; LIN, L. B.; WEI, Y. L.; TANG, S. K.; XU, L. H.; LI, W. J. Purification and partial characterisation of a thermostable xylanase from salt-tolerant *Thermobifida halotolerans* YIM 90462 T. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 225–228, 2012.

ZHANG, L.; ZENG, X.; QIU, J.; DU, J.; CAO, X.; TANG, X.; SUN, Y.; LI, S.; LEI, T.; LIU, S.; LIN, L. Spray-dried xylooligosaccharides carried by gum Arabic. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 330–343, 2019.

ZHAO, L.; MENG, K.; SHI, P.; BAI, Y.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. A novel thermophilic xylanase from *Achaetomium* sp. Xz-8 with high catalytic efficiency and application potentials in the brewing and other industries. **Process**

**Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 1879–1885, 2013.

ZHAO, M. JIAO; XU, Q. QIN; LI, G. MIN; ZHANG, Q. ZHI; ZHOU, D.; YIN, J. ZHONG; ZHAN, H. SHU. Pretreatment of agricultural residues by supercritical CO<sub>2</sub> at 50–80 °C to enhance enzymatic hydrolysis. **Journal of Energy Chemistry**, v. 31, p. 39–45, 2019.

ZHOU, J.; LIU, Y.; SHEN, J.; ZHANG, R.; TANG, X.; LI, J.; WANG, Y.; HUANG, Z. Kinetic and thermodynamic characterization of a novel low-temperature-active xylanase from *Arthrobacter* sp. GN16 isolated from the feces of *Grus nigricollis*. **Bioengineered**, v. 6, n. 2, p. 111–114, 2015.

ZHOU, T.; XUE, Y.; REN, F.; DONG, Y. Antioxidant activity of xylooligosaccharides prepared from *Thermotoga maritima* using recombinant enzyme cocktail of  $\beta$ -xylanase and  $\alpha$ -glucuronidase. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 210–224, 2018.



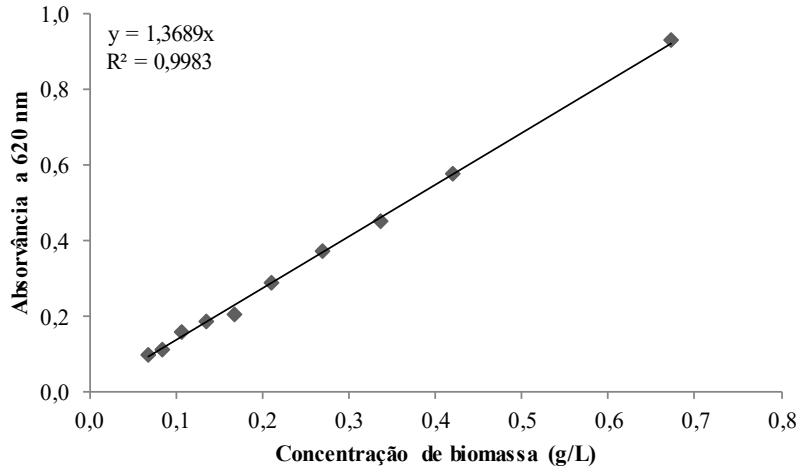
**APÊNDICE I**



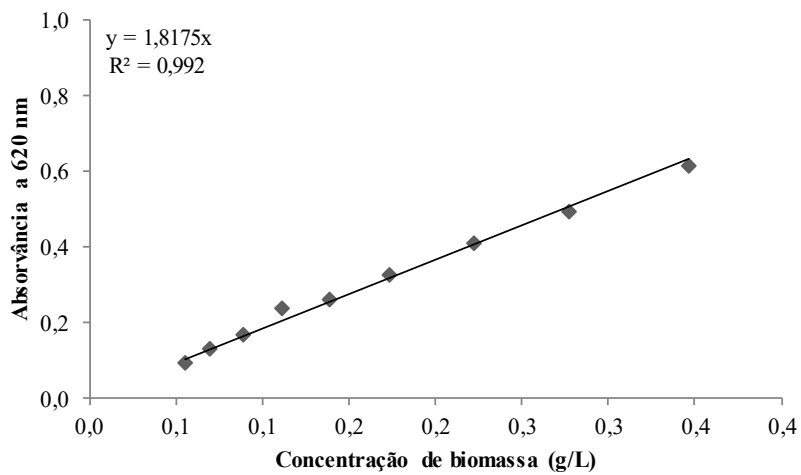


## APÊNDICE 1

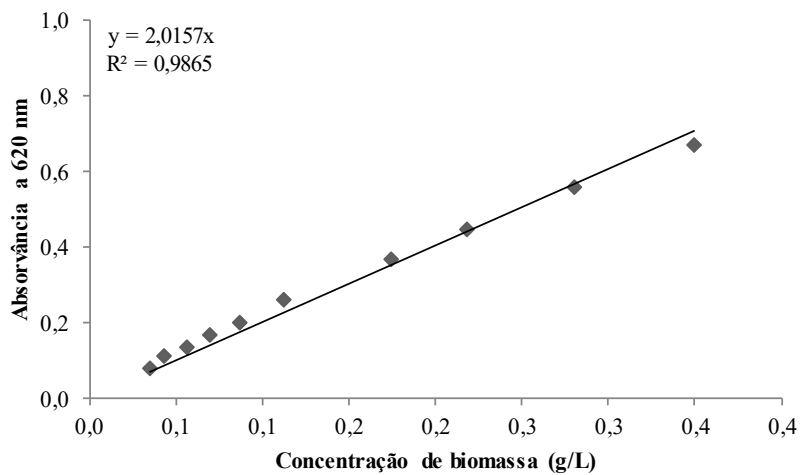
**Figura 1** – Curva padrão de biomassa para *A. pullulans* CCT 7521.



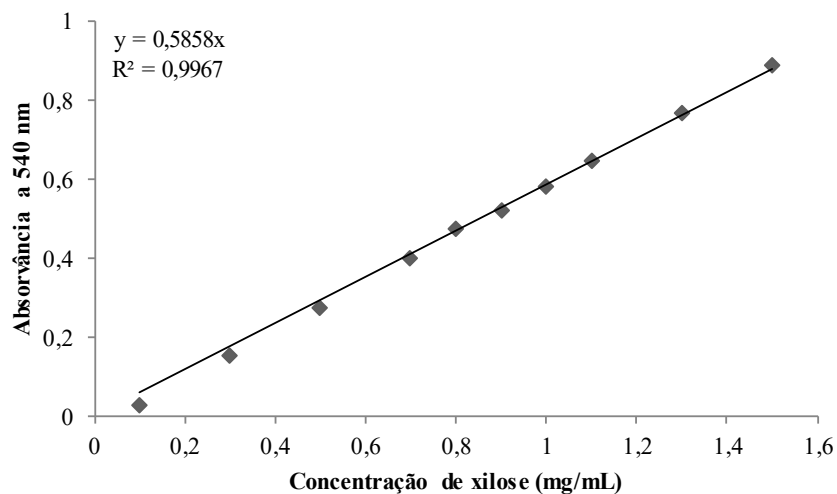
**Figura 2** – Curva padrão de biomassa para *A. pullulans* CCT 4154.



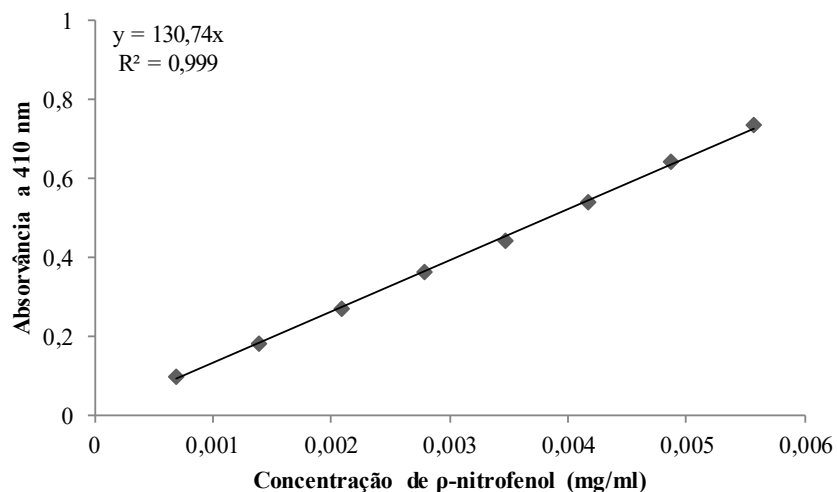
**Figura 3** – Curva padrão de biomassa para *A. pullulans* CCT 1261.



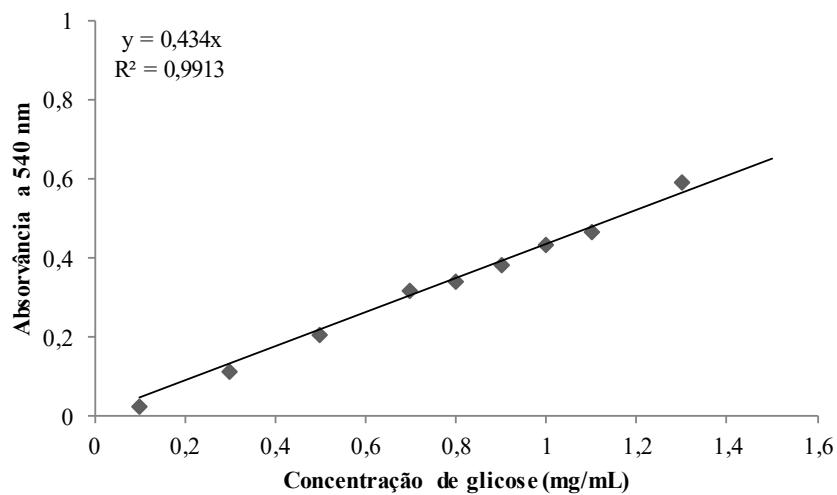
**Figura 4** – Curva padrão de xilose (utilizada para o cálculo da atividade de endo- $\beta$ -1,4-xilanase).

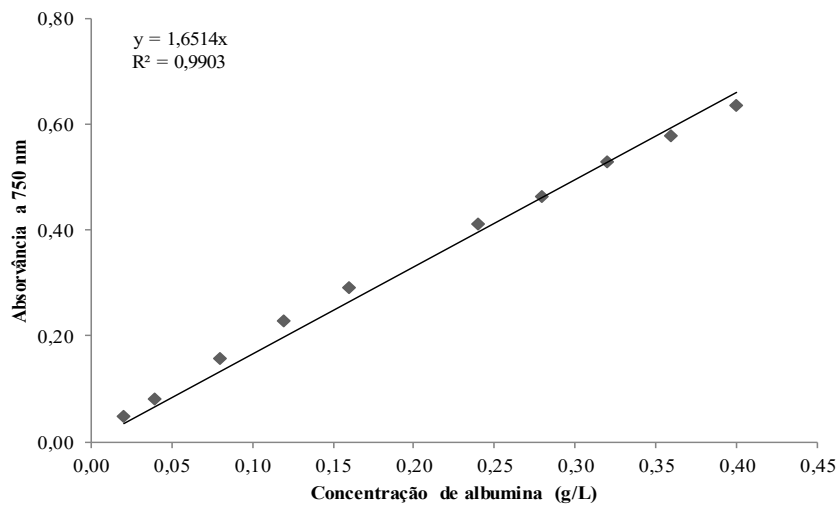
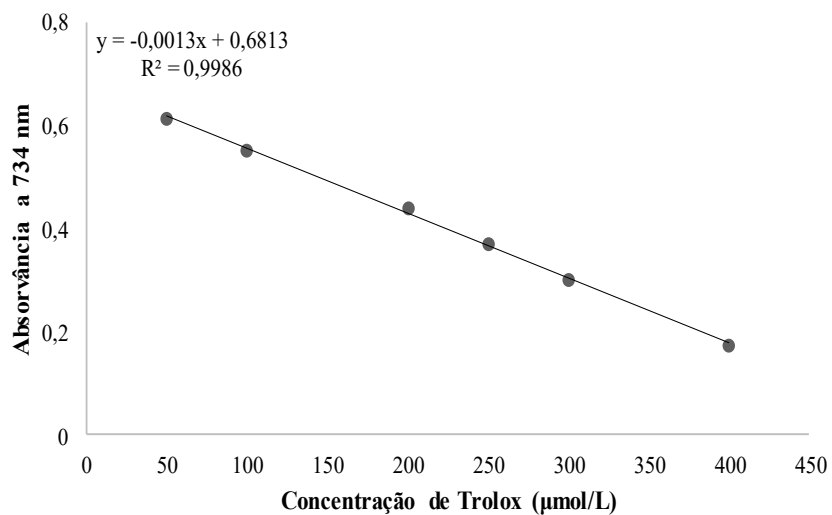
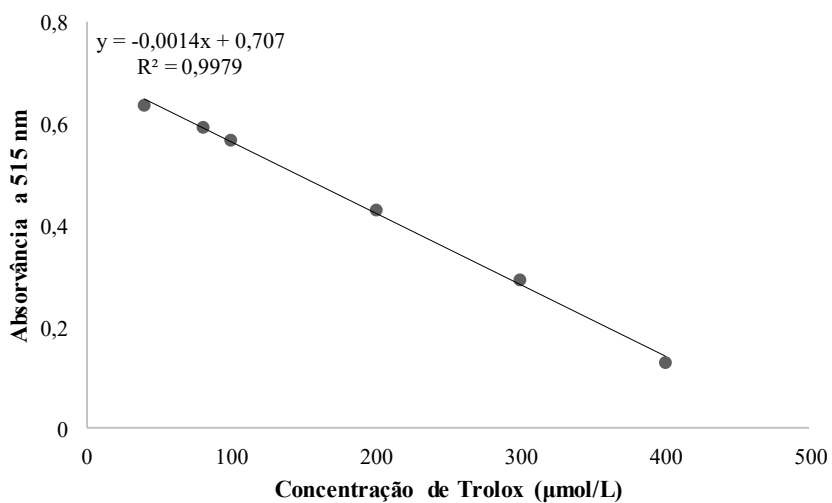


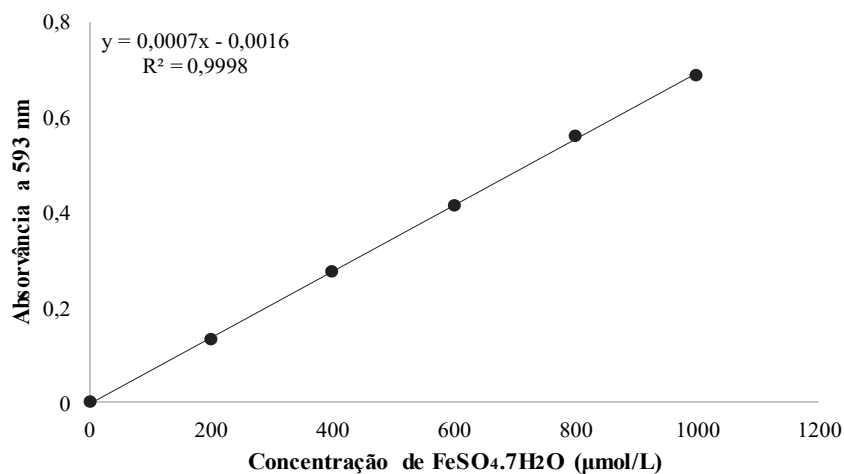
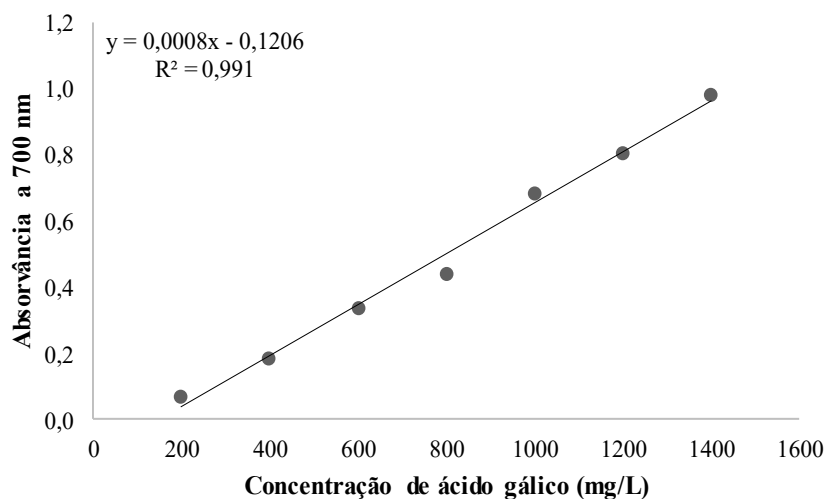
**Figura 5** – Curva padrão de pNP (utilizada para o cálculo da atividade de  $\beta$ -xilosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase e  $\beta$ -glicosidase).



**Figura 6** – Curva padrão de glicose (utilizada para o cálculo da atividade de celulases totais).



**Figura 7** – Curva padrão de albumina (utilizada para o cálculo do teor de proteínas solúveis).**Figura 8** – Curva padrão de Trolox (atividade antioxidante pelo método ABTS).**Figura 9** – Curva padrão de Trolox (atividade antioxidante pelo método DPPH).

**Figura 10** – Curva padrão de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (atividade antioxidante pelo método FRAP).**Figura 11** – Curva padrão de ácido gálico (utilizada no cálculo de compostos fenólicos totais).**Figura 12** – Curva padrão de quercitina (utilizada para o cálculo de flavonoides totais).