



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
ENG07053 - TRABALHO DE DIPLOMAÇÃO EM  
ENGENHARIA QUÍMICA



# **Xilo-oligossacarídeos - aplicação em alimentos e produção a partir de resíduos lignocelulósicos: uma revisão da literatura**

*Vanessa Yuki Grafulin*

*Orientadora: Prof. Dra. Daniele Misturini Rossi*

Porto Alegre, julho de 2018

**Sumário**

Agradecimentos	iv
Resumo	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas	viii
1 Introdução	1
2 Biomassa Lignocelulósica	3
2.1 Xilanas	4
2.2 Resíduos agrícolas	7
2.2.1 Arroz	7
2.2.2 Soja	8
2.2.3 Milho	8
2.2.4 Composição dos resíduos	9
3 Xilo-oligossacarídeos	11
3.1 Definição e propriedades	11
3.2 XOS como ingredientes alimentares	12
3.2.1 Potencial prebiótico e benefícios à saúde	12
3.2.2 Aplicação em alimentos funcionais	14
3.2.3 Alimentos funcionais contendo XOS e estudos recentes	15
3.2.4 Informações de mercado e aspectos econômicos	16
4 Processo de produção	18
4.1 Pré-tratamento	23
4.1.1 Pré-tratamento alcalino	24
4.1.2 Pré-tratamento ácido	25
4.2 Hidrólise enzimática	26
4.2.1 Xilanases	27
4.2.2 Enzimas desramificantes	29
4.2.3 Uso de enzimas imobilizadas	31
4.2.4 Enzimas como coadjuvantes de tecnologia	32

4.3	Produção de enzimas para aplicação na produção de XOS	33
5	Conclusão	36
6	Referências	37

## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Elisabete e Everton, pela educação, dedicação e incentivo, e ao meu irmão Bernardo, pela amizade desde sempre.

Àquelas pessoas que conheci desde que vim para Porto Alegre e que fizeram toda a diferença nesse tempo de faculdade. Em especial ao meu namorado Hugo, pelo apoio e companhia, do vestibular ao TCC.

À prof. Daniele, pela orientação, aos demais professores do Departamento de Engenharia Química da UFRGS e todos outros professores que tive na minha vida de estudante.

À equipe da Regenera pela compreensão e dicas durante a realização deste trabalho.

## Resumo

A atividade agrícola e agroindustrial gera uma grande quantidade de subprodutos, entre eles, resíduos lignocelulósicos. Entre os componentes destes resíduos estão as xilanas, polissacarídeos formados por uma cadeia principal composta por unidades de xilose, que fazem parte do grupo das hemiceluloses. A hidrólise desses polissacarídeos dá origem aos xilo-oligossacarídeos (XOS), compostos por 2 a 7 unidades de xilose e são oligossacarídeos não digeríveis (NDO) por vertebrados, devido às ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) presentes entre os açúcares. Quando ingeridos, chegam ao intestino de forma íntegra e podem ser utilizados como substratos pelas bactérias que o colonizam. O potencial prebiótico dos XOS, ou seja, o potencial de ser usado seletivamente por bactérias benéficas, vêm sendo estudado nas últimas décadas e estes oligossacarídeos já são usados como ingredientes em alimentos voltados para saúde intestinal no Japão desde a década de 90. O interesse pelo consumo de prebióticos e alimentos contendo prebióticos como ingredientes, considerados alimentos funcionais, vêm crescendo principalmente devido à conscientização dos consumidores sobre a relação entre saúde, bem estar e alimentação. XOS possuem a vantagem de poder ser produzido utilizando resíduos, que são uma matéria prima abundante e de baixo custo. Podem ser produzidos pela auto-hidrólise da biomassa, hidrólise ácida ou hidrólise enzimática. A hidrólise enzimática apresenta vantagens, como a especificidade e a operação em condições brandas. Antes da biomassa lignocelulósica ser submetida à hidrólise por enzimas xilanolíticas, em geral, é realizado um pré-tratamento para facilitar o acesso das enzimas e tornar o processo mais eficiente. No caso da produção de XOS a partir de resíduos agrícolas, o pré-tratamento mais usado é o químico, que pode ser alcalino ou ácido. A escolha do resíduo, que deve ser preferencialmente rico em xilana, as condições empregadas no pré-tratamento deste resíduo e na hidrólise enzimática, são fatores importantes que influenciam na quantidade de XOS obtidos no processo.

## Lista de Figuras

Figura 2.1: Representação do arranjo espacial da celulose, hemiceluloses e lignina na parede celular (U.S. DEPARTMENT OF ENERGY OFFICE OF SCIENCE, 2007) .....	3
Figura 2.2: Estrutura química da glicuronoxilana (GX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006) .....	5
Figura 2.3: Estrutura química da arabinoglicuronoxilana (AGX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006) .....	5
Figura 2.4: Estrutura química da arabinoxilana (AX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006) .....	6
Figura 2.5: Estrutura química da glicuronoarabinoxilana (AGX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006) .....	6
Figura 3.1: Xilobiase (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006) .....	11
Figura 4.1: Fluxograma simplificado da estratégia geralmente empregada para produção de XOS pelo método enzimático .....	20
Figura 4.2: Duas possíveis variações do processo.....	24
Figura 4.3: Esquema mostrando as enzimas envolvidas na hidrólise de diferentes ligações presentes possivelmente presentes nas xilanas (Adaptado de ROGOWSKI et al., 2014) .....	30
Figura 4.4: Esquema hipotético simplificado da regulação das enzimas xilanolíticas envolvendo endo-xilanases e $\beta$ -xilosidases (Adaptado de POLIZELI et al., 2005) .....	34

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Composição química de alguns resíduos lignocelulósicos .....	10
Tabela 2.2: Quantidade de xilana presente em alguns resíduos lignocelulósicos	10
Tabela 4.1: Comparativo de estudos utilizando o método enzimático para produção de XOS .....	21

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Araf –  $\alpha$ -L-arabinofuranosil

AX – Arabinoxilanas

AGX – Arabinoglicuronoxilanas

C<sub>XOS</sub> – Concentração de XOS

CS – Carga de sólidos

FES – Fermentação em estado sólido

F<sub>Sm</sub> – Fermentação submersa

FOSHU – *Foods for Specified Health Uses*

GAX – Glicuronoarabinoxilanas

GH – Glicosídeo hidrolases

GlcA – Ácido 2-O- $\alpha$ -D-glicurônico

GP – Grau de polimerização

GX – Glicuronoxilanas

HX – Heteroxilanas

MeGlcA – Ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glicurônico

MLC – Material Lignocelulósico

NDO – Oligossacarídeos não digeríveis

R<sub>XOS/Substrato</sub> – Quantidade de XOS produzida por quantidade de substrato

STR – *Stirred Tank Reactor* (Reator de tanque agitado)

XOS – Xilo-oligossacarídeos

## 1 Introdução

A atividade agrícola e agroindustrial é uma das principais bases da economia do Brasil e o país se destaca mundialmente nesse setor, tendo uma grande área cultivável de grãos, cereais, frutas e cana-de-açúcar (SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016). Essas atividades geram uma grande quantidade de subprodutos, entre eles, resíduos da colheita e do processamento. Esses resíduos representam uma fonte de biomassa lignocelulósica abundante e de baixo custo, muitas vezes subutilizada, sendo em alguns casos aproveitada como alimentação animal e na geração de energia termoelétrica e em outros, queimados ou deixados para decompor no campo (FERREIRA-LEITAO et al., 2010; MASSOLA; MAZIERO, 2017). Quando queimados em locais inadequados, poluem o ar e as sobras do processo de queima podem contaminar o solo e a água (BENTO; CASARIL, 2012).

Além dos possíveis problemas ambientais, o não aproveitamento desses materiais representa um desperdício de matéria prima e energia. Empregando as tecnologias adequadas, essa biomassa residual tem potencial para ser usada na produção de uma grande variedade de produtos biotecnológicos, como por exemplo, biocombustíveis, enzimas, ácidos orgânicos e intermediários para síntese de outros produtos (PEREIRA et al., 2012; SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016). Entre os produtos que podem ser produzidos com base nesses materiais encontram-se os xilo-oligossacarídeos (XOS), oligômeros de xilose com potencial prebiótico, que podem ser aplicados como ingredientes em alimentos funcionais (AACHARY; PRAPULLA, 2011; SAMANTA et al., 2015a; VÁZQUEZ et al., 2000).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho será realizar uma revisão da literatura científica abordando os XOS e sua produção a partir da biomassa lignocelulósica. Entre os objetivos específicos, serão abordados na referida revisão os seguintes assuntos:

- Os componentes da biomassa lignocelulósica, em especial as xilanas, que dão origem aos XOS, e os resíduos lignocelulósicos (focando em resíduos relacionados às culturas agrícolas mais produzidas no estado do Rio Grande do Sul);

- Os XOS e suas propriedades, seu potencial como prebiótico e uso como ingrediente em alimentos funcionais;
- Formas de produção dos XOS, em especial a produção pelo método enzimático; as enzimas envolvidas nesse processo e como são produzidas, os pré-tratamentos que podem ser empregados nos resíduos antes da hidrólise para produzir os XOS e a hidrólise enzimática em si.

## 2 Biomassa Lignocelulósica

O termo biomassa lignocelulósica compreende o material de origem vegetal composto principalmente por celulose, hemiceluloses e lignina (SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016). Esses compostos constituem a parede celular das plantas e as proporções em que são encontrados podem variar de acordo com a espécie, tecido e estágio de desenvolvimento (PAULY; KEEGSTRA, 2010). Formam uma matriz complexa e recalcitrante, que evoluiu para resistir à degradação (ISIKGOR; BECER, 2015). A Figura 2.1 mostra uma representação da estrutura espacial formada na parede celular vegetal.

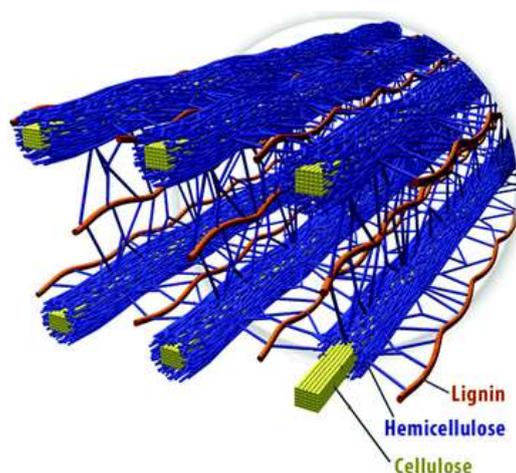


Figura 2.1: Representação do arranjo espacial da celulose, hemiceluloses e lignina na parede celular (U.S. DEPARTMENT OF ENERGY OFFICE OF SCIENCE, 2007)

A celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica (30 a 50%) e também o material polimérico mais abundante na natureza; é um polissacarídeo linear composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) (SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016; ZHANG et al., 2013).

A lignina é um polímero aromático formado por estruturas fenólicas: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico, álcool sinapílico e seus derivados. É um complexo altamente recalcitrante à degradação química e biológica e representa cerca de 10 a 30% da biomassa lignocelulósica (SILVA, 2014; SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016).

As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos e compõe em torno de 15 a 35% da biomassa lignocelulósica; são compostas por polímeros de

açúcares de 5 carbonos (xilose e arabinose), e de 6 carbonos (galactose, glicose, frutose e manose) (SCHELLER; ULVSKOV, 2010; SOCCOL; FRANÇA; REZENDE, 2016). A maior parte das hemiceluloses são heteropolissacarídeos, e são nomeadas (apesar da presença de outros substituintes) com base nos açúcares mais comuns no polímero (xilanas, glicomananas e xiloglicanas, por exemplo) (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018; STEPHEN, 1983).

## 2.1 Xilanas

As xilanas, principais componentes da hemicelulose, são polissacarídeos com uma cadeia principal composta por unidades de D-xilopiranosose (D-xilose) unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) em plantas terrestres, com grau de polimerização (GP) variando entre 150 e 200. Além da xilose, as xilanas podem conter, dependendo de sua origem biológica, substituintes como arabinose (Araf), ácido glicurônico (MeGlcA e GlcA) e grupos metil ou acetil (CHAKDAR et al., 2016; SAHA, 2003; SAMANTA et al., 2015a). Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são produtos da hidrólise desses polissacarídeos.

Na parede celular, a celulose, hemicelulose e lignina interagem através de ligações covalente e não-covalentes, sendo a xilana encontrada na interface entre a lignina e a celulose, onde acredita-se ser importante para a coesão das fibras e para a integridade da parede (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005).

As xilanas podem ser divididas em 6 subgrupos: homoxilanas, glicuronoxilanas, arabinoglicuronoxilanas, arabinoxilanas, glicuronoarabinoxilanas e heteroxilanas.

As homoxilanas são polímeros lineares muito pouco substituídos formados por unidades de xilose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3),  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ou mistas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4). Homoxilanas com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) são encontradas em algas marinhas verdes e vermelhas; homoxilanas com ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) e com ligações mistas foram isoladas em casos muito raros em plantas terrestres (EBRINGEROVÁ, 2006).

As glicuronoxilanas (GX) possuem substituintes de ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glicurônico (MeGlcA) e/ou ácido 2-O- $\alpha$ -D-glicurônico (GlcA) ligados na posição 2 de xiloses da cadeia principal (Figura 2.2). GX representam entre 15 a 30% em massa seca das madeiras duras e são os polissacarídeos não-celulósicos dominantes nas paredes celulares secundárias de dicotiledôneas (como a soja, o feijão e o amendoim, por exemplo). Em geral, contém entre 3,5 a 7 grupos acetil a cada 10 unidades de xilose

(GÍRIO et al., 2010). A proporção molar MeGlcA:Xilose varia entre 1:4 e 1:16, sendo em média 1:10 (EBRINGEROVÁ, 2006; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

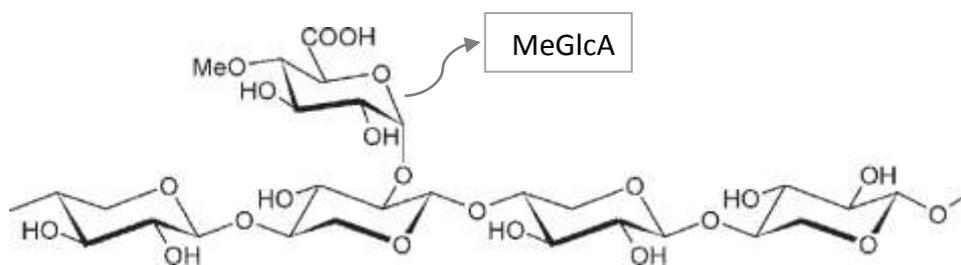


Figura 2.2: Estrutura química da glicuronoxilana (GX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006)

As arabinoglicuronoxilanas (AGX) possuem uma estrutura muito parecida com as GX, contendo substituintes MeGlcA e GlcA, mas também unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (Araf) ligadas ao carbono 3 das unidades de xilose da cadeia principal (Figura 2.3). São típicas de madeiras macias (de coníferas, por exemplo) e de tecidos lignificados de gramíneas e plantas anuais (culturas agrícolas) (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000). A razão típica Araf:MeGlcA:Xilose é de 1:2:8 (GÍRIO et al., 2010)

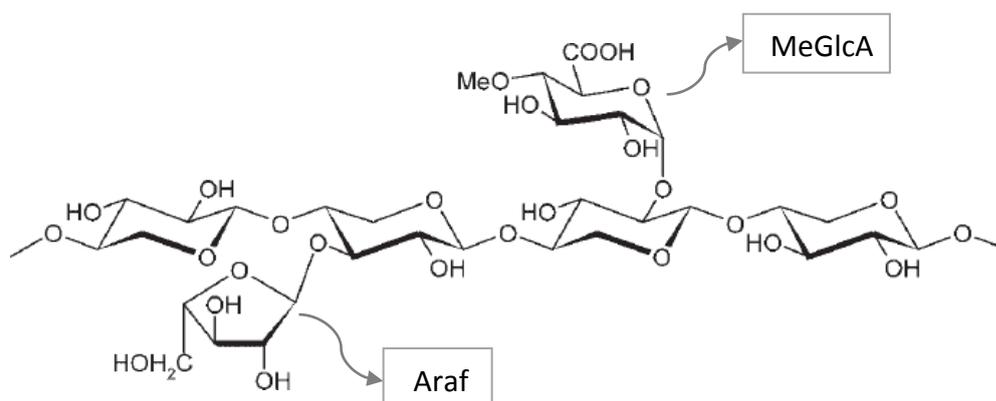


Figura 2.3: Estrutura química da arabinoglicuronoxilana (AGX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006)

As arabinoxilanas (AX) são as principais xilanas presentes em grãos de cereais e possuem unidades de xilose monossustituídas com  $\alpha$ -L-arabinofuranosil (Araf) nas posições 2 ou 3 ou dissustituídas em ambas posições (Figura 2.4). Também podem estar presentes grupos acetil como substituintes (EBRINGEROVÁ, 2006; GÍRIO et al., 2010; SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Uma característica importante das AX de gramíneas e outras monocotiledôneas, é a presença de algumas cadeias laterais de Araf carregando ésteres de ácido ferúlico (SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

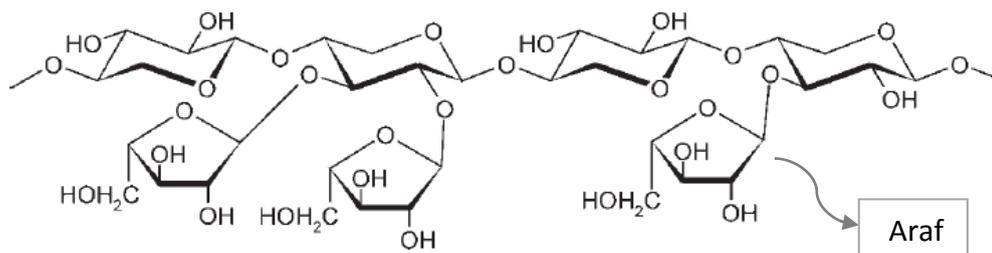


Figura 2.4: Estrutura química da arabinoxilana (AX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006)

As glicuronoarabinoxilanas (GAX) são as hemiceluloses dominantes em tecidos lignificados de gramíneas e cereais (como palhas, hastes, caule, talos e pericarpo externo de grãos). GAX isolados de diferentes vegetais mostraram variações consideráveis nas proporções MeGlcA:Xilose:Araf de 3-9:10:1-10. Em contraste com as AGX, mencionadas anteriormente, as GAX possuem também xiloses dissubstituídas por unidades de Araf (Figura 2.5) (EBRINGEROVÁ, 2006).

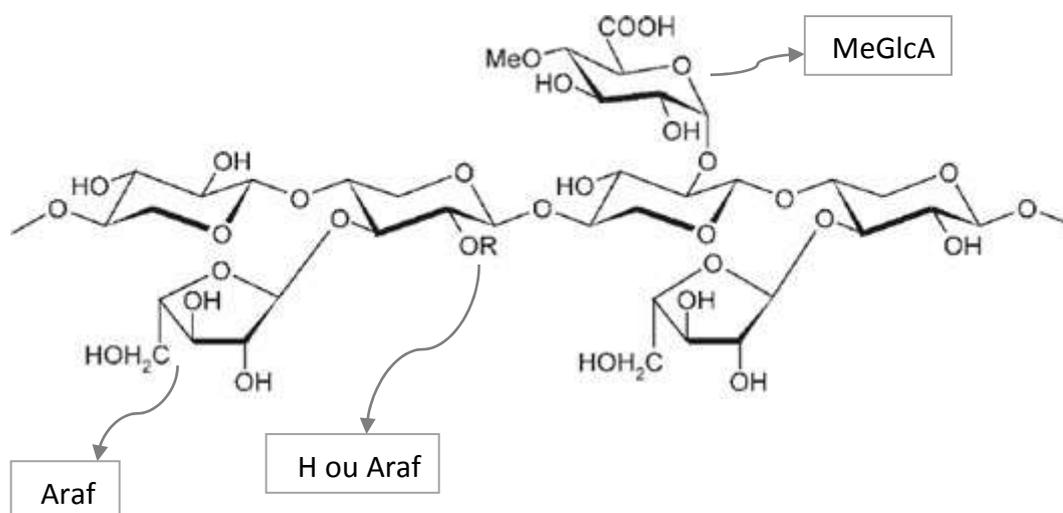


Figura 2.5: Estrutura química da glicuronoarabinoxilana (AGX) (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006)

As heteroxilanas (HX) são o grupo mais diverso estruturalmente e já foram isolados de cereais, sementes e mucilagens. Possuem a cadeia principal de β-(1→4)-D-xilopiranosose bastante substituída, com uma variedade de ramificações de sacarídeos e oligossacarídeos contendo unidades de xilose, arabinose (Araf) e galactose, além de ésteres de ácido ferúlico (EBRINGEROVÁ, 2006; EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

## 2.2 Resíduos agrícolas

Os resíduos agrícolas podem ser divididos em duas categorias: os resíduos de colheita e os resíduos agroindustriais. A primeira categoria engloba os restos de plantas que permanecem no campo após a colheita; já os resíduos agroindustriais são aqueles gerados durante o processamento de produtos agrícolas (LIM et al., 2012). Estes resíduos de colheita e agroindustriais incluem materiais como palhas, cascas, caules, folhas, sementes, bagaços, grãos e restos de legumes e cereais. São resíduos gerados em grandes quantidades durante todo o ano e são o recurso renovável mais abundante do planeta (TANDON, 2015). Grande parte dos resíduos gerados nas atividades agrícolas e agroindustriais são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo considerados como biomassa lignocelulósica.

O Rio Grande do Sul, tradicionalmente, apresenta-se como um estado que se destaca pela sua produção agrícola e pecuária. Segundo a FEE, Fundação de Economia e Estatística Siegfried Emanuel Heuser, a soja, o arroz e o milho constituem as principais culturas agrícolas praticadas no estado em termos de área plantada e quantidade produzida. Por esse motivo, resíduos lignocelulósicos associados à colheita e processamento desses produtos serão abordados neste trabalho.

### 2.2.1 Arroz

O arroz, gramínea do gênero *Oryza*, é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas. É o terceiro cereal mais produzido no mundo, perdendo apenas para o trigo e o milho (BINOD et al., 2010; SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO, 2016).

A Ásia concentra cerca de 90% da produção do grão. O continente americano é responsável por 5% da produção mundial, sendo o segundo maior produtor. Deste, o Brasil é o maior produtor e entre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul se destaca na produção de arroz em casca, sendo responsável por mais de 50% do total nacional (8,73 milhões de toneladas na safra 2016/2017) (CONAB, 2018; FERREIRA-LEITAO et al., 2010; IRGA, 2018; SPGG, 2016a).

Após ser colhido, seco e limpo, o arroz é encaminhado para indústrias de beneficiamento onde é descascado. As cascas, que cobrem e protegem os grãos,

correspondem de 20 a 33% do peso do grão com casca. Esse resíduo não é usado na alimentação animal pelo baixo valor nutritivo e elevado teor de sílica e também possui baixo valor comercial (CARVALHO, 1992; RAMBO, 2013).

A palha do arroz é um resíduo lignocelulósico da colheita deste cereal. A cada 1 kg de arroz com casca colhido, entre 0,41 e 3,96 kg de palha são produzidos. Em contraste com a casca de arroz que é obtida durante o processamento do grão, a obtenção da palha para aproveitamento é mais difícil e vários aspectos logísticos devem ser considerados, como o manuseio e coleta no campo (DELIVAND; BARZ; GHEEWALA, 2011; LIM et al., 2012).

### 2.2.2 Soja

A soja (*Glycine max*) é a principal oleaginosa cultivada no mundo. O grão é muito versátil, dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos (ARRIEL et al., 2014; EMBRAPA, [s.d.]).

O continente americano é responsável por cerca de 88% de toda soja produzida no mundo; entre os países, o Brasil é o segundo maior produtor de soja e produz aproximadamente 28% do total mundial. Dos estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de soja em grão (18,7 milhões de toneladas produzidas na safra 2016/2017), superado apenas pelo Mato Grosso e Paraná. A produção tem como destino principal o mercado externo e é o item de maior destaque da pauta de exportações gaúchas (CONAB, 2018; SPGG, 2016b).

As cascas do grão de soja são o principal resíduo lignocelulósico gerado do seu processamento e constituem cerca de 8% do grão inteiro. É um resíduo agroindustrial de baixo valor agregado, sendo amplamente utilizada como ração animal, na forma solta ou peletizada (RAMBO, 2013; ROJAS, 2012).

Outro resíduo lignocelulósico relacionado à soja é a palha. Segundo Carvalho (1992), representa o equivalente a 120 a 150% do peso do grão produzido.

### 2.2.3 Milho

O milho (*Zea mays*) é um cereal versátil, que apresenta uma vasta gama de utilizações, desde o consumo direto, na forma de milho verde, até a produção de subprodutos por grandes indústrias de áreas diversas, como: química, farmacêutica,

bebidas e de combustível. O milho é fonte de energia, proteína, gordura e fibras e é o cereal mais cultivado nas américas, sendo os Estados Unidos responsável por quase metade da produção mundial. O Brasil é terceiro maior produtor, responsável por aproximadamente 8% da produção mundial (REGITANO-D'ARCE; SPOTO; CASTELLUCCI, 2015; SPGG, 2016c).

Segundo a Embrapa, o milho é cultivado praticamente em todo o território nacional; entre os estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é o sexto maior produtor de milho em grão (6,03 milhões de toneladas produzidas na safra 2016/2017), superado pelos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Paraná e Mato Grosso (CONAB, 2018; SPGG, 2016c).

O sabugo, parte central da espiga de milho onde os grãos ficam presos, é um resíduo lignocelulósico gerado após o milho ser debulhado e é, em geral, aproveitado na produção de ração animal (AACHARY, 2009). Segundo Carvalho (1992), a produção de sabugos corresponde a 22% do peso de grãos produzido.

Os resíduos da colheita (palha, folhas e colmo) não possuem um uso definido e, na maior parte dos casos, são deixados no campo (SANTOS, 2014). Segundo Ferreira-Leitão et al. (2010), representam o equivalente a 78% do peso de grãos produzido.

#### *2.2.4 Composição dos resíduos*

Para determinar a adequação dos resíduos agroindustriais e de colheita para produção de xilo-oligossacarídeos (XOS) é importante estudar a composição desses materiais (OTIENO; AHRING, 2012). Na Tabela 2.1, estão reunidos os dados encontrados em diferentes estudos para as quantidades de celulose, hemicelulose e lignina nos resíduos citados anteriormente, e na Tabela 2.2 estão reunidos os dados para quantidade de xilana especificamente.

Com base apenas na comparação dos dados de composição, é possível observar que entre os resíduos considerados, o que apresenta maior potencial para produção de XOS é o sabugo de milho, com mais de 30% de sua massa composta por xilanas.

Tabela 2.1: Composição química de alguns resíduos lignocelulósicos

Resíduo	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Referência
Casca de arroz	35,62%	11,96%	15,38%	(SAHA et al., 2005)
	33,47%	21,03%	26,70%	(GENNADIÍ ZAIKOV; LOBO; GUARROTXENA, 2003)
	42,2%	18,47%	19,4%	(BANERJEE et al., 2009)
Palha de arroz	39%	27%	12%	(KARIMI; KHERADMANDINIA; TAHERZADEH, 2006)
	37%	24%	14%	(FERREIRA-LEITAO et al., 2010)
Casca de soja	39,7%	25,5%	9,1%	(CASSALES et al., 2011)
	38,3%	19,5%	6,5%	(MENEZES; ROSSI; AYUB, 2017)
	35,8%	23,1%	9,1%	(ROJAS, 2012)
Palha de soja	24,99%	11,91%	17,64%	(XU et al., 2007)
	34,09%	16,05%	21,6%	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
Sabugo de milho	37,7%	39,6%	7,3%	(PEREIRA et al., 2012)
	35,4%	26,9%	18,0%	(SANTOS, 2014)
	33,7 - 41,2%	31,9 - 36%	6,1 - 15,9%	(ISIKGOR; BECER, 2015)
Palha de milho	33,5%	24,9%	7,8%	(PEREIRA et al., 2012)
	36,7%	34,2%	14,0%	(SANTOS, 2014)
	35 - 39,6%	16,8 - 35%	7 - 18,4%	(ISIKGOR; BECER, 2015)

Tabela 2.2: Quantidade de xilana presente em alguns resíduos lignocelulósicos

Resíduo	Xilana	Referência
Casca de arroz	16,2%	(FERREIRA-LEITAO et al., 2010)
	13%	(MOON; JEONG; KIM, 2012)
Palha de arroz	24,5%	(OTIENO; AHRING, 2012)
	20,6%	(KARIMI; KHERADMANDINIA; TAHERZADEH, 2006)
Palha de soja	11,43%	(WAN; ZHOU; LI, 2011)
Sabugo de milho	35%	(TAN et al., 2008)
	31,9%	(AACHARY, 2009)
Palha de milho	18,9%	(TEMPLETON et al., 2009)
	23%	(MACLELLAN et al., 2017)

### 3 Xilo-oligossacarídeos

#### 3.1 Definição e propriedades

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são oligômeros constituídos de unidades de xilose (uma aldopentose) unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), com grau de polimerização variando de 2 a 7. Ocorrem naturalmente em brotos de bambu, frutas, vegetais, leite e mel e podem ser produzidos em escala industrial a partir de biomassa lignocelulósica rica em xilana (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015; VÁZQUEZ et al., 2000).

Na Figura 3.1 está representada a xilobiose, constituída por duas unidades de xilose.

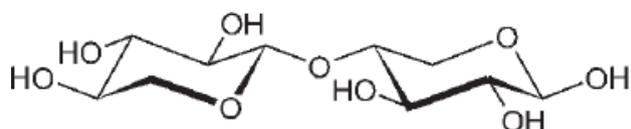


Figura 3.1: Xilobiose (Adaptado de EBRINGEROVÁ, 2006)

XOS são considerados oligossacarídeos não digeríveis (NDOs) devido ao fato de que, quando ingeridos, não são digeridos pelas enzimas secretadas por vertebrados devido ao tipo de ligação presente ( $\beta$ -1,4-xilosídica) e chegam ao intestino estruturalmente íntegros (SAMANTA et al., 2015a). Por serem associados à efeitos positivos na microbiota intestinal, são considerados prebióticos emergentes (PINEIRO et al., 2008).

Dependendo dos tipos de xilanas (abordados no capítulo anterior) presentes no material lignocelulósico (MLC) utilizado como matéria prima para obtenção de XOS e do processo e condições utilizadas na produção, estes podem manter as ramificações do substrato, unidades de arabinose, grupos acetil, metil e ácido glicurônico, que por sua vez, podem influenciar na fermentabilidade e conferir algum efeito biológico além do efeito prebiótico (MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009; VÁZQUEZ et al., 2000). Em um estudo recente, XOS produzidos a partir de glicuronoxilanas mostraram ter alta atividade antioxidante, aparentemente associada à ramificações do tipo MeGlcA (VALLS et al., 2018). Também já foi relatado, por exemplo, que a ingestão de XOS contendo ácido glicurônico como ramificação preveniu a formação de lesões tipo dermatite atópica na pele de ratos (OHBUCHI et al., 2010) e apresentaram efeitos

inibitórios sob gastrite inflamatória induzida por estresse de ratos (YOSHINO; HIGASHI; KOGA, 2006).

## 3.2 XOS como ingredientes alimentares

### 3.2.1 Potencial prebiótico e benefícios à saúde

O termo prebiótico foi definido pela primeira vez por Gibson e Roberforid (1995) como um ingrediente alimentar que afeta benéficamente o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias já residentes no cólon. Este conceito sofreu diversas atualizações ao longo do tempo, acompanhando o desenvolvimento científico e novas descobertas na área. Mais recentemente, em 2016, um painel de especialistas em microbiologia, nutrição e pesquisa clínica foi convocado pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos para revisar a definição e o escopo dos prebióticos. A definição do termo foi então atualizada para “um substrato que é seletivamente utilizado por microrganismos do hospedeiro conferindo um benefício à saúde” (GIBSON et al., 2017).

A microbiota intestinal é composta por diversos tipos de bactérias e tem um papel importante na saúde e bem-estar do hospedeiro. De uma forma geral, os efeitos positivos dos prebióticos nos indivíduos que os consomem são provocados indiretamente, com base na estimulação das bactérias benéficas presentes no organismo (WANG, 2009). O estímulo destas bactérias, principalmente dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, tem o potencial de proteção contra microrganismos patogênicos, prevenindo e diminuindo a duração e seriedade de infecções gastrointestinais, reforço da função de barreira do epitélio e estímulo da imunidade (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012; ROBERFROID et al., 2010). Prebióticos também vêm sendo associados ao aumento na absorção de minerais, particularmente cálcio, e na diminuição de alergias (CARLSON et al., 2018; ROBERFROID et al., 2010).

Experimentos *in vitro* mostram o potencial dos XOS de melhorar a microbiota intestinal, já que influenciam positivamente o crescimento de bactérias benéficas, particularmente algumas espécies do gênero *Bifidobacterium* (MANISSERI; GUDIPATI, 2012; MOURA et al., 2007; SAMANTA et al., 2012). O efeito bifidogênico dos XOS

também foi observado em estudos em ratos e camundongos (MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009).

Dados de experimentos com humanos são limitados e poucos estudos foram publicados (AACHARY; PRAPULLA, 2011; MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009); Okazaki et al. (1990a) estudaram o efeito da ingestão de 5 g de XOS diariamente por 3 semanas em homens saudáveis e relataram um aumento significativo na quantidade de bifidobactérias em amostras fecais; outro estudo dos mesmos pesquisadores mostrou que um aumento também foi observado nas amostras de fezes de indivíduos que consumiram doses menores, de 1g e 2g diárias (OKAZAKI; FUJIKAWA; MATSUMOTO, 1990a). Em um estudo com mulheres que sofriam de constipação, lino et al. (1997) relataram que com a dose diária de 0,4g de XOS por 4 semanas foi constatado um aumento na frequência de evacuações e aumento de bifidobactérias em amostras fecais já na segunda semana de ingestão. Chung et al. (2007) realizaram um estudo com indivíduos idosos saudáveis e o efeito da suplementação diária com 4g de XOS durante 3 semanas foi avaliada; de forma similar aos outros estudos comentados, este também mostrou como resultado o aumento na população de bifidobactérias, além de aumento do teor de umidade fecal, e não foram observados efeitos adversos no estado nutricional dos idosos. Mais recentemente, Finegold et al. (2014) realizaram um estudo com adultos saudáveis com ingestão de doses de 2,8g e 1,4g de XOS diárias. Os resultados mostraram aumento nas contagens das bactérias do gênero *Bifidobacterium* e nenhum efeito colateral foi observado, mostrando que a ingestão de XOS pode trazer benefícios à microbiota gastrointestinal, sendo mais efetivo na dose de 2,8g.

Outra informação relevante é que os estudos presentes na literatura científica relatam que a ingestão de XOS mostra efeitos positivos em doses mais baixas em comparação com outros prebióticos: a dose mínima de fruto-oligossacarídeos (FOS) que causa efeito bifidogênico significativo é de 10 a 20g diárias e de galacto-oligossacarídeos (GOS) é de 10g diárias (BOUHNİK et al., 1999; FINEGOLD et al., 2014; ITO et al., 1990).

### 3.2.2 Aplicação em alimentos funcionais

A aplicação mais importante dos XOS em termos de demanda atual e potencial no mercado é a de ingrediente em alimentos funcionais (AACHARY; PRAPULLA, 2011).

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão no final dos anos 1980 e é usado para descrever alimentos contendo ingredientes com a capacidade de conferir benefícios à saúde e reduzir o risco de doenças (ASHWELL, 2002; STANTON et al., 2001). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define como alimentos funcionais aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos através da atuação de um nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano. Ainda segundo a ANVISA, para um alimento veicular alegações de propriedades funcionais, este deve atender diretrizes que visam à segurança do alimento e a comprovação científica do efeito alegado. As alegações de propriedade funcional são regulamentadas pela Resolução n.18/1999 e pela Resolução n.19/1999 (BRASIL, 2016).

Entre as alegações de propriedade funcional aprovadas pela ANVISA não existe uma categoria específica para prebióticos, apenas uma categoria para fibras alimentares. Fibra alimentar é definida como qualquer material comestível que não seja hidrolisado pelas enzimas endógenas do trato digestivo humano (BRASIL, 2003) e, apesar de todos prebióticos serem fibras alimentares, nem toda fibra alimentar é um prebiótico (SLAVIN, 2013).

Além do potencial prebiótico, os XOS também têm características tecnológicas favoráveis para aplicação em alimentos, como estabilidade em uma ampla faixa de pH (2,5 a 8,0) e em altas temperaturas, sendo mais resistentes ao processo de pasteurização que outros oligossacarídeos não digeríveis (fruto-oligossacarídeos (FOS), por exemplo) (KOCABAS; OZBEN, 2014; SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015; WANG et al., 2009). XOS podem ser usados como adoçantes em alimentos de baixa caloria e para consumo de indivíduos com diabetes (NABARLAZT; FARRIOL; MONTANE, 2004; VÁZQUEZ et al., 2000). A xilobiose possui sabor doce equivalente à 30% da sacarose e XOS com outros graus de polimerização possuem doçura moderada e não apresentam *off-taste* (VÁZQUEZ et al., 2000). XOS não são cariogênicos por não serem utilizados pela microbiota oral (CARVALHO et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2000).

XOS não são mutagênicos, não apresentam toxicidade aguda e sua segurança foi confirmada também em um estudo de toxicidade subcrônica de 90 dias com ratos (MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009). A dose máxima de ingestão que não causa sintomas gastrointestinais, como diarreia, é de 0,12g/kg de massa corporal (OKU; NAKAMURA, 2002; SAMANTA et al., 2015a). No Japão, onde os XOS são considerados ingrediente funcional aprovado, a dose recomendada é de 1 a 3g diárias (MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009).

XOS com grau de polimerização (GP) entre 2 e 5 são preferíveis em alimentos funcionais devido à melhor utilização por microrganismos probióticos. XOS com GP de 2 e 3 apresentam cinética de fermentação mais rápida e promovem um ambiente intestinal mais favorável (GULLÓN; SALAZAR, 2011; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

### 3.2.3 *Alimentos funcionais contendo XOS e estudos recentes*

O mercado japonês foi pioneiro na incorporação de XOS em alimentos (STANTON et al., 2001; VÁZQUEZ et al., 2000). O primeiro produto simbiótico, que contém prebióticos e probióticos, foi lançado em 1993 pela empresa Suntory; “*Bikkle*” é uma bebida láctea que contém, entre outros ingredientes, bifidobactérias e xilooligossacarídeos e se tornou bastante popular no Japão.

Segundo Vázquez et al. (2000), no ano 2000 no Japão, haviam 60 empresas utilizando XOS em 100 produtos, vários deles sendo classificados como FOSHU (*Foods for Specified Health Uses*). A categoria FOSHU foi criada em 1991 para englobar alimentos que contém ingredientes com funções benéficas à saúde e com efeitos fisiológicos comprovados (STANTON et al., 2001). Para um alimento ser comercializado como FOSHU, a segurança e eficácia deste devem ser avaliadas e deve ser aprovado pelo Ministério da Saúde, Trabalho e Bem-estar do Japão (YAMADA et al., 2008).

É possível encontrar alguns estudos recentes que analisam a incorporação de XOS em produtos alimentícios como iogurte (MUMTAZ et al., 2008; PENKSZA et al., 2018), almôndegas chinesas (WU; LIN, 2011) e biscoitos (AYYAPPAN et al., 2016). Ferrão et al. (2018) investigaram a adição de XOS em produto de queijo processado típico do Brasil, o requeijão cremoso. Produtos desse tipo apresentam altos níveis de gordura e

sódio e quando esses teores são reduzidos, o resultado são produtos com menor cremosidade, espalhabilidade e aceitação. Alguns prebióticos podem ser usados como substitutos de gordura por mimetizarem propriedades organolépticas e físicas desses lipídeos (FERRÃO et al., 2016). No estudo citado, foi relatado que a adição de XOS resultou no aumento da viscosidade aparente, elasticidade e firmeza do produto, resultando em um requeijão reduzido no teor de gordura semelhante ao requeijão *full-fat*. Quando adicionado junto com extrato de levedura (como realçador de sabor), foi observado um efeito sinérgico que proporcionou melhorias nas propriedades reológicas, físico-químicas e nas características sensoriais. No geral, foi possível obter um requeijão cremoso com redução de 50% no teor de sódio, 80% no teor de gordura, com potencial prebiótico e com características similares ao produto convencional (*full-fat* e sem redução de sódio) pela adição de 3% (m/m) de XOS e 1% (m/m) de extrato de levedura (FERRÃO et al., 2018).

#### 3.2.4 Informações de mercado e aspectos econômicos

O mercado mundial de alimentos funcionais vem crescendo rapidamente, principalmente devido à conscientização dos consumidores sobre a relação entre saúde, bem estar e alimentação e ao interesse dos fabricantes no aumento do valor agregado causado pela adição de ingredientes funcionais (AACHARY, 2009). Esse crescimento também é estimulado por inovações tecnológicas e desenvolvimento de novos produtos (OTIENO; AHRING, 2012).

O mercado de alimentos funcionais é bastante dinâmico. De acordo com uma pesquisa da empresa Euromonitor, provedora global de inteligência estratégica de mercado, de 2007, os países que se destacam nesse ramo são o Japão, os Estados Unidos e alguns países da Europa (Reino Unido, Alemanha, França e Itália) (FAO, 2007). A América Latina é considerada como um mercado emergente. Segundo dados de levantamentos mais recentes (2017) também da Euromonitor, o Brasil é o quinto maior mercado de alimentos e bebidas saudáveis (onde estão incluídos alimentos funcionais) e esse mercado ainda deve crescer 20% nos próximos 5 anos (EUROMONITOR, 2017a, 2017b, 2018).

XOS são predominantemente usados na Ásia (Japão, China, Coreia do Sul, Vietnam e Taiwan). Entre 1997 e 2009, 32 produtos foram lançados contendo XOS

como ingredientes, sendo 38% suplementos alimentares, 25% laticínios, 16% doces, 13% bebidas não alcoólicas e o restante composto por alimentos para bebês e sopas. O Japão foi responsável por mais da metade dos produtos lançados no período citado (MÄKELÄINEN; JUNTUNEN; HASSELWANDER, 2009).

Segundo publicado pela empresa de pesquisa de mercado chinesa QY Research Reports em 2017, os principais produtores de XOS são empresas chinesas (Shandong Longlive Biotechnology, Kangwei, HFsugar, Henan Shengtai, ShunTian). Ainda segundo essa mesma fonte, o mercado global de XOS foi avaliado em 88,09 milhões de dólares em 2016, e deve chegar a 119,62 milhões de dólares até o final de 2022, crescendo a um CAGR (*Compound Annual Growth Rate*, ou taxa composta anual de crescimento) de 5,23% entre 2016 e 2022 (QY RESEARCH REPORTS, 2017).

XOS estão disponíveis no mercado em diferentes formas (além de em alimentos funcionais): em cápsulas, em pó (concentrações: >95% XOS, >35% XOS, >20% XOS) e na forma de xarope (AACHARY, 2009). Nos Estados Unidos, a empresa AIDP Inc. (City of Industry, CA) comercializa o produto *PreticX™*, composto por XOS produzidos pela Life Bridge International (Riverside, CA) a partir de sabugo de milho, nas formas *PreticX™ 70%* com maltodextrina e *PreticX™ 95%*, indicado para uso em cápsulas e tabletes e também na forma *PreticX™* líquido, indicado para uso em alimentos e bebidas funcionais (AIDP INC, 2015a, 2015b). É possível encontrar suplementos alimentares no mercado americano que utilizam esse produto em sua composição (*PureLean® Fiber* da empresa Pure Encapsulations, XOS+GOS da Jarrow Formulas e Prebiotic Powder XOS da Protocol For Life Balance®). Não foi possível encontrar informações sobre alimentos que utilizem o *PreticX™* como ingrediente.

Singh, Banerjee e Arora (2015) realizaram uma pesquisa com fornecedores e relataram que o valor de venda de XOS varia entre 1 e 200US\$/kg, dependendo do nível de pureza, que é mais alto em comparação com outros oligossacarídeos como os fruto-oligossacarídeos (1 a 20US\$/kg), galacto-oligossacarídeos (5 a 100US\$/kg) e inulina (10 a 100US\$/kg). Taniguchi (2004) apresenta dados sobre todos os oligossacarídeos produzidos no Japão, onde os XOS produzidos pela empresa Suntory Limited, apresentam uma produção anual de 650 toneladas e preço de venda de 2500 ienes/kg (aproximadamente 22US\$/kg). Dos 13 oligossacarídeos comparados, os XOS apresentavam o preço de venda mais alto.

## 4 Processo de produção

XOS podem ser produzidos a partir de biomassa lignocelulósica rica em xilana por auto-hidrólise, combinação de pré-tratamento básico seguido por hidrólise ácida, hidrólise enzimática direta ou por combinação de pré-tratamento ácido ou básico seguido por hidrólise enzimática (AKPINAR et al., 2010; MOURE et al., 2006; SAMANTA et al., 2015a).

No processo de auto-hidrólise ou hidrotermólise, o material lignocelulósico (MLC) rico em xilana é colocado em contato com água e aquecido em equipamento especial (reator Parr ou autoclave). Quando o material em contato com água é aquecido, íons hidrônio, resultantes da auto ionização da água, causam a despolimerização das xilanas (produzindo XOS e xilose) e também a clivagem dos grupos acetil (substituinte presente nos diferentes tipos de xilana). A clivagem destes grupos resulta na formação de ácido acético, que também contribui para a despolimerização (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2002; SAMANTA et al., 2015a). Sob condições severas de processamento, a xilose pode ser desidratada produzindo furfural, que pode ainda ser convertido em outros produtos indesejados (GARROTE; DOMÍNGUEZ; PARAJÓ, 2002). A auto-hidrólise tem como resultado duas frações: fase líquida rica em hemicelulose e sólidos precipitados, ricos em celulose e lignina (CARVALHO et al., 2013).

A hidrólise ácida pode ser usada para produzir XOS e ocorre de maneira parecida com a auto-hidrólise, com a clivagem de ligações de forma aleatória, sendo produzida uma grande quantidade de monômeros e produtos indesejados. Como a biomassa lignocelulósica pode apresentar certa resistência à hidrólise, um pré-tratamento com bases pode ser empregado anteriormente para extrair a xilana (AKPINAR et al., 2010).

A produção de XOS também pode ser realizada pela hidrólise de xilana por enzimas específicas chamadas xilanases. Devido ao acesso das enzimas, em geral, ser dificultado pela matriz complexa formada pelos componentes da biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática direta somente é indicada em substratos suscetíveis, como cascas de frutas cítricas (AACHARY; PRAPULLA, 2011; VÁZQUEZ et al., 2000). Em substratos como resíduos agrícolas, a estratégia mais utilizada é o emprego de um pré-tratamento químico para melhorar a acessibilidade e

degradabilidade da xilana, seguido pela hidrólise enzimática (ISIKGOR; BECER, 2015; VÁZQUEZ et al., 2000).

Pela reduzida formação de produtos de degradação indesejados, especificidade e operação em condições brandas, métodos enzimáticos são preferíveis para aplicações na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; MORAIS; CONTESINI, 2018; QING, QING; HONGJIA, LI; KUMAR, RAJEEV; WYMAN, 2013; SAMANTA et al., 2016). Como o foco deste trabalho é a produção de XOS para aplicação em alimentos, o restante desse capítulo será voltado para esse método.

Como mencionado, em geral, a produção de xilo-oligossacarídeos pelo método enzimático é composta por duas etapas principais: pré-tratamento do substrato seguido pela hidrólise enzimática para produção de XOS. Antes do pré-tratamento, o MLC pode também passar por um processamento físico (moagem, fragmentação ou trituração) para redução do tamanho das partículas. Esse processamento é recorrente em estudos da produção de XOS, e resulta no aumento da área superficial do material e facilita a transferência de massa (BRODEUR et al., 2011). A Figura 4.1 mostra um fluxograma geral simplificado do processo.

Após a hidrólise enzimática, os XOS obtidos devem ainda passar por uma etapa de purificação antes de poderem ser utilizados. Centrifugação, floculação, troca iônica, adsorção em carvão ativado e evaporação a vácuo são alguns dos processos utilizados nessa etapa, dependendo do nível de pureza desejado (OTIENO; AHRING, 2012). No entanto, neste trabalho, a etapa de purificação não será estudada.

A Tabela 4.1 contém informações sobre estudos que serão citados como exemplos nas seções seguintes e alguns adicionais. Além de informações sobre o processo empregado, estão também a concentração obtida de XOS no meio reacional ( $C_{XOS}$ ) e o rendimento obtido com base na massa de substrato bruto ( $R_{XOS/substrato}$ ), para os artigos nos quais esses valores foram informados ou que puderam ser calculados com os dados fornecidos. Casos onde o rendimento foi calculado com base na massa de substrato pré-tratado estão marcados na tabela. Grande parte destes estudos utilizam o sabugo de milho, provavelmente por terem uma maior quantidade de xilanas em sua composição que os demais resíduos (Tabela 2.2), resultando em rendimentos mais altos.

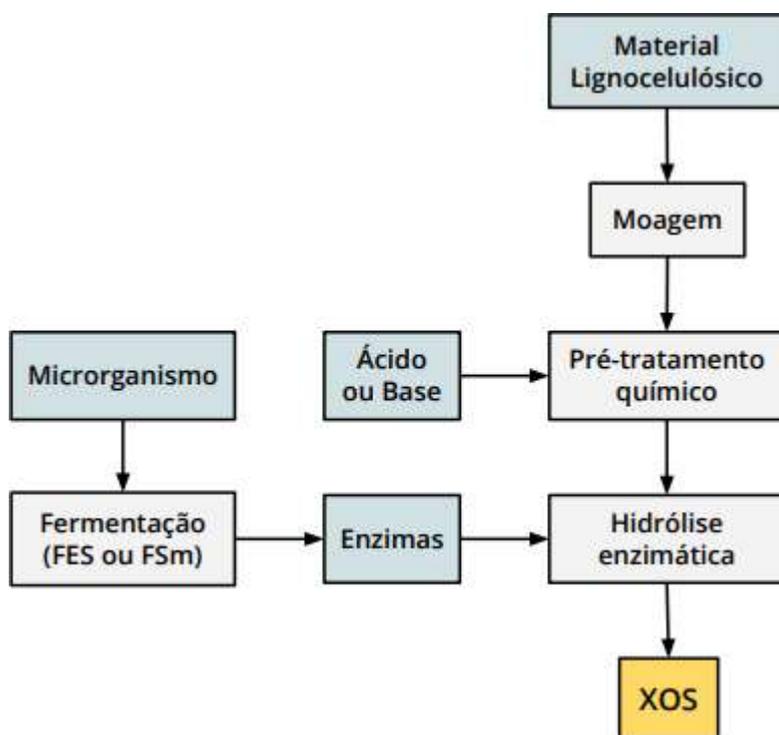


Figura 4.1: Fluxograma simplificado da estratégia geralmente empregada para produção de XOS pelo método enzimático

Tabela 4.1: Comparativo de estudos utilizando o método enzimático para produção de XOS.

	Substrato	Pré-tratamento	Hidrólise Enzimática	C <sub>XOS</sub> [mg/mL]	R <sub>XOS/Substrato</sub> [mg/g]	Referência
1	Sabugo de milho	Pré-tratamento alcalino do substrato moído (KOH 5%, 90°C, 1h)	Endo-xilanase não purificada de <i>Streptomyces thermovulgaris</i> TISTR1948 (CS 15%, pH 6,2, 54°C, 12h)	22,13	115	(BOONCHUAY et al., 2018)
2		Extração alcalina de hemiceluloses do substrato moído (KOH 24%, Ambiente, 24h)	Caldo enzimático bruto de <i>Scytalidium thermophilum</i> (30U/mL, CS 1%, pH 7, 45°C, 6h)	4,56	172,1	(KOCABAS; OZBEN, 2014)
3		Pré-tratamento alcalino do substrato moído (KOH 10%, 100°C, 1h)	Endo-xilanase não purificada de <i>Streptomyces thermovulgaris</i> TISTR1948 (129,43U/g de substrato, CS 15%, pH 6,17, 53,8°C, 12h)	-	162,97	(BOONCHUAY et al., 2014)
4		Extração alcalina (NaOH 1,25 M, 3h, 37°C)	Endo-xilanase parcialmente purificada de <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898 (20U, CS 1% (xilana), 45°C, 8 h)	6,73	107,7*	(CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012)
5		Sem pré-tratamento (substrato apenas moído)	Endo-xilanase comercial (Bioxyl P40) (CS 3%, pH 5, 50°C)	2,06	68*	(AACHARY; PRAPULLA, 2009)
6		Pré-tratamento alcalino do substrato moído (NaOH 2%, Ambiente, 12-15h)	Endo-xilanase comercial (Bioxyl P40) (CS 3%, pH 5, 50°C)	5,8	193* **	(AACHARY; PRAPULLA, 2009)
7		Pré-tratamento ácido do substrato moído (NaOH 2%, Ambiente, 12-15h)	Endo-xilanase comercial (Bioxyl P40) (CS 3%, pH 5, 50°C)	2,7	90* **	(AACHARY; PRAPULLA, 2009)
8		Pré-tratamento ácido do substrato moído (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% 60°C, 12h) e cozimento (135-140°C, 30min)	Endo-xilanase comercial (Bioxyl P40) (CS 3%, pH 5, 50°C)	3,7	123* **	(AACHARY; PRAPULLA, 2009)
9		Pré-tratamento alcalino do substrato moído (NaOH 2%, Ambiente, 12-15h)	Endo-xilanase não purificada de <i>A. oryzae</i> MTCC 5154 (14U/mL, CS 3%, pH 5, 50°C, 14h)	10,2	340* **	(AACHARY; PRAPULLA, 2009)

\*Para fins de comparação, os resultados apresentados nos artigos consultados que não estavam apresentados no formato “massa de XOS obtida [mg]/massa de substrados [g]” foram convertidos utilizando os dados informados no próprio artigo.

\*\*Rendimento por grama de substrato pré-tratado.

Continuação da Tabela 4.1:

	Substrato	Pré-tratamento	Hidrólise Enzimática	C <sub>XOS</sub> [mg/mL]	R <sub>XOS/Substrato</sub> [mg/g]	Referência
10	Sabugo de milho	Pré-tratamento ácido do substrato (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1% 60°C, 12h) e cozimento (135-140°C, 30 min)	Endo-xilanase de <i>Penicillium corylophilum</i> (10U/g de sabugo amassado, pH 4,5, 50°C, 24h)	-	235,6*	(YANG et al., 2005)
11	Casca de arroz	Sem pré-tratamento (substrato apenas moído)	Produção simultânea de xilanase e XOS, <i>Aspergillus brasiliensis</i> BLf1 (FES, 48h)	-	17,6	(MENEZES et al., 2018a)
12		Sem pré-tratamento (substrato apenas moído)	Produção simultânea de xilanase e XOS, <i>Aspergillus nidulans</i> XynC A773 (FES, 48h)	-	23,9	(MENEZES et al., 2018a)
13		Sem pré-tratamento (substrato apenas moído)	Extrato enzimático bruto (caldo concentrado) de <i>Aspergillus brasiliensis</i> BLf (1000U/g de xilana, pH 5, 50°C, 3h)	-	37,25	(MENEZES et al., 2018b)
14		Sem pré-tratamento (substrato apenas moído)	Extrato enzimático bruto (caldo concentrado) de <i>Aspergillus nidulans</i> XynC A773 (1000U/g de xilana, pH 5, 50°C, 24h)	-	75,92	(MENEZES et al., 2018b)
15	Palha de arroz	Extração alcalina do substrato moído (NaOH 4%, 85°C, 3h)	Endo-xilanase comercial (Nutrase) (1000U/g de substrato, CS 10%, pH 6.5, 35°C, 6h)	-	58*	(WANG et al., 2011)
16	Palha de milho	Pré-tratamento alcalino (NH <sub>3</sub> 15%, 90°C, 12-24h)	Endo-xilanase comercial X2753 (4 g/g de substrato, CS 5%, pH 5, 50°C, 72h)	8,754	175,1*	(ZHU et al., 2006)
17	Xilana comercial	-	Endo-xilanase de <i>Clostridium</i> BOH3 imobilizada em alginato de cálcio (20U, CS 5%, pH 5,5, 50°C, 24h)	23,74	474,8*	(RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2016)
18	Xilana comercial	-	Endo-xilanase de <i>Clostridium</i> BOH3 (20U, CS 5%, pH 5,5, 50°C, 24h)	33,87	677,4*	(RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2016)
19	Sabugo de milho	Pré-tratamento alcalino do substrato moído (NaOH 2%, Tambiente, <i>overnight</i> )	Endo-xilanase de <i>S. olivaceoviridis</i> E-86 imobilizada em Eudragit S-100 (600U, CS 4%, pH 6,3, 55°C, 24h)	7,1*	178,2* **	(Al et al., 2005)

#### 4.1 Pré-tratamento

A hidrólise enzimática de biomassa bruta, sem tratamento prévio, para síntese de bioprodutos é considerada não prática e não viável à nível comercial por alguns autores (OTIENO; AHRING, 2012). O material lignocelulósico, em virtude de sua estrutura resistente à degradação, apresenta obstáculos para utilização direta. A etapa de pré-tratamento, também chamada de etapa de pré-hidrólise, tem como objetivo facilitar o acesso à xilana, no caso da produção de XOS, e é importante para tornar a hidrólise enzimática mais eficiente (OTIENO; AHRING, 2012). Ainda assim, é possível encontrar estudos onde a produção enzimática de XOS é realizada sem nenhum tratamento prévio na biomassa e os resultados obtidos são considerados satisfatórios (itens 13 e 14 da Tabela 4.1).

O pré-tratamento da biomassa pode ser usado para extrair e fracionar seus principais componentes (celulose, hemiceluloses e lignina) ou para apenas modificar a estrutura, desordenar e expor seus constituintes, facilitando a hidrólise enzimática (ISIKGOR; BECER, 2015; KUMAR; SHARMA, 2017). Para a produção de XOS, as estratégias mais recorrentes são de pré-tratamento químico (alcalino ou ácido) brando para facilitar o acesso das enzimas ao substrato (AACHARY; PRAPULLA, 2009; BOONCHUAY et al., 2014, 2018; CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012) e a extração alcalina das xilanas (KOCABAS; OZBEN, 2014; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013; YANG; YANG; LIU, 2007). Dependendo se o pré-tratamento for utilizado para extrair ou apenas modificar a estrutura do material, o substrato que passará pela hidrólise será a xilana extraída ou o MLC tratado (Figura 4.2). Se o processo de extração é realizado, além da fase líquida contendo a hemicelulose ao final do pré-tratamento também existirá um sólido residual contendo celulose e lignina. No caso do pré-tratamento sem extração, o MLC tratado é submetido à hidrólise enzimática e ao final, os XOS estarão na fase líquida e haverá um sólido residual contendo celulose e lignina. Independente da etapa em que for gerada, essa fração sólida pode ser aproveitada para produção de outros produtos (BOONCHUAY et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2017).

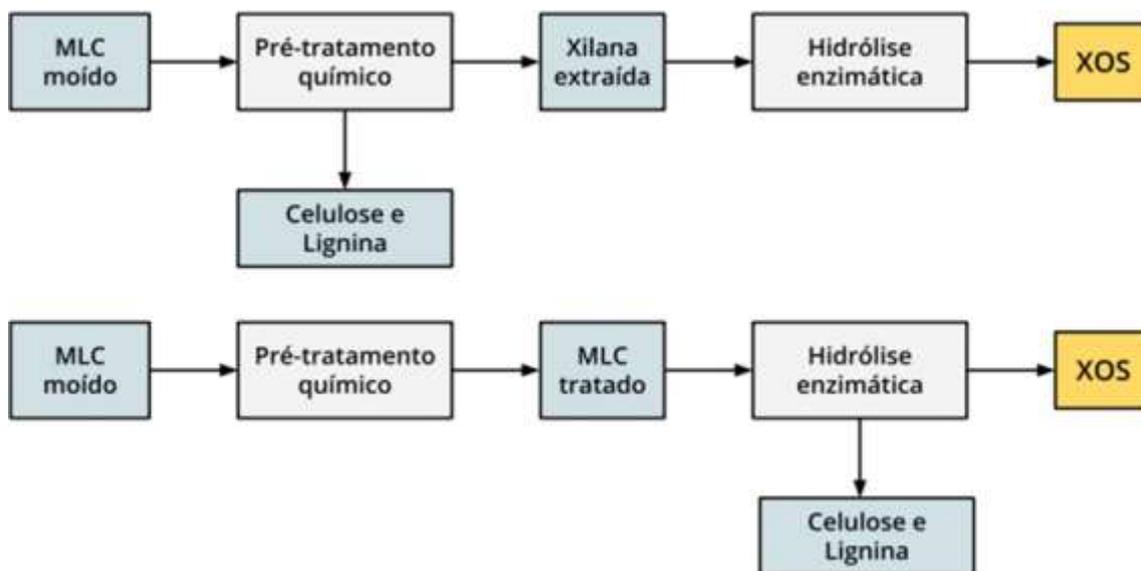


Figura 4.2: Duas possíveis variações do processo.

#### 4.1.1 Pré-tratamento alcalino

O uso de pré-tratamentos químicos é bastante relatado. No pré-tratamento alcalino, geralmente são usados hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de cálcio. As primeiras reações que ocorrem são a solvatação e saponificação, o que provoca um estado túmido (inchado) da biomassa, e a torna mais acessível às enzimas e até mesmo ao ataque microbiano (KUMAR; SHARMA, 2017; NASCIMENTO et al., 2017). Uma das vantagens do emprego de pré-tratamento alcalino é que, em geral, resulta na menor degradação dos açúcares e possibilidade de ser realizado à pressão e temperatura ambiente (CHEN et al., 2017; KUMAR; SHARMA, 2017; NASCIMENTO et al., 2016).

Diferentes variações do procedimento são relatadas na literatura, para diversos substratos, variando o tempo de imersão, reagente e temperatura adotados. Boonchuay et al. (2014), por exemplo, realizaram o pré-tratamento alcalino de sabugo de milho moído e peneirado (<100 mesh) pela imersão em uma solução de KOH (10% m/v), a 100°C por 1h. Em seguida, o pH foi ajustado para 7 com uma solução de ácido sulfúrico (5% m/v) e os sólidos foram lavados com água, filtrados e secos em forno de ar quente (84°C, 48h). A biomassa pré-

tratada foi usada como substrato para produção de XOS por hidrólise com endo-xilanase não purificada de *Streptomyces thermovulgaris* (item 3 da Tabela 4.1).

A extração das xilanas também é usada como etapa anterior à hidrólise enzimática. Utilizando hidróxido de potássio (KOH) e mantendo a temperatura baixa (temperatura ambiente ou mais baixa) é possível extrair de forma seletiva as xilanas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Kocabas e Ozben (2014) realizaram a extração de hemicelulose (xilanas, principalmente) para posterior hidrólise enzimática seguindo o procedimento que consistiu na moagem e peneiramento do resíduo lignocelulósico, que em seguida foi colocado (10g) em 250mL de água destilada para inchar (15 minutos) e filtrado. A biomassa inchada foi colocada em 85mL de uma solução de KOH (24% m/v) à temperatura ambiente, e agitada durante 24h. Após esse tempo, a mistura foi filtrada e centrifugada para remover os particulados. A hemicelulose extraída foi precipitada da solução alcalina pela adição de uma solução de etanol-ácido acético (10:1, v/v). O precipitado foi filtrado, seco à temperatura ambiente e submetido à hidrólise enzimática (item 2 da Tabela 4.1).

#### 4.1.2 Pré-tratamento ácido

O uso de ácidos na etapa de pré-tratamento é bem menos recorrente na literatura para produção de XOS. A principal reação que ocorre durante o pré-tratamento ácido é a hidrólise das hemiceluloses, especialmente as xilanas. As hemiceluloses solubilizadas (oligômeros) podem ainda ser submetidas a reações hidrolíticas, produzindo monômeros, furfural, hidroximetilfurfural e outros produtos voláteis em meio ácido (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Para que esses produtos indesejados sejam removidos são necessárias etapas adicionais ao processo, como evaporação a vácuo ou nanofiltração (ZHANG; XU; YU, 2017).

Yang et al. (2005) realizaram um pré-tratamento embebendo o sabugo de milho em ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  (0,1% m/v)), a 60°C por 12h, seguido por uma lavagem e cozimento a 135-140°C por 30 minutos. O sabugo pré-tratado foi amassado e hidrolisado com xilanase (item 10 da Tabela 4.1). Analisando imagens do substrato obtidas por microscopia eletrônica de varredura, os autores observaram que após ser embebido em ácido diluído por 12h, a estrutura xilana-lignina havia sido apenas ligeiramente alterada; já após o cozimento, a estrutura

havia sido modificada permitindo o acesso às xilanas pela enzima (YANG et al., 2005)

Aachary e Prapulla (2009) compararam o rendimento obtido com pré-tratamento ácido (com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), pré-tratamento ácido seguido por cozimento (seguindo a metodologia de Yang et al. (2005)) e pré-tratamento básico (com NaOH), seguidos pela hidrólise enzimática com uma xilanase comercial de grau alimentício. Realizando apenas o pré-tratamento com o ácido, a hidrólise enzimática foi menos eficiente, como já era esperado. Com a adição da etapa de cozimento, o rendimento foi mais alto (resultados na Tabela 4.1, itens 6-9). Mesmo assim, entre os métodos testados, o pré-tratamento básico se mostrou mais eficiente.

O ácido acético, sendo um ácido fraco, é menos corrosivo aos equipamentos do processo e ainda apresenta vantagens pela facilidade no manuseio e armazenamento (ZHANG; XU; YU, 2017). A empresa Shangdong Longlive Biotechnology, que produz XOS a partir de sabugo de milho, utiliza em seu processo um pré-tratamento com ácido acético glacial. As informações presentes em um relatório disponível são de que o sabugo em pó é misturado com água na razão 1:6, aquecido a 75°C e o ácido acético é adicionado (0,2 a 1,5% por peso de matéria prima). Essa mistura é mantida entre 155 e 180°C, 0,5 a 0,7MPa, durante 30 a 120 minutos. A produção de XOS é feita pela adição de xilanas isoladas de *Streptomyces olivaceoviridis* e incubação por 4 a 10h, 45 a 60°C, pH 5 a 6 (ajustado com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio) (NUTRASOURCE, 2013).

## 4.2 Hidrólise enzimática

Com base nos estudos presentes na literatura abordando a produção de XOS pelo método enzimático, é possível observar que as enzimas são adicionadas ao meio reacional de forma direta purificada, parcialmente purificada ou como extrato bruto (exemplos na Tabela 4.1) e ainda podem ser adicionadas na forma imobilizada (que será abordada na subseção 5.3.1).

XOS produzidos pelo método enzimático são mais comumente xilobiose, xilotriose e xilotetraose. O padrão de oligossacarídeos obtidos na hidrólise pode variar dependendo das enzimas adicionadas e da estrutura do substrato (ramificações presentes ou não) (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON,

2018). As condições de processo como temperatura, pH, tempo de reação e concentração enzimática, também podem influenciar no rendimento de XOS (CHEN et al., 2009; LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018; SAMANTA et al., 2015b)

Em geral, a hidrólise do resíduo tratado (ou das xilanas extraídas) é conduzida misturando o substrato em um tampão com o pH adequado para a enzima empregada, na proporção sólido/líquido escolhida. As enzimas são adicionadas na concentração escolhida e a mistura é mantida em uma determinada temperatura e agitação (em alguns casos o processo também pode ser conduzido de forma estática), por um determinado tempo. Boonchuay et al. (2018) por exemplo, realizaram a hidrólise de sabugo de milho moído pré-tratado em um reator tipo STR de 5L (com um volume reacional de 3,5L) com uma carga de sólidos de 15% (m/v) em tampão fosfato de potássio (pH 6,2). Uma endo-xilanase de *S. thermovulgaris* foi utilizada na concentração de 100U/g e a mistura foi mantida a 54°C por 12h. Por fim, a mistura foi filtrada com filtro de papel (Whatmann nº4) resultando em uma fração sólida, contendo as frações do substrato que não foram hidrolisadas (rica em celulose) e uma fração líquida, contendo os XOS produzidos. Neste estudo (item 1 da Tabela 4.1), além de 115 mg de XOS/g de sabugo, ainda foi produzido bioetanol (138mg/g de sabugo) a partir do sólido residual mencionado via sacarificação e fermentação simultânea com uma cepa de levedura termotolerante. Os resultados foram considerados promissores pelos autores, demonstrando que esse processo integrado pode ser uma alternativa mais rentável para a valorização do resíduo.

#### 4.2.1 Xilanases

As enzimas que hidrolisam a cadeia principal de xilanas com diferentes substituições (glicuronoxilanas (GX), arabinoglicuronoxilanas (AGX), arabinoxilanas (AX), glicuronoarabinoxilanas (GAX) e heteroxilanas (HX)) são chamadas xilanases. Essas enzimas pertencem ao grupo das glicosidases,

também chamadas de glicosídeo hidrolases (GH, EC 3.2.1.x)<sup>1</sup> (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

Xilanases possuem ampla gama de aplicações industriais e biotecnológicas: são usadas na panificação para melhorar a manipulação e qualidade de massas, na produção de rações para melhorar a digestibilidade, na clarificação de sucos de frutas, na indústria de papel e celulose no processo de branqueamento da polpa e na produção de produtos derivados das xilanas: XOS, xilose e xilitol (BEG et al., 2001; CHAKDAR et al., 2016; KAMBLE; JADHAV, 2012; UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013).

As xilanases podem agir de forma “endo”, hidrolisando ligações no interior do polímero gerando oligossacarídeos menores (endo-1,4- $\beta$ -xilanases, EC 3.2.1.8) ou de forma “exo”, hidrolisando a cadeia de xilana pela extremidade não redutora (extremidade constituída pela molécula de xilose que não possui um grupo OH livre ligado ao carbono anomérico, pois está ligado ao carbono 4 da molécula anterior), liberando monômeros de xilose ( $\beta$ -xilosidades, EC 3.2.1.37) (FONSECA, 2015; LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018). No caso da produção de XOS, é preferível que o complexo enzimático utilizado possua alta atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilanases e baixa atividade de  $\beta$ -xilosidades para minimizar a produção de monossacarídeos (CARVALHO et al., 2013).

As enzimas GH são classificadas em famílias com base na similaridade da sequência de aminoácidos. As endo-1,4- $\beta$ -xilanases são encontradas nas famílias 5, 7, 8, 10, 11, 26 e 43 e até o momento, as enzimas usadas em processos de produção de XOS pertencem, predominantemente, às famílias GH10 e GH11 (JUTURU; WU, 2012; LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

Gêneros bacterianos, tais como *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Pseudoxanthomonas* e *Rhodothermus* são relatados como produtores de xilanases (CHAKDAR et al., 2016). Entre o grupo de actinomicetos, *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Nonomuraea* também são citados como produtores (PRAKASH et al., 2013). As endo-1,4- $\beta$ -xilanases bacterianas são frequentemente produzidas de forma recombinante (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

<sup>1</sup> A IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) desenvolveu uma nomenclatura para enzimas, que consiste em uma sequência de 4 números, precedidos pelas letras “EC”, que significam *Enzyme Commission*. O primeiro número representa a reação que a enzima catalisa (classe), o segundo a subclasse, o terceiro a sub-subclasse e o quarto é o número que identifica a enzima dentro da sua sub-subclasse.

Xilanases fúngicas são mais comumente obtidas de cepas de *Aspergillus* (*Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*) e produzidas por microrganismo selvagem. Uma variedade de outras espécies fúngicas também já foi usada para obtenção de xilanases de forma recombinante ou por microrganismo selvagem, como *Paecilomyces thermophila*, *Penicillium occitanis*, *P. funiculosum*, *Pichia stipites*, *Pseudozyma hubeiensis*, *Sporotrichum thermophile*, *Talaromyces thermophilus*, *Trichoderma reesei*, and *T. longibrachiatum*, entre outras (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018).

Os microrganismos xilanolíticos geralmente produzem vários tipos de xilanases simultaneamente, que podem diferir em especificidade, sequência primária de aminoácidos, estrutura e rendimento. (UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). Como foi mencionado anteriormente, as xilanas de plantas terrestres possuem estruturas heterogêneas e variadas, o que significa que nem todas as ligações xilosídicas da cadeia principal são igualmente acessíveis. Assim, a produção de diferentes formas dessas hidrolases, com funções especializadas, pode ser considerada como uma forma de aumentar a eficiência e extensão da hidrólise (LIAO et al., 2015; WONG; TAN; SADDLER, 1988). Além disso, existe a possibilidade de que o significado funcional da produção de múltiplas xilanases esteja na capacidade de funcionarem sob diferentes condições, já que suas propriedades físico-químicas podem variar substancialmente (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

#### 4.2.2 Enzimas desramificantes

Devido à complexa e variada estrutura das xilanas, a hidrólise completa desses compostos requer uma variedade de enzimas agindo de forma cooperativa. Os microrganismos xilanolíticos podem produzir, além das endo-1,4- $\beta$ -xilanases e as  $\beta$ -xilosidases, enzimas conhecidas como desramificantes, que catalisam a clivagem dos grupos laterais.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55), liberam arabinose (Araf),  $\alpha$ -D-glicuronidases (EC 3.2.1.139) liberam as ramificações de ácido glicurônico (GlcA e MeGlcA), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) removem substituinte acetil e esterases de ácido ferúlico ou feruloil esterase (EC 3.1.1.73) removem o ácido ferúlico ligado a substituintes Araf,

permitindo a obtenção de uma maior quantidade de monossacarídeos assimiláveis para seu crescimento e manutenção (UÇKUN KIRAN; AKPINAR; BAKIR, 2013). A presença de sistemas completos de enzimas incluindo essas atividades é bastante difundida entre fungos, actinomicetos e outras bactérias (BEG et al., 2001; COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). A Figura 5.2 mostra a representação de uma xilana substituída e a ação das enzimas nas diferentes ligações.

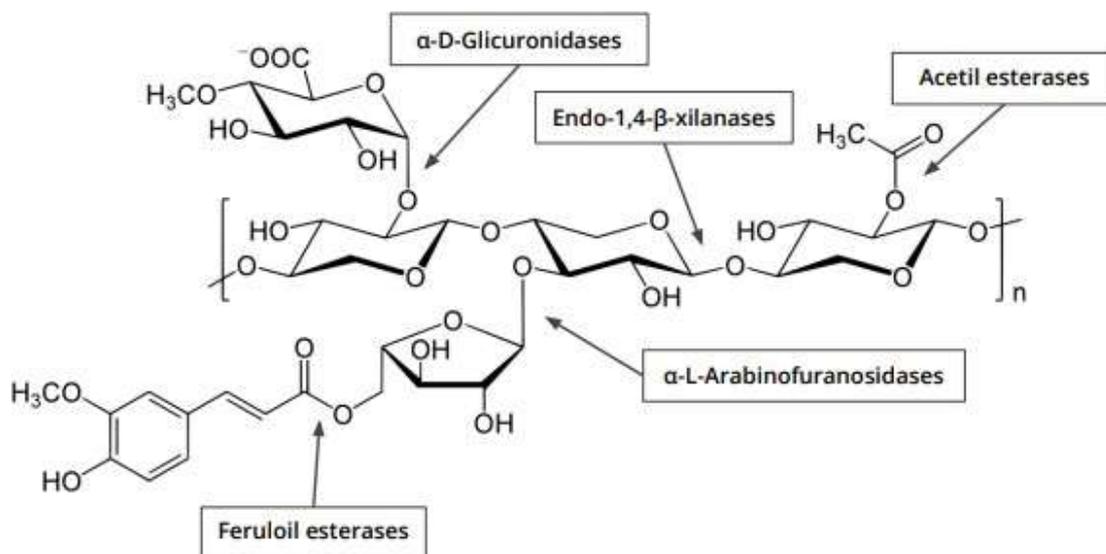


Figura 4.3: Esquema mostrando as enzimas envolvidas na hidrólise de diferentes ligações presentes possivelmente presentes nas xilanas (Adaptado de ROGOWSKI et al., 2014)

No caso da produção de XOS, a aplicação dessas enzimas acessório, como são conhecidas, em conjunto com as endo-1,4- $\beta$ -xilanases, tem o potencial de otimizar a hidrólise de xilanas heterogêneas, aumentando o rendimento do processo. Por outro lado, a remoção excessiva das ramificações resultaria principalmente em XOS lineares, enquanto alguns tipos de ramificações podem trazer efeitos biológicos desejáveis, além do efeito prebiótico.

Ainda existem poucos estudos sobre a sinergia entre enzimas na produção de XOS (LINARES-PASTÉN; ARONSSON; KARLSSON, 2018). O uso de uma mistura de enzimas para a produção desses oligossacarídeos foi relatado por Wan Azelee et al. (2016) que utilizaram uma combinação de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases e endo-1,4- $\beta$ -xilanases para hidrolisar caule de kenaf (planta herbácea). Os autores observaram vantagens no uso da mistura, resultando numa maior produção do produto de interesse em comparação com a hidrólise usando apenas uma enzima. Uçkun Kiran, Akpinar e Bakir (2013)

investigaram a co-utilização de enzimas xilanolíticas em vários substratos. Foram utilizados dois preparos enzimáticos comerciais contendo endo-1,4- $\beta$ -xilanases,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -xilosidase em diferentes quantidades e uma mistura dos dois preparos. A aplicação das misturas mostrou rendimento maior que o esperado, que foi associado a ação sinérgica, e foi observado que o preparo com menor atividade  $\beta$ -xilosidase seria mais apropriado para produção de XOS já que menos monômeros são produzidos.

Em geral, os estudos que abordam a produção de XOS não mencionam a atividade de enzimas além de endo-1,4- $\beta$ -xilanases, mesmo os que aplicam caldos enzimáticos de fermentação brutos ou parcialmente purificados, onde, potencialmente, poderia haver outras enzimas xilanolíticas. Por esse motivo, nos tópicos seguintes o foco será o uso de endo-1,4- $\beta$ -xilanases apenas.

#### 4.2.3 *Uso de enzimas imobilizadas*

A aplicação de métodos enzimáticos para a produção de oligossacarídeos a partir de biomassa é um processo geralmente considerado caro a nível comercial (OTIENO; AHRING, 2012). O processo de imobilização de enzimas oferece diversas vantagens, como: possibilitar a reutilização das enzimas, facilitar a purificação, melhorar a estabilidade da enzima e permitir a produção de forma contínua em reatores de leito recheado. Todas vantagens citadas têm potencial de reduzir o custo de produção de XOS (CHEN et al., 2010). Além disso, a imobilização pode aumentar a estabilidade térmica e tolerância à diferentes pHs (RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2016).

Diversos métodos de imobilização de xilanases já foram relatados para produção de XOS (AI et al., 2005; ARAGON et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2018; RAJAGOPALAN; SHANMUGAVELU; YANG, 2016). Ai et al. (2005) imobilizaram uma endo-xilanase de *Streptomyces olivaceoviridis* em um suporte composto por um polímero comercial (Eudragit S-100) e utilizaram para produzir XOS pela hidrólise de sabugo de milho pré-tratado (item 18 da Tabela 4.1). A enzima imobilizada manteve 81% de sua atividade mesmo após ser reciclada 4 vezes, considerada adequada para produção de XOS pelos autores.

Rajagopalan, Shanmugavelu e Yang (2016), por exemplo, realizaram a imobilização de endo-xilanase de uma cepa de *Clostridium* em gel de alginato de

cálcio e utilizaram para produzir XOS a partir de xilana de Beechwood comercial (item 17 da Tabela 4.1). A enzima imobilizada pode ser usada por 7 ciclos, detendo mais de 62% de sua atividade. Os autores também relataram que foram observadas diferenças quanto ao perfil de XOS produzido: a enzima livre produziu XOS com grau de polimerização de 2 a 5 e a enzima imobilizada produziu apenas xilobiose e xilotriose.

#### 4.2.4 Enzimas como coadjuvantes de tecnologia

No caso da produção de XOS como ingrediente alimentar, as enzimas aplicadas na etapa de hidrólise podem ser consideradas coadjuvantes de tecnologia. Coadjuvante de tecnologia é toda substância, excluindo os equipamentos e os utensílios utilizados na elaboração e/ou conservação de um produto, que não se consome por si só como ingrediente alimentar e que se emprega intencionalmente na elaboração de matérias-primas, alimentos ou seus ingredientes, para obter uma finalidade tecnológica durante o tratamento ou fabricação (BRASIL, 1997).

Existem duas resoluções da ANVISA publicadas em 2014, RDC nº 53 e RDC nº 54, que dispõem sobre o uso de enzimas com essa função. A RDC nº 54 apresenta os princípios gerais de uso de enzimas como coadjuvantes de tecnologia em alimentos, requisitos de composição da preparação enzimática e outros procedimentos relacionados. Desta, é importante ressaltar, no contexto deste trabalho, que as enzimas de origem microbiana devem ser obtidas a partir de cepas estáveis, seguras, não patogênicas e não toxigênicas, por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e que impeçam a introdução de microrganismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis (BRASIL, 2014a).

A RDC nº 53 contém a lista de enzimas com suas respectivas fontes de obtenção, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas (incluindo as substâncias que podem ser usadas como suportes em enzimas imobilizadas) para uso como coadjuvante de tecnologia na produção de alimentos em geral. A enzima xilanase consta na lista de enzimas permitidas de origem microbiana tendo como fonte microrganismos como *Aspergillus oryzae*,

*Aspergillus niger*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Humicola insolens*, entre outros (BRASIL, 2014b).

Para que enzimas, suportes e qualquer outro tipo de coadjuvante de tecnologia que não constem na resolução citada sejam usados, é necessário submeter à ANVISA seu pedido de inclusão ou extensão.

### **4.3 Produção de enzimas para aplicação na produção de XOS**

A produção das enzimas usadas no processo de hidrólise enzimática pode ser feita por fermentação em estado sólido (FES) ou fermentação submersa (FSm) (MOTTA; ANDRADE; SANTANA, 2013; SHIV; SHIKHA; MANJUL, 2016). A FES é definida como um processo no qual o cultivo microbiano e formação de produtos acontecem na superfície de substratos sólidos na presença de umidade suficiente para manter o crescimento e o metabolismo dos microrganismos (KOSSEVA, 2013). Já a FSm é um processo no qual as células produtoras se desenvolvem no seio do meio de cultivo, geralmente agitado e aerado (no caso de fermentações aeróbicas) (NASCIMENTO et al., 2017).

A FSm tem a vantagem de permitir um maior controle das condições de processo durante a fermentação e é, em geral, preferível quando se deseja enzimas mais purificadas. Entre 80 e 90% das xilanases comerciais são produzidas por esse método (LOERA CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2010).

As condições da FES são mais adequadas para o cultivo de fungos (LOERA CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2010); esse método possui vantagens como baixo investimento inicial, baixo custo de operação e menor risco de contaminação por microrganismos indesejados (BEG et al., 2001; SHIV; SHIKHA; MANJUL, 2016). É mais adequado que a FSm quando é desejado um efeito sinérgico, ou seja, uma preparação enzimática composta por um conjunto de enzimas que degradem as xilanas (LOERA CORRAL; VILLASEÑOR-ORTEGA, 2010).

O rendimento na produção de xilanases é uma função de diversos fatores: microrganismo escolhido, fatores nutricionais e condições empregadas. A seleção de um microrganismo que seja eficiente na produção da enzima de interesse e um meio nutritivo e substrato apropriado são de grande importância para a produção bem-sucedida de xilanases. Parâmetros como pH do meio, temperatura

de incubação, agitação e concentração inicial de inóculo também podem influenciar a produção durante o processo de fermentação (CHAKDAR et al., 2016).

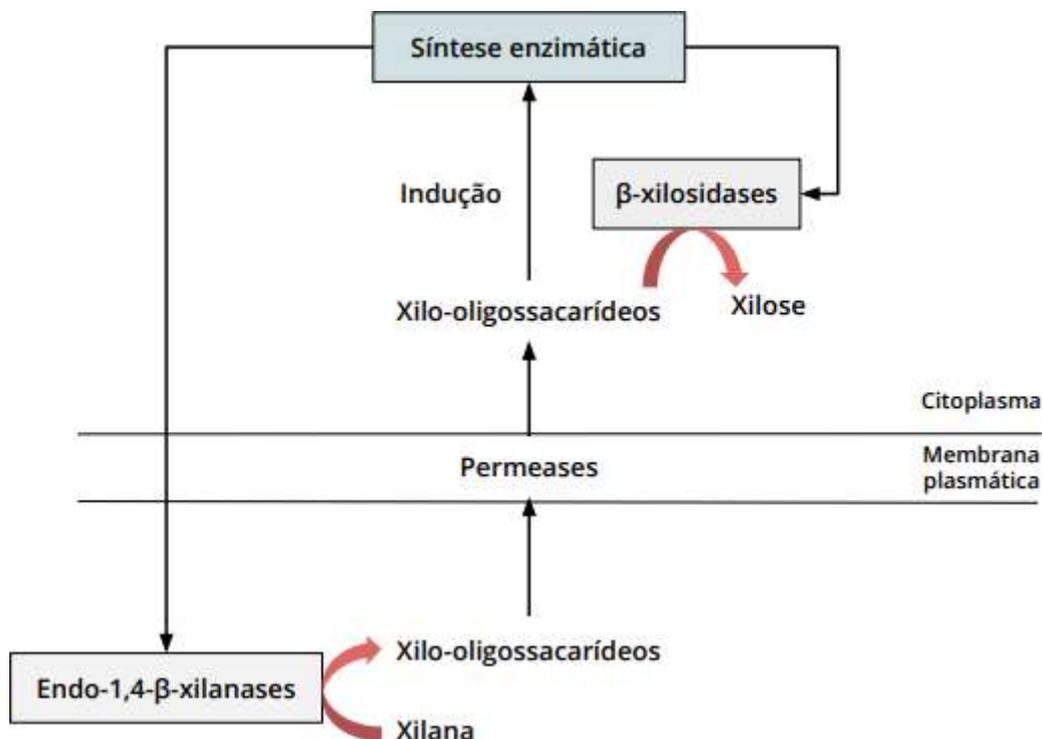


Figura 4.4: Esquema hipotético simplificado da regulação das enzimas xilanolíticas envolvendo endo-xilanases e β-xilosidases (Adaptado de POLIZELI et al., 2005).

O substrato tem como função não somente ser fonte de carbono e energia, mas também de servir como indutor na síntese das enzimas de interesse (SHARMA, 2017; VELKOVA; GOICHEVA, 2007). O uso de xilanas puras como substrato indutor aumenta o custo de produção e por isso substratos como resíduos lignocelulósicos, ricos em xilana, também vêm sendo explorados para esse fim (KNOB et al., 2014). De uma forma geral, a indução da produção de xilanases é um fenômeno complexo e a resposta, em termos de produção enzimática, varia para cada microrganismo, pois um indutor que leva a máxima atividade em uma espécie pode ser o inibidor da atividade em outra (KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; PALMA, 2003). A indução de complexos enzimáticos por polissacarídeos, como as xilanas, foi questionado por pesquisadores por um certo tempo, pelo fato de essas macromoléculas não serem capazes de entrar na célula e influenciar a regulação gênica (POLIZELI et al., 2005). O mecanismo sugerido

por alguns autores, de forma simplificada, é que endo-xilanases constitutivas (sintetizadas constantemente independente do estado metabólico) são responsáveis pelo início da hidrólise de xilanas, produzindo xilo-oligossacarídeos que são transportados para dentro da célula por enzimas chamadas permeases. Dentro da célula, esses oligômeros desencadeiam a expressão dos genes relacionadas à enzimas xilanolíticas (esquema representado na Figura 5.3) (JOSHI; KHARE, 2012; KULKARNI; SHENDYE; RAO, 1999; POLIZELI et al., 2005). Na Figura 5.3,  $\beta$ -xilosidases estão representadas de forma intracelular mas também são expressas de forma extracelular (BAJPAI, 2014a).

Realizada a fermentação, as xilanases produzidas podem passar por uma série de etapas de purificação, dependendo da aplicação. Para realizar a purificação são utilizadas técnicas como filtração convencional, centrifugação, ultrafiltração, precipitação, cromatografia de troca iônica e cromatografia de gel filtração (BAJPAI, 2014b). No caso da produção de XOS, é possível encontrar estudos onde são realizadas etapas de purificação e casos onde as enzimas são usadas não purificadas, como extrato bruto, apenas separadas dos sólidos e células presentes no cultivo. Kocabas e Ozben (2014), por exemplo, produziram xilanases de *Scytalidium thermophilum* utilizando sabugo de milho moído como fonte de carbono. Após 5 dias de cultivo, a cultura foi filtrada (filtro de papel Whatmann nº1) e centrifugada. O sobrenadante foi usado como caldo enzimático para a produção de XOS (item 2 da Tabela 4.1).

Um processo onde a produção de XOS e xilanases é feita em uma etapa, de forma simultânea, também já foi relatada na literatura (MENEZES et al., 2018a). Neste estudo, foram avaliadas a produção por duas cepas de *Aspergillus* utilizando FES com casca de arroz moída, sem nenhum pré-tratamento, como substrato. Os autores relataram que a maior concentração de XOS foi observada com 48h de cultivo, enquanto a maior atividade de xilanase foi em 120h. Essa alternativa apresenta vantagens pois utiliza menos etapas, podendo ser mais econômica; no entanto, o rendimento obtido nesse caso é mais baixo em comparação com o método mais comum, onde as xilanases são produzidas por fermentação e depois aplicadas na hidrólise enzimática de substratos contendo xilana, como é possível observar comparando os resultados de outro estudo dos mesmos autores, utilizando os mesmos microrganismos (itens 11, 12, 13 e 14 da Tabela 4.1).

## 5 Conclusão

Pelo seu potencial prebiótico e características tecnológicas favoráveis, os XOS são substâncias com um grande potencial para serem aplicados como ingredientes em alimentos funcionais. Esses oligossacarídeos vêm sendo explorados e estudados por pesquisadores ao redor do mundo e já são usados comercialmente em alguns países.

Os XOS ainda possuem a vantagem de poderem ser produzidos a partir de resíduos agrícolas, agregando valor a estes materiais. Entre os resíduos abordados neste trabalho, escolhidos por estarem relacionados às culturas agrícolas mais cultivadas no estado do Rio Grande do Sul, o sabugo de milho é o mais recorrente na literatura como substrato para a produção de XOS por seu elevado teor de xilanas, inclusive já sendo empregado para produção em escala comercial por empresas chinesas. Resíduos relacionados ao arroz e à soja ainda são pouco estudados neste contexto. Entre os resíduos agrícolas, os resíduos agroindustriais, gerados durante o processamento (como cascas e sabugo), são mais explorados provavelmente por serem mais facilmente obtidos. Os resíduos de colheita, como as palhas, são produzidos em maior quantidade, mas precisam ser recolhidos no campo, o que dificulta seu aproveitamento.

O substrato escolhido, o tipo e as condições usadas no pré-tratamento, as enzimas empregadas, na forma livre ou imobilizada, e condições de hidrólise, são variáveis que podem influenciar o rendimento obtido na produção de XOS, como foi visto neste trabalho. Estudos avaliando diferentes condições, matérias primas e enzimas produzidas por diferentes microrganismos são importantes para entender e melhorar o processo, tornando-o mais econômico, eficiente e viável. Além disso, é importante mencionar que trabalhos futuros são necessários para abordar a etapa de purificação do produto e realizar um estudo da viabilidade técnica e econômica do processo como um todo.

## 6 Referências

AACHARY, A. A. **Bioactive Xylooligosaccharides from corncob: Enzymatic Production and Applications**. 2009. University of Mysore, 2009.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.050>>

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**, Karnataka, India, v. 10, n. 1, p. 2–16, 2011.

Al, Z. et al. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylo-oligosaccharide production. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2707–2714, 2005.

AIDP INC. **PreticX**, 2015. a. Disponível em: <[http://www.lifebridgeintl.com/wp-content/uploads/2016/02/PreticX\\_white\\_paper\\_FINAL\\_2.pdf](http://www.lifebridgeintl.com/wp-content/uploads/2016/02/PreticX_white_paper_FINAL_2.pdf)>

AIDP INC. **PreticX**, 2015. b.

AKPINAR, O. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.025>>

ARAGON, C. C. et al. Continuous production of xylooligosaccharides in a packed bed reactor with immobilized-stabilized biocatalysts of xylanase from *Aspergillus versicolor*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 8–14, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.017>>

ARRIEL, N. H. C. et al. Oleaginosas, fibrosas e leguminosas. **Recursos genéticos de plantas conservados na Embrapa: histórico e inventário atualizado**. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 27–49, 2014. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1041935>>

ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Disponível em: <<http://fst.sagepub.com/content/3/4/306.2.full.pdf>>

AYYAPPAN, P. et al. Physicochemical properties of cookies enriched with xylooligosaccharides. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 5, p. 420–428, 2016.

BAJPAI, P. Microbial Xylanolytic Systems and Their Properties. **Xylanolytic Enzymes**, p. 19–36, 2014. a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128010204000032>>

BAJPAI, P. Purification of Xylanases. **Xylanolytic Enzymes**, p. 53–61, 2014. b.

Disponível em:  
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128010204000068>>

BANERJEE, S. et al. Evaluation of wet air oxidation as a pretreatment strategy for bioethanol production from rice husk and process optimization. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 12, p. 1680–1686, 2009. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.09.001>>

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3–4, p. 326–338, 2001.

BENTO, C.; CASARIL, K. Agroindustriais Ligninocelulósicos Por Fungos Causadores Da Podridão Branca: Uma Alternativa À Produção. **E-revista UNIOESTE**, v. 14, p. 151–180, 2012.

BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767–4774, 2010. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.079>>

BOONCHUAY, P. et al. 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. et al. An integrated process for xylooligosaccharide and bioethanol production from corncob. **Bioresource Technology**, v. 256, n. February, p. 399–407, 2018. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.004>>

BOUHNİK, Y. et al. Human nutrition and metabolism increases fecal Bifidobacteria in healthy humans. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 1, p. 113–117, 1999.

BRASIL. **ALIMENTOS FUNCIONAIS**. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p\\_p\\_id=101&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_count=1&\\_101\\_struts\\_action=%2Fasset\\_publisher%2Fview\\_content&\\_101\\_assetEntryId=2866855&\\_101\\_type=content&\\_101\\_groupId=2](http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2866855&_101_type=content&_101_groupId=2)>.

BRASIL. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde**, Brasília, p. 02, 1997. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA\\_540\\_1997.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d1b6da0047457b4d880fdc3fbc4c6735/PORTARIA_540_1997.pdf?MOD=AJPERES)>

BRASIL. Resolução RDC nº 360. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**, p. 1–9, 2003. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360\\_23\\_12\\_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc)>

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 54, de 10 de outubro de 2014. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, v. 2014, 2014. Disponível em:  
<[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0058\\_10\\_10\\_2014.pdf/](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0058_10_10_2014.pdf/)>

9536c1c1-29ff-4405-a5f1-230335cdc37f>

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 53, de 07 de outubro de 2014. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, 2014. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3637633/RDC\\_53\\_2014\\_.pdf/421908f6-ab41-4ef2-acd5-2bde7912821f](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3637633/RDC_53_2014_.pdf/421908f6-ab41-4ef2-acd5-2bde7912821f)>

BRASIL. Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>

BRODEUR, G. et al. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–17, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/er/2011/787532/>>

CARLSON, J. L. et al. Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber. **Current Developments in Nutrition**, p. 1–8, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cdn/advance-article/doi/10.1093/cdn/nzy005/4828321>>

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials : Chemical structure , health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **FRIN**, v. 51, n. 1, p. 75–85, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>>

CARVALHO, F. C. De. Disponibilidade De Resíduos Agroindustriais E Do Beneficiamento De Produtos Agrícolas. **Informações Econômicas**, v. 22, p. 31–46, 1992.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CHAKDAR, H. et al. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. **3 Biotech**, , v. 6, n. 2, p. 1–15, 2016.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>>

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 187–191, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.12.028>>

CHEN, H. et al. Immobilization of aspergillus niger xylanase on chitosan using dialdehyde starch as a coupling agent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 24–32, 2010.

CHEN, H. et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals. **Fuel Processing Technology**, v. 160, p. 196–206, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.12.007>>

CHEN, L. L. et al. Purification and enzymatic characterization of two  $\beta$ -endoxyanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5230–5236, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.038>>

CHUNG, Y. C. et al. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal moisture, and pH value in the elderly. **Nutrition Research**, v. 27, n. 12, p. 756–761, 2007.

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

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos. **Monitoramento agrícola - Safra 2017**, v. 8, n. 1, p. 1–145, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>

DE OLIVEIRA, S. M. et al. Covalent immobilization-stabilization of  $\beta$ -1,4-endoxyanases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 64, n. August 2017, p. 170–176, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.018>>

DELIVAND, M. K.; BARZ, M.; GHEEWALA, S. H. Logistics cost analysis of rice straw for biomass power generation in Thailand. **Energy**, v. 36, n. 3, p. 1435–1441, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2011.01.026>>

EBRINGEROVÁ, A. Structural diversity and application potential of hemicelluloses. **Macromolecular Symposia**, v. 232, n. 333, p. 1–12, 2006.

EBRINGEROVÁ, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives - Biopolymers with valuable properties, 1: Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 9, p. 542–556, 2000.

EMBRAPA. **Soja**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja>>.

EUROMONITOR. **Senior Research Analyst provides insight on food and drink trends in Brazil**. 2017a. Disponível em: <<https://blog.euromonitor.com/2017/10/overview-food-drink-trends-brazil-interview-angelica-salado.html>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

EUROMONITOR. **Health and Wellness in Brazil**. 2017b. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/health-and-wellness-in-brazil/report>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

EUROMONITOR. **What the New Health and Wellness Data is Telling Us: A Look into Latest Trends**. 2018. Disponível em: <<https://blog.euromonitor.com/2018/02/new-health-wellness-data-look-latest-trends.html>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

FAO. Report on Functional Foods. **Food Quality and Standards Service**, 2007. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Report+on+Functional+Foods#5>>

FEE. **Características da agropecuária do RS**. 2015. Disponível em: <<https://www.fee.rs.gov.br/sinteseilustrada/caracteristicas-da-agropecuaria-do-rs/>>. Acesso em: 9 abr. 2018.

FERRÃO, L. L. et al. Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. **Food Research International**, v. 86, p. 93–102, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.034>>

FERRÃO, L. L. et al. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food Research International**, v. 107, n. February, p. 137–147, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.018>>

FERREIRA-LEITAO, V. et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**, v. 1, n. 1, p. 65–76, 2010.

FINEGOLD, S. M. et al. Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. **Food & Function**, n. 5, p. 436–445, 2014.

FONSECA, M. A. Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja. p. 115, 2015.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Autohydrolysis of corncob: Study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 3, p. 211–218, 2002.

GENNADIÏ ZAIKOV, E.; LOBO, V. M. M.; GUARROTXENA, N. **International Perspectives on Chemistry and Biochemistry Research**. : Nova Publishers, 2003.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, 125, 1401–1412, 1995.

GIBSON, G. R. et al. CONSENSUS The International Scientific Association and scope of prebiotics. **Nature Publishing Group**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>>

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>>

GULLÓN, P.; SALAZAR, N. Assesment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks. ..., v. 6, n. December 2015, p. 2096–3114, 2011. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=19302126&AN=66960820&h=dmjXcnp5n7QheO4UjiK4s0bXoSCPwIx4NpY9xR2rRfzBOTLuWN+P3L7UWCCpcfE9DbrjuhZ+tDmleACbcIRGA==&crl=c>>

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18,

2009.

IINO, T et al. Improvement of constipation by a small amount of xylooligosaccharides ingestion in adult women. *J Jpn Assoc Dietary Fiber Res* 1:19–24, 1997.

#### IRGA. **Área e produção de arroz (Série Histórica).**

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polym. Chem.*, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5PY00263J>>

ITO, M. et al. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microbial Ecology in Health and Disease*, v. 3, n. 6, p. 285–292, 1990.

JOSHI, C.; KHARE, S. K. Induction of xylanase in thermophilic fungi *Scytalidium thermophilum* and *Sporotrichum thermophile*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, n. 1, p. 21–27, 2012.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 6, p. 1219–1227, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.006>>

KAMBLE, R. D.; JADHAV, A. R. Isolation, purification, and characterization of xylanase produced by a new species of bacillus in solid state fermentation. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2012.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, n. 3, p. 247–253, 2006.

KNOB, A. et al. Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi. *BioResources*, v. 9, n. 3, p. 5738–5773, 2014.

KOCABAS, D. S.; OZBEN, N. Co-production of xylanase and xylooligosaccharides from lignocellulosic agricultura. *RSC Advances*, p. 26129–26139, 2014.

KOSSEVA, M. R. **Recovery of Commodities from Food Wastes Using Solid-State Fermentation.** First Edit ed. : Elsevier Inc., 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391921-2.00005-6>>

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

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 4, n. 1, p. 7, 2017. Disponível em: <<http://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-017-0137-9>>

LIAO, H. et al. Functional diversity and properties of multiple xylanases from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Scientific Reports*, v. 5, n. 88, p. 1–14, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep12631>>

LIM, J. S. et al. A review on utilisation of biomass from rice industry as a source of renewable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3084–3094, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.051>>

LINARES-PASTÉN, J.; ARONSSON, A.; KARLSSON, E. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, p. 48–67, 2018. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&doi=10.2174/1389203717666160923155209>>

LOERA CORRAL, O.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. Xylanases. **Research Signpost**, v. 37, n. 2, p. 305–322, 2010. Disponível em: <[http://www.trnres.com/ebook/uploads/gonzalezfinal/T\\_1231139053gonzalez14.pdf](http://www.trnres.com/ebook/uploads/gonzalezfinal/T_1231139053gonzalez14.pdf)>

MACLELLAN, J. et al. Effects of protein and lignin on cellulose and xylan analyses of lignocellulosic biomass. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 6, p. 1268–1275, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61142-X](http://dx.doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61142-X)>

MÄKELÄINEN, H.; JUNTUNEN, M.; HASSELWANDER, O. Prebiotic Potential of Xylo-Oligosaccharides. **Prebiotics and Probiotics Science and Technology**, p. 245–258, 2009. Disponível em: <[http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-79058-9\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-79058-9_8)>

MANISSERI, C.; GUDIPATI, M. Prebiotic Activity of Purified Xylobiose Obtained from Ragi (Eleusine coracana, Indaf-15) Bran. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 251–257, 2012.

MASSOLA, C. P.; MAZIERO, E. Cenário brasileiro da geração e uso de biomassa adensada. **Revista [IPT] Tecnologia e Inovação**, v. 1, n. 4, p. 58–73, 2017.

MENEZES, B. da S. et al. Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC A773. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1–9, 2018. a.

MENEZES, B. da S. et al. Xylooligosaccharides production by fungi cultivations in rice husk and their application as substrate for lactic acid bacteria growth. **Bioresource Technology Reports**, v. 2, n. March, p. 100–106, 2018. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.05.004>>

MENEZES, B. da 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. 0, 2017.

MHLW. **Food for Specified Health Uses (FOSHU)**. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html>>. Acesso em: 21 abr. 2018.

MOON, H. C.; JEONG, H. R.; KIM, D. H. Bioethanol production from acid-

pretreated rice hull. **ASIA-PACIFIC JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING**, n. 7, p. 206–211, 2012.

MORAIS, W. G. De; CONTESINI, F. J. Enzyme Immobilization for Oligosaccharide Production. 2018.

MOTTA, F.; ANDRADE, C.; SANTANA, M. A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. **Intech**, v. Chapter 10, p. 251–275, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/a-review-of-xylanase-production-by-the-fermentation-of-xylan-classification-characterization-and-app>>

MOURA, P. et al. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by Bifidobacterium and Lactobacillus strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 963–972, 2007.

MOURE, A. et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1913–1923, 2006.

MUMTAZ, S. et al. Xylooligosaccharide enriched yoghurt: Physicochemical and sensory evaluation. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 566–569, 2008.

NABARLAZT, D.; FARRIOL, X.; MONTANE, D. Kinetic Modeling of the Autohydrolysis of Lignocellulosic Biomass for the Production of Hemicellulose-Derived Oligosaccharide. **Industrial Engineering and Chemistry Research**, v. 43, p. 4124–4131, 2004. Disponível em: <[file:///c:/Documents and Settings/Administrador/Escritorio/biblio\\_tesis/2447-Nabarlatz\\_Montan?\\_Farriol.pdf](file:///c:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Escritorio/biblio_tesis/2447-Nabarlatz_Montan?_Farriol.pdf)>

NASCIMENTO, R. P. Do et al. **Microbiologia Industrial: Bioprocessos**. 1. ed. : Elsevier, 2017.

NASCIMENTO, V. M. et al. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, p. 112–125, 2016. Disponível em: <<https://www.degruyter.com/view/j/bioeth.2015.2.issue-1/bioeth-2016-0008/bioeth-2016-0008.xml>>

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NC-IUBMB).

**Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse**. 2018. Disponível em: <<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

NUTRASOURCE, I. **GRAS notification for Shangdong Longlive Biotechnology, Ltd's Xylooligosaccharides** GRAS Notice. [s.l: s.n.].

OHBUCHI, T. et al. Oral administration of acidic xylooligosaccharides prevents the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 56, n. 1, p. 54–9, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354347>>

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 9, n. 2, p. 77–86, 1990. a. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bifidus1982/9/2/9\\_2\\_77/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bifidus1982/9/2/9_2_77/_article)>

OKAZAKI, M.; FUJIKAWA, S.; MATSUMOTO, N. Effects of Xylooligosaccharide on Growth of Bifidobacteria Masako. **J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.**, n. 43, p. 395–401, 1990. b.

OKU, T.; NAKAMURA, A. S. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 7, p. 1253–1261, 2002.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.07.017>>

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. p. 1–169, 2003. Disponível em: <<http://www2.enq.ufsc.br/teses/d010.pdf>>

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Plant cell wall polymers as precursors for biofuels. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 3, p. 305–312, 2010.

PENKSZA, P. et al. Utilization of xylo-oligosaccharides as prebiotics in yoghurt. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 22, p. 1–6, 2018.

PEREIRA, M. R. et al. **Utilização de enzimas lipolíticas na produção de biodiesel**. [s.l.: s.n.].

PINEIRO, M. et al. FAO Technical Meeting on Prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, n. September, p. S156–S159, 2008. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004836-200809002-00002>>

POLIZELI, M. L. T. M. et al. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005.

PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: A repertory of green catalysts with a potential revenue resource. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

QING, QING; HONGJIA, LI; KUMAR, RAJEEV; WYMAN, C. E. Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterisation in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, p. 391–415, 2013. Disponível em: <<http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470972025.html>>

QY RESEARCH REPORTS. **2017 Global Xylooligosaccharides (XOS) Market Research Report**. 2017. Disponível em:

<<https://www.qyresearchreports.com/report/2017-global-xylooligosaccharides-xos-market-research-report.htm>>.

RAJAGOPALAN, G.; SHANMUGAVELU, K.; YANG, K.-L. Production of xylooligosaccharides from hardwood xylan by using immobilized endoxylanase of *Clostridium* strain BOH3. **RSC Advances**, v. 6, n. 85, p. 81818–81825, 2016. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA17085D>>

RAMBO, M. K. D. Caracterização de resíduos lignocelulósicos por espectroscopia NIR aliada à quimiometria para a obtenção de insumos químicos. **Universidade Estadual de Campinas**, p. 182, 2013.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F.; CASTELLUCCI, A. C. L. Processamento e industrialização do milho para alimentação humana. **Visão Agrícola**, n. 13, p. 138–140, 2015.

ROBERFROID, M. et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **The British journal of nutrition**, v. 104 Suppl, n. November, p. S1-63, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920376>>

ROJAS, M. J. Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja. **Dissertação de mestrado-UFSCar, São Carlos-SP**, p. 93, 2012.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

SAHA, B. C. et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnol Prog**, v. 21, n. 3, p. 816–822, 2005.

SAMANTA, A. K. et al. Production and in vitro evaluation of xylooligosaccharides generated from corn cobs. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 466–474, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.11.001>>

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>>

SAMANTA, A. K. et al. Process for Enzymatic Production of Xylooligosaccharides from the Xylan of Corn Cobs. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 729–736, 2015. b.

SAMANTA, A. K. et al. Value addition of corn husks through enzymatic production of xylooligosaccharides. v. 59, n. December, p. 1–8, 2016.

SANTOS, M. S. R. Dos. **Estudos de pré-tratamento de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. 2014. Universidade Federal do Alagoas, 2014.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 263–289, 2010. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>>

SHARMA, P. K. Xylanases current and future perspectives: a review Pawan Kumar Sharma. v. 6, n. 1, p. 12–22, 2017.

SHIV, S.; SHIKHA, S.; MANJUL, G. Microbial xylanases: production, applications and challenges. **The handbook of microbial bioresources**, n. January, p. 313–330, 2016. Disponível em: <<http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20163199963>>

SILVA, C. O. de G. Emericella nidulans E BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR: FERRAMENTAS PARA PRODUÇÃO DE ENDO- $\beta$ -1, 4-. p. 111, 2014.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19–30, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.11.003>>

SLAVIN, J. Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. **Nutrients**, v. 5, n. 4, p. 1417–1435, 2013.

SOCCOL, C. R.; FRANÇA, L. R.; REZENDE, R. R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&indústria**. [s.l: s.n.].

SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO. **ARROZ IRRIGADO: Recomendações Técnicas da Pesquisa para o Sul do Brasil XXXI REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.sosbai.com.br/docs/Boletim\\_RT\\_2016.pdf](http://www.sosbai.com.br/docs/Boletim_RT_2016.pdf)>

SPGG. **Arroz**. 2016a. Disponível em: <<http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/arroz>>.

SPGG. **Soja**. 2016b. Disponível em: <<http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/soja>>.

SPGG. **Milho**. 2016c. Disponível em: <<http://www.atlassocioeconomico.rs.gov.br/milho>>.

STANTON, C. et al. Market potential for probiotics 1 – 4. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 476–483, 2001.

STEPHEN, A. M. **Other Plant Polysaccharides**. : ACADEMIC PRESS, INC., 1983. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012065602850008X>>

TAN, S. S. et al. Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using Thermotoga maritima xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 200–204, 2008.

TANDON, G. D. Bioproducts from residual lignocellulosic biomass. **Advances in Biotechnology**, n. March, p. 52–75, 2015.

TANIGUCHI, H. Carbohydrate Research and Industry in Japan and the Japanese Society of Applied Glycoscience. **Starch - Stärke**, v. 56, n. 1, p. 1–5, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/star.200300258>>

TEMPLETON, D. W. et al. Assessing corn stover composition and sources of

variability via NIRS. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 621–639, 2009.

U.S. DEPARTMENT OF ENERGY OFFICE OF SCIENCE. **U.S Department of Energy Genome Programs image gallery**. 2007. Disponível em: <<https://genomics.energy.gov/>>. Acesso em: 13 maio. 2018.

UÇKUN KIRAN, E.; 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.

VALLS, C. et al. Antioxidant activity of xylooligosaccharides produced from glucuronoxylan by Xyn10A and Xyn30D xylanases and eucalyptus autohydrolysates. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, n. December 2017, p. 43–50, 2018.

VÁZQUEZ, M. J. et al. Xylooligo- saccharides : manufacture and applications. n. 11, p. 387–393, 2000.

VELKOVA, Z.; GOICHEVA, V. Optimization of nutritive media composition for hylanase production by aspergillus awamori. **Bulgarian Journal of ...**, v. 13, p. 651–656, 2007. Disponível em: <<http://agrojournal.org/13/06-04-07.pdf>>

WAN AZELEE, N. I. et al. High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 11–19, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.11.038>>

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.075>>

WANG, F. et al. Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from rice straw by feed xylanase with ultrafiltration. **Archives of Biological Sciences**, v. 63, n. 1, p. 161–166, 2011.

WANG, J. et al. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.005>>

WANG, Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, n. 1, p. 8–12, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2008.09.001>>

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305–317, 1988.

WU, Y. B.; LIN, K. W. Influences of xylooligosaccharides on the quality of Chinese-style meatball (kung-wan). **Meat Science**, v. 88, n. 3, p. 575–579, 2011.

XU, Z. et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. **Biomass and**

**Bioenergy**, v. 31, n. 2–3, p. 162–167, 2007.

YAMADA, K. et al. Health claim evidence requirements in Japan. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1192S–8S, 2008.

YANG, C. H.; YANG, S. F.; LIU, W. H. Production of xylooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 3955–3959, 2007.

YANG, R. et al. Aqueous extraction of corncob xylan and production of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 6, p. 677–682, 2005.

YOSHINO, K.; HIGASHI, N.; KOGA, K. Inhibitory effects of acidic xylooligosaccharide on stress-induced gastric inflammation in mice. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi Journal Of The Food Hygienic Society Of Japan**, v. 47, n. 6, p. 284–287, 2006. Disponível em: <<http://doi.acm.org/10.1145/357360.357366>>

ZHANG, H.; XU, Y.; YU, S. Co-production of functional xylooligosaccharides and fermentable sugars from corncob with effective acetic acid prehydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 343–349, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.094>>

ZHANG, Z. et al. **Biodegradable Polymers**. Fourth Edi ed. : Elsevier, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9>>

ZHU, Y. et al. Enzymatic production of xylooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 130, n. 1–3, p. 586–598, 2006.