

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO FIBRA DE SOJA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
HEMICELULOLÍTICAS POR *Aspergillus nidulans* RECOMBINANTE E APLICAÇÃO  
NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

**Gabriela Feix Pereira**

Porto Alegre

2017

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**APROVEITAMENTO DO RESÍDUO FIBRA DE SOJA NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS  
LIGNOCELULÓSICAS POR *Aspergillus nidulans* RECOMBINANTE E APLICAÇÃO  
NA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

**Gabriela Feix Pereira**

Bacharel em Biotecnologia-UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientadora: Dra. Sabrina Gabardo

Porto Alegre

2017

Gabriela Feix Pereira

## DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS** Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 05/05/17

Homologada em: \_\_/\_\_/\_\_

Pela banca examinadora:

Por:

**Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub**

**Prof. Dr. Adriano Brandelli**

Orientador – PPGCTA/UFRGS

Coordenador – PPGCTA/UFRGS

**Dra. Sabrina Gabardo**

**Prof. Dr. Vitor Manfroi**

Co-orientadora

Diretor – ICTA/UFRGS

**Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz**

Docente - ICTA/UFRGS

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilian Hickert Cruz**

Docente – UERGS

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza**

Docente – UNIVATES

Porto Alegre

2017

## DEDICATÓRIA

“À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e preocupação foram o estímulo para seguir. Pai, sua presença significou segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa jornada. ”

## **AGRADECIMENTOS**

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub, pelos ensinamentos e por me guiar nessa caminhada. Fica aqui registada a minha profunda gratidão.

À minha co-orientadora, Dra. Sabrina Gabardo, pela iniciação no mundo da pesquisa, pela amizade e disposição em ajudar.

Aos colegas do laboratório de Biotecnologia, pelo auxílio e amizade ao longo deste projeto.

Aos professores e funcionários do ICTA que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo auxílio financeiro.

E finalmente, à minha mãe Lisane, meu pai Ubirajara, meu irmão Victor, minha avó Lori e meu namorado William, por serem meu porto seguro.

### CIP - Catalogação na Publicação

Feix Pereira, Gabriela  
APROVEITAMENTO DO RESÍDUO FIBRA DE SOJA NA  
PRODUÇÃO DE ENZIMAS HEMICELULOLÍTICAS POR  
Aspergillus nidulans RECOMBINANTE E APLICAÇÃO NA  
PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS / Gabriela Feix  
Pereira. -- 2017.  
80 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.  
Coorientadora: Sabrina Gabardo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. fibra de soja. 2. cultivo em estado sólido. 3.  
xilanase. 4. arabinofuranosidase. 5. xilo-  
oligosacarídeos. I. Záchia Ayub, Marco Antônio ,  
orient. II. Gabardo, Sabrina, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## RESUMO

A fibra de soja (FS) é um resíduo agroindustrial lignocelulósico proveniente do processamento da soja, que, apesar de apresentar potencial para aproveitamento em bioprocessos, é empregado em produtos com baixo valor agregado, como ração animal. A fibra apresenta composição rica em hemicelulose e baixa concentração de lignina, o que destaca ainda mais seu potencial como substrato em bioprocessos. Tendo em vista o presente contexto, este trabalho teve como objetivo o aproveitamento da fibra de soja na produção das enzimas hemicelulolíticas xilanase e arabinofuranosidase por meio do cultivo em estado sólido de duas linhagens de *Aspergillus nidulans* recombinantes, e a subsequente aplicação dessas enzimas na produção de xilo-oligossacarídeos (XOS). A produção das enzimas foi realizada em três etapas avaliando-se os seguintes fatores: umidade, onde quatro diferentes níveis de umidade foram testados (53 %, 68 %, 76 % e 81 %), adição ou não de tampão HEPES e presença de maltose em duas concentrações (2% e 6 %). As maiores atividades enzimáticas ocorreram em cultivo com umidade de 68 %, presença do tampão HEPES (100 mM), ausência de maltose e em tempos de cultivo de 72 h para xilanase e 96 h para arabinofuranosidase. A produção de XOS foi obtida a partir da aplicação dos extratos enzimáticos brutos obtidos na etapa anterior tendo como substrato a fibra de soja. As produções de xilobiose (X2), xilotriose (X3) e xilotetraose (X4) foram otimizadas por planejamento composto central (DCCR), gerando uma superfície de resposta a partir das variáveis temperatura e concentração de xilanase. A melhor condição obtida (50 °C e 117 U·g<sup>-1</sup> de FS) foi utilizada para avaliar a produção de XOS pela adição em conjunto do extrato bruto contendo xilanase com o extrato bruto contendo diferentes concentrações de arabinofuranosidase. O rendimento na produção de XOS neste trabalho

foi de 28,8 % (p/p), sendo 138,36 mg·g<sup>-1</sup> de xilana a concentração de xilobiose, 96,96 mg·g<sup>-1</sup> de xilana a concentração de xilotriose e 53,04 mg·g<sup>-1</sup> de xilana a concentração de xilotetraose, todas em 9 h de reação. A fibra de soja demonstrou ser um substrato adequado para a produção de xilanase e arabinofuranosidase, sendo produzidas altas concentrações de ambas as enzimas. Através da aplicação dessas enzimas obteve-se alta conversão de xilana em diferentes XOS, principalmente aqueles com baixo grau de polimerização, utilizados industrialmente como ingrediente alimentar.

Palavras-chave: fibra de soja, cultivo em estado sólido, xilanase, arabinofuranosidase, xilo-oligossacarídeos.



## ABSTRACT

Soybean fiber (SF) is a lignocellulosic agroindustrial residue from the processing of soybean, which, despite having potential in bioprocesses, is used in products with low added value. The fiber is rich in hemicellulose and low concentrations of lignin, which further highlights its potential as a bioprocesses substrate. Considering present context, this work had as objective the use of soybean fiber in production of hemicellulolytic enzymes xylanase and arabinofuranosidase under solid state cultivation of two strains of recombinant *Aspergillus nidulans*, and the subsequent application of these enzymes in the production of xylooligosaccharides (XOS). Enzyme production was performed in three stages, with the following factors: moisture, where four different moisture levels were tested (53 %, 68 %, 76 % and 81 %), addition or absence of HEPES buffer and presence of maltose in two concentrations (2 % and 6 %). The major enzymatic activities occurred in cultures with moisture of 68 %, presence of HEPES buffer (100 mM), absence of maltose and at 72 h culture times for xylanase and 96 h for arabinofuranosidase. The production of XOS was obtained from the application of the crude enzymatic extracts obtained in the previous step with soybean fiber as the substrate. The production of xylobiose (X2), xylotriose (X3), and xyloetraose (X4) was optimized by central composite design (CCD), generating a response surface from the temperature and xylanase concentration variables. The best condition obtained (50 °C and 117 U·g<sup>-1</sup> of SF) Was used to evaluate XOS production by the addition of the crude xylanase-containing crude extract containing the crude extract containing different concentrations of arabinofuranosidase. The yield of XOS in this work was 28.8 % (w/w), being the concentration of xylobiose 138.36 mg·g<sup>-1</sup> of xylan, xylotriose concentration 96.96 mg·g<sup>-1</sup> of xylan, and xyloetraose concentration 53.04 mg·g<sup>-1</sup> of xylan in 9 h of reaction. Soybean fiber has been shown to be a suitable substrate for the production of xylanase and

arabinofuranosidase, with high concentrations of both enzymes produced. Through the application of these enzymes, high conversion of xylan to different XOS was achieved, especially those with low degree of polymerization, used industrially as a food ingredient.

Key words: soybean fiber, solid-state cultivation, xylanase, arabinofuranosidase, xylooligosaccharides.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática da hemicelulose de palha de milho (Adaptado de SAULNIER <i>et al.</i> , 1995).....	6
Figura 2. Produção da fibra de soja.....	8
Figura 3. Ponto de clivagem da xilana por $\beta$ -1,4-endoxilanase (Adaptado de GOLDMAN, 2009).....	13
Figura 4. Estrutura primária da arabinana (SAHA, 2000). ....	15
Figura 5. Vetor pEXPYR para recombinação de <i>A. nidulans</i> . (SEGATO <i>et al.</i> , 2012).....	18

### CAPÍTULO II

Figure 1. Enzymatic activity of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) in soybean fiber under SSC and different moistures.....	34
Figure 2. Influence of buffer addition on pH variation and enzymatic activity of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) of two strains <i>A. nidulans</i> A773 grown under culture moisture of 68 %, at 37 °C and 120 h.. ....	35
Figure 3. Influence of the addition of two concentrations of the maltose inducer on the enzymatic activity of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) of two strains <i>A. nidulans</i> A773 grown under culture moisture of 68 %, at 37 °C, 120 h, with buffer HEPES 100 mM. ....	36
Figure 4. Secretion of proteins by <i>A. nidulans</i> A773 grown under optimum conditions. Analysis of arabinofuranosidase (AbfB) and xylanase (XynC) by SDS-PAGE.....	37

Figure 5. Contour plot of the parameters temperature and concentration of xylanase for the production of total XOS.....39

Figure 6. Kinetics of the production of XOS under optimal conditions (50 °C and 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate).....41

Figure 7. Production of xylose (A), xylobiose (B), xylotriose (C), and xylotetraose (D) by different enzymatic systems.....42

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Table 1. Chemical composition of soybean fiber (%).....	32
Table 2. Coded values and real values of the CCD along with the observed values of total XOS production. ....	38
Table 3. Statistical analysis of CCD.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CES</b>	Cultivo em estado sólido
<b>GP</b>	Grau de polimerização
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfônico
<b>DCCR</b>	Planejamento composto central rotacional
<b>GH</b>	Glicosil-hidrolase
<b>XOS</b>	Xilo-oligossacarídeos
<b>GOS</b>	galacto-oligossacarídeos
<b>FOS</b>	fruto-oligossacarídeos

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b><u>CAPÍTULO I</u></b>	
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
1. Resíduos lignocelulósicos.....	4
1.1. Fibra de soja.....	7
2. Cultivo em estado sólido e suas aplicações.....	8
3. Enzimas hemicelulolíticas .....	12
3.1. $\beta$ -1,4-endoxilanasas .....	13
3.2. $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas.....	14
3.3. Enzimas hemicelulolíticas recombinantes .....	16
4. Oligossacarídeos .....	18
4.1. Xilo-oligossacarídeos e suas aplicações .....	19
<b><u>CAPÍTULO II</u></b>	
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b><u>CAPÍTULO III</u></b>	
<b>DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## INTRODUÇÃO

A produção biotecnológica de compostos de interesse visando enriquecer alimentos vem sendo estimulada nos últimos anos. A crescente demanda do mercado consumidor por produtos rotulados como naturais e saudáveis, associada à necessidade de uma produção de alimentos ambientalmente responsável, onde a geração de resíduos seja minimizada, têm impulsionado estudos a desenvolver tecnologias alternativas para a condução de novos processos biotecnológicos, possibilitando a geração de produtos com alto valor agregado.

O setor agroindustrial produz expressivas quantidades de resíduos sólidos, resultando na preocupação em relação ao seu descarte. Essa problemática tem demonstrado a necessidade de utilização destes materiais como fontes alternativas de matérias-primas em novos processos que, além de diminuir o dano ambiental causado pelo descarte incorreto, possam agregar valor a produtos que venham a ser produzidos (LAUFENBERG *et al.*, 2003; SÁNCHEZ, 2009). Entre os resíduos agroindustriais encontra-se a fibra de soja. O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo e o processamento desta semente gera uma grande quantidade de fibra de soja, que, segundo estimativas, alcança cerca de 10 mil toneladas por ano. O potencial desse resíduo permanece pouco explorado, pois apenas uma pequena parcela da quantidade gerada é aproveitada, e, ainda assim, sendo utilizada em produtos com pouco valor industrial, como a ração animal. A composição rica em hemicelulose e baixa concentração de lignina demonstra o potencial para utilização como substrato em bioprocessos para a produção de diferentes metabólitos e compostos, como enzimas e prebióticos (ASGHER *et al.*, 2013; IQBAL *et al.*, 2013).



Bioprocessos para produção de enzimas envolvendo resíduos agroindustriais apresentam vantagens quando utilizado o cultivo em estado sólido. Devido à pouca umidade do meio, os microrganismos mais adaptáveis para esse tipo de cultivo são os fungos filamentosos (PANDEY, 2003). Fungos como os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* destacam-se devido à capacidade de secretar no meio enzimas de interesse industrial, como a xilanase e a arabinofuranosidase. Com o avanço das técnicas de bioprocessos aliadas à engenharia genética, vislumbrou-se a possibilidade de adaptar a expressão dessas enzimas em organismos modelo, como o *Aspergillus nidulans*, facilitando a utilização e compreensão dos processos, e, conseqüentemente, a produtividade (SEGATO *et al.*, 2012).

A xilanase e a arabinofuranosidase são responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas na cadeia de arabinoxilana, resultando na formação de monômeros de xilose, arabinose e xilo-oligossacarídeos (XOS). Os XOS de grau de polimerização (GP) 2-4 são os que oferecem maior potencial para aplicação como ingrediente em alimentos funcionais, já que possuem características prebióticas e oferecem benefícios à saúde de quem os consome. Por agirem na regulação da microbiota intestinal, contribuem para a diminuição da possibilidade de desenvolvimento de câncer de intestino e doenças cardiovasculares e, ainda, agem sobre o sistema imunológico como anti-inflamatório (LI *et al.*, 2008; REDDY and KRISHNAN, 2016; VAZQUEZ *et al.*, 2000). Entre os oligossacarídeos, os XOS possuem a vantagem de serem obtidos através de fontes altamente disponíveis e de baixo custo, como a fibra de soja, e de possuírem propriedades funcionais semelhantes ou superiores às dos demais compostos (DE MENEZES *et al.*, 2009).

Neste contexto, o **objetivo principal** do presente estudo visa o aproveitamento da fibra de soja em dois bioprocessos distintos: a produção das enzimas xilanase e arabinofuranosidase pelo fungo *A. nidulans* recombinante e a aplicação dessas enzimas para a produção de XOS.

Mais detalhadamente, os **objetivos específicos** desse trabalho são:

1. Caracterizar quimicamente o resíduo agroindustrial fibra de soja;
2. Otimizar as condições para produção das enzimas xilanase e arabinofuranosidase, através do cultivo em estado sólido a partir de *A. nidulans* recombinante, em fibra de soja;
3. Aplicar o extrato bruto contendo xilanase recombinante, obtido na etapa anterior para produção de XOS, utilizando fibra de soja como substrato;
4. Otimizar a produção de XOS a partir das variáveis temperatura e concentração de xilanase em um delineamento composto central rotacional (DCCR);
5. Avaliar a produção de XOS através da aplicação dos extratos brutos contendo xilanase e arabinofuranosidase concomitantemente.

Este trabalho encontra-se estruturado em capítulos. O Capítulo I apresenta o embasamento teórico pertinente ao desenvolvimento deste estudo. O Capítulo II encontra-se na forma de artigo científico, onde constam as metodologias empregadas na condução dos experimentos, bem como a análise e discussão dos resultados. No Capítulo III são discutidas as considerações finais deste trabalho, as principais conclusões e as perspectivas.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Resíduos lignocelulósicos

Devido à grande quantidade gerada de resíduos agroindustriais lignocelulósicos, existe um interesse crescente no aproveitamento destes materiais. Grande parte desses resíduos, gerados através de agroindústrias, é descartado de forma incorreta, ocasionando problemas ambientais. Outra parcela deste material é destinada à queima de biomassa, desperdiçando potenciais fontes de nutrientes que poderiam ser utilizados em bioprocessos para obtenção de produtos com alto valor agregado. O uso como substrato em processos tecnológicos além de ser economicamente viável, levando-se consideração a origem do material, pode auxiliar na solução dos problemas ambientais decorrentes do descarte incorreto destes resíduos no meio-ambiente (ANWAR *et al.*, 2014; IQBAL *et al.*, 2013).

A composição química de resíduos lignocelulósicos é bastante interessante ao ponto de vista biotecnológico. Geralmente esses resíduos são compostos de 20 % a 60 % de celulose, 20 % a 30 % de hemicelulose e 15 % a 30 % de lignina. O bagaço de cana, farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contém cerca de 25 % a 40 % de celulose, 20 % a 35 % de hemicelulose e 15 % a 35 % de lignina. A lignocelulose, principal componente estrutural deste tipo de resíduo, é uma fonte de matéria renovável e é composta basicamente por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (BEHERA and RAY, 2016; IQBAL *et al.*, 2013).

A celulose é o material orgânico mais abundante na terra, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas (ARAÚJO *et al.*, 2008). A unidade repetitiva da celulose

é formada por duas moléculas de glicose esterificadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas. Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência de a celulose formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento. A celulose de algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70 %, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de cristalinidade ao redor de 40 % (CASTRO, 2010).

A hemicelulose é o segundo polímero mais comum no meio ambiente, representando cerca de 20 % a 30 % da biomassa lignocelulósica. As hemiceluloses são genericamente caracterizadas como uma família de polissacarídeos presentes na parede celular vegetal, sendo definidas como polissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser extraídos da parede celular de vegetais superiores. Estruturalmente as hemiceluloses são polímeros heterogêneos compostos por xilanas. As xilanas são heteropolissacarídeos com cadeias homopoliméricas compostas por ligações 1,4 em unidades  $\beta$ -D-xilopiranosose. Além da xilose, as xilanas podem conter arabinose, ácido glucurônico, ácido acético, ácido ferúlico e ácido cumárico, diferenciando sua composição de acordo com a fonte, como mostrado na Figura 1 (GAO *et al.*, 2008).

A lignina está associada à celulose e à hemicelulose na composição de materiais lignocelulósicos e atua ligando as fibrilas e como um agente enrijecedor no interior das fibras. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência

de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose (MUSSATTO *et al.*, 2012).

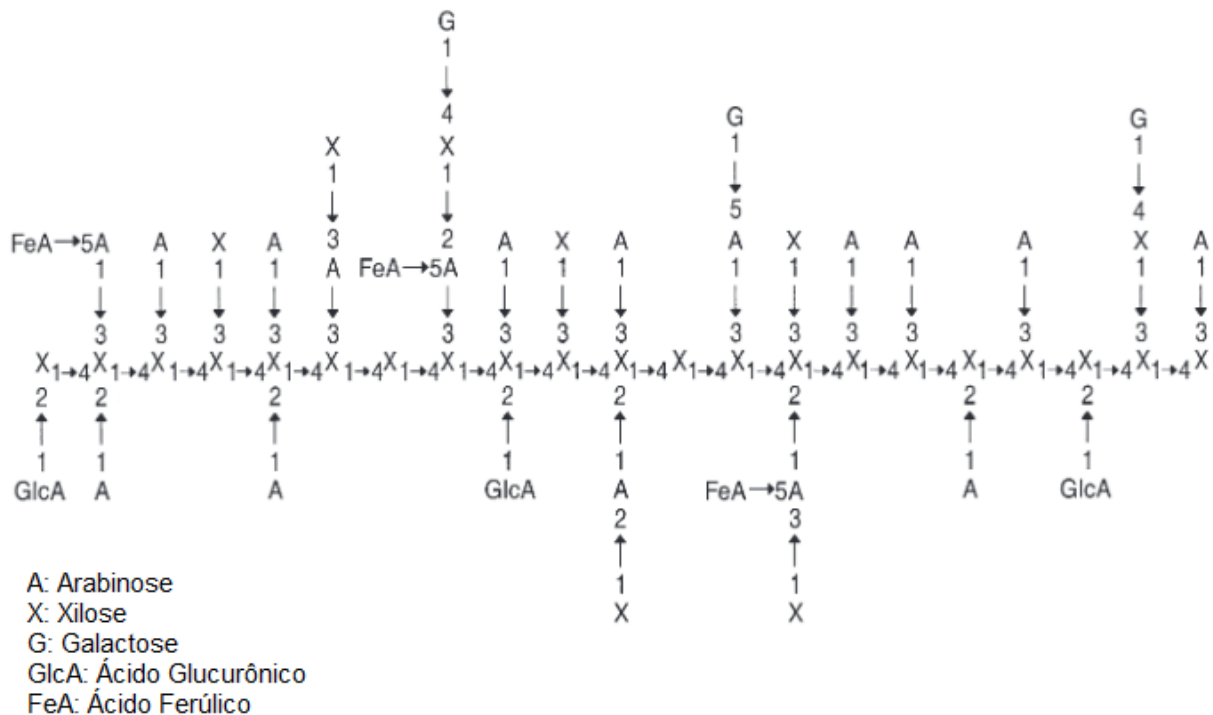


Figura 1. Representação esquemática da hemicelulose de palha de milho (Adaptado de SAULNIER *et al.*, 1995).

Entre os materiais lignocelulósicos encontram-se as fibras vegetais. Algumas fibras ocorrem espontaneamente na natureza, outras são cultivadas como atividade agrícola e ainda há aquelas que são resíduos gerados, principalmente, pela agroindústria. Uma grande parte destas fibras é descartada, outra parcela é destinada à queima de biomassa, e ainda uma terceira parte é utilizada industrialmente em produtos pouco valorosos, desperdiçando potenciais fontes de nutrientes que poderiam ser utilizados em bioprocessos para obtenção de produtos de maior interesse comercial. Estruturalmente, as fibras

vegetais são cadeias de fibrilas de celulose mantidas coesas por uma matriz constituída de lignina e hemicelulose (AREVALO-GALLEGOS *et al.*, 2017; IQBAL *et al.*, 2013).

As tendências internacionais no estudo de fibras lignocelulósicas têm dado ênfase no aproveitamento através da conversão em biopolímeros, principalmente por estas fibras possuírem potenciais aplicações como polímeros biodegradáveis. Porém, estas fibras vegetais também apresentam potencial para aplicação em bioprocessos, devido às suas composições com altas concentrações de polissacarídeos e baixas concentrações de lignina, dando origem a produtos como enzimas e oligossacarídeos para utilização na indústria de alimentos (GUERRIERO *et al.*, 2016).

### **1.1. Fibra de soja**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja (*Glycine max*), sendo precedido apenas pelos Estados Unidos, com produção de 97 milhões de toneladas em 2015 (USDA, 2015). A soja é um grão composto por um alto teor de proteínas e óleo, sendo utilizado, por essa razão, em diversos tipos de alimentos. O processamento do grão de soja foi se desenvolvendo e disseminando ao longo dos anos, o que contribuiu para o surgimento de novos produtos, como a proteína isolada de soja.

A etapa de produção de proteína isolada de soja (Figura 2) durante o beneficiamento dos grãos gera, somente em uma única indústria, responsável por uma grande contribuição na produção deste resíduo no Brasil, cerca de 10 mil toneladas anuais de fibra de soja. Normalmente, esse material tem destino incerto, parte dele pode ser descartado, outra parte pode ser incorporada à alimentação de animais suínos e bovinos (informação proveniente da indústria DUPONT, 2002).

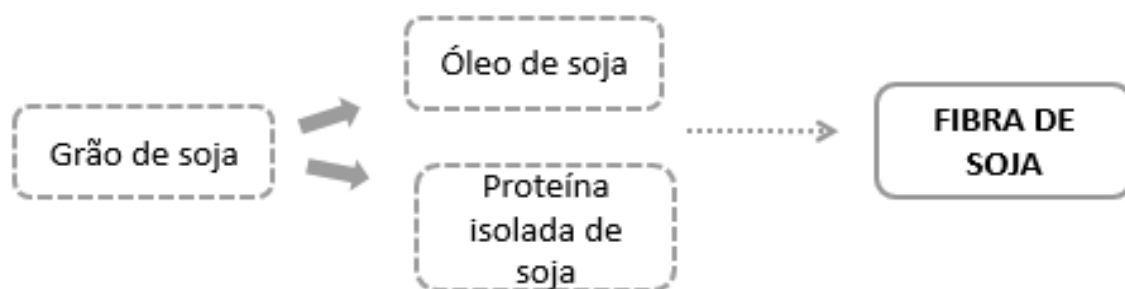


Figura 2. Produção da fibra de soja

A fibra de soja é um resíduo que apresenta composição adequada para uso em bioprocessos. A fibra é formada por aproximadamente 16 % de celulose e 23 % de hemicelulose e 28 % de proteína (HECK *et al.*, 2002), o que indica um alto nível de xilana e, conseqüentemente, um potencial substrato para produção de enzimas de interesse comercial e também de oligossacarídeos para aplicação em alimentos funcionais. Além disso, como a fibra de soja é derivada do grão da soja, a concentração de lignina tende a ser baixa, o que possibilita a utilização direta como substrato, sem a necessidade de uma etapa prévia de extração de xilana. Apesar de todas essas potencialidades, a fibra de soja ainda é um resíduo pouco explorado tecnologicamente, sendo importante o desenvolvimento de processos capazes de aproveitar de forma eficiente este material.

## 2. Cultivo em estado sólido e suas aplicações

O cultivo em estado sólido (CES) é definido como o cultivo de microrganismos em substratos sólidos insolúveis na ausência (ou quase) de água livre. Nesse caso, o substrato fornece umidade suficiente para o desenvolvimento do microrganismo e funcionamento de seu metabolismo (PANDEY, 2003).

Uma das características desse tipo de cultivo é a fase sólida atuar como fonte de carbono, nitrogênio e demais componentes, além de servir como suporte para o crescimento microbiano. Por esse motivo é interessante que se utilizem substratos com composição rica em nutrientes essenciais e, que, ao mesmo tempo, apresentem boa porosidade, para que o ar necessário ao desenvolvimento microbiano possa chegar ao microrganismo (PANDEY, 2003). Entre as vantagens da utilização do CES estão a utilização de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, o baixo requerimento de água e energia durante o cultivo, a baixa possibilidade de contaminação, a concentração e maior estabilidade dos produtos e a alta produtividade. Algumas desvantagens como a dificuldade no controle dos parâmetros e a heterogeneidade ainda são inerentes ao processo (HÖLKER *et al.*, 2004; SINGHANIA *et al.*, 2009).

Vários fatores afetam o CES como a forma de inóculo, a umidade, o pH e a temperatura. Esses fatores são específicos para cada processo e podem variar com o emprego de diferentes substratos, microrganismos e escalas utilizados (KRISHNA, 2005).

Quanto ao inóculo fúngico, existem várias formas de prepará-lo. Para identificar o tipo de inóculo mais adequado a ser empregado, tanto a natureza dos fungos envolvidos como a finalidade dos estudos têm de ser levados em consideração. Os métodos de preparação de inóculo normalmente aplicados para CES incluem suspensão de esporos, disco de micélios, suspensão de micélios e substratos pré-inoculados (YOON *et al.*, 2014). Outro fator relacionado ao inóculo é o tamanho. O tamanho do inóculo determina a biomassa produzida. Uma concentração adequada de inóculo, relacionada ao substrato, é de grande importância para suprir a necessidade metabólica dos microrganismos e garantir



a geração de produtos de interesse, sem esgotar os nutrientes prematuramente (SANDHYA *et al.*, 2005).

O teor de umidade ótimo em um substrato sólido está intimamente relacionado com a nutrição correta e difusão de oxigênio durante o cultivo. O alto teor de umidade diminui a porosidade, com a perda da estrutura das partículas, interferindo na difusão do oxigênio. Ao contrário, o baixo teor de umidade pode limitar a solubilidade dos nutrientes, dificultando o desenvolvimento de microrganismos (ABU YAZID *et al.*, 2017; CASTRO and SATO, 2015).

Os fatores pH e temperatura podem variar no decorrer do cultivo. As variações resultam do consumo de substrato e/ou produção de metabólitos. Eles são indicadores de mudanças na atividade metabólica (BELLON-MAUREL *et al.*, 2003). A geração de calor durante o crescimento microbiano deve ser controlada, pois altas temperaturas prejudicam o cultivo. Ao mesmo tempo, o controle de pH durante o CES é complexo, devido a heterogeneidade e consistência do substrato. Uma maneira de manter o pH pouco variável é a utilização de soluções tampão para umidificação do substrato (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Bactérias, leveduras e fungos são capazes de crescer nesse tipo de cultivo. Contudo, os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a essa condição, já que necessitam de pouca água (medido como atividade de água,  $a_w$ ) para o seu desenvolvimento e não são prejudicados com altas concentrações de sólidos no meio. Além disso, seu crescimento por meio de hifas favorece a colonização no substrato sólido (DURAND, 2003; HÖLKER *et al.*, 2004). Esse fato se traduz na grande quantidade de aplicações e produtos obtidos pelo emprego desses microrganismos em CES.

Enzimas industriais foram, entre os vários produtos produzidos por CES, o de mais sucesso a nível comercial. Empresas ao nível mundial como a Novozymes (Dinamarca), especializada em comercialização de enzimas para uso em detergentes, alimentos e bebidas, e a DuPont (Estados Unidos), especializada em enzimas para uso industrial, como as lignocelulósicas, são algumas das principais fornecedoras desses produtos. Os esforços continuam em busca de se obter uma elevada produção de enzimas a menores custos, a partir de novas fontes microbianas, melhoria dos processos e engenharia genética (THOMAS *et al.*, 2013).

PATHAK e colaboradores utilizaram o fungo *Trichoderma harzianum* para produzir xilanase e celulase para aplicação no aproveitamento de resíduos de papel. Dois tipos de cultivos foram testados: cultivo submerso e cultivo em estado sólido. O CES com farelo de trigo foi a metodologia mais promissora encontrada no trabalho. Esse cultivo ocorreu sob condições de temperatura 34 °C, pH 6,0, relação de umidade 1:3 e tempo de cultivo de 4 dias. Curvas de estabilidade foram realizadas e as atividades de celulase e xilanase foram consideradas máximas a pH 5,5 e temperatura 55 °C a 60 °C com estabilidade de até 6 h (PATHAK *et al.*, 2014).

CSISZAR, SZAKACS e KOCZKA investigaram a biopreparação de tecidos de algodão por CES, utilizando *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus giganteus* e *Trichoderma virens*. As fibras de algodão são ricas em lignocelulose, celulose e hemicelulose, um excelente substrato para a produção de enzimas hemicelulolíticas como a xilanase. Os resultados indicaram que o fungo *Aspergillus oryzae* produziu, em maior concentração, enzimas hidrolíticas e oxidativas, bem como grande redução de fragmentos

encontrados nos tecidos brutos. A concentração de xilanase produzida nesse caso foi de 326 U·g<sup>-1</sup> de substrato (CSISZAR *et al.*, 2006).

### 3. Enzimas hemicelulolíticas

Entre a gama de enzimas que podem ser produzidas em CES estão aquelas responsáveis pela degradação da cadeia de hemicelulose. As propriedades químicas e estruturais da hemicelulose podem ser influenciadas pela presença de uma grande diversidade de resíduos, que, dessa forma, necessitam de uma série de enzimas para a sua lise total. Uma degradação eficiente requer interações sinérgicas ou cooperativas entre as enzimas responsáveis por clivar as diferentes ligações (SHAHZADI *et al.*, 2014).

O sistema enzimático responsável pela degradação da hemicelulose, com xilana sendo a estrutura principal, é composto, principalmente, por duas classes enzimáticas: as  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que são capazes de clivar o esqueleto de xilana em oligossacarídeos menores, e as  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37), que são responsáveis por clivar esses oligossacarídeos em monômeros ou dímeros. Ambas as classes de enzimas, bem como a codificação genética em diversos organismos tem sido caracterizada. Além dessas duas classes, existe a possibilidade da presença da  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), que remove os resíduos de arabinose presentes no C-3 das unidades de xilose;  $\beta$ -glucuronidase, acetilxilana esterase,  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$ -galactosidase, acetil-manana esterase (BRETHAUER and STUDER, 2015; SAHA, 2003). As enzimas são classificadas na base de dados de Enzimas Ativas de Carboidratos (CAZy) ([www.cazy.org](http://www.cazy.org)) com base nas suas similaridades de sequências de aminoácidos (TERRAPON *et al.*, 2017).

### 3.1. $\beta$ -1,4-endoxilanasas

As  $\beta$ -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8) são enzimas extracelulares, e, juntamente com as  $\beta$ -xilosidasas, fazem parte de um vasto grupo de enzimas envolvidas na produção de xilose, uma fonte primária de carbono para o metabolismo celular de diversos organismos. Metabolicamente, as  $\beta$ -1,4-endoxilanasas catalisam a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto da xilana (Figura 2), resultando na diminuição do grau de polimerização deste substrato e formação de XOS. De modo geral, as xilanasas são glicoproteínas monoméricas, com massas moleculares a partir de 20 kDa (PATEL and SAVANTH, 2015).

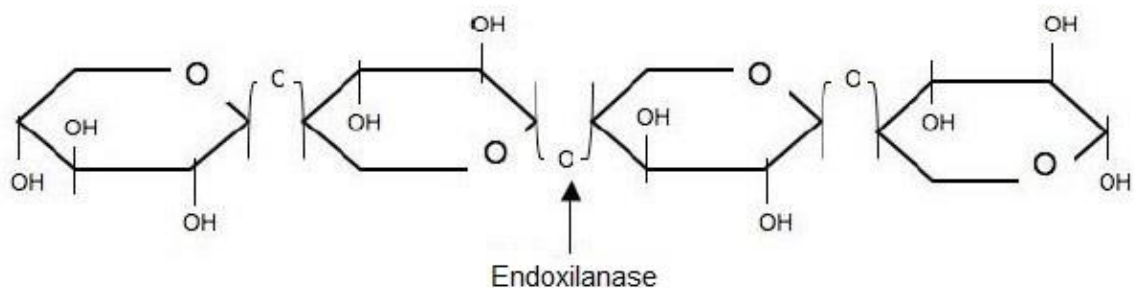


Figura 3. Ponto de clivagem da xilana por  $\beta$ -1,4-endoxilanasase (Adaptado de GOLDMAN, 2009).

As xilanasas pertencem à família das glicosil-hidrolases (GH) e grande parte delas compõem duas principais famílias: a família GH 10 e a família GH 11. As xilanasas da família GH 10 são maiores, mais complexas, apresentam uma topologia em barril, e em alguns casos são altamente glicosiladas. Já as xilanasas pertencentes à família GH 11 são menores (< 30 kDa), mais estruturadas, não são glicosiladas, possuem dois glutamatos que agem como sítios catalíticos e possuem mais especificidade em relação à xilana. De acordo com essas características, o grupo 11 de xilanasas é o que apresenta o maior interesse biotecnológico (KULKARNI *et al.*, 1999).

Endoxilanases têm sido utilizadas para melhorar a qualidade de alimentos e bebidas, tais como produtos de panificação, sucos e cervejas. No caso de massas e pães acredita-se que a capacidade das xilanases de hidrolisar a arabinoxilana favorece a redistribuição de água, melhorando assim a textura, o volume e a estabilidade das massas. Nos sucos de fruta e vinhos as xilanases atuam na extração, clarificação e estabilização, e no processo de liquefação de frutas. Na fabricação de cerveja ocorre liberação de longas cadeias de arabinoxilanas que aumentam sua viscosidade, podendo deixá-la mais turva. As xilanases auxiliam na solubilização das xilanas à oligossacarídeos menores, diminuindo a viscosidade e, conseqüentemente, eliminando a turbidez (KRONBAUER *et al.*, 2007; MOTTA *et al.*, 2013).

As xilanases comerciais são produzidas, principalmente, no Japão, por indústrias como a Nikko Chemicals, na Finlândia, pela Alko Group, na Holanda, pela DSM, na Dinamarca, pela Novo Nordisk e nos Estados Unidos, pela Sigma Aldrich. As linhagens mais utilizadas para a produção industrial incluem *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis* e *Streptomyces lividans*. Entre os fungos filamentosos, os gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* são destaque na produção de xilanase (POLIZELI *et al.*, 2005).

### 3.2. $\alpha$ -L-arabinofuranosidases

Assim como as xilanases, as arabinofuranosidase são enzimas hemicelulolíticas, atuando, mais especificamente na hidrólise de polissacarídeos que contêm resíduos com terminais não redutores de arabinose. Estas enzimas podem hidrolisar ligações 1→3 e 1→5 de arabinana (Figura 3) (SAHA, 2000).

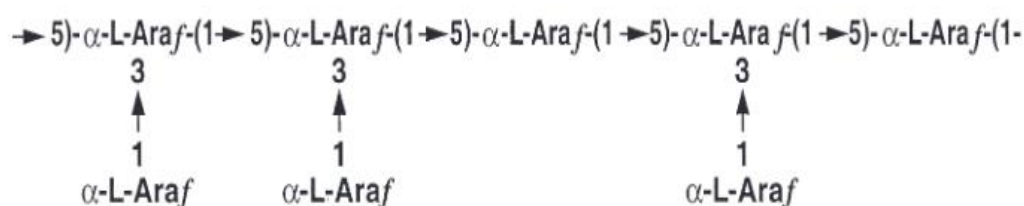


Figura 4. Estrutura primária da arabinana (SAHA, 2000).

A ausência dessa classe de enzimas representa uma potencial limitação na taxa de degradação de xilana, particularmente, xilanas provenientes de resíduos agrícolas, como a fibra de milho, farelo de soja e palha de arroz, o que torna necessária sua presença quando se busca uma degradação total de xilana (SAHA *et al.*, 1999). A ação destas enzimas e a especificidade com o substrato depende, diretamente, do microrganismo que às origina. A arabinofuranosidade intracelular de *A. niger*, por exemplo, é capaz de liberar somente um terminal  $\alpha$ -1,3 ligado a resíduos de arabinose, enquanto a enzima extracelular deste microrganismo é capaz de liberar terminais  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,5 destes resíduos (DE VRIES *et al.*, 2000).

Em relação à classificação, existem cinco famílias de arabinofuranosidase: 3, 43, 51, 54 e 62. O grupo das GH 54 é relativamente pequeno, com menos de 100 sequências, divididas igualmente entre bactérias e eucariotos. Todas as 22 enzimas já caracterizadas são proteínas fúngicas altamente conservadas que exibem exclusivamente atividade de arabinofuranosidase em substratos naturais. Apesar de pertencerem a mesma família, cada arabinofuranosidase apresenta características únicas. A arabinofuranosidase AbfB de *A. niger* AbfB, por exemplo, libera a arabinose de arabinoxilooligossacarídeos apenas quando a arabinose está ligada a um resíduo de xilose (KORMELINK *et al.*, 1993). De modo similar, as arabinofuranosidasas expressas por *A. awamori* e *Hypocrea jecorina* clivam o resíduo

de arabinose ligado na posição C3 da xilose final não redutora na xilobiose (KANEKO *et al.*, 1998). De outra forma, a arabinofuranosidase de *Penicillium chrysogenum* atua liberando a arabinose a partir de uma única molécula de xilose (SAKAMOTO *et al.*, 2013).

O emprego industrial de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases pode ser citado em diferentes processos. Dentre estes processos, destacam-se a produção de compostos medicinais como agentes anti-glicêmicos e anti-carcinogênicos, melhoramento do sabor do vinho, aumento da qualidade do pão, tratamento de polpas vegetais, clarificação de sucos, aumento da qualidade de rações, produção de bioetanol e síntese de oligossacarídeos (NUMAN and BHOSLE, 2006).

### **3.3. Enzimas hemicelulolíticas recombinantes**

Para satisfazer necessidades industriais pontuais, enzimas degradadoras de hemicelulose, como xilanase e arabinofuranosidase, devem possuir uma gama de propriedades específicas, tais como estabilidade em ampla faixa de pH e temperaturas, alta atividade específica e resistência a cátions metálicos e produtos químicos (QIU *et al.*, 2010). Outras especificações estão relacionadas às questões econômicas e ambientais do processo, tais como: facilidade de uso, relação custo-benefício e sustentabilidade (TAIBI *et al.*, 2012). Portanto, a maioria das enzimas nativas atualmente utilizadas não possui todas as características desejáveis (VERMA and SATYANARAYANA, 2012).

Para que questões como essas sejam solucionadas, abordagens moleculares devem ser implementadas para a concepção de enzimas com as características necessárias. A expressão heteróloga é a principal ferramenta para a produção de xilanases a nível industrial. A engenharia genética facilita a expressão em larga escala já que as

aplicações industriais exigem enzimas mais baratas, com elevados níveis de expressão e secreção eficiente (AHMED *et al.*, 2009).

Os fungos filamentosos são hospedeiros atraentes para a expressão de proteínas devido à sua capacidade natural de secretar grandes quantidades de proteínas no meio. Os fungos que dominam o mercado como hospedeiros de expressão são *A. niger*, *Aspergillus oryzae* e *T. reesei*. A maioria dos genes de xilanase são expressos em fungos sob sistema homólogo, porém esses microrganismos também são capazes de secretar proteínas heterólogas (AHMED *et al.*, 2009).

Outra espécie, ainda pouco explorada, que apresenta potencial para expressão heteróloga de proteínas é o *A. nidulans*. Esse microrganismo já foi utilizado como hospedeiro para produção de enzimas como a xilanase e a arabinofuranosidase. KIMURA e colaboradores expressaram o gene *xynG1* de *A. oryzae* em *A. nidulans* utilizando seus próprios promotores, o que demonstrou indução na presença de xilana e repressão na presença de glicose (KIMURA *et al.*, 1998).

Seguindo essa linha, para a construção dos fungos utilizados neste trabalho, SEGATO e colaboradores utilizaram uma xilanase codificada pelo gene *xynC* de *Penicillium funiculosum* e uma arabinofuranosidase codificada pelo gene *abfB* de *A. niger* para expressão no fungo *A. nidulans*. O vetor de expressão pEXPYR (Figura 4) foi utilizado para a superexpressão heteróloga das duas enzimas. O vetor contém um promotor induzível por maltose, uma sequência de peptídeo sinal para secreção, duas marcas de seleção que permitem seleção positiva e negativa para resistência a zeomicina e um gene de marca auxotrófica *pyrG* de *A. niger*. Além disso, este sistema de expressão contém sítios de restrição para as enzimas NotI e XbaI, e permite a expressão da proteína conduzida pelo



promotor e secreção da glucoamilase com base na sequência sinal da glucoamilase nativa (SEGATO *et al.*, 2012).

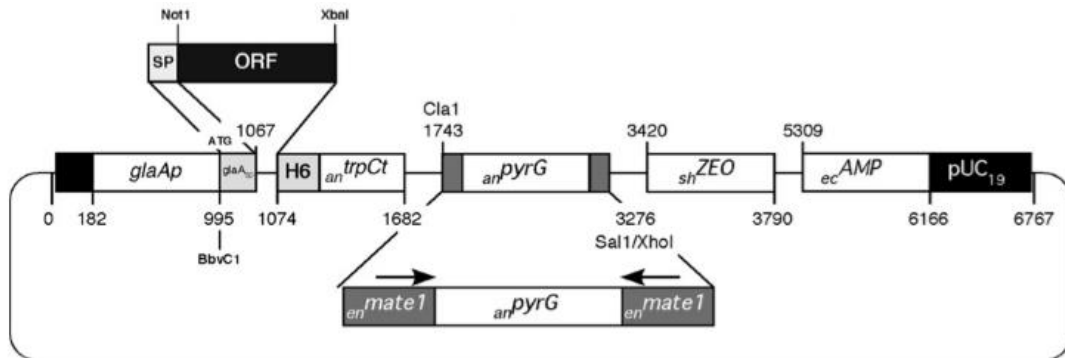


Figura 5. Vetor pEXPYR para recombinação de *A. nidulans*. (SEGATO *et al.*, 2012).

#### 4. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos podem ser formados por uma gama de reações como a transgalactosilação, a transfrutosilação, a despolimerização, entre outras. O resultado dessas reações é a formação de oligossacarídeos com variado GP. O grande potencial para aplicação destes carboidratos na indústria alimentícia tem promovido a condução de novas pesquisas para viabilizar sua obtenção e elucidar suas propriedades biológicas e funcionais, assim como encontrar novas fontes de obtenção dessas moléculas (MOURA *et al.*, 2015).

Os oligossacarídeos são classificados em diferentes grupos dependendo do carboidrato que os origina. Os mais conhecidos são: galacto-oligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS). Os GOS são gerados a partir da lactose pela reação de transgalactosilação por  $\beta$ -galactosidase, os FOS são gerados pela reação de transfrutosilação de resíduos de sacarose ou por hidrólise da inulina e os XOS são derivados da xilana, produtos da reação de despolimerização. Apesar da necessidade

de maiores estudos, pesquisas recentes têm demonstrado que XOS exercem influência positiva em funções fisiológicas através de efeitos prebióticos, sendo comparados a FOS e inulina (MUDGIL and BARAK, 2013; SINGH *et al.*, 2015).

#### **4.1. Xilo-oligossacarídeos e suas aplicações**

Os XOS são oligossacarídeos formados por unidades de xilose ligadas através de ligações  $\beta$ -1,4. O número de moléculas de xilose envolvidos na sua formação pode variar entre 2 e 10 e eles são conhecidos como xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4) e assim por diante. Essa classe de oligossacarídeos é encontrada naturalmente em frutos, vegetais, leite e mel. Industrialmente são produzidos através de materiais lignocelulósicos, como resíduos agroindustriais. Alguns exemplos de resíduos agroindustriais utilizados como substrato na produção de XOS são a espiga de milho, casca de arroz, casca de soja, bagaço de cana de açúcar, entre muitos outros (DA SILVA MENEZES *et al.*, 2017; KAWEE-  
AI *et al.*, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2012)

Os XOS podem ser utilizados para várias finalidades, entre as quais destacam-se as aplicações nos alimentos e na indústria farmacêutica (VAZQUEZ *et al.*, 2000). Para aplicação como ingrediente alimentar os XOS com GP de 2-4 são os mais indicados. Dentre eles, a xilobiose é considerada o xilo-oligossacarídeo mais adequado, já que seu grau de doçura é equivalente a 30 % em relação à sacarose e é metabolizada mais rapidamente por microrganismos probióticos como os dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Os XOS, no geral, são estáveis em pH entre 2,5 e 8,0 e temperaturas acima de 100 °C (TATEYAMA *et al.*, 2005). A estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura é uma vantagem em comparação aos outros oligossacarídeos, particularmente na variação de acidez, já que, fisiologicamente, o suco gástrico apresenta baixos níveis de pH, o que

contribui para a não absorção destes oligossacarídeos pelo organismo (COURTIN *et al.*, 2009; VAZQUEZ *et al.*, 2000).

Em relação aos efeitos à saúde pode-se citar como principal benefício a atividade positiva na regulação da microbiota intestinal. A ingestão de XOS estimula a proliferação intestinal de microrganismos como *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus fermentum* (GULLÓN *et al.*, 2008; MUSSATTO and MANCILHA, 2007). Estudos conduzidos por MOURA e colaboradores demonstraram o potencial dos XOS, obtidos através da hidrólise de sabugo de milho, na proliferação de microrganismos considerados probióticos, ou seja, que beneficiam fisiologicamente o organismo. Entre esses microrganismos encontram-se *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus brevis* e *L. fermentum* (MOURA *et al.*, 2007). Os benefícios comprovados do gênero *Bifidobacterium* na saúde humana incluem a supressão da atividade de bactérias putrefativas; a repressão da proliferação de bactérias patogênicas e a promoção da digestão e absorção de nutrientes. Isso resulta na habilidade de prevenir infecções gastrintestinais, reduzindo assim a diarreia, com aumento do bolo fecal e esvaziamento intestinal periódico nas evacuações (BRAGA *et al.*, 2011; VANDENPLAS and DE HERT, 2011).

Além disso, como o corpo humano não possui as enzimas necessárias para degradação desses compostos, e por possuírem elevado nível de doçura, pesquisas inferem que XOS possam ser utilizados em alimentação restrita para diabéticos (DELGADO *et al.*, 2011; RIVERO-URGELL and SANTAMARIA-ORLEANS, 2001). A ingestão de XOS provoca, ainda, outros efeitos benéficos para a saúde, incluindo a prevenção de cáries dentárias, o efeito protetivo, causado pela atividade prebiótica, contra doenças

cardiovasculares e a redução do risco de desenvolvimento de câncer de colo de intestino (GROOTAERT *et al.*, 2007).

As aplicações mais importantes de XOS em termos de mercado correspondem a ingredientes para alimentos funcionais ou como componentes ativos em preparações simbióticas. O mercado de alimentos funcionais está crescendo rapidamente a partir da consciência dos consumidores sobre a relação entre alimentação e saúde, e também sobre o interesse dos fabricantes de alimentos devido ao alto valor agregado que os ingredientes funcionais fornecem ao alimento. De acordo com o relatório Global Industry Analyst sobre a demanda de prebióticos, com base em estudos de tendências de mercado em países como EUA, Canadá, Japão, continente europeu e asiático, a indústria que em 2011 movimentava a economia com de US\$ 1,0 bilhão, em 2018 aumentará para US\$ 4,8 bilhões (BELORKAR and GUPTA, 2016).

O interesse das indústrias pela produção de XOS está em crescimento, mas a sua exploração a longo prazo como ingredientes funcionais depende de vários fatores, incluindo evidências cientificamente comprovadas de atividade prebiótica, informações do consumidor, estratégias de marketing eficazes e, acima de tudo, produtos de alta qualidade (STANTON *et al.*, 2001). Com a crescente consciência voltada à manutenção da saúde por parte dos consumidores e ao desejo por alimentos funcionais que proporcionem benefícios fisiológicos, o futuro de produtos contendo oligosacarídeos apresenta um grande potencial (NAKAKUKI, 2005).

Os XOS são produzidos através de métodos químicos (hidrólise ácida, alcalina, entre outros métodos), enzimáticos ou uma combinação de ambos. Em alguns casos, como quando o substrato possui alta concentração de lignina em sua composição, é necessário

um pré-tratamento antes da hidrólise para a quebra dos polímeros e liberação dos oligossacarídeos, mas neste caso, os oligossacarídeos geram-se em reações intermediárias e a reação principal produz basicamente monossacarídeos. Além disso, na degradação da xilana ocorre a solubilização das ligninas ácido-solúveis e a neutralização de cinzas. Todos estes fatores geram quantidades indesejáveis de compostos não-sacarídicos na solução, tornando a de purificação de extrema importância (NABARLATZ *et al.*, 2007; VAZQUEZ *et al.*, 2000).

A hidrólise enzimática apresenta vantagens em relação às hidrólises ácida e alcalina. Dentre essas vantagens estão: o baixo consumo energético, a ausência de perda de substrato e a ausência de subprodutos após a reação. Já como desvantagem pode ser citado, principalmente, o alto custo em relação às enzimas. Esse custo pode ser minimizado através de estudos visando a produção de enzimas lignocelulósicas empregando substratos de baixo custo (AACHARY and GURUDUTT, 2011; AKPINAR *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo resíduos agroindustriais para produção de XOS são cada vez mais frequentes. CARVALHO e colaboradores demonstraram que a xilanase de *Aspergillus fumigatus* M51 atingiu níveis consideráveis no rendimento de XOS (37,6 % (p/p)) em 72 h. Os XOS formados foram, principalmente, xilobiose e xilotriose. O substrato utilizado foi hemicelulose extraída do bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO *et al.*, 2013). Em outro trabalho, as enzimas xilanase e arabinofuranosidase provenientes do fungo *Trichoderma reesei* foram utilizadas na hidrólise de caule de kenaf. A hidrólise teve duração de 48 h e o rendimento foi de 29,4 % (WAN AZELEE *et al.*, 2016).

## CAPÍTULO II

### RESULTADOS

#### **Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase and arabinofuranosidase to obtain prebiotic xylooligosaccharides from soybean fiber**

Os resultados gerados durante o estudo da produção das enzimas xilanase e arabinofuranosidase produzidas por duas linhagens recombinantes do fungo *A. nidulans* A773 e a aplicação dessas enzimas na produção de XOS estão apresentados em forma de artigo, submetido à revista World Journal of Microbiology and Biotechnology.

Solid-state cultivation of recombinant *Aspergillus nidulans* to co-produce xylanase and arabinofuranosidase to obtain prebiotic xylooligosaccharides from soybean fiber

Gabriela Feix Pereira<sup>1</sup>, Daniela de Bastiani<sup>1</sup>, Sabrina Gabardo<sup>2</sup>, Fabio Squina<sup>3</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Center of Natural Sciences, Federal University of São Carlos (UFSCar), ZC 18.245-970, Buri, SP, Brazil

<sup>3</sup>Department of Process Engineering (DEPro), School of Chemical Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), ZC 13083-852, Campinas, SP, Brazil.

*\*Correspondence to: Marco Antônio Záchia Ayub. Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil. E-mail address: [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br). Tel.: 55 51 33086685*

## Abstract

We investigated the production of xylanase and arabinofuranosidase by genetically modified *Aspergillus nidulans* A773 strain using soybean fiber as substrate for solid-state cultivation, and their posterior application to obtain xylooligosaccharides from this agro-residue. Enzymes production was carried out evaluating moisture content, buffering of substrate, temperature, and maltose addition to cultures to obtain the crude enzyme extract, which was used to obtain xylooligosaccharides. The production of xylobiose (X2), xylotriose (X3), and xylo-tetraose (X4) was optimized by central composite design and response surface analysis of two variables, xylanase concentration and temperature. The best condition obtained (50 °C and 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate) was used to evaluate the co-production of xylooligosaccharides (XOS) by the addition of different concentrations of arabinofuranosidase. The best yields of xylooligosaccharides obtained were 28.8 % (w/w), with final concentrations of X2 138.36 mg·g<sup>-1</sup> of xylan, X3 96.96 mg·g<sup>-1</sup> of xylan, and X4 53.04 mg·g<sup>-1</sup> of xylan, after 9 h of enzymatic reaction. The high conversion of arabinoxylan into different xylooligosaccharides demonstrates the potential of the use of the recombinant *A. nidulans* enzymes for XOS production and their applications as food ingredients.

**Keywords:** Xylooligosaccharides; xylanase; arabinofuranosidase; arabinoxylan; *Aspergillus nidulans*.



## **Introduction**

The use of agroindustrial residues, such as soybean fiber, as substrates in bioprocesses to produce compounds of industrial interest has been stimulating the research for the development of new fermentation techniques. The use of these residues is an interesting alternative, both for the minimization of environmental damage caused by their inappropriate disposal, and for the exploitation of their biotechnological potential. These substrates are abundant in nature and in food industry, and have no added value, and therefore contribute to the generation of products with high added value if properly transformed (Laufenberg et al. 2003; Akpınar et al. 2007; Falck et al. 2014; Jain et al. 2015).

Brazil is the second largest soybean producer in the world, preceded by the USA. In the year 2016, the world soybean production was 312.4 million tons, with Brazil accounting for about 30 % of this total (USDA, 2017; CONAB, 2017). In grain processing plants where isolate soy protein is produced, large amounts of soybean fiber are generated, which is a sugar-rich residue, partially used as a complement in animal feeding, or simply discarded in the environment. Soybean fiber has a high hemicellulose content, mostly as xylan, and it is low in lignin, becoming a potential substrate for enzymes and xylooligosaccharides (XOS) production (Heck et al. 2002).

Bioprocesses for enzymes production using agroindustrial residues have advantages when microbial cultivations are run as solid-state cultivation (SSC). The absence of free water and the high concentration of solids in the medium favor the development of filamentous fungi, reducing the possibility of contaminations and mimicking the adequate environmental conditions for these microorganisms to grow as they would do it in nature (Durand 2003; Pandey 2003; Barrios-González 2012). Fungi are capable of secreting lignocellulolytic enzymes in the culture medium, requiring no cell disruption for their release.

Furthermore, they present high levels of enzymatic production, which is required for industrial applications (Polizeli et al. 2005; Stroparo et al. 2012). However, genetic modifications that further increase this potential have been studied. In fungi, the insertion of enzyme-encoding genes that are more efficient and stable than the endogenous enzymes is one way of increasing the yields of processes involving lignocellulosic degradation. An example is the introduction of genes encoding endoxylanase (*XynC*) from *Penicillium funiculosum* and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*AbfB*) from *Aspergillus niger* in *Aspergillus nidulans*, a model microorganism for studies involving gene expression (Goncalves et al. 2012; Segato et al. 2012).

Both xylanase (E.C. 3.2.1.8) and arabinofuranosidase (E.C. 3.2.1.55) are responsible for catalyzing the hydrolysis of glycosidic linkages in the arabinoxylan chain, resulting in xylose, arabinose and XOS formation. Xylooligosaccharides are defined as oligosaccharides formed from two to seven xylose monomers, differing in molecular weight and degree of polymerization (DP) (Yuan et al. 2004). Classified as non-digestible fibers by the human organism, XOS are considered prebiotics and can be used as functional foods ingredients, as they assist gastrointestinal health by boosting the growth of probiotic microorganisms. The most used XOS in functional formulations are xylobiose (DP 2), xylotriose (DP 3), and xylo-tetraose (DP 4), among which the xylobiose presents the fastest assimilation by intestinal microorganisms (Chen et al. 1997; Uçkun Kiran et al. 2013).

In this context, the present research aimed at studying the variables that influence the production of xylanase (*XynC*) and arabinofuranosidase (*AbfB*) by a recombinant strain of *A. nidulans*, using soybean fiber substrate for SSC, and subsequent use the enzymatic extract for XOS production. A central composite design was performed to determine the best

enzymatic reaction conditions. The conversion of arabinoxylan to XOS by the combined use of xylanase (*XynC*) and arabinofuranosidase (*AbfB*) has also been evaluated.

## Materials and Methods

**Soybean fiber and microorganism.** The soybean fiber was provided by DUPONT (Esteio, Brazil). The microorganisms used in this work were two recombinant strains of *Aspergillus nidulans* A773 (pyrG89, WA3, pyroA4), provided by National Laboratory of Bioethanol Science and Technology (CTBE, Campinas, Brazil). *A. nidulans* A773 was genetically modified by transformation using the expression vector pEXPYR. The vector pEXPYR contains a maltose inducible promoter, a peptide signal sequence for secretion, two positive and negative selection markers and a pyrG auxotrophic signal marker from *Aspergillus niger*. The heterologous genes inserted into the vector were an endo-1,4-xylanase (*XynC*) from *Penicillium funiculosum* and an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (*AbfB*) from *Aspergillus niger*. The *XynC* and *AbfB* genes coding sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers *XynC* fwd 5'TATAG**C**GG**C**CG**C**CGCTTCCCATCAGAACTTGCTCAACGCGC-3', *XynC* rev 5'TATAT**C**TAG**A**CTAGGACACTGTGATGGTACTAGAGCCACT-3' and *AbfB* fwd 5'-TATAG**C**GG**C**CG**C**CGCCCTGTGACATCTACGAAGCCGGCGAC-3', *AbfB* rev 5'TATAT**C**TAG**A**TTACGAAGCAAACGCCGTCTCAATCTCAA-3'. The primers sequences included restriction sites to the enzymes *NotI* and *XbaI* (Segato et al. 2012).

The microorganisms were kept in mineral medium plates containing NaNO<sub>3</sub>, 6.0 g L<sup>-1</sup>; KCl, 0.52 g L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.52 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.52 g L<sup>-1</sup>, 2 mL of trace elements solution (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 22.0 g L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 11.0 g L<sup>-1</sup>; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 5.0 g L<sup>-1</sup>; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5.0 g L<sup>-1</sup>; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.6 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1.6 g L<sup>-1</sup>; ammonium molybdate, 1.1 g L<sup>-1</sup>; EDTA, 50.0 g L<sup>-1</sup>), glucose, 10 g L<sup>-1</sup>; pyridoxine, 0.1 g L<sup>-1</sup> and agar, 15 g L<sup>-1</sup> (Gonçalves et al. 2012),

adjusted to pH 6.5 and incubated for 72 h at 37 °C. The cultures were renovated every 30 days, and the plates were stocked at 4 °C.

**SSC Crude enzymatic extracts production.** The crude enzymatic extracts were obtained from the solid-state cultivation of both fungi. The cultures were carried out in 125 mL flasks containing 5 g of soybean fiber. In this test, four different moisture levels were tested: 53 %, 68 %, 76 %, and 81 %, which correspond to the substrate/minimum media ratio of 1:1, 1:2, 1:3, and 1:4, respectively. The pH was adjusted to 6.5. The inoculum were prepared by spore suspension of the different strains after culture at 37 °C for 72 h in Petri plates, using the concentration of  $10^6$  spores·g<sup>-1</sup> substrate. The flasks were kept static in an incubator at 37 °C for 192 h.

The enzymatic extraction was carried out by adding 30 mL of 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 to the culture. The flasks were homogenized in a shaker (180 rpm, 30 min) and then centrifuged (3 000 × g, 4 °C). The supernatant was used for further analysis. The presence of enzymes in the supernatant was monitored by 12 % SDS-PAGE.

The influence of HEPES buffer (100 mM, 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinoetanossulfonico), and of maltose on cell growth was also analyzed. Two different maltose concentrations were evaluated: 2 % and 6 % (w/w). Both assays were carried by static incubation of cultures at 37 °C for 120 h. The experimental controls were carried out without adding HEPES or maltose under these same conditions.

**Enzymatic activity.** Enzymatic activity determination of xylanase and arabinofuranosidase were carried out in a reaction containing 500 µL of xylan 1 % (Birchwood – Sigma, USA) or 500 µL of arabinan 1 % (sugar beet arabinan – Novozymes, USA) and 500 µL of crude enzymatic extract. After incubation (50 °C, 30 min) the reducing sugars were analyzed by

the 3,5-dinitrossaalic acid method (DNS) (Miller 1959). The reactions were measured in a spectrophotometer at 540 nm wavelength. Xylose and arabinose were used as standards. A unit (U) of xylanase or arabinofuranosidase was defined as the amount of enzyme that released 1  $\mu$ mol of xylose or arabinose per minute under the method conditions.

**XOS production by xylanase.** XOS production using soybean fiber was first performed by testing xylanase alone, without the addition of arabinofuranosidase, with the crude enzyme extract containing the heterologous xylanase. The crude extract was previously concentrated using an Amicon membrane (10 kDa, Millipore) and centrifuged (7 000  $\times$  g, 5 min). The reaction was performed following the fixed conditions of moisture (90 %), shaking (200 rpm), substrate added of 50 mM sodium acetate buffer pH 4.75, and the best conditions for temperature ( $X_i$ ) and enzyme concentration ( $X_j$ ) determined using a central composite design (CCD). In total, 11 experiments were performed, with three replicates and with three central points, as determined by the CCD matrix. In each case, XOS production was determined after 10 h of reaction. The second-order polynomial equation for the variables is the following:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_j X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{jj} X_j^2 \quad (1)$$

Where Y is the response variable,  $\beta_0$  is the constant,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$ , and  $\beta_{ij}$  are the linear, quadratic, and interaction effects coefficients, and,  $X_i$  and  $X_j$  are the coded levels of the two variables. The equation described above was utilized to generate response surfaces using software Statistica 10.0 (Stat Soft, USA). Analysis of variance (ANOVA) were employed to generate the regression model.

**XOS production using the combination of enzymatic extracts.** Xylanase and arabinofuranosidase crude extracts, concentrated through Amicon membrane (50 kDa,

Millipore), were added to soybean fiber to evaluate the synergy of the enzymes on XOS production. The reaction conditions used in this experiment were the conditions optimized in the CCD, except for the concentration of arabinofuranosidase, which was added to concentrations of 50 U·g<sup>-1</sup> of substrate and 100 U·g<sup>-1</sup> of substrate. The reaction was shakered (200 rpm) and followed for 24 h. The sampling and analyzes were done in duplicate.

**Analytical methods for sugars and XOS quantification.** The concentrations of glucose, arabinose and XOS were determined by HPLC (Shimadzu, Japan), using a Refractive Index Detector (RID) and the columns Bio-Rad Aminex HPX-87H, Kromasil, and Aminex HPX 42A. The mobile phase used in the Aminex HPX 87H column was 5 mM sulfuric acid solution under flow conditions of 0.6 mL min<sup>-1</sup> and oven temperature at 45 °C. For the Kromasil column, it was used acetonitrile solution and ultrapure water (75:25 (v/v)) as eluent, flow of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and oven temperature at 40 °C. Both columns were used to determine the sugars concentration. For the Aminex 42A column used to XOS quantification, the mobile phase was ultrapure water, at the conditions of flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> and oven temperature at 85 °C. The sample injection volume was 20 µL. Prior to quantification, the samples were filtered thorough 0.22 µm and 0.45 µm acetate and cellulose membranes. XOS were identified by standards of xylose (X1), xylobiose (X2), xylotriose (X3), and xylotetraose (X4) standards (Megazyme, Ireland). The significance among the groups of experimental data was analyzed using the ANOVA test.

**Analytical methods to characterize the soybean fiber.** The lignocellulosic fraction of soybean fiber was determined according to the quantitative saccharification of the polysaccharides present in the soybean fiber. For the analysis, 10 mL of sulfuric acid 72 % (w/w) was added to 2 g of previously dried soybean fiber. Hydrolysis was performed under

agitation for 7 min at 50 °C. The reaction was stopped by adding 275 mL of distilled water. The mixture was autoclaved at 121 °C for 15 min and filtered using synthesized filter (Whatman number 1). The volume of reaction was adjusted to 500 mL with distilled water. The solid fraction was stove-dried at 105 °C until constant weight for lignin determination. The liquid fraction was analyzed by HPLC to determine hydro-solubles components (Sluiter et al. 2011). The soybean fiber proteic fraction was determined by the Kjeldahl method, using factor 6.25 (Kjeldahl 1883). The ash percentage was determined by incinerating 2 g of soybean fiber, followed by oven burning at 600 °C for 4 h (AOAC 1997). The sample moisture was calculated by drying the soybean fiber in an oven at 105 °C until constant weight (AOAC 1997). All analyzes were performed in triplicates to obtain standard deviation.

## Results

**Composition of soybean fiber.** The chemical composition of the soybean fiber used in this research is presented in Table 1. Soybean fiber has lower lignin concentration (4.3 %) compared to hemicellulose concentration (22.2 %). The main components of hemicellulose are xylose (15.2 %) and arabinose (7.0 %).

Table 1. Chemical composition of soybean fiber (%).

Cellulose	4.3 ± 0.42
Hemicellulose	22.2 ± 2.42
Xilose	15.1 ± 1.81
Arabinose	7.0 ± 0.30

Lignin	4.3 ± 0.43
Protein	15.4 ± 0.19
Ash	4.8 ± 0.00
Moisture	8.2 ± 0.02

\*(w/w of soybean fiber)

**Production of enzymes in SSC: effects of moisture content, pH, and addition of maltose.** The production of xylanase and arabinofuranosidase by the two strains of *A. nidulans* A773 *XynC* and *AbfB* in soybean fiber was tested at different moisture levels. The highest enzymatic activity of arabinofuranosidase was obtained in 48 h of culture with 68 % moisture (51.8 U·g<sup>-1</sup> of substrate) (Fig 1A). In the case of xylanase, the highest enzymatic activity occurred in 96 h of cultivation, at the same 68 % moisture level (157.5 U·g<sup>-1</sup> of substrate) (Fig 1B).



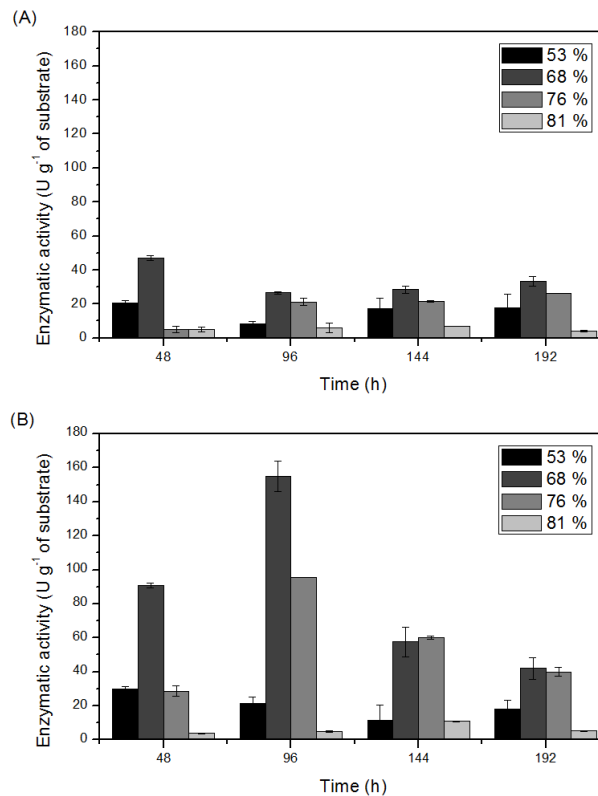


Figure 1. Enzymatic activity of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) in soybean fiber under SSC and different moistures.

Another factor that could have some influence on fungi strains growth and enzymatic production is variation of pH of medium during cultivation. For *A. nidulans* A773, an ideal pH was described as 6.5, whereas pH values higher than 8.0 could lead to decreased fungal growth and hence decreased enzyme production (Saha 2000; Goncalves et al. 2012). To avoid negative effects to growth by pH variation, HEPES buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) was added to the culture. Cultivations with this buffer showed no statistical difference in the enzymatic activity of arabinofuranosidase in the first 72 h of culture, but in 96 h the use of the buffer increased the activity of this enzyme by 86.4 % in relation to the control without buffer (Fig 2A). The enzymatic activity of

xylanase was influenced by addition of buffer to soybean fiber, increasing 140.6 % compared to control at 120 h (Fig 2B).

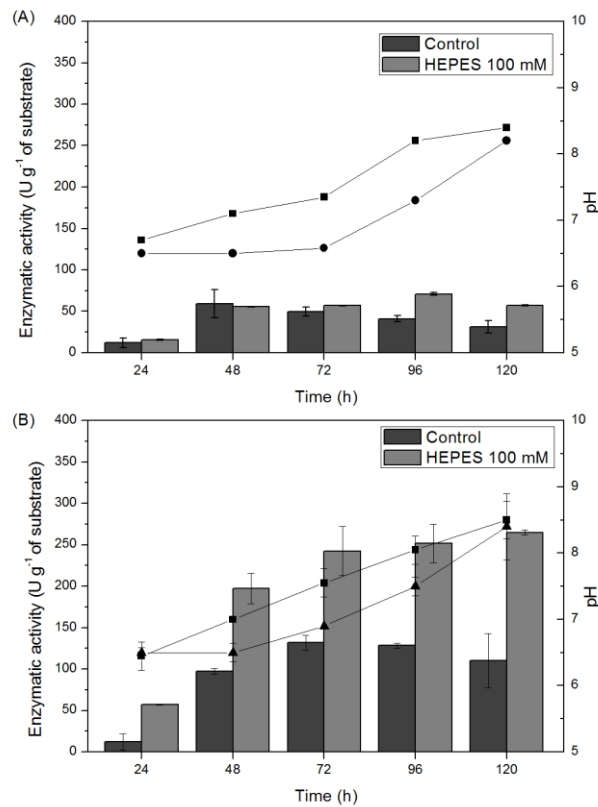


Figure 2. Influence of buffer addition on pH variation (lines) and enzymatic activity (bars) of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) of two strains *A. nidulans* A773 grown under soybean fiber moisture of 68 %, at 37 °C and 120 h. pH control without buffer (■), HEPES 100 mM (●).

Optimized conditions of moisture and pH were used to test whether maltose would be important to increase the production of recombinant enzymes. Maltose is used as an inducer in expression of the *XynC* and *AbfB* genes in *A. nidulans* A773, suggesting that presence of this sugar in culture would be required (Segato et al. 2012). In this work, we tested two different concentrations of maltose added to soybean fiber: 2 % and 6 % (weight

fraction), and the results were compared with the control without maltose addition (Fig 3). Results show that there were no significant differences among three treatments for both enzymes, thus addition of inducer was unnecessary. Our analysis showed that soybean fiber is composed of 0.4 % bioavailable maltose (data not shown), which emphasizes the potential of this substrate without the addition of maltose to induce to expression of *XynC* and *AbfB*.

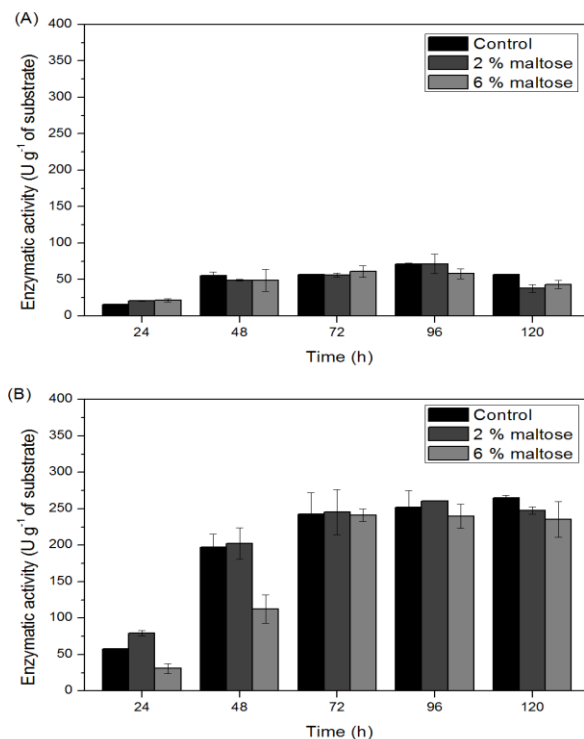


Figure 3. Influence of the addition of two concentrations of the maltose inducer on the enzymatic activity of arabinofuranosidase (A) and xylanase (B) of two strains *A. nidulans* A773 grown soybean fiber moisture of 68 %, at 37 °C, 120 h, with buffer HEPES 100 mM.

The highest enzymatic activity for xylanase, encoded by the *XynC* gene, of *A. nidulans* A773 in soybean fiber was 265.1 U·g<sup>-1</sup> of substrate in 120 h. However, the

enzymatic activity showed no statistical difference between 72 h and 120 h, the best condition being the time 120 h (242.6 U·g<sup>-1</sup> of substrate). In the case of arabinofuranosidase encoded by the AbfB gene the highest enzymatic activity in the soybean fiber culture was 71.0 U·g<sup>-1</sup> substrate at 96 h of culture. The presence xylanase (28 kDa) and arabinofuranosidase (60 kDa) in the culture medium can be observed in SDS-PAGE analysis (Fig 4).

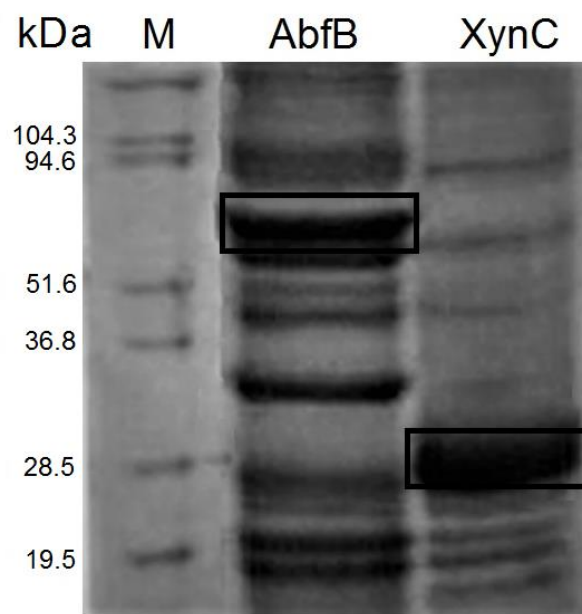


Figure 4. Secretion of proteins by *A. nidulans* A773 grown under optimum conditions. Analysis of arabinofuranosidase (AbfB) and xylanase (XynC) by SDS-PAGE.

**Enzymatic production of XOS by xylanase.** The concentrated crude enzymatic extract containing the heterologous xylanase was used for the production of XOS over soybean fiber, with best temperature and enzymatic concentration of xylanase defined in the CCD. Values of temperature and xylanase concentration were previously established by factorial design (data not shown). The coded and real variables and the results are shown in Table

2. A response surface was used as a graphical representation of the regression equation (Fig 5). The response in our work represents total sum of X2, X3, and X4. The highest yields of XOS occurred around the central point, with best reaction conditions of 50 °C and xylanase concentration of 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate. The coefficient of linearity (R<sup>2</sup>) for this model was 0.92, which indicates that 92 % of the dependent variable can be explained by this model. The experimental data have been adjusted to the proposed model in Eq (1) and the second-order polynomial model to XOS production is presented in Eq (2),

$$Y = 87.8 + 4.4 X_i - 19.6 X_i^2 + 8.4 X_j + 3.7 X_j^2 \quad (2)$$

Where Y is the total XOS production, and X<sub>i</sub> and X<sub>j</sub> are the coded values of temperature and xylanase concentration, respectively. The results demonstrated an adequate representation and correlation between the experimental and predicted values of the process synthesized in this equation.

Table 2. Coded values and real values of the CCD along with the observed values of total XOS production.

Run	Coded variables		Real variables		Response
	X <sub>i</sub>	X <sub>j</sub>	Temperature (°C)	Xylanase (U·g <sup>-1</sup> of substrate)	XOS (mg·g <sup>-1</sup> of xylan)
1	-1	-1	43	39	99.5
2	+1	-1	57	39	120.7
3	-1	+1	43	131	127.6
4	+1	+1	57	131	147.0

5	-1.42	0	40	85	105.0
6	+1.42	0	60	85	103.5
7	0	-1.42	50	20	137.0
8	0	+1.42	50	150	150.0
9	0	0	50	85	150.9
10	0	0	50	85	156.6
11	0	0	50	85	155.6

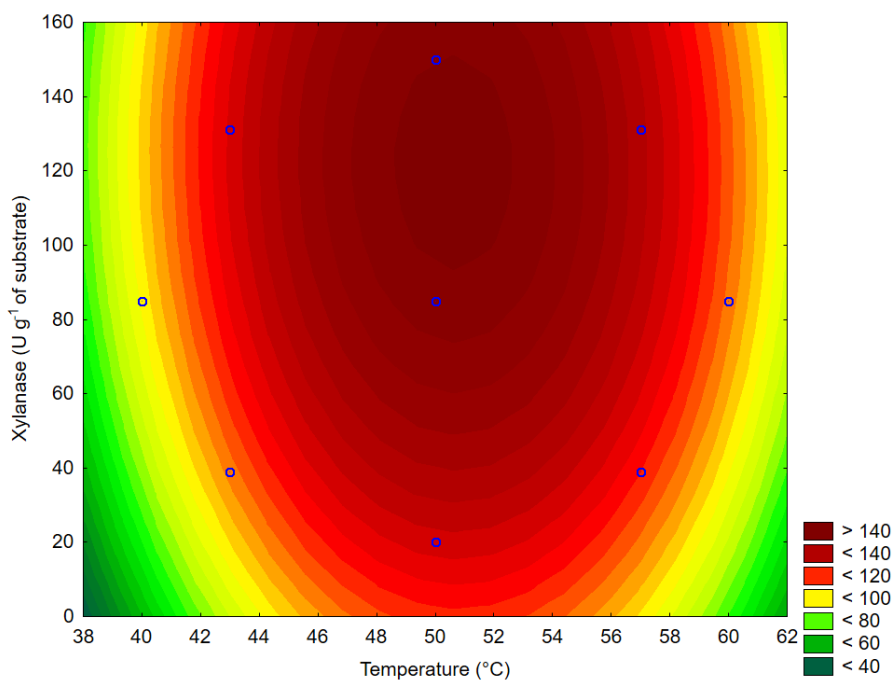


Figure 5. Contour plot of the parameters temperature and concentration of xylanase for the production of total XOS.

The linear, quadratic and interaction effects of the temperature ( $X_i$ ) and xylanase ( $X_j$ ) concentrations in the XOS production resulting from this analysis are presented in Table 3. The linear effects represent the variation of the mean and are proportional to the

response, if the effect is positive the response is increased, if the effect is negative, the response is decreased. The linear effects for both variables were significant and positive (Fig 5), i.e., with increasing temperature and xylanase concentration, XOS are produced in larger quantities. Quadratic effects, contrary to linear effects, have an inverse influence on the results. These effects also influenced significantly the process, but with a negative value for the temperature variable and positive for xylanase concentration.

Table 3. Statistical analysis of CCD.

Variable	Effect	Standard error	<i>p</i> -value
Mean	154.36	1.75	<0.005
Linear			
X <sub>i</sub>	9.51	2.14	<0.005
X <sub>j</sub>	18.20	2.52	<0.005
Quadratic			
X <sub>i</sub>	-49.43	2.52	<0.005
X <sub>j</sub>	9.52	2.51	<0.005
Interaction			
X <sub>i</sub> X <sub>j</sub>	-0.90	3.04	0.794

\*Statistical significance at 95% of confidence.

In order to demonstrate the adequacy of the results, the model was validated according Fig. 6. Highest results from the experimental model are demonstrated from the kinetics of soybean fiber hydrolysis by the addition of crude extract containing xylanase (*XynC*). At 8 h the maximum concentration of X2 (74.10 mg·g<sup>-1</sup> of xylan), X3 (39.90 mg·g<sup>-1</sup> of xylan) and X4 (44.52 mg·g<sup>-1</sup> of xylan) was detected, representing yields of 15.8 % (w/w of xylan).

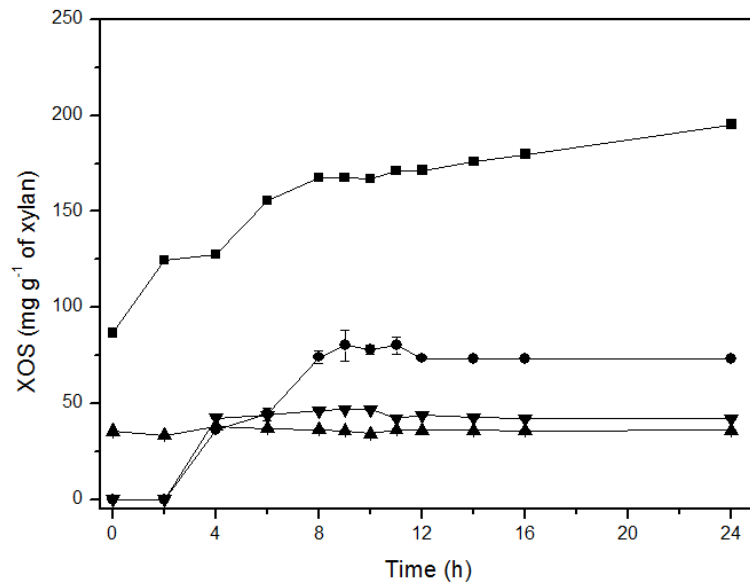


Figure 6. Kinetics of the production of XOS under optimal conditions (temperature 50 °C and xylanase concentration 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate). Xylose (■), xylobiose (●), xylotriose (▲), xylotetraose (▼).

**Production of XOS by the combination of xylanase and arabinofuranosidase.** In order to further increase XOS production and to evaluate the combined influence of two enzymes produced by recombinant strain, the crude enzymatic extracts containing both arabinofuranosidase and xylanase were tested to obtain XOS, which were quantified (Fig 7). For both arabinofuranosidase concentrations tested, 50 U·g<sup>-1</sup> of substrate and 100 U·g<sup>-1</sup> of substrate, there were increases in production of total XOS (X2, X3, and X4) 13 % and 75 %, respectively, when compared to the application of crude enzyme extract containing only xylanase (Fig 6). The yields of total XOS for condition with addition of crude enzyme extract containing the enzymatic combination (xylanase 1117 U·g<sup>-1</sup> of substrate and arabinofuranosidase 100 U·g<sup>-1</sup> of substrate) were 28.8 % (w/w of xylan). The maximum



amounts of X2 (138.36 mg·g<sup>-1</sup> of xylan), X3 (96.96 mg·g<sup>-1</sup> of xylan), and X4 (53.04 mg·g<sup>-1</sup> of xylan) were achieved in 9 h of reaction.

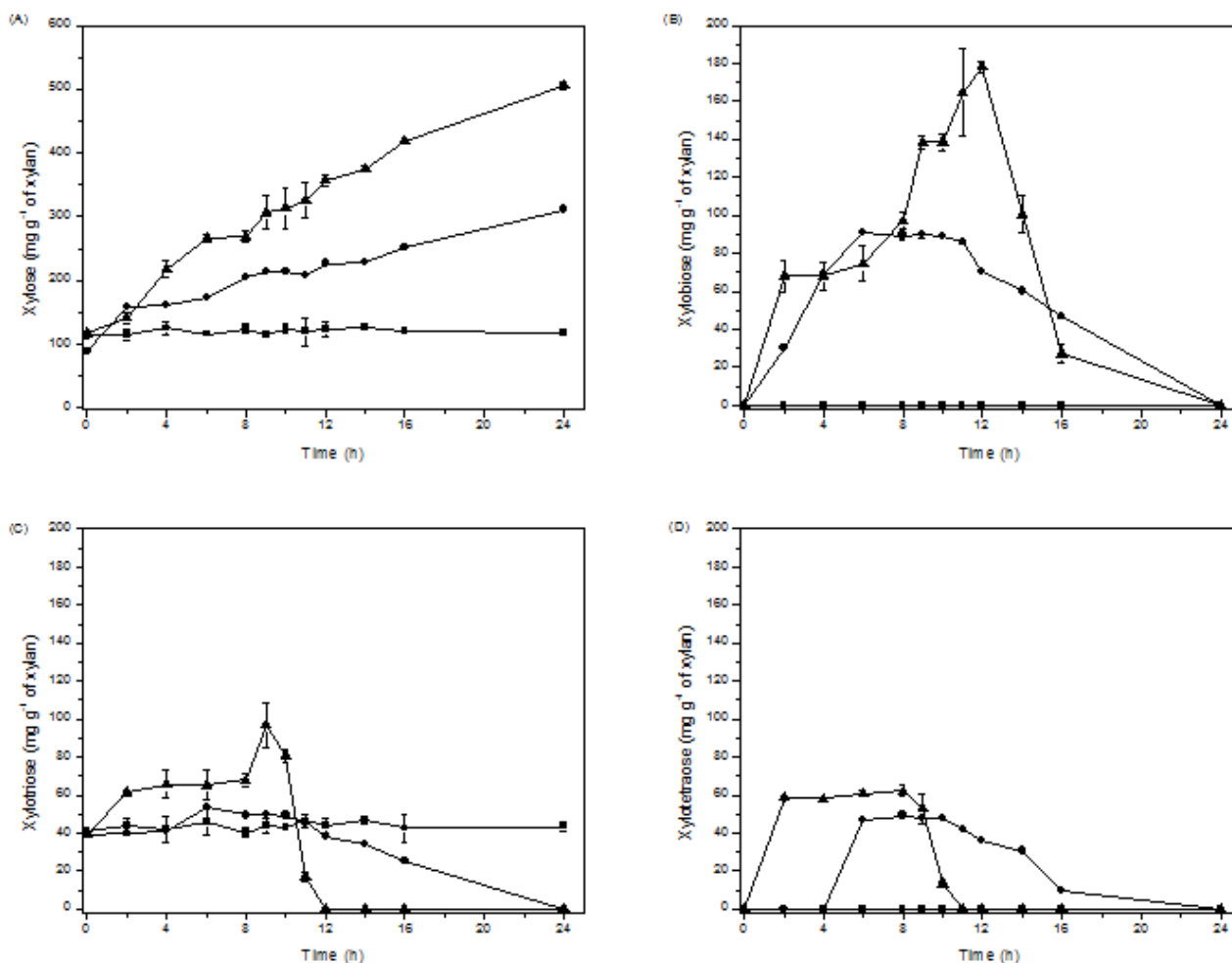


Figure 7. Production of xylose (A), xylobiose (B), xylotriose (C) and xylotetraose (D) by different enzymatic systems. Control (without enzymes) (■), xylanase 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate + arabinofuranosidase 50 U·g<sup>-1</sup> of substrate (●), xylanase 117 U·g<sup>-1</sup> of substrate + arabinofuranosidase 100 U·g<sup>-1</sup> of substrate (▲).

## Discussion

The analysis of the chemical composition of lignocellulosic residues is an important step, since it allows the obtaining of essential information for the conduction of the

bioprocess. Depending on chemical composition, substrate needs to be subjected to one or more pre-treatments for hydrolysis of the xylan chain and removal of the lignin, thus facilitating the action of the microorganisms. The use of these substrates, despite being efficient and reducing environmental problems generated by the incorrect disposal, often presents the drawback of needing previous hydrolysis, making the process more expensive (Hansen et al. 2015).

As it is shown by our results, soybean fiber presents low lignin content (4.3 %) in comparison with most of other agroindustrial residues, such as tobacco stalk and sugarcane bagasse that contain 24.1 % and 26.3 % of lignin, respectively (Akpınar et al. 2007; Li et al. 2014). Because of this low concentration of lignin, soybean fiber does not require pretreatment hydrolyses. In addition, hemicellulose is present in high concentration (22 %), which demonstrates the potential for the use of soybean fiber as a substrate in bioprocesses to produce xylanase, arabinofuranosidase, and to obtain XOS. The composition of soybean fiber described in this work is approximate to values reported by Heck et al. 2002, which were 23 % hemicellulose, 16 % cellulose, and 28 % protein, and variations reflecting aspects of crop variability, seasonality, soil, and climate.

Xylanase and arabinofuranosidase are important enzymes in the enzymatic system responsible for the degradation of hemicellulose, the composition of which in the substrate determines the level of expression of genes encoding these two enzymes. The hemicellulose in soy fiber is composed of approximately double of xylose compared to arabinose, which suggests that greater expression of the *XynC* gene could be expected by increasing concentration of xylanase in the culture, compared to arabinofuranosidase. Factors such as moisture and presence of HEPES buffer influence enzymatic production in

SSC and, in addition, the presence of maltose is responsible for activating the expression of both genes (*XynC* and *AbfB*), increasing concentration of enzymes in the culture.

The moisture is strongly related to fungal growth consequently influencing the production of enzymes. The low enzymatic activity obtained under conditions of higher moisture can be attributed to the porosity reduction, to alteration in the structure of particles of substrate and, possibly, mass transfer of gasses - oxygen in, CO<sub>2</sub> out - of the bulk of cultivation. The lower moisture also gave inferior results for enzymatic activity because this condition can hinder the mass transfer of the nutrients in the substrate and spreading of fungus hypha (Ruijter et al. 2004; Buenrostro-Figueroa et al. 2014).

The lower enzymatic activities obtained, especially for xylanase, when 6 % (w/w) of maltose was added to the medium, are possibly related to catabolic repression of genes related to carbon metabolism, such as *hxkA* gene. This gene encodes a hexokinase responsible for catalyzing the first step of the glycolytic pathway. The high concentration of maltose in medium acts to repress this gene, bypassing fungal metabolism of glucose and degrading maltose instead. The growth in maltose is slower, decreasing growth rate of fungus and, consequently, the production of enzymes. Once maltose is fully consumed, glucose begins to be used, accelerating metabolism and increasing enzyme production (Flippi et al. 2003; Segato et al. 2012; Dos Reis et al. 2013).

The enzymatic activity of xylanase under optimal conditions elucidated in this study can be compared with works using other substrates, such as sugarcane bagasse, the most common biomass residue studied in SSC. For instance, xylanase activity produced by *A. fumigatus* growing in sugarcane bagasse peaked at maximum of 180 U·g<sup>-1</sup> of sugarcane bagasse after 168 h (Gomes et al. 2016). The good results obtained in our work with

recombinant xylanase may be related to the biochemical properties present in this enzymatic family. According to other studies, endo-xylanases demonstrate activity over a wide temperature range (40 °C to 75 °C) and pH (2.0 to 8.0), which facilitates fungus culture and enzymatic production in lignocellulosic residues (Polizeli et al. 2005; Goncalves et al. 2012).

Arabinofuranosidase was also produced at high concentrations (71.0 U·g<sup>-1</sup> substrate) in our work when compared to the literature. For example, the arabinofuranosidase produced by *P. brasilianum* growing in brewery waste had a highest activity of 3.5 U·g<sup>-1</sup> brewery residues in 120 h of culture (Panagiotou et al. 2006). The combination of recombinant gene expression for *AbfB* in *A. nidulans* and use of arabinose-rich soybean fiber has proved to be an interesting strategy to produce this enzyme at low costs.

The production of XOS through use of agroindustrial residues such as wheat bran, cane bagasse, corn straw among others, using commercial xylanases is well studied. However, there are few studies involving production of XOS by recombinant fungal xylanases using lignocellulosic substrates rich in xylan, such as soybean fiber. The xylanases catalyze the cleavage of the glycosidic bonds of the xylan backbone, resulting in decrease of degree of polymerization of this substrate and formation of XOS (Goldman 2009). The XOS can be used for several purposes, among which stand out the applications in functional foods and in the pharmaceutical industry (Vazquez et al. 2000). For application as food ingredient XOS with DP 2-4 are the most indicated (Moura et al. 2007).

We could show that the reactional parameters of enzymatic hydrolysis of temperature and enzyme concentration had marked influence on production of XOS. YANG and collaborators (2011) also demonstrated the influence of xylanase concentration and

temperature on XOS production. Under optimum conditions (25 U·g<sup>-1</sup> of substrate and 50 °C), 36.8 % of xylan extracted from *Popula tomentosa* was converted to XOS. Despite the higher yields, the xylan extraction step would add costs to the process, decreasing its economic viability.

Although xylanase is the main enzyme involved in hydrolysis of xylan, other enzymes such as arabinofuranosidase can increase the production of XOS depending on substrate composition (Uçkun Kiran et al. 2011). Soybean fiber, having a composition with high concentration of arabinose, demonstrated to have potential as substrate in this reaction. Like xylanases, arabinofuranosidases are hemicellulolytic enzymes that act on the hydrolysis of polysaccharides containing residues with non-reducing arabinose terminals, releasing arabinose from arabinoxylooligosaccharides and increasing the concentration of XOS (Saha 2000; Wan Azelee et al. 2016). Such as in this work, Wan Azelee and collaborators (2016) obtained advantages when using xylanase and arabinofuranosidase together. *Hibiscus cannabinus* previously hydrolyzed was used as substrate and the highest yield was 351.46 mg·g<sup>-1</sup> of substrate in 48 h of incubation, with a ratio xylanase: arabinofuranosidase 400 U:10 U.

Our results show that, as the concentration of arabinofuranosidase used in the enzymatic mixture increased the concentration of X1, while the amount of X2, X3, and X4 decreased. An explanation for this fact is that with increasing cleavage of arabinose branches present in xylan chain carried out by arabinofuranosidase, xylanase more easily reaches the catalytic sites in xylan and XOS, presenting greater potential for xylose monomer formation, decreasing the DP of XOS. The highest yield in XOS production was 28.8 % (w/w). This result compares with some studies demonstrating the production of XOS

using other agro-industrial residues such as sugarcane bagasse, kenaf stem, corn ear, and wheat straw with reported yields of 25 %, 29.4 %, 32 % and 32.5 % (w/w), respectively (Lin et al. 2011, Mandelli et al. 2014, Reddy and Krishnan 2016, Wan Azelee et al. 2016).

**Conclusions.** The production of xylanase and arabinofuranosidase by the recombinant fungus *A. nidulans* A773 in SSC with soybean fiber as substrate presents great potential for industrial application. Both enzymes were produced in relatively high amounts. Important factors that could influence the cultivation, such as moisture content, buffering and addition of maltose inducer were evaluated, and under optimal conditions high concentrations of xylanase and arabinofuranosidase were obtained. The use of crude extracts of xylanase and of this enzyme combined with arabinofuranosidase applied to soybean fiber to produce xyloligosaccharides has been proven to be effective, liberating considerable amounts of X2, X3, and X4. Further research is granted in order to scale up this process to obtain both enzymes and XOS.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from *Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, scholarships for the first author), and grants from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, grant # 442516/2014-2 for the corresponding author).

## References

AKPINAR O, AK O, KAVAS A, BAKIR U, YILMAZ L (2011) Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. *J Agric Food Chem* 55:5544-5551.

AOAC (1997). Official methods of analysis of AOAC International. Gaithersburg.

BARRIOS-GONZÁLEZ J (2012) Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Proc Biochem* 47:175-185.

BUENROSTRO-FIGUEROA J et al. (2014) Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food Bioprod Process* 92:376-382.

CHEN C, CHEN J L, LIN T Y (1997) Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme Microb Technol* 21:91-96.

DOS REIS T F et al. (2013) Identification of Glucose Transporters in *Aspergillus nidulans*. *Plos One* 8:11.

DURAND A (2003) Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem Eng J* 13:113-125.

FALCK P et al. (2014) Production of arabinoxylan-oligosaccharide mixtures of varying composition from rye bran by a combination of process conditions and type of xylanase. *Bioresour Technol* 174:118-125.

FARYAR R et al. (2015) Production of prebiotic xylooligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. *Food Bioprod Process* 93:1-10.

FLIPPHI M et al. (2003) Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* - Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. *J Biological Chem* 278:11849-11857.

GOLDMAN N R (2009) Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. *Biotech J* 5(1):31-36.

GOMES A F S, DOS SANTOS B S L, FRANCISCON E G, BAFFI M A (2016) Substrate and temperature effect on xylanase production by *aspergillus fumigatus* using low cost agricultural wastes. *Biosci J* 32:915-921.

GONCALVES T A et al. (2012) Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. *Bioresour Technol* 119:293-299.

HANSEN G H, LUBECK M, FRISVALD J C, LUBECK P S, ANDERSEN B (2015) Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochem* 50:1327-1341.

- HECK J X, HERTZ P F, AYUB M A Z (2002) Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Brazilian J Microb* 33:213-218.
- JAIN I, KUMAR V, SATYANARAYANA (2015) Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian J Exp Biol* 53(3):131-42.
- JAYAPAL N et al. (2013) Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Ind Crops Prod* 42:14-24.
- KJELDAHL J (1883) A new method for the determination of nitrogen in organic matter. *Z Anal Chem* 22(1):366-382.
- LAUFENBERG G, KUNZ B, NYSTROEM M (2003) Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations (2003). *Bioresour Technol* 87(2):167-198.
- LI J B et al. (2014) Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. *Bioresour Technol* 155:258-265.
- LIN Y S, TSENG M J, LEE W C (2011) Production of xylooligosaccharides using immobilized endo-xylanase of *Bacillus halodurans*. *Process Biochem* 46(11):2117-2121.
- MANDELLI F et al. (2014) Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. *Ind Crops Prod* 52:770-775.
- MILLER G L (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426-428.
- MOURA P et al. (2007) In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT - Food Sci Technol* 40(6):963-972.
- PANAGIOTOU G, GRANOUILLET P, OLSSON L (2006) Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(6):1117-1124.
- PANDEY A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 13(2-3):81-84.
- POLIZELI M et al. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 67(5):577-591.
- REDDY S S, KRISHNAN C (2016) Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude  $\beta$ -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function. *LWT-Food Sci Technol* 65:237-245.
- RUIJTER G J G, VISSER J, RINZEMA A (2004) Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. *Microbiol-Sgm* 150:1095-1101.
- SAHA B C (2000) Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnol Adv* 18(5):403-423.



SEGATO F et al. (2012) High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. *Enzyme Microb Technol* 51(2):100-106.

SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, SCARLATA C, SLUITER J, TEMPLETON D, CROCKER D (2011) Determine of structure carbohydrates and lignin in biomass. NREL. <https://www.nrel.gov/bioenergy/biomass-compositional-analysis.html>. Accessed 10 february 2017.

STROPARO E C et al. (2012) Filamentous fungi and agro-industrial residues selection for enzyme production of biotechnological interest. *Semin Cien Agr* 33(6):2267-2278.

UÇKUN K E, AKPINAR O, BAKIR U (2013) Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. *Food Bioprod Process* 91(4):565-574.

VAZQUEZ M J et al. (2000) Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci Technol* 11(11):387-393.

WAN AZELEEN I et al. (2016) High xylooligosaccharides (XOS) production from pretreated kenaf stem by enzyme mixture hydrolysis. *Ind Crops Prod* 81:11-19.

YANG H, WANG K, SONG X, XU F (2011) Production of xylooligosaccharides by xylanase from *Pichia stipitis* based on xylan preparation from triploid *Populus tomentosa*. *Biores Technol* 102(14):7171-7176.

YUAN Q P (2004) et al. Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *J Chem Technol Biotechnol* 79(10):1073-1079.

## CAPÍTULO III

### DISCUSSÃO GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi produzir as enzimas recombinantes xilanase e arabinofuranosidase, produzidas por fungos geneticamente modificados, através da utilização de fibra de soja como substrato em cultivos de estado sólido. A fibra de soja é um resíduo agroindustrial lignocelulósico com potencialidades para aplicação em bioprocessos, porém, pouco explorado pela indústria.

O substrato fibra de soja foi caracterizado quimicamente para se obter a concentração de hemicelulose, necessária para as etapas seguintes. Através dessa caracterização notou-se a baixa concentração de lignina, o que torna a fibra de soja um substrato interessante do ponto de vista biotecnológico. Substratos com altas concentrações de lignina têm de passar por etapas prévias de tratamento, para que após essas etapas a xilana presente na hemicelulose possa estar disponível como substrato enzimático. Dispensando essa etapa de pré-tratamento o bioprocesso envolvendo fibra de soja apresenta uma vantagem em relação aos demais, quando envolvem materiais lignocelulósicos.

Inicialmente, para a realização da etapa de produção enzimática nesse trabalho, ambas as enzimas foram produzidas variando-se as condições de cultivo, tais como umidade, presença de tampão HEPES, necessário para manutenção do pH durante o cultivo, e adição de maltose, utilizada como indutor da expressão gênica em *A. nidulans*. As condições ótimas obtidas para esse bioprocessos foram 68 % de umidade, presença de tampão HEPES 100 mM e tempo de cultivo de 120 h para xilanase e de 96 h para arabinofuranosidase. Através dessas condições a concentração enzimática de xilanase

(265,1 U·g<sup>-1</sup> de substrato) e de arabinofuranosidase (71,0 U·g<sup>-1</sup> de substrato) foi maximizada. Com a observação desses resultados nota-se a influência desses fatores durante a produção enzimática no cultivo de *A. nidulans*.

A umidade de 68 % tida como ótima é relativamente baixa para o cultivo de outros microrganismos, o que acarreta na diminuição das taxas de contaminação do cultivo. Ao mesmo tempo, com a necessidade de utilização de menores quantidades de água e com a diminuição dos tempos de cultivos, o processo torna-se mais viável economicamente.

A necessidade da utilização de tampão foi demonstrada após a observação do pH durante o cultivo de *A. nidulans*. Os pHs ao final de ambos os cultivos chegaram a 8,5, prejudicando tanto as enzimas, quanto os microrganismos. O HEPES foi escolhido para tamponar os cultivos devido à sua faixa tamponante englobar o pH de 6,5 (valor ótimo para o fungo recombinante *A. nidulans*, conforme trabalhos anteriores).

Já a adição de maltose demonstrou-se desnecessária para a expressão das enzimas recombinantes em fibra de soja. Ao investigar a questão, foi observado que a fibra de soja apresenta em sua composição quantidade suficiente de maltose biodisponível para utilização pelo fungo para expressão de xilanase e arabinofuranosidase recombinantes.

Na etapa seguinte o extrato bruto contendo xilanase foi utilizado diretamente para a produção de XOS através de um DCCR. A temperatura e a concentração de xilanase afetaram significativamente a produção de XOS ( $p < 0,05$ ). A possibilidade de emprego desse extrato sem a necessidade da etapa de purificação enzimática foi demonstrada de acordo com os resultados. A aplicação sem a etapa de purificação torna o processo simplificado e, simultaneamente, mais viável do ponto de vista econômico, já que a etapa de purificação utiliza grande quantidade de recursos econômicos, além do tempo. A

condição ótima para produção de XOS foi de 50° C e 117 U·g<sup>-1</sup> de xilanase em relação ao substrato. As concentrações somadas de XOS com GP 2-4 atingiram 158,52 mg·g<sup>-1</sup> de xilana, e um rendimento de 15,8 % (p/p).

O efeito da adição do extrato bruto contendo arabinofuranosidase a esse processo foi testada através de duas diferentes concentrações: 50 U·g<sup>-1</sup> de substrato e 100 U·g<sup>-1</sup> de substrato. A concentração de xilanase foi mantida em 117 U·g<sup>-1</sup> de substrato. A condição com a maior concentração de arabinofuranosidase foi a que obteve a maior produção de XOS. A sinergia de xilanase e arabinofuranosidase já foi, muitas vezes, demonstrada na literatura. Enquanto a xilanase é responsável por clivar a cadeia de xilana, formando, entre outras moléculas, os XOS, a arabinofuranosidase é responsável por clivar essa ligação residual de arabinose, aumentando a concentração de XOS. Em 9 h de reação a concentração de xilobiose foi de 138,36 mg·g<sup>-1</sup> de xilana, de xilotriose 96,96 mg·g<sup>-1</sup> de xilana e de xilotetraose 53,04 mg·g<sup>-1</sup> de xilana. O rendimento dessa reação chegou a 28,8 % (p/p), um dos maiores encontrados na literatura.

Em conclusão, a aplicação das enzimas recombinantes de *A. nidulas* para a produção de XOS pode ser comprovada neste trabalho. O alto rendimento na reação demonstrou o potencial dessas enzimas quando aplicadas ao resíduo fibra de soja. Aliado a isso, o aproveitamento desse resíduo em dois bioprocessos diferentes, produção de enzimas e produção de XOS, demonstrou o potencial da utilização da fibra de soja em processos para geração de produtos com alto valor agregado.

A utilização da fibra de soja como substrato, além de tornar o bioprocessos economicamente mais interessante, por se tratar do aproveitamento de um resíduo ainda pouco utilizado, demonstra um potencial benefício ambiental. A fibra de soja produzida

atualmente é aproveitada em produtos com baixo valor agregado ou ainda descartada incorretamente no meio-ambiente, o que gera impacto ambiental negativo.

Através da aplicação de tecnologias como as descritas neste trabalho, questões como essa podem ser amenizadas. Apesar dos esforços, ainda é necessária uma maior ênfase nessa área de aproveitamento de resíduos agroindustriais, aumentando a geração de lucro de uma forma ambientalmente correta.

## CONCLUSÕES

- O resíduo fibra de soja é um substrato adequado para produção de xilanase, arabinofuranosidase e XOS
- A umidade ideal para *A. nidulans* em fibra de soja é de 68 %. Baixas umidades auxiliam na manutenção dos cultivos, diminuindo a taxa de contaminação;
- A independência da adição de maltose ao cultivo aumenta a viabilidade econômica do processo. A maltose necessária para a expressão da enzima já se encontra biodisponível na fibra de soja;
- A adição de tampão HEPES aumentou em 140,6 % a produção de xilanase em 72 h e em 86,4 % a produção de arabinofuranosidase em 96 h, sob condições ótimas de umidade;
- A produção de XOS através de extratos enzimáticos sem purificação demonstrou-se eficaz, dessa forma, viabilizando o processo;
- Através de um planejamento experimental (DCCR), a produção de xilobiose, xilotriose e xilotetraose obteve as condições ótimas de temperatura (50 °C) e concentração de xilanase (117 U·g<sup>-1</sup> de substrato), com rendimento de 15,8 % (p/p) de XOS;
- A atuação conjunta do extrato enzimático contendo xilanase recombinante com o extrato enzimático contendo arabinofuranosidase recombinante demonstrou potencial de aplicação para produção de XOS em fibra de soja. O rendimento do processo (28,8 % (p/p)) foi um dos maiores encontrados na literatura.

## PERSPECTIVAS

- Produzir xilanase e arabinofuranosidase através do cultivo de outros microrganismos;
- Testar outros substratos para a produção de enzimas e XOS;
- Testar diferentes métodos de purificação de XOS;
- Comprovar a atividade prebiótica do extrato bruto contendo XOS através do crescimento de *Lactobacillus plantarum* e outros microrganismos probióticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AACHARY, A. A.; GURUDUTT, P. S. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2--16, 2011.
- ABU YAZID, N. et al. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization: A Review. **Sustainability**, v. 9, n. 2, p. 224, 2017.
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19-35, 2009.
- AKPINAR, O. et al. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5544-5551, Jul 2007.
- 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, 1// 2010.
- ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 163-173, 4// 2014.
- ARAÚJO, J.R.; WALDMAN, W.R.; DE PAOLI, M.A. Thermal properties of high density polyethylene composites with natural fibres: Coupling agent effect. **Polymer Degradation and Stability**, 2008.
- AREVALO-GALLEGOS, A. et al. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017.



ASGHER, M.; AHMAD, Z.; IQBAL, H. M. N. Alkali and enzymatic delignification of sugarcane bagasse to expose cellulose polymers for saccharification and bio-ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 488-495, 2013.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International journal of biological macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 881-896, 1/31/ 2003.

BELORKAR, S. A.; GUPTA, A. K. Oligosaccharides: a boon from nature's desk. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 82, 2016// 2016.

BRAGA, T. D. et al. Efficacy of Bifidobacterium breve and Lactobacillus casei oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. **The American journal of clinical nutrition**, v. 93, n. 1, p. 81-86, 2011.

BRETHAUER, S.; STUDER, M. H. Biochemical conversion processes of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals—A review. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 10, p. 572-581, 2015.

CARVALHO, A. F. A. et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75-85, 2013.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-

industrial Wastes Valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085-1093, 2015.

COURTIN, C. M. et al. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 831-837, 2009.

CSISZÁR, E.; LOSONCZI, A.; KOCZKA, B.; SZAKÁCS, G.; POMLÉNYI, A. Degradation of Lignin-Containing Materials by Xylanase in Biopreparation of Cotton. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 749-753, 2006.

DA SILVA MENEZES, B.; 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. 58, 2017// 2017.

DE MENEZES, C. R. et al. Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by the white-rot fungi *Pleurotus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 6, p. 673-678, 2009.

DE VRIES, R. P. et al. Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 327, n. 4, p. 401-410, 8/7/ 2000.

DELGADO, G. T. C. et al. The putative effects of prebiotics as immunomodulatory agents. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3167-3173, 2011.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 113-125, 3// 2003.

GAO, J. M. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover.

**Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, Nov 2008.

GOLDMAN, N. R. Methods for optimizing enzymatic hydrolysis of xylan to improve xylooligosaccharide yield. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p. 31-36, 2009.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 293-299, 9// 2012.

GROOTAERT, C. et al. Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 2, p. 64-71, 2007.

GUERRIERO, G. et al. Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 1, p. 1-16, 2016.

GULLÓN, P. et al. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7482-7487, 2008.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175-186, 2004// 2004.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; KESHAVARZ, T. Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. **BioResources**, v. 8, n. 2, p. 3157-3176, 2013.

KANEKO, S. et al. Purification and substrate specificities of two  $\alpha$ -L- arabinofuranosidases from *Aspergillus awamori* IFO 4033. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4021-4027, 1998.

KAWEE-AI, A. et al. Eco-friendly processing in enzymatic xylooligosaccharides production from corncob: Influence of pretreatment with sonocatalytic–synergistic Fenton reaction and its antioxidant potentials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 31, p. 184-192, 7// 2016.

KIMURA, T. et al. Molecular cloning of xylanase gene xynG1 from *Aspergillus oryzae* KBN 616, a shoyu koji mold, and analysis of its expression. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 10-16, 1998/01/01 1998.

KORMELINK, F. J. M.; GRUPPEN, H.; VORAGEN, A. G. J. Mode of action of (1→4)- $\beta$ -d-arabinoxylan arabinofuranohydrolase (AXH) and  $\beta$ -l-arabinofuranosidases on alkali-extractable wheat-flour arabinoxylan. **Carbohydrate Research**, v. 249, n. 2, p. 345-353, 1993/11/03 1993.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1-2, p. 1-30, 2005.

KRONBAUER, E. A. W. et al. Produção de xilanase por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, n. 2, 2007.

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

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products:: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations.

**Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 167-198, 4// 2003.

LI, N. et al. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase with broad temperature adaptability from *Streptomyces* sp. S9. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 2, p. 231, 2008.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of airflow rate on enzyme production in packed bed bioreactors. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 63-75, 2015.

MOTTA, F. L.; ANDRADE, C. C. P.; SANTANA, M. H. A. A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass-Techniques, Applications and Commercialization**, 2013.

MOURA, F. A.; MACAGNAN, F. T.; SILVA, L. P. Oligosaccharide production by hydrolysis of polysaccharides: a review. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 2, p. 275-281, 2015.

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, 8// 2007.

MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 1-6, 10// 2013.

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

MUSSATTO, S. I. et al. **Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes**. INTECH Open Access Publisher, 2012. ISBN 9535102532.

NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20-28, 2007.

NAKAKUKI, T. Present status and future prospects of functional oligosaccharide development in Japan. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 52, n. 3, p. 267-271, 2005.

NUMAN, M. T.; BHOSLE, N. B.  $\alpha$ -l-Arabinofuranosidases: the potential applications in biotechnology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 247-260, 2006// 2006.

PANAGIOTOU, G.; GRANOUILLET, P.; OLSSON, L. Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 6, p. 1117-1124, 2006// 2006.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 3// 2003.

PATEL, S. J.; SAVANTH, V. D. Review on fungal xylanases and their applications. **International Journal**, v. 3, n. 3, p. 311-315, 2015.

PATHAK, P.; BHARDWAJ, N. K.; SINGH, A. K. Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 3776-3797, 2014.

POLIZELI, M. et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

QIU, Z. et al. A xylanase with broad pH and temperature adaptability from *Streptomyces megasporus* DSM 41476, and its potential application in brewing industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 506-512, 5/5/ 2010.

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

RIVERO-URGELL, M.; SANTAMARIA-ORLEANS, A. Oligosaccharides: application in infant food. **Early Human Development**, v. 65, p. S43-S52, 2001.

SAHA, B. C. alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 5, p. 403-423, Aug 2000.

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

SAHA, B. C.; BOTHAST, R. J. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 65-77, 1999

SAKAMOTO, T. et al. Substrate specificity and gene expression of two *Penicillium chrysogenum*  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases (AFQ1 and AFS1) belonging to glycoside hydrolase families 51 and 54. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1121-1130, 2013.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 3// 2009.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, V. 40, p. 2689-2694, 2005.

SAULNIER, L. et al. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. **Carbohydrate polymers**, v. 26, n. 4, p. 279-287, 1995.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*, v. 2. São Paulo. Edgard Blucher LTDA, 2001.

SEGATO, F. et al. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 100-106, 7/15/ 2012.

SHAHZADI, T. et al. Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 2014, 2014.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 558-571, 2016.

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, 1// 2015.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 4/15/ 2009.

STANTON, C. et al. Market potential for probiotics. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, n. 2, p. 476s-483s, 2001.



TAIBI, Z. et al. Purification and Biochemical Characterization of a Highly Thermostable Xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 Isolated from Poultry Compost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 3, p. 663-679, 2012// 2012.

TATEYAMA, I. et al. Effect of xylooligosaccharide intake on severe constipation in pregnant women. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 51, n. 6, p. 445-448, 2005.

TERRAPON, N. et al. The CAZy Database/the Carbohydrate-Active Enzyme (CAZy) Database: Principles and Usage Guidelines. In: (Ed.). **A Practical Guide to Using Glycomics Databases**: Springer, 2017. p.117-131.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146-161, 12/15/ 2013.

VANDENPLAS, Y.; DE HERT, S. G. Randomised clinical trial: the synbiotic food supplement Probiotal vs. placebo for acute gastroenteritis in children. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 8, p. 862-867, 2011.

VAZQUEZ, M. J. et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387-393, 2000.

VERMA, D.; SATYANARAYANA, T. Molecular approaches for ameliorating microbial xylanases. **Bioresource technology**, v. 117, p. 360-367, 2012.

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, 3// 2016.

YOON, L. W. et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **biomass and bioenergy**, v. 67, p. 319-338, 2014.