

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos

Cristiano Ragagnin de Menezes
Farmacêutico Bioquímico

Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências de Alimentos.

Campinas – SP, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M524e Menezes, Cristiano Ragagnin de
Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos / Cristiano
Ragagnin de Menezes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Prebióticos. 2. Xilooligossacarídeos. 3. Biodegradação.
4. *Pleurotus*. 5. Enzimas. I. Durrant, Lucia Regina. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of prebiotic activity of lignocellulosics hydrolyzed products

Palavras-chave em inglês (Keywords): Prebiotics, Xylooligosaccharides, Biodegradation,
Pleurotus, Enzymes

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Lucia Regina Durrant

Gabriela Alves Macedo

Fernanda Vaz Alves

Erika Cristina Pavarina

Francisco Maugeri Filho

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Lucia Regina Durrant
Universidade Estadual de Campinas
Orientadora

Profª Drª Gabriela Alves Macedo
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Profª Drª Semíramis Martins Álvares Domede
PUC- Campinas
Membro

Profª Drª Fernanda Vaz Alves
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Profª Drª Erika Cristina Pavarina
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Campinas, junho de 2007

*"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível".
(São Francisco de Assis)*

*"Faze a tua parte. Prepara a tua obra, sem te preocupares com aqueles
que caminham à retaguarda. Tua luz deverá iluminar-lhes o caminho. Eis
a tua tarefa."
Anônimo*

Agradeço a Deus pela oportunidade de aprendizado e ao incessante auxílio da Espiritualidade Maior, sempre muito presente em todos os momentos de minha vida.

“O Deus em mim saúda o Deus em ti”

Dedico e agradeço aos meus queridos pais Aert e Rosângela, exemplos de honestidade, determinação e força interior. Aprendi com vocês que os verdadeiros valores estão na responsabilidade, lealdade e principalmente, no amor. Sou eternamente grato pelos ensinamentos, constante apoio e confiança. Esta vitória é de vocês! Obrigado por me receberem como filho nesta vida.

À minha amada esposa Fabiane, pelo amor incondicional, apoio constante e carinho. Você é a minha fortaleza, na alegria, nos momentos difíceis, nos desafios! Obrigado por ser a minha companheira de jornada, nesta difícil missão de conviver comigo. Meu amor por ti é infinito, você habita eternamente em mim, meu amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Lucia Regina Durrant, pela amizade, ensinamentos e pela confiança na capacidade de trabalhar, que foi essencial na execução do nosso trabalho.

A FAPESP, pelo suporte financeiro, propiciando a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões de grande importância para a finalização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Fábio, Elisângela, Emerson, Éder (*Patrão*), Andréia (*Mineirinha*), Roberto (*Betão*), Maricy, Kethlen, Francine, Mário, Érika, e mais remotamente, Josemar, Márcia, Ana Claudia e Erika Pavarina. Obrigado pela amizade, colaboração, ensinamentos e parcerias formadas.

À Isis, uma verdadeira irmã de jornada (*Irmãzinha*), que me auxiliou muito nesta caminhada. Parceira de projetos e trabalhos, sempre buscando contribuir com o máximo de dedicação.

Aos colegas do Laboratório Thonson de Espectrometria de Massas (IQ/UNICAMP) pela cooperação nas análises, em especial para o Rodrigo Catharino e o Prof. Marcos Eberlin.

Aos funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos, com os seus trabalhos, que em muito facilitaram o nosso, em especial, Cosme, Jardete, Marquinhos e Marcão, além do pessoal do Centro de Informática.

À Prof^a Helena Godoy, pelo seu profissionalismo, preocupação com os alunos e amizade.

Ao tio Roberto Carlos (Beto), pelo auxílio fundamental concedido no início de minha carreira universitária. Fica aqui meu singelo agradecimento.

Aos professores Leadir Martins Fries e Nelcindo Terra (DTCA/UFSM), que possibilitaram os meus primeiros contatos com a pesquisa científica, na época da graduação.

Aos amigos conterrâneos, Elizete, Silvane, Lísia, Camila, Roger e Cedenir pela ajuda, amizade e convívio, principalmente nos primeiros anos de estadia em Campinas.

Ao tio Rodrigo e Clóvis Paniz, verdadeiros irmãos para mim. Nosso convívio na época da UFSM foi de extrema importância para uma visão mais ampla da vida e do mundo (Conversas *Kellerianas* do 2446).

Aos companheiros de nutrição *Gattiniana*, Paulo, Beto e Sebastião. Com uma conversa instrutiva e descontraída, aliviou muito o fardo pesado da tese.

À família que reencontramos aqui em Campinas, *o grupo do Irmão Francisco de Assis*, que muito nos ajudaram com vibração e força espiritual nestes anos de trabalho e um grande exemplo a ser seguido no trabalho da caridade.

À minha família, pela torcida e carinho, em especial, os manos Simone e Ricardo, os cunhados Jairo e Daniel, a sobrinha Mariana, a sogra Areci e o primo Vinícius (*Velhinho da internet*), como também aos familiares de Cacequi e Santa Maria.

A todos que ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho, muito obrigado!

Cristiano

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Alimentos Funcionais.....	3
2.1.1 Probióticos, prebióticos e simbióticos.....	3
2.1.1.1 Probióticos.....	3
2.1.1.1.1 Gênero Bifidobacterium.....	5
2.1.1.1.2 Gênero Lactobacillus.....	6
2.1.1.2 Prebióticos.....	8
2.1.1.3 Simbióticos.....	11
2.2 Oligossacarídeos como Ingredientes Funcionais.....	12
2.2.1 Os Frutooligossacarídeos.....	13
2.2.2 Os Xilooligossacarídeos.....	15
2.2.2.1 Os xilooligossacarídeos e suas propriedades tecnológicas.....	17
2.2.2.2 Comparação da atividade prebiótica entre os XOS e os principais oligossacarídeos estudados.....	18
2.3 Biodegradação de Resíduos Agroindustriais.....	20
2.3.1 Composição dos resíduos lignocelulósicos.....	22
2.3.1.1 Celulose.....	22
2.3.1.2 Hemicelulose.....	23
2.3.1.3 Lignina.....	25
2.3.2 Fungos basidiomicetos.....	27
2.3.3 Enzimas lignocelulolíticas.....	28
2.3.3.1. Enzimas celulolíticas.....	30
2.3.3.2 Enzimas hemicelulolíticas.....	32

2.3.3.2.1 β -1,4- endoxilanase (1,4- β -D-xilana xilohidrolase).....	32
2.3.3.2.2 β -D-xilosidase.....	34
2.3.3.2.3 Aplicação das enzimas xilanolíticas na indústria.....	34
2.3.3.3 Enzimas ligninolíticas.....	35
2.3.3.3.1 Lacases.....	36
2.3.3.3.2 Lignina-peroxidase.....	37
2.3.3.3.3 Manganês-peroxidase.....	38
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Material.....	41
4.1.1 Material lignocelulósico.....	41
4.1.2 Fungos lignocelulolíticos.....	41
4.2 Metodologia.....	41
4.2.1 Seleção dos hidrolisados.....	41
4.2.1.1 Meios de cultivos e condições de crescimento.....	41
4.2.1.2 Determinação da atividade enzimática.....	42
4.2.1.2.1 Atividade das enzimas ligninolíticas.....	43
4.2.1.2.1.1 Atividade da lacase.....	43
4.2.1.2.1.2 Atividade da manganês peroxidase.....	43
4.2.1.2.2 Atividade de enzimas celulolíticas.....	43
4.2.1.2.2.1 Atividade da β -glicosidase.....	44
4.2.1.2.2.2 Atividade de avicelase.....	44
4.2.1.2.2.3 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase).....	44
4.2.1.2.3 Atividade de enzima xilanolítica.....	44
4.2.1.2.3.1 Atividade de xilanase	44

4.2.2	Determinação dos hidrolisados lignocelulósicos.....	45
4.2.2.1	Determinação dos hidrolisados por espectrometria de massas.....	45
4.2.2.1.1	Preparo das amostras.....	45
4.2.2.1.2	Espectrometria de massas.....	45
4.2.3	Planejamento experimental para atividade enzimática de xilanase e β -xilosidase.....	45
4.2.4	Hidrólise do material hemicelulósico e análise da degradação.....	46
4.2.4.1	Condições do experimento.....	46
4.2.4.2	Atividade enzimática	46
4.2.4.2.1	Atividade de xilanase.....	46
4.2.4.2.2	Atividade de β -xilosidase	46
4.2.4.2.2	Atividade de pH.....	47
4.2.4.3	Utilização dos hidrolisados em matrizes de xilana e Carboximetilcelulose.....	47
4.2.4.4	Análise dos compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE).....	47
4.2.5	Investigação “in vitro” dos efeitos dos compostos prébióticos em microrganismos probióticos e sua ação sobre os patógenos selecionados da flora intestinal humana.....	47
4.2.5.1	Material.....	47
4.2.5.2	Microrganismos.....	48
4.2.5.3	Condições de crescimento microbiano.....	48
4.2.5.3.1	Ativação das culturas.....	48
4.2.5.3.2	Meio basal.....	48
4.2.5.4	Curvas de crescimento – Culturas probióticas.....	48
4.2.5.5	Curvas de crescimento – Microrganismos patogênicos.....	49
4.2.5.6	Análise de pH.....	49
4.2.5.7	Análise estatística.....	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Seleção dos Hidrolisados.....	51
5.1.1	Atividade enzimática.....	51

5.1.1.1 Atividade das enzimas ligninolíticas.....	51
5.1.1.1.1 Atividade da enzima lacase.....	51
5.1.1.1.2 Atividade da enzima manganês peroxidase.....	53
5.1.1.2 Atividade das enzimas celulolíticas.....	55
5.1.1.2.1 Atividade de β -glicosidase.....	55
5.1.1.2.2 Atividade de avicelase.....	57
5.1.1.2.3 Atividade de Carboximetilcelulase (CMCase).....	59
5.1.1.3 Atividade de enzimas xilanolíticas.....	61
5.1.1.3.1 Atividade de xilanase.....	61
5.2 Determinação dos Hidrolisados Lignocelulósicos.....	68
5.3 Planejamento experimental para atividade enzimática de xilanase e β - xilosidase.....	69
5.3.1 Otimização de atividade enzimática de <i>Pleurotus sp</i> BCCB068.....	70
5.3.1.1 Atividade de xilanase.....	71
5.3.1.2 Atividade de β - xilosidase.....	73
5.3.2 Otimização de atividade enzimática de <i>Pleurotus sp</i> tailândia.....	77
5.3.2.1 Atividade de xilanase.....	78
5.3.2.2 Atividade de β -xilosidase.....	79
5.4 Hidrólise do Material Hemicelulósico e Análise da Degradação.....	82
5.4.1 Utilização de xilana como substrato fúngico sob fermentação submersa durante 40 dias de incubação.....	82
5.4.1.1 Atividade enzimática e pH.....	83
5.4.1.2 Análise da degradação de xilana e formação de compostos pelas linhagens fúngicas.....	84
5.4.2 Utilização dos hidrolisados selecionados em matriz celulósica e em xilana.....	90
5.4.2.1 Utilização dos hidrolisados em matriz de xilana.....	90
5.4.2.2 Análise da degradação da matriz de xilana e formação de compostos pelo complexo enzimático dos hidrolisados.....	91
5.4.2.3 Análise da degradação de matriz de celulose e formação de compostos pelo complexo enzimático dos hidrolisados.....	96

5.4 Investigação “in vitro” dos Efeitos dos Compostos Prebióticos em microrganismos Probióticos e sua ação sobre os Patógenos Seleccionados da Flora Intestinal Humana.....	101
5.4.1 Curvas de Crescimento – Culturas probióticas.....	101
5.4.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	101
5.4.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	103
5.4.1.3 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	105
5.4.1.4 <i>Lactobacillus reuteri</i>	107
5.4.1.5 <i>Lactobacillus pentosus</i>	109
5.4.2 Curvas de Crescimento – Culturas patogênicas.....	111
5.4.2.1 <i>Salmonella enteritidis</i>	111
5.4.2.2 <i>Escherichia coli</i>	113
5.4.3 Análise de pH.....	115
5.4.3.1 Culturas probióticas.....	115
5.4.3.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	115
5.4.3.1.2 <i>Lactobacillus plantarum</i>	116
5.4.3.1.3 <i>Bifidobacterium bifidum</i>	118
5.4.3.1.4 <i>Lactobacillus reuteri</i>	119
5.4.3.1.5 <i>Lactobacillus pentosus</i>	120
5.4.3.2 Culturas patogênicas.....	121
5.4.3.2.1 <i>Salmonella enteritidis</i>	121
5.4.3.2.2 <i>Escherichia coli</i>	122
6 CONCLUSÕES.....	126
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas relacionadas às bactérias probióticas em seres humanos.....	8
Tabela 4.1 Contagem inicial das culturas probióticas para o experimento de crescimento destas perante os hidrolisados selecionados. Quantidade expressa em 2 ml de cultura contida em meio Litmus milk.....	49
Tabela 5.1 Valores dos níveis codificados utilizados no planejamento completo 2^3	69
Tabela 5.2 Matrizes com os valores codificados e as respostas da atividade enzimática de xilanase e β -xilosidase (U/mL).....	90
Tabela 5.3 Coeficientes de regressão para a atividade de xilanase, utilizando o fungo <i>Pleurotus. sp</i> BCCB068.....	91
Tabela 5.4 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de xilanase no processo, utilizando o fungo <i>Pleurotus sp</i> BCCB068.....	91
Tabela 5.5 Coeficientes de regressão para a atividade de β -xilosidase, utilizando o fungo <i>Pleurotus sp</i> BCCB068.....	94
Tabela 5.6 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de β -xilosidase no processo, utilizando o fungo <i>Pleurotus sp</i> BCCB068.....	94
Tabela 5.7 Planejamento completo 2^3 com 17 ensaios, para a linhagem <i>Pleurotus tailândia</i>	99
Tabela 5.8 Efeitos estimados para a atividade de xilanase, utilizando o fungo <i>P. tailândia</i>	100
Tabela 5.9 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de β -xilosidase no processo, utilizando o fungo <i>P. tailândia</i>	100
Tabela 5.10 Coeficientes de regressão para a atividade de β -xilosidase, utilizando o fungo <i>P. tailândia</i>	102
Tabela 5.11 Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de β -xilosidase no processo, utilizando o fungo <i>P. tailândia</i>	102
Tabela 5.12 Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares por <i>P. sp</i> BCCB068 sob fermentação submersa.....	86

Tabela 5.13 Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares por <i>P. taiandia</i> sob fermentação submersa.....	86
Tabela 5.14 Perfil enzimático das linhagens <i>P. sp</i> BCCB068 e <i>P. taiandia</i> cultivados sob fermentação submersa utilizando farelo de arroz como única fonte de carbono durante 10 dias. (ND* – não detectado).....	90
Tabela 5.15 Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por <i>P. sp</i> BCCB068 no período de 60 minutos de reação.....	93
Tabela 5.16 Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por <i>P. taiandia</i> no período de 60 minutos de reação.....	93
Tabela 5.17 Degradação de CMC, produção de oligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por <i>P. sp</i> BCCB068 no período de 60 minutos.....	98
Tabela 5.18 Degradação de CMC, produção de Oligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por <i>P. taiandia</i> no período de 60 minutos de reação.....	98
Tabela 5.19 Crescimento da cultura <i>L. acidophilus</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	101
Tabela 5.20 Crescimento da cultura <i>L. plantarum</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	103
Tabela 5.21 Crescimento da cultura <i>B. Bifidum</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	105
Tabela 5.22 Crescimento da cultura <i>L. reuteri</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	107
Tabela 5.23 Crescimento da cultura <i>L. pentosus</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	109
Tabela 5.24 Crescimento da cultura <i>S. enteritidis</i> no período de 0, 6, 12, 18 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	111

Tabela 5.25 Crescimento da cultura <i>E. coli</i> , no período de 0, 6, 12, 18 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.....	113
Tabela 5.26 Valor de pH da cultura <i>L. acidophilus</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	115
Tabela 5.27 Valor de pH da cultura <i>L. plantarum</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	116
Tabela 5.28 Valor de pH da cultura <i>B. bifidum</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	118
Tabela 5.29 Valor de pH da cultura <i>L. reuteri</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	119
Tabela 5.30 Valor de pH da cultura <i>L. pentosus</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	120
Tabela 5.31 Valor de pH da cultura <i>S. enteritidis</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	121
Tabela 5.32 Valor de pH da cultura <i>E. coli</i> , no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Cultura probiótica <i>Bifidobacterium longum</i>	6
Figura 2.2 Cultura probiótica <i>Lactobacillus casei</i> presente no aparelho digestivo humano.....	7
Figura 2.3 Os prébióticos como fatores bifidogênicos e o mecanismo de ação das bactérias probióticas.....	10
Figura 2.4 Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).....	14
Figura 2.5 Estrutura química de diferentes fontes de xilanas: (A) O-acetil-4-O-Metilglucuronoxilana de madeiras duras, (B) Arabino-xilooligossacarídeo de hemicelulose de trigo.....	16
Figura 2.6 Camadas da parede celular da lignocelulose.....	21
Figura 2.7 Estrutura básica da celulose.....	22
Figura 2.8 Arranjo das microfibrilas da celulose.....	24
Figura 2.9 Precursores da lignina.....	26
Figura 2.10 Segmento de um polímero de lignina.....	27
Figura 2.11 Microscopia de varredura mostrando a estrutura de um basidiomiceto (<i>Pleurottus sp</i> BCCB068).....	28
Figura 2.12 Enzimas que atuam na degradação de lignoceluloses.....	30
Figura 2.13 Centro de cobre de lacase de <i>Bacillus subtilis</i>	37
Figura 2.14 Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase.....	38
Figura 2.15 Ciclo catalítico da manganês peroxidase.....	39
Figura 5.1 Atividade da enzima lacase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....	51
Figura 5.2 Atividade da enzima manganês peroxidase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de	

arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....53

Figura 5.3 Atividade da enzima β -glicosidase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....55

Figura 5.4 Atividade da enzima avicelase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....57

Figura 5.5 Atividade da enzima carboximetilcelulase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....59

Figura 5.6 Atividade da enzima xilanase sobre os substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), produzidas pelas linhagens fúngicas no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa.....61

Figura 5.7 As linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 (esquerda) e *Pleurotus sp tailândia* (direita) cultivadas sob fermentação submersa, tendo farelo de arroz como fonte de carbono no 10° dia de cultivo.....67

Figura 5.8 Espectros da varredura dos tempos de degradação do hidrolisado selecionado (*Pleurotus sp* BCCB068, cultivado em farelo de arroz, no período de 10 dias) em matriz hemicelulósica (xilana). O espectro 1 corresponde ao controle, os espectros 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem respectivamente aos tempos de degradação enzimática de 10, 15, 20, 30, 40 e 50 minutos respectivamente, na temperatura de 50°C.....68

Figura 5.9 Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de xilanase U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).....72

Figura 5.10 Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de β -xilosidase U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).....74

Figura 5.11 Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de β -xilosidase U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).....80

Figura 5.12 Atividades de xilanase, β -xilosidase e pH produzidos por *P. sp* BCCB068 durante 40 dias sob fermentação submersa utilizando xilana como única fonte de carbono. Resultados foram expressos em triplicata e os desvios padrão foram expressos em barras.....83

Figura 5.13 Atividades de xilanase, β -xilosidase e pH produzidos por *P. thailandia* durante 40 dias sob fermentação submersa utilizando xilana como única fonte de carbono. Resultados foram expressos em triplicata e os desvios padrão foram expressos em barras.....83

Figura 5.14 CLAE de *P. sp* BCCB068 cultivado em fermentação submersa para (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 25, (E) 30, (F) 40 dias, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....84

Figura 5.15 CLAE de *P. thailandia* cultivado em fermentação submersa para (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 25, (E) 30, (F) 40 dias, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....85

Figura 5.16 CLAE de *P.sp* BCCB068 hidrolisando matriz de xilana para (A) 5, (B) 20, (C) 25, (D) 30, (E) 40, (F) 50 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....91

Figura 5.17 CLAE de *P. thailandia* hidrolisando matriz de xilana para (A) 5, (B) 15, (C) 30, (D) 40, (E) 50, (F) 60 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....92

Figura 5.18 CLAE de *P. sp* BCCB068, hidrolisando matriz de CMC para (A) 5, (B) 20, (C) 25, (D) 30, (E) 40, (F) 60 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, oligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....96

Figura 5.19 CLAE de *P. thailandia* hidrolisando matriz de CMC para (A) 5, (B) 15, (C) 20, (D) 30, (E) 40, (F) 50 minutos, respectivamente, indicando a presença de

monômeros de açúcar, oligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle é mostrado na linha tracejada de todos os cromatogramas.....97

Figura 5.20 Crescimento da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....101

Figura 5.21 Crescimento da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....103

Figura 5.22 Crescimento da cultura *B. bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (com incubação de 10 dias).....105

Figura 5.23 Crescimento da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (com incubação de 10 dias).....107

Figura 5.24 Crescimento da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 30°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de

reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....109

Figura 5.25 Crescimento da cultura *S. enteritidis*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, sob condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....111

Figura 5.26 Crescimento da cultura *E. coli*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, sob condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (com incubação de 10 dias).....113

Figura 5.27 Análise de pH da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....115

Figura 5.28 Análise de pH da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....116

Figura 5.29 Tubos com a cultura *L. plantarum*, no período de 72 horas de incubação, a 37°C, utilizando as seguintes amostras: (C) controle, (FOS) Frutooligossacarídeo, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias). O meio litmus milk possui um indicador de cor que varia de acordo com o pH, sendo a cor rosa atribuída a um meio ácido, amarelo/incolor corresponde a um pH neutro e a cor azul/roxa corresponde a um pH básico.....117

Figura 5.30 Análise de pH da cultura *B. bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....118

Figura 5.31 Análise de pH da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....119

Figura 5.32 Análise de pH da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 30°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....120

Figura 5.33 Análise de pH da cultura *S. enteritidis*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, sob condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de

reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).....121

Figura 5.34 Análise de pH da cultura *E. coli*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, sob condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (com incubação de 10 dias).....122

LISTA DE ABREVIATURAS

LiP: Lignina peroxidase

MnP: Manganês peroxidase

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

XOS: Xilooligossacarídeos

FOS: Frutooligossacarídeos

PSC: *Pleurotus sajor caju*

PT: *Pleurotus tailandia*

LCMs: Materiais lignocelulósicos

AAFC: Agriculture and Agri-Food Canadá

FAO: Food and Agriculture Organization

WHO: World Health Organization

NDOs: Oligossacarídeos não digeríveis

GF2: 1-Kestose

GF3: Nistose

GF4: Frutofuranosil nistose

LCDs: Carboidratos de baixa digestibilidade

SCC: Carboidratos de cadeia curta

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas 6 linhagens de fungos basidiomicetos, sendo que estas foram testadas em 5 tipos de fontes lignocelulósicas provindas de resíduos agroindustriais. Estes foram testados sob fermentação submersa em cultivo estacionário no período de 30 dias de incubação. Na busca dos melhores hidrolisados para os testes prebióticos, foram selecionados os hidrolisados utilizados para fonte de enzimas dos fungos *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia*, no 10º dia de incubação, utilizando farelo de arroz como fonte de carbono com as maiores atividades de xilanase de 0,29 U/ml e 0,24 U/mL respectivamente. Estes valores foram ampliados posteriormente com a otimização do processo de fermentação, elevando as atividades para 0,4 U/mL e 0,69 U/mL, respectivamente. Os hidrolisados escolhidos foram aplicados como fonte de enzimas lignocelulolíticas sobre a matriz de xilana e carboximetilcelulose, avaliando a degradação destas matrizes no período de 0 a 60 minutos de hidrólise. Neste período, os hidrolisados mostraram-se capaz de hidrolisar até 66,4% da xilana e 59,9% de carboximetilcelulose, formando compostos xilooligossacarídeos e celooligossacarídeos, respectivamente, além de vários monômeros de açúcares.

As linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* também foram utilizadas diretamente para degradar a matriz de xilana em fermentação de 40 dias de cultivo, onde degradaram esta matriz em 73,6% no 20º dia para a primeira e 70,1% já no 5º dia de cultivo para a segunda linhagem, com produção de xilooligossacarídeos e seus monômeros.

Os hidrolisados com efeito positivo na degradação das matrizes de xilana e carboximetilcelulose foram testados na sua atividade prebiótica, com significativa estimulação de culturas probióticas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e sem estimulação significativa de bactérias enteropatogênicas como a *S. enteritidis* e *E. coli*, em experimentos *in vitro*. Estes resultados indicam o grande potencial destas linhagens fúngicas para a degradação de matrizes hemicelulósicas, para a obtenção de compostos hidrolisados com características prebióticas.

ABSTRACT

In this present work, six basidiomycete strains were evaluated using five different lignocelulosic agricultural residues as substrates. These fungi were cultivated under non-agitated conditions for 30 days. Searching for the best strains able to produce lignocellulolytic enzymes, hidrolise these growth substrates and generate compounds having prebiotic activity, *Pleurotus* sp BCCB068 and *Pleurotus tailândia* were selected at 10 days of growth using rice bran as the sole carbon source, because they exhibited the best xylanase activities (0.29 and 0.24 U/mL, respectively). Growth of these fungi was optimized using an experimental design, resulting in the increase of xylanase activities to 0.4 and 0.69 U/mL, respectively. The crude extract obtained following growth of these fungi used as enzyme source for the hidrolises of xylan and carboxymethylcellulose matrices, which were degraded (66.4 and 59.9%), respectively, during 0-60 minutes of hydrolysis, forming xylo- and celo-oligosaccharides, as well as several sugar monomers.

Pleurotus sp BCCB068 and *Pleurotus tailândia* were also used directly to degrade xylan under fermentation during 40 days, produzing xylooligosaccharides and sugars, and showing degradation of 73.6% at the 20th day, and 70,1% at the 5th day, respectively.

The hydrolyzed products with positive effect in the degradation of xylan and carboxymethylcellulose were evaluated regarding their prebiotic activity, showing significant stimulation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. However, no significant stimulation of enteropatogenic bacteria such as *S. enteritidis* and *E. coli*, in an *in vitro* experimentation. These results indicate a great potential of these fungal strains to degrade hemicelulosic materials and produce hydrolyzed compounds with prebiotic characteristics.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se por ser um dos principais países de atividade agrícola, onde uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos é gerada anualmente, possuindo um valor negativo na economia das operações agrícolas, provocando efeitos adversos sobre o ambiente, no decorrer da sua disposição final. Os resíduos agrícolas contêm cerca de 20 a 60% de celulose, 20 a 30% de hemicelulose e 15 a 30% de lignina. O bagaço de cana, o farelo de trigo e de arroz, por exemplo, contêm cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%) (COWLING et al. 1976). Espécies fúngicas, como a de *Pleurotus*, são relatadas como eficientes colonizadoras e degradadoras de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração de diversas enzimas lignocelulolíticas, formando um grupo altamente degradativo, que atuam sobre os constituintes maiores de resíduos lignocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina. Estas enzimas possuem grande valor para o mercado biotecnológico, devido a sua aplicação direta nos processos de biopolpação e na indústria de alimentos, como as enzimas atuantes em polpas e clarificação de sucos. Estas enzimas atuam na degradação de hemiceluloses, como a xilana, e celuloses, como a carboximetilcelulose, formando compostos oligossacarídicos com propriedades prebióticas (POINTING, 2001).

Os prebióticos são constituintes naturais de vários alimentos, sendo amplamente distribuídos nos produtos de origem vegetal. O crescente interesse por estes compostos é devido à não digestão destes pelo organismo humano, sendo resistentes às enzimas salivares, pancreáticas e também ao ácido estomacal (RASTALL et al. 2005). Por consequência atingem o intestino grosso (cólon) na forma intacta e podem ser digeridas por bactérias nativas do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacilos*. A estas bactérias atribuem-se efeitos benéficos à saúde sendo assim chamados de microrganismos probióticos (CRITTENDEN e TANNOCK, 1999). Os benefícios dos prebióticos incluem a redução de bactérias nocivas e de metabólitos tóxicos, prevenção da diarreia, efeito anticarcinogênico, redução da lipídemia e aumento da absorção e produção de nutrientes, devido ao

efeito positivo sobre as bactérias benéficas intestinais (SCHEPPACH et al. 2001; GIBSON, 2004). Os compostos reconhecidos como prebióticos são basicamente os carboidratos identificados como não digeríveis como a inulina e a linha de oligossacarídeos, sendo utilizados como ingredientes em diversos alimentos como, gomas de mascar, iogurtes e bebidas. Segundo HOLZAPFEL e SCHILLINGER (2002), estes compostos englobam cerca de 65% dos alimentos funcionais no mercado mundial, sendo que este segmento está em plena ascensão onde se estima um faturamento de 75 bilhões de dólares nos últimos anos.

A obtenção de compostos prebióticos, como os oligossacarídeos, a partir da degradação enzimática de resíduos agroindustriais, é uma alternativa para as indústrias de alimentos de obterem compostos com estas características funcionais, com um custo mais barato em relação aos atuais compostos que estão no mercado, agregando valor a estes resíduos agrícolas, e assim, criando uma alternativa de aproveitamento destes, com diminuição do impacto ambiental que estes resíduos provocam ao meio-ambiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos Funcionais

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde através de mecanismos não previstos através da nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998). Esta denominação diferencia o alimento funcional do alimento nutracêutico, onde este é isolado de um alimento e comercializado para dosagem enquanto o alimento funcional é similar em aparência a um alimento convencional, sendo modificado com a adição de ingredientes que conferem efeitos adicionais à saúde. Segundo a AAFC (Agriculture and Agri-food Canadá, 2007), alimentos funcionais e nutracêuticos são aqueles com potencial de agregar benefícios fisiológicos à saúde humana ou de reduzir o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutritivas.

2.1.1 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

2.1.1.1 Probióticos

Segundo FOOKS et al. (1999), a palavra probiótico deriva de duas palavras gregas que significam “por vida”. O termo foi usado para significar a substância que estimula o crescimento de outro microrganismo ou extratos de tecido com os quais se promove o crescimento microbiano, porém esta denominação não recebeu aceitação geral na área científica. PARKER (1996), foi o primeiro a utilizar a palavra probiótico no contexto de suplementação animal e foi definida como organismos e substâncias que contribuem para o balanço da flora intestinal. Recentemente, GIMENEZ, (2002) definiu os probióticos como: “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos na saúde do indivíduo”. Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO-WHO, 2002; SANDERS, 2003; SAAD, 2006).

Os alimentos probióticos surgiram em 1908 com a produção de leites fermentados utilizando-se culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. A atividade probiótica é baseada no fato que a flora do cólon, como as bifidobactérias e lactobacilos considerados benéficos para a saúde humana, podem ser seletivamente estimulados por carboidratos indigeríveis através da fermentação (FAO-WHO 2002, CUMMINGS et al. 2001). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra microrganismos patogênicos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPEN-PIMIA et al. 2002).

Um microrganismo é considerado probiótico se o mesmo for habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver a passagem pelo estômago e manter a viabilidade e atividade no intestino (FAO-WHO, 2002).

Sabe-se que cerca de 100 trilhões de bactérias pertencentes a mais de 400 espécies diferentes, de natureza saprófita e patogênica, vivem harmoniosamente num delicado balanço no trato gastrointestinal, até que este seja desequilibrado pela dieta, consumo de drogas, situações de estresse, tratamentos quimioterápicos, idade, tempo de trânsito intestinal, pH intestinal, disponibilidade de material fermentável e outras situações, provocando diferentes tipos de problemas gastrointestinais como a disbiose intestinal, definido como desordem do trato gastrointestinal, devido ao desequilíbrio das bactérias intestinais (CARVALHO, 2001). Sabe-se também que, em diferentes regiões do trato intestinal, estão presentes grupos específicos de microrganismos, como bactérias lácticas e bífidas, que modulam a microbiota nestes espaços, principalmente devido aos seus produtos de metabolismo (FERREIRA e TESHIMA, 2000). Essa microbiota desejável protege o hospedeiro antagonizando o crescimento de microrganismos patogênicos, além de manter a sua saúde, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, decompondo ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio, ferro e outros nutrientes, diminuindo a

incidência de doenças coronárias, ajudando a digestão, estimulando o sistema imunológico, apresentando atividades antitumorogênica e antimutagênica (OUWEHAND e SALMINEN, 1998; BUJALANCE et al. 2007), e, por meio de suas enzimas, favorecendo o metabolismo de algumas substâncias como a lactose, em indivíduos lactase não persistentes (OUWEHAND e SALMINEN, 1998).

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, decorrente do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989).

Lactobacilus e bifidobactérias, que fazem parte da microflora do intestino humano, podem ser introduzidas por produtos fermentados. Estas espécies de bactérias exercem efeitos probióticos nos humanos, bem como melhoram as propriedades da flora nativa (BERNET et al., 1993).

2.1.1.1.1 Gênero *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* foi isolado e classificado em 1924 por Orla-Jensem e hoje já são conhecidas 24 espécies, as quais diferenciam-se entre si pela capacidade de fermentarem diferentes tipos de açúcares; a maioria fermenta a lactose, como também hidrolisa o amido (HOLT et al. 1994).

As bifidobactérias são bastonetes, gram-positivos, anaeróbicos, no entanto, algumas são tolerantes ao oxigênio, possuem formato de Y e requerem nutrientes especiais, o que dificulta seu isolamento e crescimento em laboratório. Segundo TAMINE et al. (1995), estes microrganismos crescem em meios que contêm triptose, fitona (peptona de soja), extrato de levedura, onde agrupam-se em colônias com forma de disco oval com bordas bem definidas; as células apresentam epitélio específico: em *B. breve* é mais fino e curto; muito alongado,

relativamente fino, com irregularidades pequenas no contorno. Algumas das espécies de bifidobactérias fermentam a lactose e crescem bem em leite. Lactato (L+) e acetato são os principais componentes do *flavor* durante a fermentação por *Bifidobacterium ssp* (SAARELA et al. 2000). Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20 °C a 46 °C e morrem a 60 °C. O pH ótimo é 6,5-7,0, não havendo crescimento em pH < 5,1 ou pH > 8,0 (GIMENEZ, 2002). VELAZQUEZ e FEITARC (1997), observaram que as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* são capazes de promover modificações gastrointestinais, aumentando o valor nutricional quando adicionada à dieta como probiótico, e atuando no sistema de imunização. As bifidobactérias são os maiores componentes da flora intestinal de indivíduos saudáveis, e são consideradas benéficas para todos os grupos de idade porque inibem o crescimento de muitas bactérias nocivas conforme observado por OIKI et al. (1996), quando utilizaram *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* como suplemento alimentar e em leite fermentado, e porque auxiliam na construção da resistência contra infecções no hospedeiro (GARRO et al. 2004).

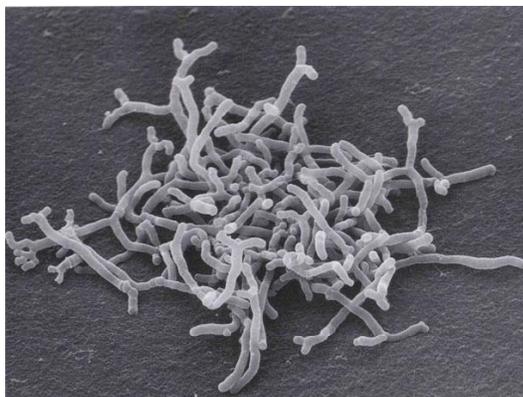


Figura 2.1. Cultura probiótica *Bifidobacterium longum*.

2.1.1.1.2 Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* foi isolado e classificado no ano de 1901 por Otto Kandler e Norbert, sendo que hoje já se conhece 44 espécies. Constituem-se em bastonetes, gram positivos, não esporulados, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, que se dispõem em forma de cadeias diferentes tamanhos (SAARELA

et al. 2000). São células que variam de longas a delgadas, as vezes tendem a hastes curtas, cocobacilos, comumente sem motilidade, coradas com azul de metileno, catalase negativa, crescimento ótimo entre 30°C e 40°C, pH de crescimento entre 5,5 e 6,2 (HOLT et al., 1994). A maioria fermenta glicose, lactose e frutose; são divididos em três grupos (STAMFORD, 2000):

⇒ grupo I: são obrigatoriamente denominados homofermentativos;

⇒ grupo II: todos fermentam a frutose e glicose, e apenas uma espécie, o *Lactobacillus homohiochei* não fermenta a galactose;

⇒ grupo III: todos fermentam a glicose, mas nem todos fermentam a galactose e frutose. Os seus substratos provocam o decréscimo do pH pela formação de ácido láctico, impedindo assim o crescimento de outras bactérias competidoras.

Estas propriedades fazem dos lactobacilos valiosos habitantes do trato intestinal humano, trazendo importantes contribuições para a tecnologia dos alimentos (GUTIERREZ et al. 1996).

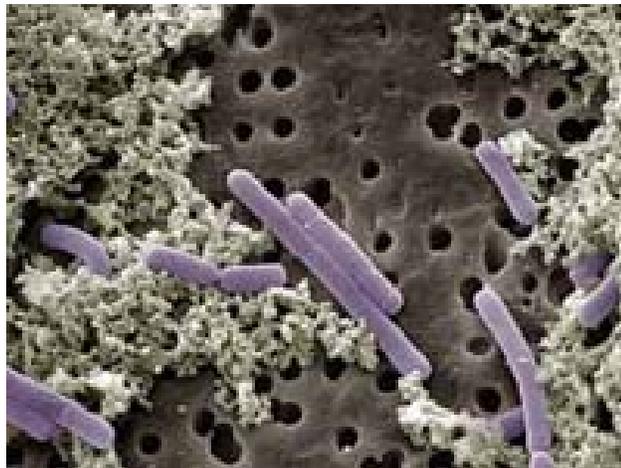


Figura 2.2. Cultura probiótica *Lactobacillus casei* presente no aparelho digestivo humano.

As bactérias ácido lácticas têm sido utilizadas como cultura iniciadora em produtos derivados de leite, produtos cárnicos e vegetais, e mais recentemente são utilizadas como probióticos para humanos e animais. (VERELLEN et al. 1998; HYUM e SHIN, 1998; KAO et al. 2007; YADAV et al. 2007).

A implantação e sobrevivência deste microrganismo quando administrado como probiótico dependerá grandemente do tipo de dieta consumida pelo hospedeiro, a qual pode promover a proliferação destes microrganismos. A predominância de bifidobactérias nas paredes do cólon proporciona competição por espaço e nutrientes às custas de gêneros menos desejáveis (LIZARDI et al. 1996; COLLADO et al. 2006).

Tabela 2.1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas relacionadas às bactérias probióticas em seres humanos

Efeitos benéficos

Manutenção da microflora intestinal normal
Antagonista de crescimento de patógenos
Estimulação do sistema imunológico
Redução da intolerância à lactose
Redução dos níveis de colesterol
Impedimento da reabsorção de compostos aminados indesejáveis
Desconjugação de ácidos biliares
Diminuição de doenças coronárias
Atividade antimutagênica
Atividade anticarcinogênica
Atividade antitumorogênica
Melhora o valor nutricional dos alimentos
Efeitos nutricionais

Atividades terapêuticas e profiláticas

Prevenção de infecção urogenital
Alívio da constipação
Proteção contra diarreia
Prevenção de diarreia infantil
Redução da diarreia induzida por antibióticos
Prevenção da hipocolesteremia
Prevenção contra câncer de cólon e bexiga
Prevenção da osteoporose

Fonte: FULLER, 1989; FOOKS et al., 1999.

2.1.1.2 Prebióticos

O termo prebiótico é conferido aos carboidratos identificados como não digeríveis incluindo inulina e a linha de oligossacarídeos, que fornecem substratos fermentáveis para as bactérias benéficas do cólon (CRITTENDEN e TANNOCK, 1999).

Os prebióticos induzem a efeitos antimicrobianos principalmente pela via da estimulação seletiva de determinadas espécies de bactérias, modulando as funções imunológicas e competindo com os patogênicos por receptores (RASTALL et al. 2005).

Alguns carboidratos dietéticos indigeríveis, mas que são fermentáveis, podem estimular seletivamente grupos de bactérias que habitam o cólon, especialmente as bifidobactérias e lactobacillus, considerado benéfico para a saúde do homem, sendo chamados assim de prebióticos. Os carboidratos de cadeia curta (SCC) possuem propriedades semelhantes e também são definidos como oligossacarídeos não digeríveis (CUMMINGS et al. 2001) ou carboidratos de baixa digestibilidade (LDCs) (MARTEAU e FLORIÉ, 2001).

Existem várias comprovações sobre efeitos benéficos dos prebióticos, que também relatados para a atividade intestinal, resulta numa desejável influência sobre a digestão e absorção dos carboidratos, metabolismo da glicose, lipídios e proteção contra os fatores de risco conhecidos das doenças cardiovasculares. No nível de cólon, a produção fermentativa de ácidos graxos de cadeia curta é considerado o mais importante benefício relacionado com a prevenção do câncer de cólon (SCHEPPACH et al. 2001; GIBSON, 2004).

Conforme os efeitos e aspectos relacionados com os prebióticos, estes possuem as propriedades de não serem digeríveis e de valor enérgico menor que 9 Kcal/g; aumento do volume fecal; propriedades moduladoras da flora colonial tais como estimulação de bactérias benéficas (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Eubacterium spp.*) e inibição de bactérias indesejáveis como *Clostridium* e *Bacterioides*.

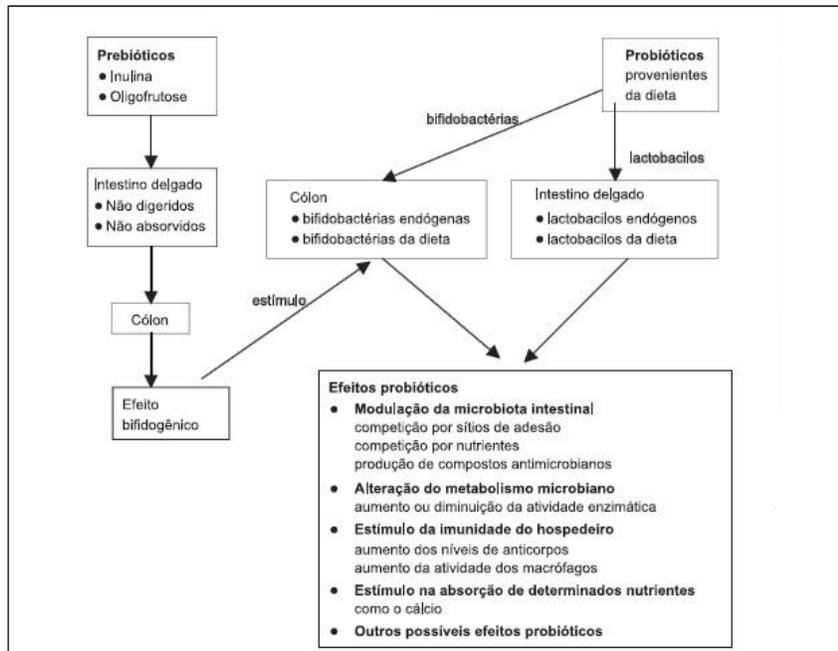


Figura 2.3. Os prebióticos como fatores bifidogênicos e o mecanismo de ação das bactérias probióticas. Fonte: SAAD, 2006.

Conforme descrito por FOOKS et al. (1999), o critério para a caracterização dos prebióticos como ingredientes alimentares inclui:

⇒ Não deve ser nem hidrolisado, nem absorvido, na parte superior do trato gastrointestinal.

⇒ Deve promover a fermentação seletiva por bactérias potencialmente benéficas no colon, onde deste modo, promove seletivamente o crescimento e/ou estimulação da atividade metabólica de bactérias promotoras da saúde e não a de outras sem estas funções.

⇒ Alteração na composição da microflora do colon a favor de uma composição mais saudável.

⇒ Induzir efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro.

A inulina e frutooligossacarídeos são provavelmente os prebióticos mais usados, sendo que vários tipos de probióticos utilizam estes oligossacarídeos, formando assim os chamados simbióticos; estas substâncias alcançam o ceco intestinal, sendo fermentados e bem tolerados (NITSCHKE e UMBELINO, 2002).

2.1.1.3 Simbióticos

O termo simbiótico refere-se a um produto no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico. O efeito simbiótico pode ocorrer em duas regiões do intestino, isto é, no intestino grosso e intestino delgado. Se houver a adição de um carboidrato prebiótico a uma cultura probiótica, este crescimento é promovido seletivamente no intestino (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

O consumo de probióticos e prebióticos selecionados apropriadamente confere efeitos benéficos mais acentuados, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002; MATTILA-SANDHOLM, 2002; PUUPPONEN-PIMIA et al. 2002).

No desenvolvimento de simbióticos é necessária a seleção de linhagens de microrganismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (FERREIRA e TESHIMA, 2000).

A combinação de um pré e probiótico nos produtos alimentícios além de conferir os benefícios citados acima, atua em particular na redução de efeitos nocivos ao organismo, como por exemplo reduzir câncer de cólon, isto comprovado em ratos (GALLAHER e KHIL, 1999).

2.2 Oligossacarídeos como Ingredientes Funcionais

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados naturalmente em vários alimentos como frutas, leite, mel e vegetais. Muitos destes compostos possuem atividades funcionais, isto é, apresentam características benéficas para a saúde do consumidor. Estes melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo modificações no sabor e nas propriedades físico-químicas (ONISHI et al. 1996). Estes compostos consistem de uma cadeia de 2 a 20 sacarídeos unidos, como os polissacarídeos de cadeia curta. Enquanto alguns podem ser sintetizados naturalmente em frutas e vegetais, outros podem ser comercializados através da produção via hidrólise de polissacarídeos, como fibras dietéticas e amido, como também podem ser gerados pela quebra enzimática (MANNING e GIBSON, 2004). Os seguintes oligômeros são classificados como potencial atividade prebiótica:

- ⇒ Lactulose
- ⇒ Frutooligossacarídeos
- ⇒ Galactooligossacarídeos
- ⇒ Oligossacarídeos da soja
- ⇒ Lactosacarose
- ⇒ Isomaltooligossacarídeos
- ⇒ Glicooligossacarídeos
- ⇒ Xilooligossacarídeos
- ⇒ Palatinose

Durante a década de 90 a sua popularidade como ingredientes de alimentos aumentou de modo significativo, principalmente no Japão e Europa. O governo Japonês criou em 1991 o termo FOSHU (Food for Specified Health Use), para os alimentos funcionais, estando listados entre eles os galacto e frutooligossacarídeos (CRITTENDEN et al. 1996). O crescente interesse pelos oligossacarídeos provém do fato que estes compostos não são digeridos pelo

organismo humano, sendo resistentes às enzimas salivares, pancreáticas e intestinais, bem como o ácido estomacal. Conseqüentemente, atingem o intestino grosso (cólon) na forma intacta e podem ser digeridos por bactérias nativas do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, microrganismos estes, conhecidos como probióticos (MANNING e GIBSON, 2004).

Os oligossacarídeos são os ingredientes alimentares que cumprem com todas as funções prebióticas, onde os mais utilizados na indústria de alimentos são os Frutooligossacarídeos (FOS), Gluco-oligossacarídeos (GOS), Transgalacto-oligossacarídeos (TOS), Isomaltooligossacarídeos (IMO), inulina e Xilooligossacarídeos (XOS) (VÁZQUEZ et al. 2000; MANNING e GIBSON, 2004)

2.2.1 Os Frutooligossacarídeos

Os frutooligossacarídeos são açúcares de três a dez unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas tipo $\alpha(1-2)$ entre frutose terminal e glicose (TAMINE et al. 1995). Estes são encontrados naturalmente em vários alimentos como frutas, leite, mel e vegetais. Muitos destes compostos possuem atividades funcionais, isto é, apresentam características benéficas para a saúde do consumidor. Estes melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo modificações no sabor e nas propriedades físico-químicas (ONISHI et al. 1996).

Nos últimos anos tem crescido muito o interesse pelo consumo dos oligossacarídeos, principalmente no Japão e Europa.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são constituintes naturais de muitos alimentos, sendo amplamente distribuídos nos produtos de origem vegetal. Estes oligossacarídeos possuem frutose como unidade monomérica principal em diferentes graus de polimerização, podendo ser produzidos industrialmente, por meio de extração, fermentação microbiana ou pela ação de enzimas. Entre estes compostos podemos destacar a inulina e oligofrutose como fibras dietéticas solúveis, consideradas seguras para o consumo humano, com base em avaliações toxicológicas. Os FOS apresentam propriedades físicas e fisiológicas que conferem a estes compostos um grande potencial de aplicação para

alimentos de nutrição animal e humana. A nomenclatura FOS é dada apenas a oligômeros de frutose, que são compostos de 1-kestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4) (Figura 2.4), em que as unidades de frutosil (F) são ligadas na posição beta- 2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996).

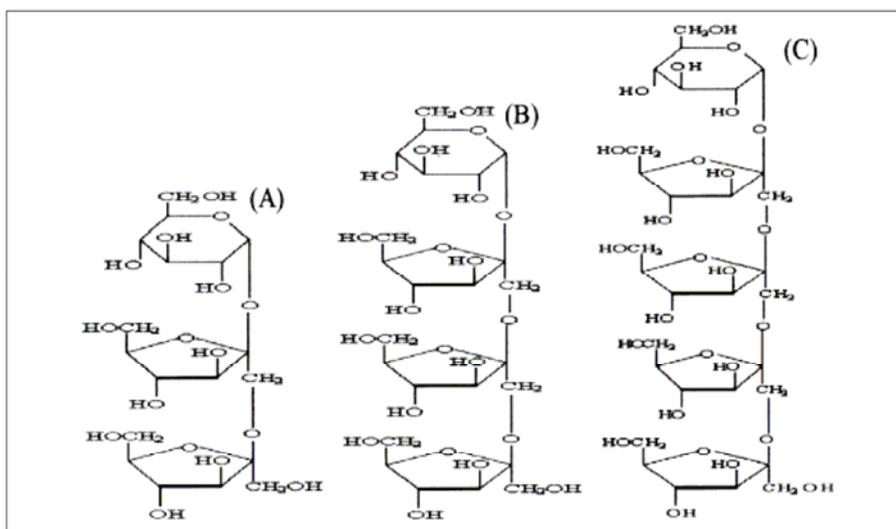


Figura 2.4 . Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos: 1-kestose (A), nistose (B) e frutofuranosil nistose (C).

Fonte: PASSOS e PARK, 2003.

Os FOS podem ser divididos em dois grupos do ponto de vista comercial: o grupo 1 é o preparado por hidrólise enzimática de inulina, e consiste de unidades lineares de frutosil com ou sem uma unidade final de glicose. Este produto é comercializado como Raftilose, produzido pela Orafti Ltda, da Bélgica, ou como Frutafit, produzido pela Imperial-Suikner Unie, da Holanda. O grau de polimerização desses FOS varia entre 1 e 7 unidades de frutosil. Este processo ocorre amplamente na natureza, e esses oligossacarídeos podem ser encontrados em uma grande variedade de plantas (mais de 36 mil) (ROBERFROID, 1993), mas principalmente em aspargos, alcachofras, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo, tomate, conforme relatam YAMASHITA et al. (1984), SPIEGEL (1994) e YUN (1996). O grupo 2 é preparado por reação enzimática de transfrutosilação em resíduos de sacarose, e consiste tanto de cadeias lineares

como de cadeias ramificadas de oligossacarídeos, com grau de polimerização variando entre 1 e 5 unidades de frutose. Esse produto é produzido pela Meiji Seika Ltd (Tóquio, Japão), e comercializado como Neosugar, Profeed, Meioligo, ou Nutraflora. O Actilight é produzido e comercializado na Europa pela Béghin Meiji Industries (HIDAKA et al., 1986, HARTEMINK et al., 1997).

2.2.2 Os Xilooligossacarídeos

Os xilooligossacarídeos (XOS) estão incluídos entre os oligossacarídeos não digestíveis (NDOs) e são licenciados como ingredientes em alimentos FOSHU (food for specified health use) pelo Ministério da Saúde do Japão. A produção estimada de xilooligossacarídeos no mundo em 1995 foi de cerca de 300 toneladas, com mais da metade consumida no Japão, que juntamente com os outros NDOs produziram um faturamento no mercado de aproximadamente 10 bilhões de yen (SAKO et al. 1999). Os xilooligossacarídeos melhoram a qualidade dos alimentos, promovendo uma modificação no sabor e nas características físico-químicas, e ainda possuem atividades benéficas para a saúde do consumidor, como a de estimular a atividade de *Bifidobacterium* no trato intestinal (NAKANO, 1998).

Os XOS são oligômeros de açúcar formados por unidades de xilose, que aparecem naturalmente em frutos, vegetais, leite e mel. Sua produção industrial é obtida através dos materiais lignocelulósicos (LCMs). Os XOS podem ser utilizados para várias finalidades, onde entre estas destacam-se as aplicações nos alimentos (VÁZQUEZ et. al. 2000).

Os materiais lignocelulósicos utilizados para a produção dos XOS podem vir de uma grande variedade de resíduos (florestais, agroindustriais), de acordo com a sua composição. Os LCMs são constituídos de três polímeros básicos: lignina (estrutura fenólica), celulose (polímero linear formado por unidades de glicose ligadas na forma β -1-4) e a hemicelulose (heteropolissacarídeo derivado de vários monossacarídeos, incluindo xilose, arabinose, manose e ramnose (GARROTE et al. 1999). Dependendo da natureza do material lignocelulósico, polímeros de xilose (xilana), arabinose (arabinana) ou manose (mananas) podem ser

substituídas nas ligações via éter ou éster formando por exemplo o α -o-glicopiranosil ácido urônico ou 4-o- metil derivados, grupos acetila e ácidos (EBRINGEROVÁ e HEINZE, 2000; PULS e SCHUSEL 1993).

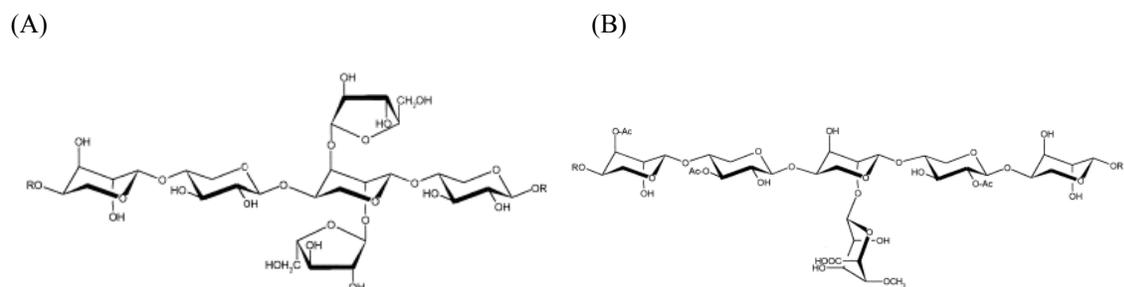


Figura 2.5 - Estrutura química de diferentes fontes de xilanas: (A) O-acetil-4-O-Metilglucuronoxilana de madeiras duras, (B) Arabino-xilooligossacarídeo de hemicelulose de trigo. Fonte: VÁZQUEZ et. al., (2000).

Os materiais utilizados para a produção dos XOS provindos dos LCMs provém de uma base rica em xilana, com algumas cadeias heterocíclicas de éter, devendo ser hidrolisada para gerar compostos degradados de cadeia longa. Três diferentes formas tem sido utilizadas para a produção destes compostos:

⇒ Tratamento com enzimas nativas em xilana contida nas LCM.

⇒ Fracionamento químico de LCM de xilana isolada ou solubilizada, com adição de hidrólise enzimática destes polímeros para XOS.

⇒ Degradação hidrolítica de xilana para XOS, utilizando vapor d'água ou soluções diluídas de ácidos minerais.

A produção direta de XOS de LCMs contendo xilana exige que este seja extraído do composto onde esteja contido. Por esta razão, os XOS produzidos de membranas de polpas de frutas cítricas por métodos enzimáticos foi realizado por TAKAO e YOSHIO (1996), onde xilana ou fragmentos de xilana solúveis podem

ser obtidos por LCMs, através de tratamento de álcalis (ex: NaOH, KOH, Ca(OH)₂, amônia ou mistura destes componentes).

Este processo é favorecido pela estabilidade de pH destes polímeros e a fração solubilizada pode ser recuperada através do líquido do processo. Nestes casos, o material cru pode ser preparado com agentes oxidantes, sais e álcoois para remover lignina ou substâncias perdidas. No caso da xilana pode ser solubilizada em líquido caustico, precipitado em compostos orgânicos (álcoois, ácidos ou cetonas) seguindo de recuperação da hemicelulose dissolvida e seus produtos de degradação. Uma vez que a xilana tenha sido isolada ou degradada para a forma solúvel, estará pronta para a hidrólise através de xilanases (MASAYASU et. al. 1993).

Para produção enzimática de XOS, são desejados complexos enzimáticos com exo-xilanases e ou β -xilosidases, para evitar a produção de xilose. Onde estas enzimas podem ser diretamente adicionadas para a reação, imobilizadas ou produzidas in situ por microrganismos (PELLERIN et. al. 1991; SUWA et al. 1999; CAI et. al. 1997). Através destes métodos, longas cadeias de XOS podem ser produzidas, sendo que para alimentos são preferíveis cadeias entre 2-4 DP (LOO et. al. 1999).

2.2.2.1 Os xilooligossacarídeos e suas propriedades tecnológicas

A utilização de XOS como ingredientes para alimentos funcionais é fundamentado nos seus benefícios para a saúde, incluindo a sua estabilidade em longa faixa de pH e temperatura, metabolismo seletivo para as Bifidobactérias, aumento da produção de ácidos graxos voláteis e atividade de redução de lesões de úlcera de estômago (PARAJÓ et al. 2004).

Para aplicação em ingredientes de alimentos, xilobiose (grau de polimerização= 2) é considerado como um XOS, até mesmo para outros conceitos de “oligo” é associado com alto grau de polimerização. A doçura da xilobiose é equivalente a 30% em relação a sacarose, sendo que a doçura dos outros XOS é moderada e não possuem efeito residual. Os xilooligossacarídeos são estáveis em pHs entre (2,5 - 8,0), uma vantagem em comparação aos outros oligossacarídeos,

como os frutooligossacarídeos (FOS), particularmente na variação de acidez, como a relativa baixa de valores de pH do suco gástrico e temperaturas (acima de 100°C). A atividade de água da xilobiose é superior a da xilose, sendo muito similar a da glicose. A atividade (antifreezing) de xilobiose na água a temperaturas maiores que -10°C é a mesma da xilose, mas maiores que a glicose, sacarose e maltose (BHAT, 1998). Como ingrediente em alimentos, os XOS possuem um odor aceitável e são anticarcinogênicos (KAZAMITSU, 1997, KAZUYOSHI, 1998) de baixa caloria sendo utilizado em dietas antiobesidade (TOSHIO et al., 1990, TAEKO et al., 1998). No processamento dos alimentos, os XOS apresentam vantagens sobre a inulina em termos de resistência para os ácidos em aquecimento, sendo utilizados em sucos de baixo pH e bebidas carboidratadas (MODLER, 1994).

2.2.2.2 Comparação da atividade prebiótica entre os xilooligossacarídeos e os principais oligossacarídeos estudados

Os efeitos dos xilooligossacarídeos para a saúde são principalmente relatados sobre a flora intestinal (JEONG et al., 1998, GIBSON, 2004). Resultados foram obtidos *in vivo* usando ratos, com considerável crescimento de *Bifidobacterium ssp.* no trato gastrointestinal (SUWA et al., 1999) e o aumento dos ácidos graxos totais de cadeia curta no cecum de ratos (CAMPBELL et al., 1997, IMAIZUMI et al., 1991). Testes realizados em humanos mostram que a ingestão de XOS beneficiam a flora intestinal, onde a ingestão de xilobiose (X₂) não foi excretado nas fezes e urina em 24 horas seguindo uma administração por via oral. Estes compostos ainda não foram hidrolisados pela saliva, pancreatina e suco gástrico, fatores estes que sugerem a utilização dos XOS por bactérias intestinais (OKAZAKI et al., 1991).

A digestibilidade dos XOS no trato gastrointestinal e seus efeitos na absorção de ácidos biliares são comparados aos efeitos dos FOS e Isomaltooligossacarídeos (IOS). Considerando a digestibilidade, análises de HPLC mostraram a hidrólise de produtos de FOS, IOS, e XOS após 4 horas de digestão *in vitro*, sendo que a maioria dos IOS e parte dos FOS foram digeridos pelo suco

intestinal, porém os XOS não foram digeridos por nenhuma enzima digestiva. O retardamento dos efeitos dos XOS sobre a absorção de ácidos biliares comparados com IOS e FOS foram comprovados em experimentos *in vitro* (JOO et al., 1998).

Ensaio *in vitro* provaram que *Bifidobacterium spp.* e *B. adolescentis* são hábeis utilizadores de ambos os XOS (x2 e x3) onde a absorção oral de XOS estimula a proliferação de *Bifidobacterium bifidum* no intestino, ao contrário de, *Staphylococcus*, *E. coli* e espécies de *Clostridium spp.* que não utilizaram os xilooligossacarídeos (SUWA et al., 1999, OKAZAKI et al., 1990) A maioria das espécies de *Lactobacillus* utilizaram XOS, onde *L. fermentum* demonstrou esta habilidade, sendo que *Bacterioides* utilizaram XOS, mas em baixa escala comparada com a glicose (OKAZAKI et al., 1990). Em comparação com outros (NDOs), *Bifidobacterium spp.* preferiu os XOS, rafinose e FOS em relação às hexoses, sendo que os XOS foram mais eficazes que a rafinose e tão eficaz quanto os FOS em experimentos de crescimento *in vitro* com estas bactérias (JASKARI et al., 1998).

Os benefícios comprovados das Bifidobactérias na saúde humana incluem a supressão da atividade de bactérias putrefativas; prevenção da formação de produtos de nitrosaminas (FUJIKAWA, 1991, CAMPBELL et al., 1997); repressão da proliferação de bactérias patogênicas (SUWA et al., 1999, OKAZAKI et al., 1990, WOLF et al., 1998), devido a produção de ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, láctico e outros) (LOO et al., 1999, OKAZAKI et al., 1990, WOLF et al., 1994) e promoção da digestão e absorção de nutrientes. Isso resulta na habilidade de prevenir infecções gastrointestinais, reduzindo assim a diarreia (DOHNALEK et al., 1998), com aumento do bolo fecal e esvaziamento intestinal periódico nas evacuações (ZIENER e GIBSON, 1998).

Baseado nos efeitos positivos dos xilooligossacarídeos para a saúde humana, pode-se afirmar que estes compostos são comprovadamente denominados de prebióticos. Por este motivo, são usados como ingredientes ativos em alimentos funcionais (CLYDESDALE, 1997).

Os XOS são utilizados como ingredientes funcionais no Japão, onde suas normas diferem das da América do Norte e Europa, onde os japoneses ao invés de denominarem tais compostos de “alimentos funcionais” os conceituam de FOSHU (Food for Specified Health Use), denominação utilizada desde 1991 (VÁZQUEZ et al., 2000).

2.3 Biodegradação de Resíduos Agroindustriais

Nas últimas décadas há uma crescente busca da maior utilização dos resíduos agroindustriais, devido a incessante demanda das atividades agrícolas. Entre estes resíduos, podemos citar o bagaço de cana de açúcar, sabugo de milho, farelo e casca de arroz, etc. O acúmulo de resíduos na biomassa aumenta a cada ano, causando deterioração do meio ambiente e perda de recursos. Esse aumento é uma contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A utilização destes resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma racional alternativa para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental, (PANDEY et al., 2000).

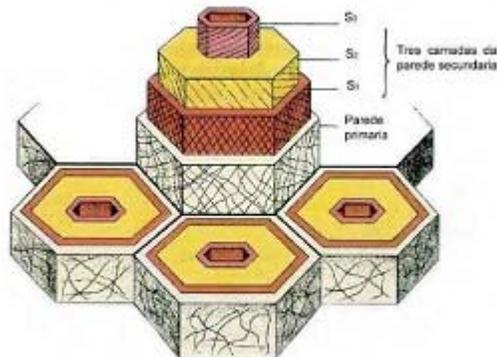
As lignoceluloses são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera abrangendo aproximadamente 50% da biomassa no mundo, com uma produção anual estimada entre 10 e 50 x 10⁹ toneladas. Esta produção é referente as atividades da agricultura, florestas, frutas e vegetais. Estes compostos agrupam-se em polímeros com ligações covalentes e ponte de hidrogênio acompanhadas diretamente na combinação com ligações de forças Van der Waals. (OVEREND e CHORNET, 1987).

Os resíduos lignocelulósicos são uma grande alternativa para a geração de energia, devido a sua grande disponibilidade na natureza. Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papéis, proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, além de poderem gerar energia através da produção de etanol (BALLESTEROS, 2001).

Os resíduos agrícolas contêm 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, contêm cerca de 25 a 40% de celulose e o restante de hemicelulose (20 a 35%) e lignina (15 a 35%) (COWLING e KIRK, 1976).

Espécies de *Pleurotus* são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulases, β -glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de ligninoceluloses (QINNGLE et al. 2003; PALMIERI et al. 2000).

Os fungos formadores de cogumelos comestíveis formam um grupo altamente degradativo que atuam sobre constituintes maiores de resíduos ligninocelulósicos, como a celulose, a hemicelulose e a lignina (SHISHIDO, 1992).



Fonte: Raven (2001)

Figura 2.6. Camadas da parede celular da lignocelulose.

Os substratos farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz e bagaço de cana demonstraram ser grandes fontes de carbono para a produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *P. sajor-caju*, isto através de fermentação submersa e semi-sólida nos estudos conduzidos por SILVA (2001).

2.3.1 Composição dos resíduos lignocelulósicos

A lignocelulose representa mais de 90% do peso seco de uma célula vegetal, sendo composta pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina, unidos fortemente entre si por forças não covalentes e ligações covalentes. Nas paredes celulares de tecidos vasculares de plantas terrestres superiores, as fibrilas de celulose estão localizadas em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose. A quantidade de cada um dos polímeros varia com a espécie e a idade da planta, bem como entre as partes de uma planta. Em média, a lignocelulose consiste de 45% de celulose, 30% de hemicelulose e 25% de lignina (GLAZER e NIKAIDO, 1995).

2.3.1.1 Celulose

A celulose é o mais abundante componente de biomassa em plantas, encontrada principalmente na parede celular destas, correspondendo a aproximadamente 35-50% do peso da planta. É formada por longas cadeias lineares de moléculas de glicose que são ligadas na forma de unidades de D-anidroglicopirranose com pontes ésteres (1→4)- α -D-glicosídicas tornando difícil a sua separação do complexo lignocelulósico e particularmente ao processo de hidrólise deste polímero. A resistência da celulose a processos de hidrólise é devido muito mais a sua estrutura cristalina do que a existência de ligações tipo β -1,4 glicosídica. As pontes de hidrogênio conferem as cadeias de celulose uma estrutura altamente ordenada e rígida. Algumas regiões menos ordenadas (amorfias) são mais sensíveis à hidrólise, formando microcristais (LYND, et al. 2002).

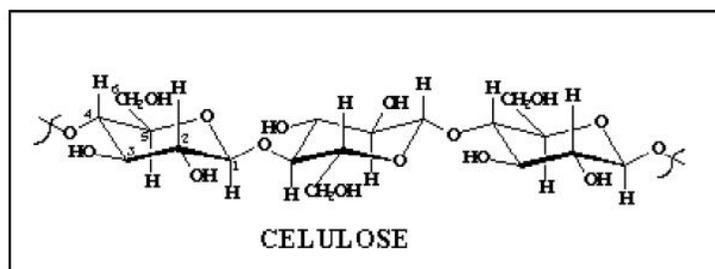


Figura 2.7. Estrutura básica da celulose

Cada uma das fibrilas que compõe a estrutura da celulose é formada pela agregação de cerca de 250 microfibrilas, sendo que cada microfibrila é formada por um pequeno número de feixes de molécula de celulose (fibrilas elementares), onde cada molécula de celulose é formada por mais de mil unidades de glicose, os quais se interligam por pontes de hidrogênio. Em alguns pontos das fibrilas elementares as moléculas de celulose estão dispostas de maneira desordenada, em outros elas se dispõem ordenadamente, formando as micelas de estrutura cristalina. Entre as fibrilas, microfibrilas e fibrilas elementares, ocorrem outros componentes da parede celular como a hemicelulose, lignina, etc SAITO (2005).

2.3.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são macromoléculas, nas quais participam pelo menos dois tipos de unidades de açúcares, apresentando peso molecular muito menor do que a celulose, com 100 a 200 moléculas de monômeros polimerizadas. De acordo com o material lignocelulósicos, as hemiceluloses podem ser classificadas como: xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas. Em madeiras duras e em uma gama de resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo em xilanas. Estes polímeros ou heteropolímeros da galactose, manose, xilose, arabinose, onde as xiloglucanas (formadas por moléculas de glicose com ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações de xilose em ligações α -1,6) e as xilanas (cadeias de xilose em ligações β -1,4) são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias, respectivamente, sendo que as xilanas são as formas mais comuns de hemiceluloses (SACHSLEHNER et al. 1997).

A hemicelulose possui certa similaridade com a celulose, porém é constituída de unidades de pentoses (xilanas) ou unidades alternadas de manoses e glicoses ou unidades de galactoses, com o diferencial de que todas as hemiceluloses possuem cadeias laterais constituídas de ácido acético, pentoses, ácidos hexurônicos e deoxihexoses (α -L-raminose, α -L-fucose) que são responsáveis pela solubilidade da hemicelulose em água e/ou em álcalis. Na

planta, as hemiceluloses estão na maioria, ligadas às ligninas, através de ligações covalentes, e assim fixadas à estrutura fibrosa.

Para o isolamento da hemicelulose, é necessário quebrar as ligações lignina - polissacarídeo. A baixas temperaturas isso é feito com soluções alcalinas, porém apresenta rendimentos insatisfatórios. Altos rendimentos podem ser obtidos com a deslignificação antes do tratamento alcalino. Quando separadas por explosão a vapor, obtém-se furfural como produto principal, que forma resinas com fenol ou uréia, ou pode ser hidrolisado para ácido maleico. Através da hidrogenação catalítica obtém-se o xilitol (umectante, adoçante, plastificante, aditivo de alimentos) a partir da xilose; manitol (adoçante, plastificante, secante) a partir da manose, e uma grande variedade de produtos (SCHUCHARDT e RIBEIRO, 2001).

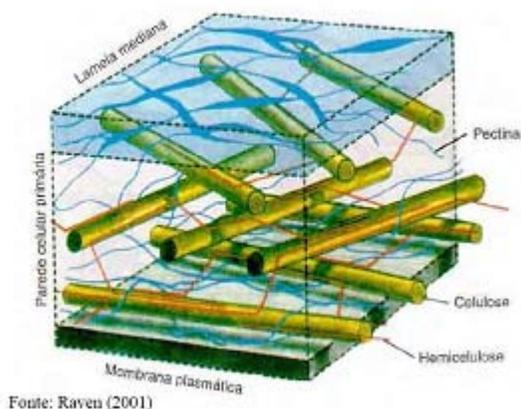


Figura 2.8. Arranjo das microfibrilas da celulose.

A hemicelulose de natureza heteropolissacarídea, pode ser extraída quase que integralmente do complexo lignocelulósico através de processo envolvendo utilização de tratamento hidrotérmico que pode ser seguido ou não de rápida descompressão e deste modo desarranjando a estrutura física do material e facilitando a extração de um liquor composto principalmente de xilose com pequeno grau de polimerização (< 10) e portanto de fácil hidrólise que são

constituídas basicamente por unidades xilano-piranosídicas unidas por ligações β -1,4 com ramificações variáveis de outros monossacarídeos. (PEREIRA JR., 1999).

A hemicelulose de estrutura heteropolissacarídica, pode ser extraída quase que integralmente do complexo lignocelulósico através de processos envolvendo utilização de tratamento térmico e presença de ácido inorgânico como catalisador em pequenas concentrações. (LARSSON, et al., 1999).

2.3.1.3 Lignina

A lignina possui uma estrutura aromática disposta em uma rede macromolecular tridimensional, sendo mais hidrofóbica que a celulose e a hemicelulose. É o mais abundante composto fenólico na natureza e serve como um ligante entre as fibras da madeira dando rigidez e força à estrutura. Este polímero fenólico é um dos componentes da parede celular dos vegetais, ao lado dos carboidratos estruturais celulose e hemicelulose, não sendo digerido pelas enzimas dos animais mamíferos (VAN SOEST, 1994).

A lignina está diretamente associada a queda da digestibilidade dos nutrientes, associada a elevada concentração da mesma à medida que a planta amadurece; isto tem levado a conclusão que a lignina é o principal fator causador do baixo valor nutritivo das plantas forrageiras maduras (JUNG e VOGEL, 1986).

Superadas pela celulose como o mais abundante composto orgânico na Terra, as ligninas são polímeros formados pela união covalente de três tipos de monômeros: álcoois *p*-cumarílico, guaiacílico e sinapílico (Figura 2.9). A distribuição e proporção destes monômeros obedecem à origem filogenética de cada vegetal. Estas ligações do tipo éter resistem a vários agentes hidrolíticos e diversos sistemas enzimáticos degradativos. A quantidade relativa de cada monômero difere significativamente, dependendo da origem da lignina (angiospermas, gimnospermas).

Existe uma grande variação na composição monomérica de ligninas de diferentes espécies, órgãos, tecidos e até mesmo de frações da parede celular. Por exemplo, as madeiras mais moles são quase que exclusivamente formadas de

núcleos guaiacílicos, enquanto as madeiras duras possuem núcleos guacílicos e serigílicos na lignina (FUKUSHIMA e HATFIELD., 2003 e ZIEGLER et al., 2004).

A principal importância da lignina para a planta é a resistência à compressão e a rigidez que ela fornece à parede celular; conferindo resistência ao ataque da maior parte dos microorganismos. Outra função da lignina é também impermeabilizar a parede celular, facilitando o transporte de água para cima nas células condutoras do xilema (RAVEN et al., 2001).

A lignina é biossintetizada nas plantas vasculares em um complexo encadeado de reações, começando pelo CO₂ e H₂O, e originando os ácidos shikímico, prosseguindo via aminoácido aromático L-fenilalanina. A fenilalanina amônialiase, é uma enzima regulatória do metabolismo fenólico nas células vegetais, que converte a fenilalanina no ácido trans cinâmico. A concentração de lignina na célula primária e secundária é estimada em 70 a 90% do total de lignina presente.

Mesmo com vários estudos em andamento para o entendimento do processo degradativo, a degradação da lignina ocorre principalmente por um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas intra e extracelulares, do grupo das oxidoreduções (representadas por peroxidases, lacases e outras oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio) e de metabólitos intermediários de baixa massa molecular, estas enzimas são elaboradas por uma série de microrganismos, principalmente algumas espécies de fungos (LEONOWICZ et al. 2001, PALMIERI et al., 2000; SHAN e NERUD 2002; CANTARELLA et al. 2003).

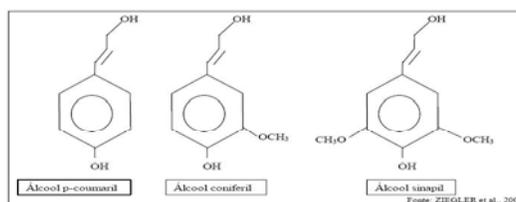


Figura 2.9. Precursores da lignina

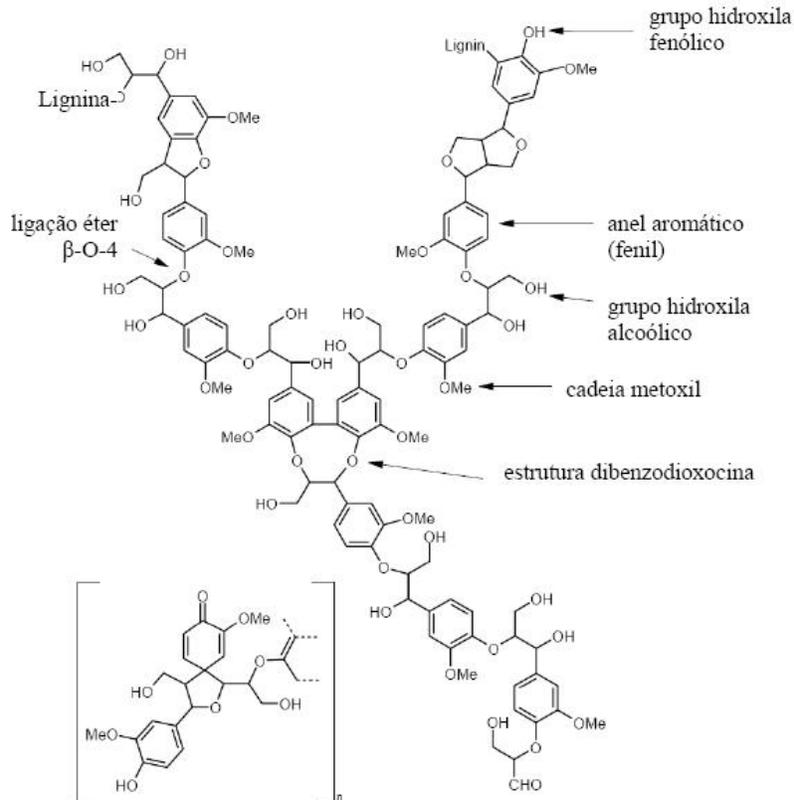


Figura 2.10. Segmento de um polímero de lignina.

2.3.2 Fungos basidiomicetos

O grupo dos basidiomicetos engloba os fungos que produzem esporos (basidiósporos) de origem sexuada em uma estrutura especializada denominada de basídio e popularmente chamados de cogumelos e orelhas-de-pau. A fase vegetativa dos basidiomicetos é denominada micélio, onde estes são formados por muitos filamentos septados chamados de hifas. O septo das hifas pode ser simples ou possuir ansas, que é uma estrutura característica do grupo e são conhecidos como septo dolipórico em função da estrutura complexa que apresentam. Os basidiomicetos também são caracterizados por possuírem dois tipos básicos de basidiósporos. Os denominados balistosporos, que são liberados

violentamente dos basídios e os denominados estatismosporos, que são liberados passivamente (GUGLIOTTA e CAPELARI 1998).

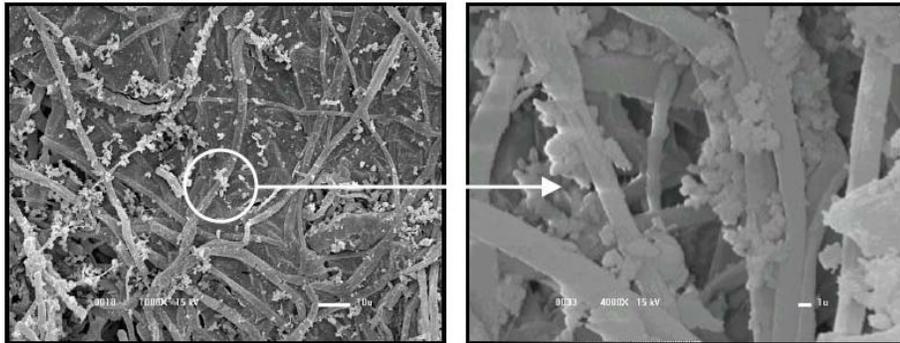


Figura 2.11. Microscopia de varredura mostrando a estrutura de um basidiomiceto (*Pleurotus sp* BCCB068).

Os fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus*, denominados popularmente de “cogumelos ostra”, são conhecidos no Brasil como “cogumelos gigantes”, “Caetetuba”, ou ainda, pela colônia japonesa, por “Hiratake” ou “Shimeji”, são cultivadas em palhas de arroz e trigo, podendo também ser utilizados em resíduos de espigas de milho, bagaço de cana-de-açúcar como substratos para o *Pleurotus spp.* (KOHARI et al. 1997).

Os fungos basidiomicetos ligninolíticos, atacam a madeira dura (*hardwood*) ou madeira mole (*softwood*), enquanto outros gêneros, como os ascomicetos degradam unicamente madeira dura. A degradação da lignina por basidiomicetos ligninolíticos é mais rápida que quaisquer outros organismos e eles são responsáveis pela maior parte da degradação da lignina na natureza. Entretanto, o substrato de crescimento não é exclusivamente lignina, mas também hemiceluloses e celulose (KIRK e FARRELL 1987).

2.3.3 Enzimas ligninocelulolíticas

Os basidiomicetos apresentam a capacidade de produzir simultaneamente enzimas hidrolíticas e oxidativas necessárias para degradar substratos ligninocelulósicos. A maioria dos fungos da podridão branca produz estas de forma a prover sua adaptação ao meio extremamente rico em ligninoceluloses (VALASKOVÁ e BALDRIAN, 2006). Estes fungos secretam enzimas que

convertem os polímeros em moléculas menores, que são assimiladas e utilizadas como nutrientes. Os fungos decompositores da madeira podem ser classificados em grupos ecofisiológicos: causadores de podridão branca, de podridão parda e de podridão mole. Ao lado de outros microrganismos, os basidiomicetos lignocelulolíticos atuam na decomposição da matéria orgânica, dinamizando a ciclagem de nutrientes e regulando o equilíbrio energético dos ecossistemas terrestres (TUOMELA et al. 2000).

Muitos destes microrganismos são capazes de fazer a bioconversão desses substratos lignocelulósicos em compostos de fácil assimilação para o seu metabolismo, onde as enzimas hidrolíticas tem papel fundamental nessa bioconversão, e agem conjunta e sinergisticamente formando um complexo com várias enzimas destacando-se: celobiohidrolases, endoglucanases, beta-glucosidases e xilanases (VALASKOVÁ e BALDRIAN, 2006).

O material lignocelulósico é uma fonte renovável de grande abundância no mundo, onde a celulose pode ser hidrolisada por enzimas hidrolíticas, para a bioconversão destes compostos em açúcares fermentáveis para a produção de etanol. Estudos recentes já apontam esta alternativa para o processo de fermentação (DAWSON e BOOPATHY, 2007).

Atualmente, estas enzimas são utilizadas em várias aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas tem crescido rapidamente. Em 1995, o mercado mundial de enzimas superou 1 bilhão de dólares, enquanto espera-se para 2005, a comercialização de 1,7 a 2 bilhões. Cerca de 60% das indústrias que vendem enzimas encontram-se na Europa, as outras 40% estão nos Estados Unidos e no Japão. A aplicação de celulasas e xilanases começou na década de 80, primeiro em rações animais, seguida pela adição em alimentos e posteriormente em indústrias têxtil e de papel. Atualmente, essas enzimas juntamente com as pectinases, são responsáveis por 20% do mercado mundial (BHAT, 2000).

Nome recomendado	Nome sistemático	EC	Reação
Endo-1,4-β-glucanase	1,4-(1,3; 1,4)-β-D-Glucan-4 glucanohidrolase	3.2.1.4	Endohidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas
Exo-1,4-β-glucanases	1,4-β-D-Glucano celobiohidrolase	3.2.1.91	Hidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas liberando celobiose
	1,4-β-D-Glucano glicohidrolase	3.2.1.7	Hidrólise de ligações 1,4-β-D-glicosídicas liberando glicose
β-glucosidase	β-D-Glucosideo glucohidrolase	3.2.1.21	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos β-D-glicose com liberação de β-D-glicose
Endo-1,4-β-xilanase	1,4-β-D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.8	Endohidrólise de ligações 1,4-β-D-xilosídicas em xilanos
β-Xilosidase	1,4-β-D-Xilano xilanohidrolase	3.2.1.37	Hidrólise de 1,4-D-xilanos para remover sucessivamente resíduos D-xilose
α-L-Arabinofuranosidase	α-L-Arabinofuranosideo arabinofuranohidrolase	3.2.1.55	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos α-L-arabinofuranosideo em α-L-arabinosídeos
Acetilesterase	Ester acético acetilhidrolase	3.1.1.6	Um éster acético + H ₂ O = um álcool + acetato
α-Glucuronidase	α-D-Glucuronosideo glucuronosohidrolase	3.2.1.7	α-D-glucuronosideo + H ₂ O = um álcool + D-glucuronato
Endo-1,4-β-mananase	1,4-D-Manano mananohidrolase	3.2.1.78	Hidrólises aleatórias de ligações 1,4-β-D-manosídicas em mananos
β-Manosidase	β-D-Manosideo manohidrolase	3.2.1.25	Hidrólise de terminações não redutivas de resíduos β-D-manose em β-D-manosídeos
α-Galactosidase	α-D-Galactosideo galactohidrolase	3.2.1.22	Hidrólise de terminações de resíduos α-D-galactose em α-D-galactosídeos
Lignina peroxidase	diarilpropano O ₂ , H ₂ O ₂ oxidoreduases	1.11.1.14	Catalisa várias oxidações em cadeia laterais alquil, quebra de ligações C-C
Manganês peroxidase	Mn(II); H ₂ O ₂ oxidoreduase	1.11.1.13	Cataliticamente dependente de H ₂ O ₂ e ions Mn ²⁺
Lacase	Benzenodiol:oxigênio oxidoreduase	1.10.3.2	4-Benzenodiol + O ₂ = 4-benzosemiquinona + H ₂ O
Horseradish peroxidase (peroxidase da raiz forte)	Doador:peróxido de hidrogênio oxidoreduase	1.11.1.7	Doador + H ₂ O ₂ = doador oxidado + 2H ₂ O
Protocatecóico 3,4-dioxigenase	Protocatecoato:oxigênio 3,4-oxidoreduase	1.13.11.3	3,4-Dihidroxibenzoato + O ₂ = 3-carboxi- <i>cis,cis</i> muconato
Catecol 1,2-dioxigenase	Catecol:oxigênio 1,2-oxidoreduase	1.13.11.1	Catecol + O ₂ = <i>cis,cis</i> muconato
Superóxido dismutase	Superóxido:superóxido oxidoreduase	1.15.1.1	O ₂ ⁻ + O ₂ ⁻ + 2H ⁺ = O ₂ + H ₂ O ₂
Glioxal oxidase	Glioxalato:oxigênio oxidoreduase	1.2.3.5	Glioxalato + H ₂ O + O ₂ = oxalato + H ₂ O ₂
Glucose-1-oxidase	β-D-Glicose:oxigênio 1-oxidoreduase	1.1.3.4	β-D-Glicose + O ₂ = D-Glicano-1,5-lactona + H ₂ O ₂
Áril álcool oxidase	Áril álcool:oxigênio oxidoreduase	1.1.3.7	Álcool aromático primário + O ₂ = aldeído aromático + H ₂ O ₂
Pirano-2-oxidase	Pirano:oxigênio 2-oxidoreduase	1.1.3.10	D-Glicose + O ₂ = 2-desidro-D-glicose + H ₂ O ₂
Celobiose:quinona oxidoreduase	Celobiose:quinona 1-oxidoreduase	1.1.5.1	Celobiose + quinona = celobiona-1,5-lactona + fenol
Celobiose desidrogenase	Celobiose.(aceptor) 1-oxidoreduase	1.1.99.18	Celobiose + aceptor = celobiona-1,5-lactona + aceptor reduzido

Figura 2.12. Enzimas que atuam na degradação de lignoceluloses (LEONOWICZ et al., 2001).

2.3.3.1 Enzimas celulolíticas

O sistema celulolítico é formado por endoglucanases, exoglucanases e β-glicosidases. A endoglucanase é uma endoenzima que rompe aleatoriamente a cadeia de celulose, onde detaca-se a enzima carboximetilcelulase (CMCase). Esta enzima é capaz de quebrar a molécula de celulose no meio da cadeia para criar finais não redutores para subsequente ação das exoenzimas, atacando as ligações internas da cadeia da celulose na região amorfa, aumentando o número de terminais não redutores. A atividade da CMCase é normalmente determinada

usando derivados celulósicos solúveis como carboximetilcelulose (CMC) (TOMME et al., 1995).

As exoglucanases rompem as unidades a partir do final da cadeia, com destaque para a enzima Avicelase, que é a principal responsável pela produção de celobiose a partir da celulose micristalina. Tais enzimas são constituídas por dois tipos:

⇒ Exo-celobiohidrolase: 1,4- β -D-glicano celobiohidrolase – Remove resíduos de celobiose a partir de terminal não redutor. As exoenzimas atuam causando a inversão na configuração do carbono 1 do resíduo liberado.

⇒ Exo-glicohidrolase: β -1,4-D- glicanase - remove resíduos de glicose a partir de terminais não redutores da cadeia celulósica.

A β -glicosidase é uma enzima específica para a celobiose tendo como produto final a glicose. Atuam sobre a molécula de celobiose e outras celodextrinas de baixo peso molecular; produzindo glicose na configuração β , o que a diferencia de outras exoglicanases. A β -glicosidase não é considerada uma celulase específica, mas apenas uma enzima auxiliar da ação das celulases que são, inibidas por elevadas quantidades de resíduos de celobiose (WOOD e GARCIA-CAMPAYO, 1994). As enzimas endo e exoglucanases em atuação conjunta solubilizam a celulose cristalina em celooligossacarídeos e celobiose (BIRSAN et. al. 1998; WHITERS, 2001).

Dependendo do sistema celulolítico produzido por um determinado microrganismo a celulose cristalina pode ser convertida a oligodextrinas, celodextrinas e celobiose (BRODA, 1992).

BIRSAN et. al. (1998), observaram que a maioria dos complexos enzimáticos contém mais que um tipo de exoglicanase e endoglicanases e que as isoenzimas podem ser formas modificadas de um único gene ou podem ter origem em genes diferentes.

2.3.3.2 Enzimas hemicelulolíticas

As propriedades químicas e estruturais das hemiceluloses podem ser influenciadas pela presença de uma grande diversidade de resíduos, onde deste modo, necessitam de uma série de enzimas para a sua degradação total. O sistema enzimático responsável pela degradação total das hemiceluloses, contendo xilana como estrutura principal, é composto principalmente por β -1,4-endoxilanase e β -xilosidase, podendo existir a possibilidade da presença da α L-arabinofuranosidase, que remove os resíduos de L-arabinose substituídos no C-3 das unidades de xilose; β -glucuronidase, que age hidrolisando as ligações β -1,2 entre ácido glucurônico e resíduos de xilose em glucuroxilano; acetilxilana esterase, que remove grupamentos O-acetil a partir da posição C-2 e/ou C-3 dos resíduos de xilose e algumas esterases, como o ácido ferrúlico esterase e o ácido p-coumárico esterase que clivam na xilana, respectivamente, as ligações éster entre resíduos de arabinose e ácido ferrúlico ou ácido p-coumárico (KANEKO et al. 1993; PULS e SCHUSEIL, 1993; SHAO e WIEGEL, 1995; CHRISTOV e PRIOR, 1993). Todas essas enzimas agem em conjunto permitindo a conversão de xilana em seus açúcares constituintes.

2.3.3.2.1 β -1,4- endoxilanase (1,4- β -D-xilana xilohidrolase)

A enzima β -1,4- endoxilanase (1,4- β -D-xilana xilohidrolase) provoca a quebra das ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana resultando na diminuição do grau de polimerização do substrato. O ataque ao substrato não é feito ao acaso e as ligações a serem hidrolisadas dependem da natureza do substrato como por exemplo o comprimento e o grau de ramificação do composto e a presença de substituintes, sendo que os principais compostos formados no início da hidrólise da xilana são os xilooligossacarídeos (KUHAD et al. 1997; VÁZQUEZ et. Al. 2000; VICENTE, 2002).

Estas enzimas são encontradas em bactérias terrestres e marinhas, em bactérias presentes no sistema digestivo dos ruminantes, fungos, algas marinhas, protozoários, caracóis, crustáceos, insetos e sementes de plantas terrestres (DEKKER e RICHARDS, 1976). Entre as diferentes funções das xilanases estão a

biodegradação que permite o fornecimento de fontes de energia metabolizante, a degradação de componentes da parede celular em interação com outras enzimas que degradam polissacarídeos e digestão dos vegetais da dieta (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

As xilanases de origem fúngicas têm massas moleculares entre 6 – 83 kDa e são geralmente mais ativas em pHs 3,5 – 6,5 e a 40 – 60°C (Bailey *et al.*, 1991). Em relação às de origem bacteriana, as massas moleculares são maiores, entre 15 a 85 kDa, com poucas exceções. Essas são mais ativas em pHs 5,0 – 8,0 e 50 – 80°C (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

As ligações a serem hidrolisadas dependem do comprimento e/ou grau de ramificação da xilana, assim como a presença ou não de substituintes. Inicialmente, a clivagem da xilana tem xilooligossacarídeos como produtos formados, mas conforme a hidrólise prossegue, estes podem ser hidrolisados à xilotriose, xilobiase e xilose (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

As endoxilanases são classificadas de diferentes formas, tendo como base os seguintes critérios:

⇒ Os produtos finais liberados pela hidrólise da xilana, podendo ser não ramificadoras ou ramificadoras, sendo que no primeiro caso não há a liberação de arabinose, ao contrário do segundo (DEKKER e RICHARDS, 1976).

⇒ No ponto isoelétrico e massa molecular, pois as endoxilanases possuem uma forte relação entre os valores das suas massas moleculares e seus pontos isoelétricos. Aproximadamente 70% das endoxilanases ácidas têm massa molecular acima de 30 kDa. Percentuais próximos estão relacionados as endoxilanases básicas que mostram valores de massas moleculares abaixo de 30 kDa. Sendo reportadas várias exceções de endoxilanases com baixo ponto isoelétrico e baixa massa molecular ou o inverso (WONG *et al.* 1988).

Várias xilanases já foram purificadas de diferentes microrganismos, porém a purificação dessas enzimas é difícil, necessitando de várias etapas, sendo que a

recuperação na maioria das vezes é baixa (MORALES et al. 1995; BATAILLON et al., 2000).

2.3.3.2.2 β -D-xilosidase

A β -D-xilosidase (β -D-xilosídeo xilohidrolase; E.C. 3.2.1.37) são exoglicosidases que hidrolisam xilooligossacarídeos pequenos, a partir da extremidade não redutora (WONG et al., 1988). Estas enzimas são capazes de clivar substratos artificiais como o p-nitrofenil β -D-xilosídeo (COUGHLAN e HAZLEWOOD, 1993), como foi demonstrado em *Humicola grisea* var. *thermoidea* (ALMEIDA et al. 1995) e *Aspergillus phoenicis* (RIZZATTI et al. 2000).

Vários estudos estão sendo realizados para o melhor entendimento do potencial desta enzima. Seu sistema catalítico hidrolisa os compostos xilooligossacarídeos, gerando compostos com graus de polimerização menores, até xilose. HASMANN et al. (2003), trabalharam na otimização da β -D-xilosidase para a recuperação de micélios reversos secretados pelo fungo *Penicillium janthinellum*, utilizando o sistema de surfactante catiônico CTAB. Trabalhos de produção, caracterização e estudo das propriedades desta enzima utilizando *Aureobasidium* sp. foram conduzidos por IEMBO et al. (2002) em sistemas de fermentação submersa e estado sólido, demonstrando o ótimo de atividade em pH de 2,5 na temperatura de 65°C.

2.3.3.2.3 Aplicação das enzimas xilanolíticas na indústria

As enzimas que degradam a xilana possuem um grande potencial em várias aplicações na área da biotecnologia. As xilanases estão envolvidas na bioconversão da xilana, altamente presente em resíduos agrícolas e em resíduos provenientes de indústrias alimentícias, em xilose, o qual age como substrato na obtenção de etanol através de processos de fermentação (CHANDRAKANT e BISARIA, 2000) e em xilitol, utilizado como adoçante em vários tipos de alimentos (PARAJÓ et al. 1998).

Atualmente, o interesse nas xilanases aumentou muito, devido ao seu uso em processos de branqueamento da polpa de papel, com processos que dispensam a utilização do cloro (VIKARI et al., 1994).

A aplicação de xilanases em indústrias alimentícias é muito ampla, com atuação progressiva em associação com as celulases e pectinases, promovendo a hidrólise de componentes da parede celular e diminuição da viscosidade e a clarificação dos sucos de frutas (WONG et al. 1993).

Em panificações, sua ação está no mecanismo de hidrolisar os compostos arabinoxilanas, facilitando a redistribuição da água na massa, favorecendo seu volume, textura e estabilidade, com considerável aumento no valor nutritivo do alimento (POUTANEN et al. 1987).

Na indústria vinícola, as xilanases são utilizadas na hidrólise da parede celular das uvas, facilitando a maceração de sua casca, a clarificação e aumento da qualidade e estabilidade do vinho (GALANTE et al. 1998).

Na indústria têxtil também existe a utilização das xilanases no processamento de fibras vegetais, como cânhamo ou o linho. De acordo com os estudos conduzidos por PRADE (1995), a incubação de caules de rami secos com as enzimas xilanases libera fibras de celulose intactas que não necessitam de um branqueamento intensivo.

Na indústria de rações para animais, a utilização de xilanases aumenta o valor nutritivo da dieta, devido a melhor digestão e absorção dos componentes das rações (GRAHAM et al. 1998; GALANTE et al. 1998).

2.3.3.3 Enzimas ligninolíticas

Enquanto os processos de degradação de celulose e hemicelulose são de natureza hidrolítica e ocorrem com maior facilidade, a degradação da lignina representa um processo oxidativo complexo, não específico e estritamente dependente das condições do meio de cultivo do organismo (KIRK e FARRELL, 1987).

A lignina possui uma estrutura altamente complexa, necessitando de um sistema altamente diversificado de enzimas ligninolíticas, enzimas redutoras e

enzimas produtoras de H_2O_2 . Deste modo, para uma biodegradação eficaz da lignina é necessária uma série de combinações nos processos de óxido-redução, já que não é possível a degradação total destes compostos utilizando estas enzimas separadamente (SCHOEMAKER et al., 1985).

2.3.3.3.1 Lacases

Lacases são proteínas globulares contendo entre 10-25% de carboidrato *N*-ligado, podendo ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, dispostas em subunidades de 45 à 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma. É uma glicoproteína contendo cobre no seu sítio ativo, catalisando a redução de O_2 para H_2O , sem a necessidade de H_2O_2 (LEONOWICZ et al., 2001).

A lacase catalisa a oxidação via transferência de um elétron de fenóis para radicais fenoxila, sendo que a origem desta enzima é que vai determinar a sua especificidade pelo substrato oxidado. Assim lacases de diferentes fungos podem oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes pHs (RINGLING e VAN ALFEN, 1993).

Para a sua atividade catalítica, em geral, a lacase apresenta quatro átomos de cobre por unidade de proteína ativa, denominados de cobre tipo 1,2 e 3. O cobre 1 e 2 são os responsáveis pelo processo de captura e transferência do elétron, e o cobre tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio (CALL e MUCKE, 1997).

As lacases estão muito difundidas pela natureza, sendo produzidas por fungos ou plantas, envolvidas nos processos de polimerizações, desmetilações, oxidações e despolimerizações de compostos fenólicos. Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as lacases fúngicas estão recebendo grande atenção em várias aplicações na indústria de biotecnologia como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas. Pesquisas recentes têm sido intensas e muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e suas utilidades (COUTO e HERRERA, 2006).

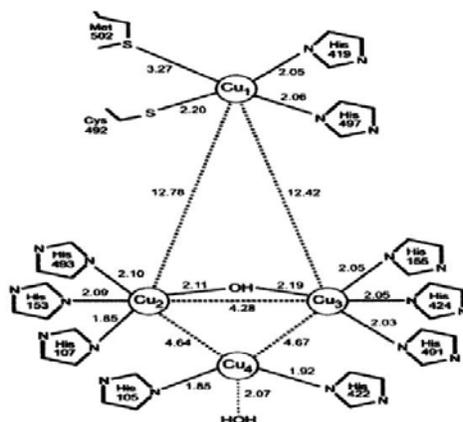


Figura 2.13- Centro de cobre de lacase de *Bacillus subtilis*.

2.3.3.3.2 Lignina-peroxidase

A enzima lignina peroxidase (LiP) foi descoberta em 1984, em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* (TIEN e KIRK, 1984). A LiP é uma glicoproteína, composta por 20-30% de açúcar, possui ferro como grupo prostético e necessita de H₂O₂ para a sua atividade catalítica. Sua massa molar é de aproximadamente 38-43 Kda, tendo ponto isoelétrico entre 3,2 e 4,0 e pH ótimo de atividade entorno de 3,0. A lignina peroxidase é produzida durante o metabolismo secundário do fungo, pela falta de nutrientes (NETO, 2006).

No processo de degradação da lignina, a LiP é inicialmente oxidada pelo H₂O₂ e oxida núcleos aromáticos da molécula de lignina (fenólicos e não fenólicos), gerando radicais catiônicos. Estes reagem espontaneamente com nucleófilos (primariamente H₂O) e com oxigênio molecular, despolimerizando a lignina e abrindo os anéis aromáticos. Durante o ciclo catalítico o Fe contido, no grupo heme da LiP, passa por estados de óxido-redução. A primeira etapa inicia com a oxidação do Fe (III) da enzima nativa para Fe (IV), pela ação do H₂O₂, com a geração do composto I, tipo radical catiônico da LiP. Pela redução do composto I, por transferência de um elétron, é formado o composto II, que ainda contém Fe (IV). O agente redutor pode ser um substrato como o álcool veratrílico ou o H₂O₂. E por último ocorre a etapa de redução por um elétron, que retorna a enzima a seu

estado nativo, completando o ciclo catalítico. Na falta do substrato redutor, o composto II é oxidado pelo H_2O_2 para o composto III, uma conformação da LiP com baixa capacidade catalítica, que com excesso de H_2O_2 é rapidamente inativada (MARTÍNEZ, 2002).

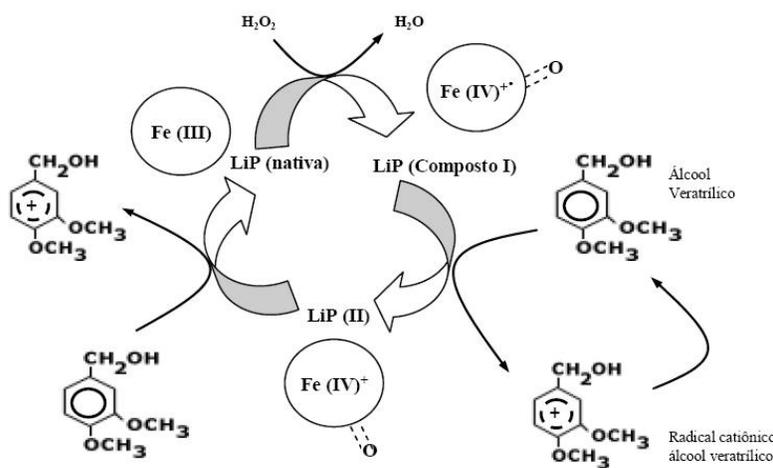


Figura 2.14. Ciclo catalítico da enzima lignina peroxidase

O álcool veratrílico, um metabólito produzido pelos fungos da podridão branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo catalítico da LiP. Este composto atua como redutor da enzima e a protege da inativação por excesso de H_2O_2 (ROTHSCHILD et al. 2002).

A presença de LiP em basidiomicetos ligninolíticos tem sido considerada escassa, porém existem crescentes estudos desta enzima, assim como dos fungos que a produzem, devido ao seu potencial de aplicação em processos de descontaminação do meio ambiente e na utilização em processos industriais (CAMARERO et al., 2000).

2.3.3.3 Manganês-peroxidase

A manganês peroxidase é a peroxidase extracelular mais comumente encontrada nos fungos da degradação branca. A MnP é uma glicoproteína com ferro protoporfirínico IX como grupo prostético, dependente de H_2O_2 para sua atividade, onde seu ponto isoelétrico é cerca de 4,9 e massa molar entre 38 – 62,5

Kda. Seu ciclo catalítico é semelhante ao da Lignina Peroxidase, porém, o Mn^{2+} atua como doador de elétrons para gerar o composto II (HOFRICHTER, 2002).

A produção de manganês peroxidase é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetos, e até agora, não se evidenciou qualquer bactéria, levedura e nenhum basidiomiceto micorrízico capaz de produzir esta enzima. A capacidade de sintetizar MnP está distribuída entre grupos de basidiomicetos taxonomicamente distintos. O ciclo catalítico da MnP é iniciado pela ligação de H_2O_2 ou um outro peróxido orgânico ao ferro nativo da enzima, formando um complexo ferro-peróxido.

A manganês peroxidase é produzida simultaneamente com a lignina peroxidase, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono no meio de cultura (BUSWELL e ODIER, 1987).

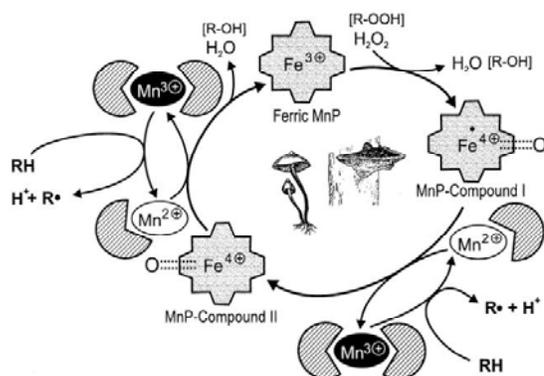


Figura 2.15. Ciclo catalítico da manganês peroxidase.

Estas enzimas participam de reações de despolimerização de ligninas e cloroligninas, desmetilação de lignina e deslignificação. A oxidação da lignina por manganês peroxidase depende de íons manganês II ((HOFRICHTER, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

→ Obter compostos prebióticos a partir de resíduos lignocelulósicos hidrolisados e compará-los com prebióticos disponíveis comercialmente.

3.2 Objetivos específicos

→ Obter hidrolisados a partir de material lignocelulósico, através da utilização de enzimas produzidas por fungos basidiomicetos lignocelulolíticos.

→ Determinar a presença de compostos oligossacarídicos provindos da degradação das matrizes celulósicas e hemicelulósicas.

→ Determinar a atividade prebiótica destes hidrolisados.

→ Comparar a atividade prebiótica destes hidrolisados com compostos obtidos comercialmente.

→ Investigar os efeitos *in vitro* da combinação dos hidrolisados de celulose e hemicelulose com os microrganismos probióticos e este efeito sobre enteropatógenos do intestino humano.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Material lignocelulósico

Foram utilizados para o crescimento e produção de enzimas ligninocelulolíticas pelos fungos basidiomicetos: bagaço de cana de açúcar, casca e farelo de arroz, farelo de trigo e sabugo de milho.

Como matriz de degradação enzimática foi utilizada xilana comercial (Sigma) e Carboximetilcelulose (Sigma).

4.1.2 Fungos lignocelulolíticos

Os fungos utilizados compreendem as seguintes espécies, disponíveis no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana – FEA-UNICAMP, como parte da Coleção de cultura: *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus* sp BCCB 068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus* sp (P001) e *Pleurotus* sp (9403).

4.2 Metodologia

4.2.1 Seleção dos hidrolisados

4.2.1.1 Meios de cultivos e condições de crescimento

Os resíduos agroindustriais foram coletados nas regiões de maior produção no país. O bagaço de cana foi obtido na região sucroalcooleira de Ribeirão Preto – SP, onde a amostra continha baixo teor de umidade, estando a consistência das fibras em estado seco. Logo após a coleta, as fibras foram trituradas até o ponto dos granulos ficarem do tamanho próximo a de uma farinha. Para a casca e farelo de arroz, estas amostras foram obtidas de uma usina de beneficiamento de arroz da cidade de Santa Cruz do Sul –RS, onde estas foram obtidas no momento do descascamento do arroz processado. As amostras foram condicionadas em caixas de isopor e enviadas ao laboratório, onde a casca de arroz foi triturada até o ponto dos grânulos adquirirem o tamanho dos de uma farinha. O sabugo de milho foi obtido numa propriedade rural de Santa Cruz do Sul –RS, sendo os sabugos armazenados em caixa de isopor e levados ao laboratório, onde foram trituradas

até o tamanho dos grânulos ficarem similares aos de uma farinha. Para o farelo de trigo, este foi obtido no comércio da cidade de Campinas-SP, em embalagem plástica. Todas estas amostras, depois de processadas fora esterilizadas a 121°C por 15 min e armazenadas em refrigerador adequado na temperatura de -4°C, até a sua utilização no experimento.

A metodologia de cultivo utilizada foi recomendada por SILVA (2001). Os fungos avaliados foram mantidos em tubos de ensaio, contendo o meio de cultivo batata dextrose ágar (BDA-Difco), esterilizado a 121°C por 15 min. Após o crescimento fúngico por 7 dias a 30°C, os tubos foram refrigerados a 4°C. O micélio fúngico cultivado em placa de Petri com agar BDA por 7 dias, foi utilizado como inóculo na forma de discos de 6 mm de diâmetro.

A fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyers contendo 30 ml de meio basal (em pH 5,5) adicionado de 1% (m/v) dos substratos avaliados. O meio basal, descrito por REGINATTO (1992) apresenta a seguinte composição: 1,4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 0,1 g/L de uréia; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de CaCl_2 ; 5,0 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,56 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg/L de CoCl_2 e 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a pH 5,5. Os frascos foram fechados e esterilizados a 121°C por 15 minutos.

Após a esterilização os frascos foram inoculados com 3 discos de micélio fúngico (6 mm de diâmetro), foram incubados por 30 dias a 30°C, sem agitação (cultivo estacionário). Foram coletadas amostras em duplicatas a cada 5 dias, a partir do 5º dia de incubação, até o 30º dia. O fluido extracelular cultivado foi centrifugado a 33.450 g, a 4°C por 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto.

4.2.1.2 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas iniciais foram determinadas em espectrofotômetro ultravioleta marca Spectronic, modelo 20 e Shimadzu, modelo UV-1201, realizadas em duplicatas e acompanhadas por controles (caldos enzimáticos e substratos analisados isoladamente), para descartar possíveis interferentes com os métodos de determinação.

4.2.1.2.1 Atividade das enzimas ligninolíticas

As atividades das enzimas lacase (Lac, EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), foram determinadas, a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir. Todas as atividades foram expressas em U/L.min⁻¹ (μmoles produto/min.L). Os cálculos realizados a partir da equação:

- $U/L = \Delta \text{ abs} \times 10^6 / E \times R \times t = U/L.\text{min}^{-1}$, onde A, absorbância final - absorbância inicial; E, ε (do produto formado); R, quantidade de caldo enzimático (L); t, tempo de reação (minutos).

4.2.1.2.1.1 Atividade da lacase

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se siringaldazina como substrato enzimático (SZKLARZ et al., 1989). A oxidação de siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 10 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL água destilada e 0,1 mL de siringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

4.2.1.2.1.2 Atividade da manganês peroxidase

A atividade de peroxidase dependente de Mn(II), foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (KUWAHARA et al. 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO₄ 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H₂O₂ 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

4.2.1.2.2 Atividade de enzimas celulolíticas

Nas determinações de carboximetilcelulase e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de μmoles de açúcar redutor produzido por minuto por ml de enzima.

4.2.1.2.2.1 Atividade da β -glicosidase

A atividade de β -glicosidase (EC 3.2.1.21) ou mais especificamente aril- β -D-glicosidase foi determinada incubando 1mL do substrato p-nitrofenil- β -D-glicosídeo 0,005M, em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 com 0,5 mL de extrato enzimático, por 15 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de bicarbonato de sódio 1,0 M e a absorbância medida a 410 nm. A unidade de atividade enzimática expressa com a liberação de 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto por mL de enzima.

4.2.1.2.2.2 Atividade de avicelase

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com MILLER (1959).

4.2.1.2.2.3 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de Carboximetilcelulase (CMCase, EC 3.2.1.4) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema sustrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com MILLER (1959).

4.2.1.2.3 Atividade de enzima xilanólítica

4.2.1.2.3.1 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4- β -xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo MILLER (1959). A reação consiste na mistura contendo 1

mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1 mL de solução de 1% de xilana (Sigma) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi incubado em 50° C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Os tubos contendo as reações foram lidas em espectrofotômetro (Bausch & Lomb) em 550nm. Os valores foram expressados em U/mL , onde 1 unidade representa 1 µmol de xilose produzido por minuto.

4.2.2 Determinação dos hidrolisados lignocelulósicos

4.2.2.1 Determinação dos hidrolisados por Espectrometria de massas

4.2.2.1.1 Preparo das amostras

Para a hidrólise enzimática, foi escolhido o melhor conjunto fungo-substrado, através da atividade enzimática, onde 1 mL deste extrato bruto foi adicionado a 1 mL de solução de xilana (Sigma) 1%, em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, durante 50 minutos. Foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, e 50 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter o substrato em suspensão. As amostras foram coletadas e rapidamente congeladas para futuras análises.

4.2.2.1.2 Espectrometria de massas

As amostras obtidas através da hidrólise enzimática foram analisadas no Laboratório Thonsom de Espectrometria de Massas – IQ/UNICAMP. Para a determinação dos hidrolisados foi utilizada a técnica de fingerprinting, utilizando um espectrômetro de massas Q-Tof, Waters.

4.2.3 Planejamento experimental para atividade enzimática de xilanase e β-xilosidase

No estudo da atividade enzimática, realizou-se um planejamento experimental fatorial completo, totalizando 17 ensaios, sendo 14 ensaios e 3 pontos centrais a fim de avaliar as 3 variáveis independentes no estudo da produção de xilanase e β-xilosidase para as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia*.

As 3 variáveis estudadas foram:

X1= pH

X2= Temperatura de incubação em °C

X3= Concentração de substrato (farelo de arroz) em porcentagem.

Foi utilizado o software Statistica (Statsoft, v.5.0 *for Windows*) para a análise dos resultados.

4.2.4 Hidrólise do material hemicelulósico e análise da degradação

Para as degradações subseqüentes, foram utilizadas as linhagens escolhidas no item 4.2.1, estas utilizando xilana comercial como fonte de carbono, para a produção dos compostos em estudo enzimas lignocelulolíticas.

4.2.4.1 Condições do Experimento

A fermentação submersa foi realizada conforme o item 4.2.1.1, porém por 40 dias de incubação. Foram retiradas alíquotas nos dias 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 de incubação.

4.2.4.2 Atividade enzimática

4.2.4.2.1 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase foi determinada conforme anteriormente descrito no item 4.2.1.2.3.1.

4.2.4.2.2 Atividade de β -xilosidase

Atividade desta enzima (EC 3.2.1.37) foi determinada de acordo com a metodologia do p-nitrofenol provindo de PNPX. Foi realizada em 50°C em 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 6,5), com 50 μ l de 10 mM de PNPX (Sigma) mais a solução da enzima devidamente diluída, totalizando um volume de 0,5 ml. O p-nitrofenol liberado foi medido em absorvância de 410 nm seguido de 10 minutos de incubação. A reação foi parada com a adição de 1,0 ml de carbonato de sódio 1,0 M. Uma unidade de β -xilosidase foi definida como 1 μ mol de p-nitrofenol produzido por minuto (IEMBO et al. 2005).

4.2.4.2.2 Análise de pH

Para monitoramento do processo de degradação, a atividade de pH foi realizada, utilizando pHmetro específico.

4.2.4.3 Utilização dos hidrolisados em matrizes de xilana e carboximetilcelulose

Foram utilizados os complexos enzimáticos provindos das 2 linhagens escolhidas no item 4.2.1, estas utilizando farelo de arroz como fonte de carbono para a produção das enzimas lignocelulolíticas (10 dias de incubação). Para tal reação, colocou-se quantidades de hidrolisado na proporção de 1:1 em solução de 1% de xilana e CMC, onde monitorou-se os tempos de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos de incubação, na temperatura fixa de 50°C, coletando alíquotas de cada tempo de reação para análise dos compostos degradados.

4.2.4.4 Análise dos compostos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A degradação de xilana e carboximetilcelulose foi analisada no cromatógrafo Shimadzu LC-6a usando coluna de troca iônica Supelcogel C-610H fase estacionária: poliestireno divinilbenzeno (Supelco). Um volume de 20 µl foi previamente filtrado em membrana PVDF 0,22 (Milipore) e injetado, usando como fase móvel 0,1% de ácido fosfórico em água deionizada, com uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹, utilizando detector de índice de refração RID 10A (Shimadzu), específico para análises de carboidratos e ácidos orgânicos.

4.2.5 Investigação “in vitro” dos efeitos dos compostos prébióticos em microrganismos probióticos e sua ação sobre os patógenos selecionados da flora intestinal humana

4.2.5.1 Material

Os substratos utilizados para o crescimento das bactérias probióticas foram: Oligofrutose (FOS) e os hidrolisados selecionados nos experimentos anteriores.

4.2.5.2 Microrganismos

Os probióticos testados foram obtidos através da Fundação André Tosello: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum Bb12*. Os enteropatogênicos utilizados foram *E. coli*, e *S. enteritidis*.

4.2.5.3 Condições de crescimento microbiano

4.2.5.3.1 Ativação das culturas

Os microrganismos probióticos foram reativados em caldo MRS (Man, Rogosa & Shape), em tubos com 10 mL deste meio, durante o período de 24 horas, incubados conforme a sua temperatura ótima de crescimento. Logo após, foi retirado de cada tubo 2 mL de cultura, sendo colocado em 20 mL de caldo Litmus milk, e posteriormente incubado por 24 horas, na temperatura de 30°C. Após este período, os tubos foram refrigerados a 4°C. Para as enteropatogênicas *E. coli* e *S. Enteritidis*, estas foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton, extraíndo uma alçada para cada tubo com 10 mL de caldo, estes foram incubados por 48 horas e logo após refrigerados a 4°C .

4.2.5.3.2 Meio basal

O meio basal consiste em 0,3 g l⁻¹ de NaCl; 0,4 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0,4 g l⁻¹ de KH₂PO₄; 0,4 g l⁻¹ de K₂HPO₄; 0,01 g l⁻¹ de CaCl₂ e 2,0 g l⁻¹ de NaHCO₃ dissolvidos em água destilada. Este meio foi distribuído em tubos de 20 ml, em condições assépticas.

4.2.5.4 Curvas de crescimento – Culturas probióticas

Para demonstrar a taxa de crescimento dos probióticos em cada hidrolisado, utilizou-se 2 mL de cada cultura probiótica (em concentrações pré-determinadas – tabela 4.1) em 20 mL de meio mineral, sendo posteriormente incubados em estufa específica em 37°C, com exceção da linhagem *L. Pentosus* com 30°C, durante 72 horas, sob condições anaeróbicas. Foram utilizados para o crescimento e quantificação destas linhagens, meio ágar MRS (Man, Rogosa &

Shape), sendo aplicado as amostras em sucessivas diluições, e incubados em condições anaeróbicas, no período de 72 horas. O controle não constituiu de nenhuma fonte de carbono e o padrão utilizado constitui 1% (m/v) de frutooligossacarídeo (controle). A quantificação foi realizada através de contagem total, entre 30 e 300 colônias, com o resultado obtido através das medias das triplicatas de cada amostra, foram realizadas as contagens nos períodos de 0, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 4.1- Contagem inicial das culturas probióticas para o experimento de crescimento destas perante os hidrolisados selecionados. Quantidade expressa em 2 ml de cultura contida em meio Litmus milk.

Cultura Probiótica	Contagem de células UFC/mL
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,04
<i>Lactobacillus plantarum</i>	7,34
<i>Lactobacillus reuteri</i>	9,74
<i>Lactobacillus pentosus</i>	9,30
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5,37

4.2.5.5 Curvas de crescimento – Microrganismos patogênicos

Para o crescimento dos microrganismos patogênicos utilizando os hidrolisados como fonte de carbono, aplicou-se 2 ml das culturas de *E. coli* e *S. enteritidis*, com as contagens iniciais de (9,24 e 9,15 UFC/mL) para utilização em cada hidrolisado, em 20 mL de meio mineral, sendo posteriormente incubados em estufa específica em 37°C. Foram utilizados para o crescimento destas linhagens, meio agar nutriente suplementado com hidrolisados de diferentes fontes de substratos (hidrolisados de xilana, carboximetilcelulose e frutooligossacarídeo 1% (controle). A quantificação foi realizada através de contagem total, entre 30 e 300 colônias, com o resultado obtido através das medias das triplicatas de cada amostra. Foram feitas as contagens nos períodos de 0, 6, 12, 18 e 24 horas.

4.2.5.6 Análise de pH

Para a determinação do potencial hidrogeniônico (pH), utilizou-se pHmêtro (Hanna instruments HI 8314) calibrado com tampão a pH 4,0 e 7,0. Para as

determinações das culturas probióticas serão realizadas de 6 em 6 horas e para as patogênicas de 3 em 3 horas.

4.2.5.7 Análise estatística

Para o ensaio foram utilizados os melhores hidrolisados obtidos da reação enzimática com as matrizes lignocelulósicas no período de 0 a 50 minutos.

Os resultados dos parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$), verificando se existe diferença entre as amostras, através do programa STATISTICA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção dos hidrolisados

5.1.1 Atividade enzimática

5.1.1.1 Atividade das enzimas ligninolíticas

5.1.1.1.1 Atividade de lacase

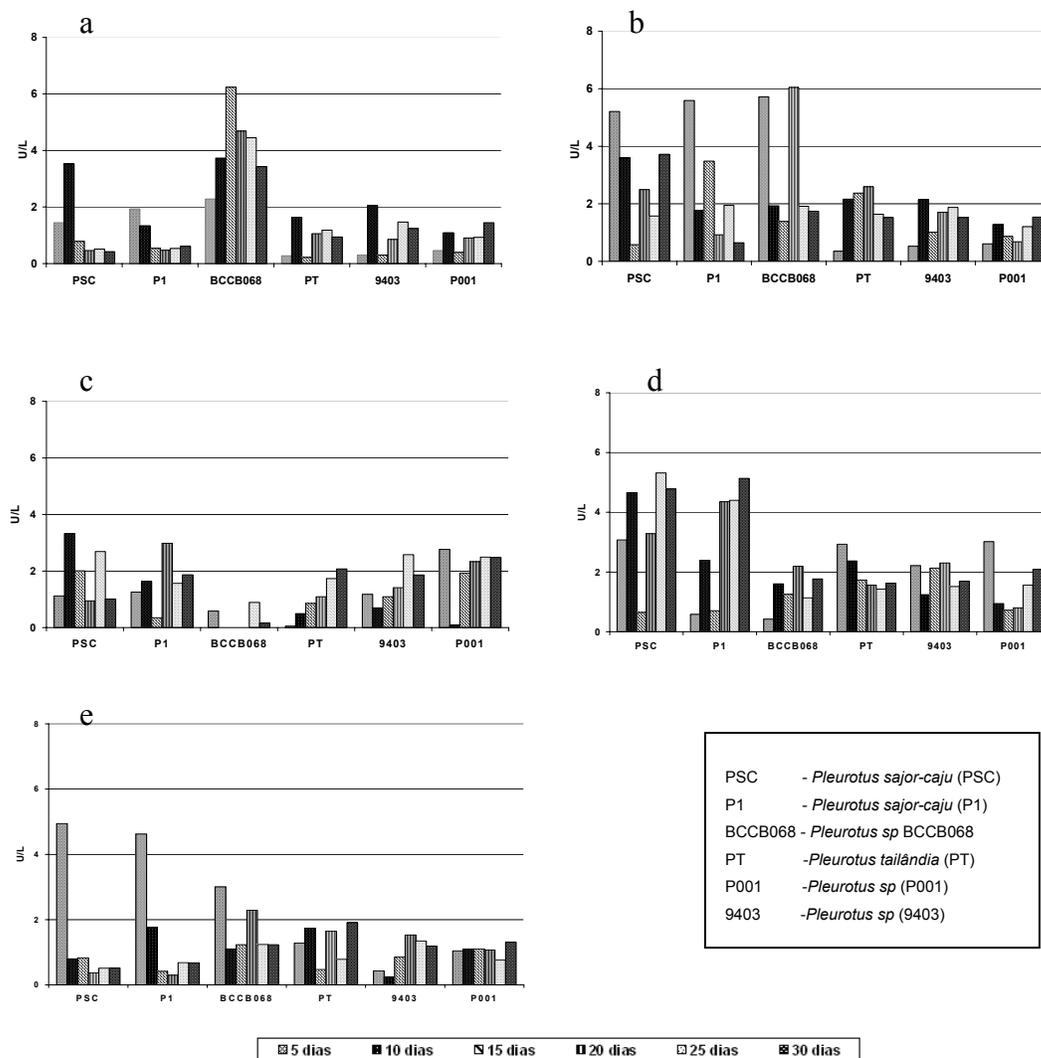


Figura 5.1- Atividade de lacase após crescimento das linhagens nos substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C

A Figura 5.1 mostra os resultados da atividade da enzima Lacase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) cultivadas nos substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA) nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob condição de fermentação submersa, a 30°C.

Pela análise do gráfico, para o substrato BC observou-se que a maior atividade enzimática das linhagens foi obtida com o fungo *Pleurotus sp* BCCB068, com a maior atividade no 15º dia com 6,23 U/L.

Para o substrato SM, observou-se que a maior atividade enzimática das linhagens foi obtida pelo fungo *Pleurotus sp* BCCB068, com a maior atividade no 20º dia (6,04 U/L).

Para o substrato FT, observou-se uma baixa atividade para todas as linhagens sendo que o no fungo *Pleurotus tailândia* (PT) e *Pleurotus sp* (P001) tiveram uma atividade maior que as demais no 25º dia de incubação, com 1,73 U/L e 2,48 U/L, respectivamente.

Pela análise do gráfico, para o substrato FA, observou-se uma maior atividade com as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) e *Pleurotus sajor-caju* (P1), principalmente no 25º e 30º dia, com 5,31U/L e 5,13 U/L, respectivamente.

Em relação ao substrato CA, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) com 4,94 U/L, *Pleurotus sajor-caju* (P1) com 4,62 U/L e *Pleurotus sp* BCCB068 com 3,0 U/L, no 5º dia, sendo que as demais linhagens não tiveram rendimentos significativos com este tipo de substrato.

5.1.1.1.2 Atividade de manganês peroxidase

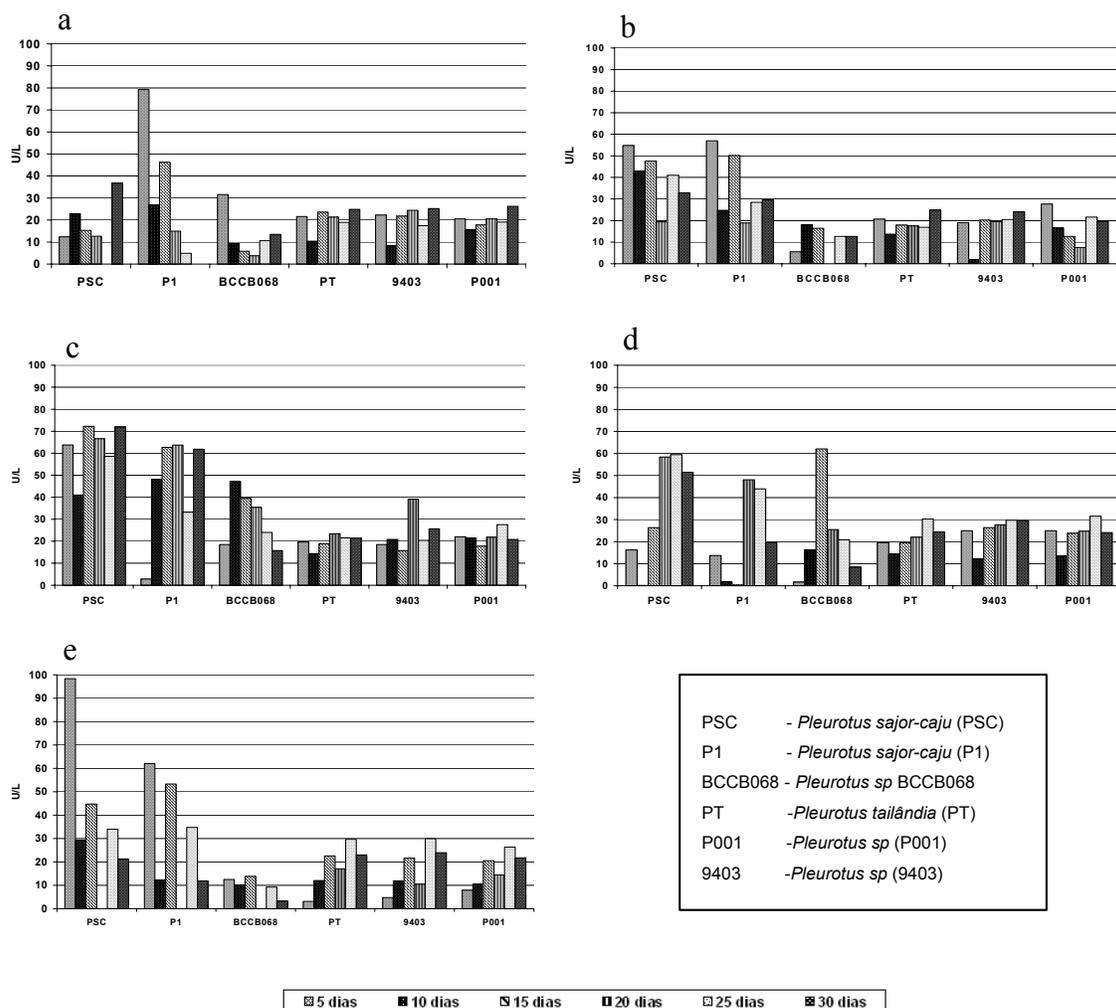


Figura 5.2- Atividade de manganês peroxidase após crescimento das linhagens nos substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C.

A Figura 5.2 mostra os resultados da atividade da enzima manganês peroxidase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) sobre os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA), nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob fermentação submersa.

Pela análise do gráfico, observou-se que com o substrato BC, a maior atividade foi obtida com a linhagem *Pleurotus sajor-caju* (P1), no 5° e 15° dia, com 79,27 U/L e 46,27 U/L, respectivamente, sendo que as demais linhagens não apresentaram rendimentos significativos com este tipo de substrato no decorrer dos 30 dias de incubação.

Para o substrato SM, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) com 54,79 U/L no 5° dia e 15° dia de incubação e *Pleurotus sajor-caju* (P1), no 5° e 15° dia, com atividades de 56,94 U/L e 50,13 U/L, respectivamente, onde as demais linhagens não apresentaram rendimentos significativos com este tipo de substrato.

Para o substrato FT, o gráfico demonstra que a maior atividade de enzima manganês peroxidase foi obtida pelas linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) com 63,76 U/L no 5° dia e 72,19 U/L no 15° dia de incubação, para *Pleurotus sajor-caju* (P1), no 20° dia com 63,67 U/L, sendo que a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 apresentou uma produção de atividade próximas no 10°, 15° e 20° dias de incubação com 47,17 U/L, 39,45 U/L e 35,42 U/L, respectivamente, em comparação com as linhagens citadas anteriormente. Para os demais fungos, foi verificado rendimentos mais baixos, porém mais elevados em relação aos testes realizados com os resíduos BC e SM.

Pela análise da Figura 5.2, com o substrato farelo de arroz, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) no 20°, 25° e 30° dia, com 58,38U/L, 59,45 U/L e 51,47 U/L, respectivamente, sendo que a linhagem *Pleurotus sp* (068) apresentou a maior atividade enzimática (62,05 U/L) no 15° dia de incubação. As demais linhagens apresentaram rendimentos mais baixos.

Em relação ao resíduo CA, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) e *Pleurotus sajor-caju* (P1) no 5° dia, sendo que a primeira apresentou a maior atividade entre todos os substratos testados para esta enzima (98,38 U/L).

5.1.1.2 Atividade das enzimas celulolíticas

5.1.1.2.1 Atividade de β -glicosidase

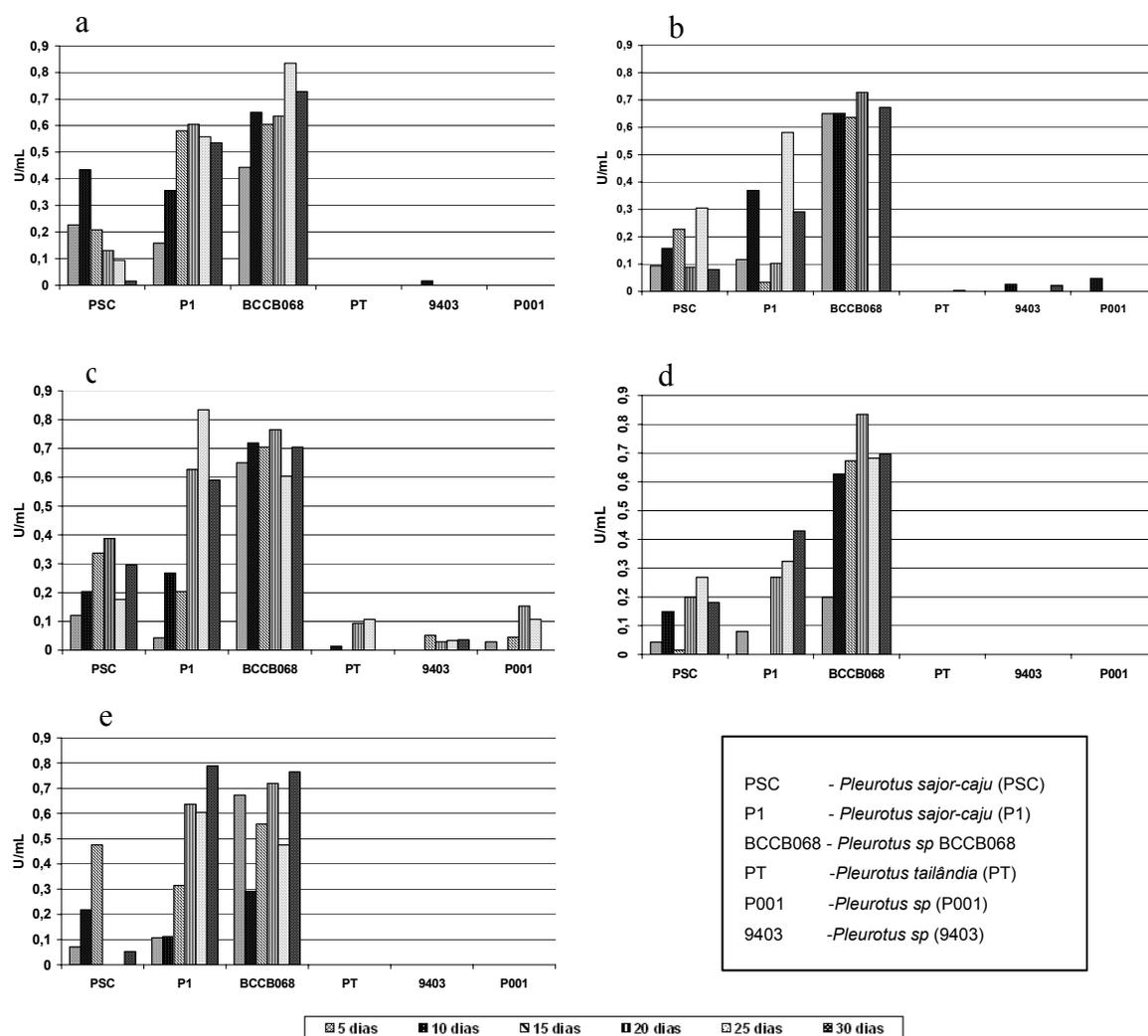


Figura 5.3- Atividade de β -glicosidase após crescimento das linhagens nos substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C.

A Figura 5.3 mostra os resultados da atividade de β -glicosidase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) sobre os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM), farelo

de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA), nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob fermentação submersa.

Pela análise da Figura 5.3, para o substrato BC, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus sajor-caju* (P1) com atividade crescente no decorrer dos tempos de incubação, atingindo a máxima no 25° dia com 0,83 U/mL e 20° dia com 0,60 U/mL, respectivamente. As linhagens *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) não apresentaram atividade ou não foi significativa em nenhum dos tempos estudados.

Para o resíduo SM, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sp* (068) com atividade crescente no decorrer dos tempos de incubação, atingindo 0,72 U/mL no 20° dia. As linhagens *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) não apresentaram atividade ou não foi significativa em nenhum dos tempos estudados.

Em relação ao substrato FT, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sp* (068) com atividade considerável durante todo o período de incubação, atingindo a máxima de 0,76 U/mL no 20° dia. As linhagens *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) apresentaram atividades discretas ou não foram significativa nos tempos estudados.

Para o substrato FA, observou-se uma maior atividade para a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 com atividade alta em relação as demais linhagens no período de incubação, chegando ao valor de 0,83 U/mL no 20° dia. As linhagens *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) mais uma vez, não apresentaram atividade significativa em nenhum dos tempos estudados.

Pela análise do gráfico, para o substrato CA, observou-se uma maior atividade para as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus sajor-caju* (P1) com as maior atividade no 30° dia com 0,76 U/mL e 0,78 U/mL, respectivamente. As linhagens *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) também não apresentaram atividade com este resíduo.

5.1.1.2.2 Atividade de avicelase

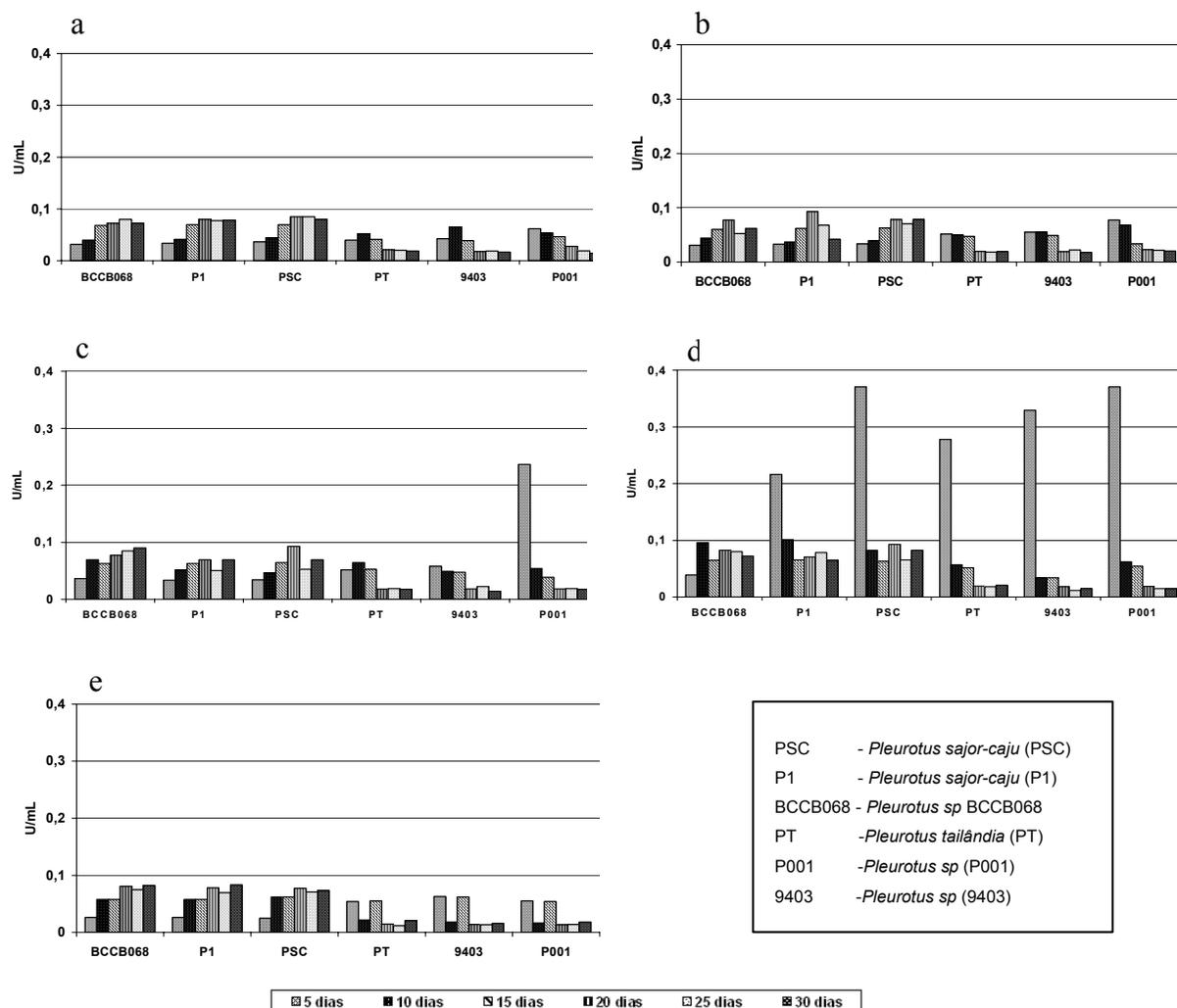


Figura 5.4 - Atividade de avicelase das linhagens após crescimento nos substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C.

A Figura 5.4 apresenta os resultados da atividade da enzima avicelase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) sobre os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA), nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob fermentação submersa.

Pela análise do gráfico, para o substrato BC, observou-se uma atividade discreta para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) e *Pleurotus sajor-caju* (P1) com 0,08 U/mL e *Pleurotus sp* BCCB068 em torno de 0,07 U/mL. Porém nenhuma linhagem destacou-se mediante os resultados obtidos.

Para o substrato SM, através dos resultados obtidos no gráfico, observou-se uma atividade baixa para as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1) e *Pleurotus sp* (068), onde a maior atividade para estas linhagens foi obtida no 20° dia. Por isso não houve destaque para nenhum fungo mediante os resultados obtidos.

Em relação ao substrato FT, observou-se a maior atividade com a linhagem *Pleurotus sajor-caju* (PSC) no 20° dia de incubação com 0,09 U/mL. As demais linhagens mantiveram atividades similares com exceção da linhagem *Pleurotus sp* (068) que teve atividades crescentes no decorrer dos dias de incubação, embora em concentrações baixas.

Pela análise do gráfico, para o substrato FA, observou-se a maior atividade das linhagens no 5° dia de incubação, com exceção da linhagem *Pleurotus sajor-caju* (068) que obteve baixo rendimento. Nos demais dias, houve grande decréscimo na atividade enzimática, tendendo a quase nula a partir do 20° dia de incubação para os fungos *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (9403) e *Pleurotus sp* (P001).

Em relação ao substrato CA, observou-se as maiores atividades para as linhagens *Pleurotus sp* (068), *Pleurotus sajor-caju* (P1), ambas com 0,08 U/mL de atividade de enzima e *Pleurotus sajor-caju* (PSC) com 0,07 U/mL, todas no 30° dia de incubação. As demais linhagens apresentaram resultados abaixo deste valor.

5.1.1.2.3 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

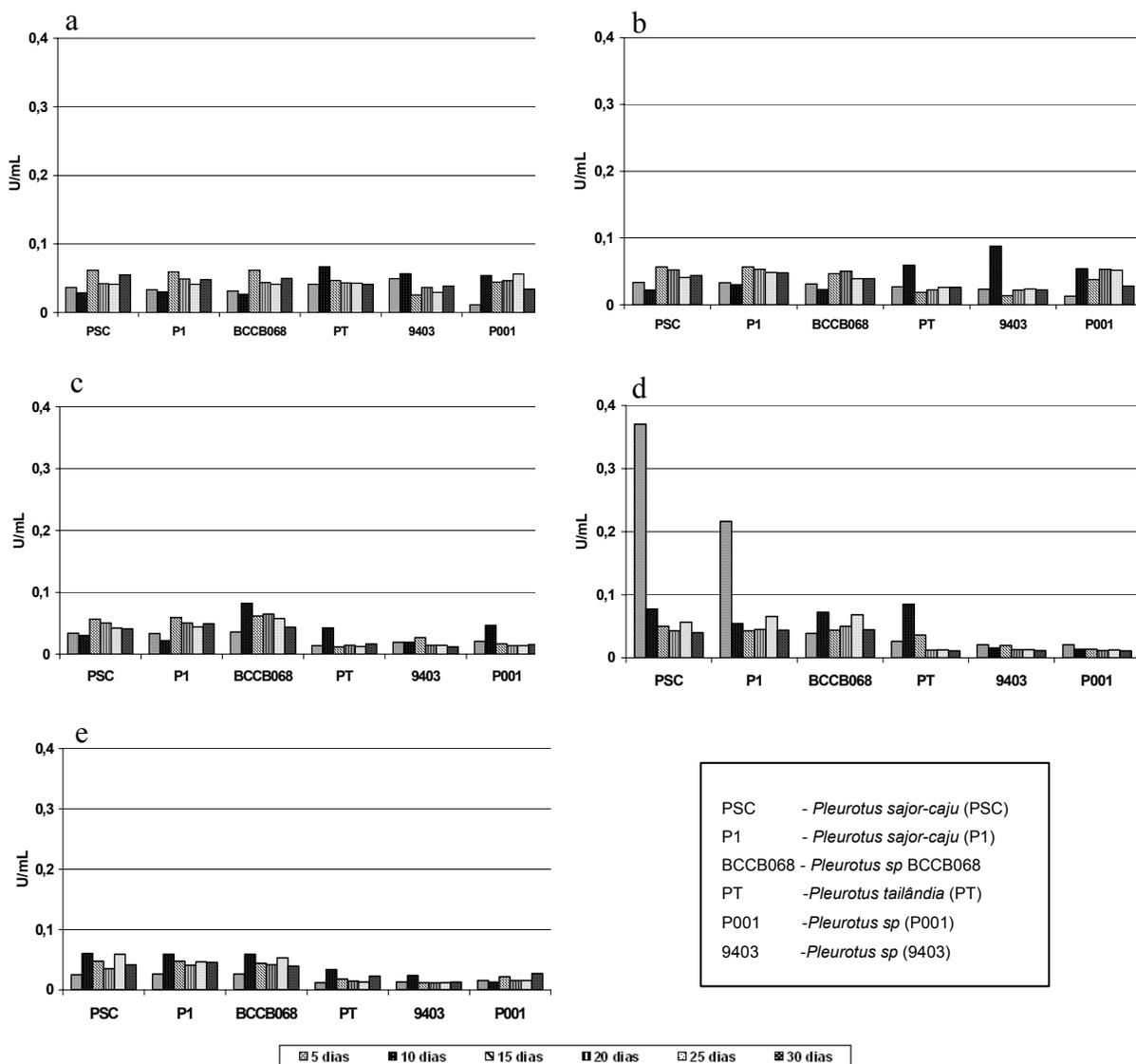


Figura 5.5- Atividade de carboximetilcelulase das linhagens após crescimento nos substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C.

A Figura 5.5 apresenta os resultados da atividade da enzima carboximetilcelulase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) sobre os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho (SM), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de

arroz (CA), nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob fermentação submersa.

Pela análise do gráfico, para o substrato BC, observou-se a maior atividade para a *Pleurotus tailândia* (PT) no 10° dia de incubação com 0,06 U/mL. No geral, as demais linhagens apresentaram resultados similares.

Para o substrato SM, através dos resultados do gráfico, novamente observou-se a maior atividade para a linhagem *Pleurotus tailândia* (PT) no 10° dia de incubação com 0,06 U/mL. No geral, os resultados foram muito similares aos resultados utilizando BC como substrato.

Pela análise do gráfico, para o substrato FT, observou-se a maior atividade para a linhagem *Pleurotus sp* (068) no 10° dia de incubação com atividade de 0,08 U/mL, verificou-se também que esta linhagem apresentou as maiores atividades em relação as demais no período de incubação para esta enzima.

Em relação ao substrato FA, os resultados demonstram maior atividade para a linhagem *Pleurotus sajor-caju* (PSC), no 5° dia de incubação (0,37 U/mL), sendo esta a maior atividade entre todos os substratos testados para esta enzima. A linhagem *Pleurotus sajor-caju* (P1) apresentou no 5° dia atividade de 0,21 U/mL tendo assim apresentado a segunda maior atividade para esta enzima.

Para o substrato CA, pela análise do gráfico, observou-se que no geral, nenhuma linhagem se destacou, com atividades relativamente baixas em relação aos outros substratos testados.

5.1.1.3 Atividade de enzimas xilanolíticas

5.1.1.3.1 Atividade de xilanase

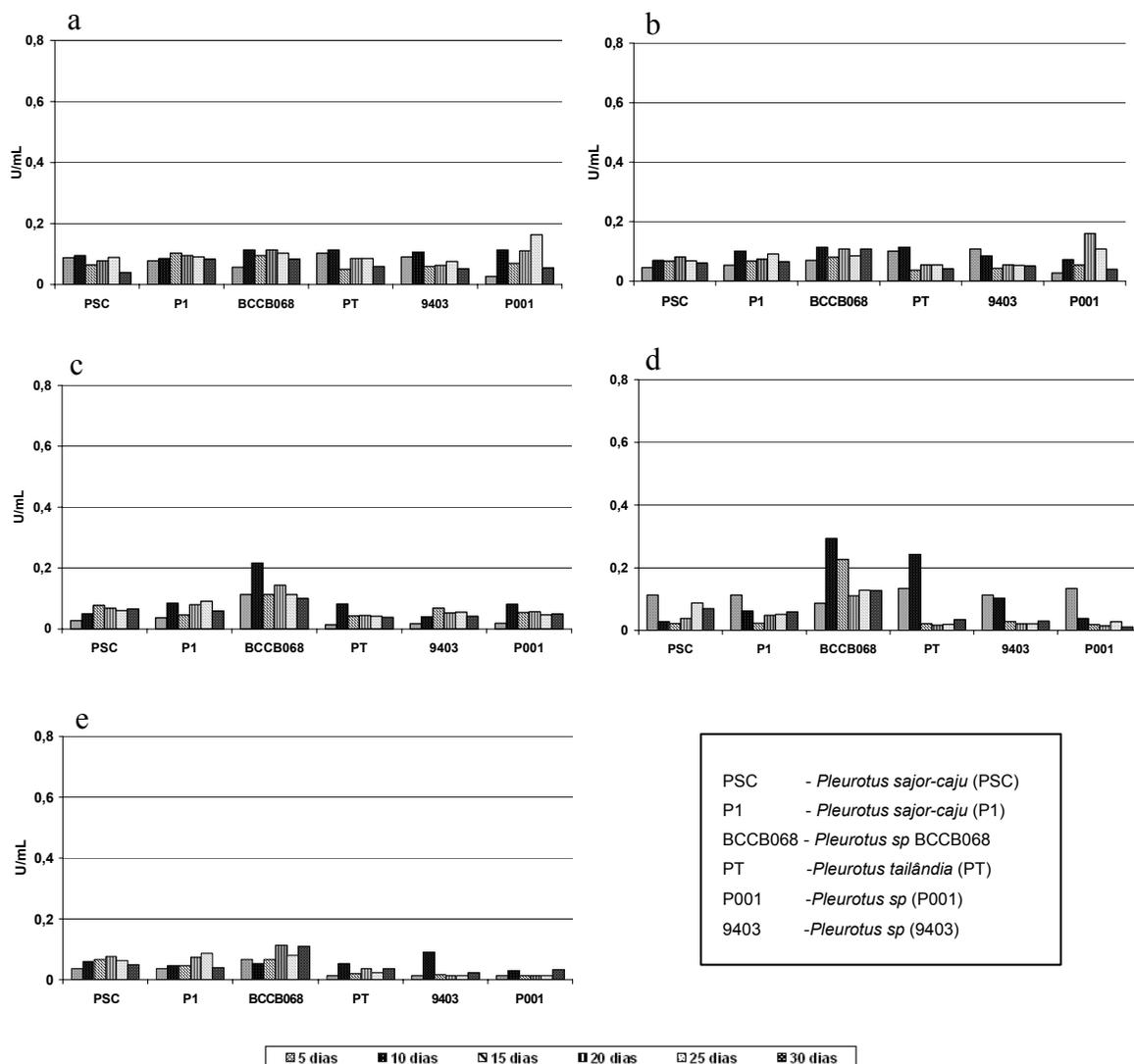


Figura 5.6- Atividade de xilanase produzidas pelas linhagens após crescimento em substratos bagaço de cana (a), sabugo de milho (b), farelo de trigo (c), farelo de arroz (d) e casca de arroz (e), no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30°C.

A Figura 5.6 mostra os resultados da atividade da enzima xilanase produzida pelas linhagens fúngicas *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1), *Pleurotus sp* BCCB068, *Pleurotus tailândia* (PT), *Pleurotus sp* (P001) e *Pleurotus sp* (9403) sobre os substratos bagaço de cana (BC), sabugo de milho

(SM), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA), nos períodos de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias sob fermentação submersa.

Nenhuma linhagem se destacou, com atividades relativamente baixas e semelhantes após crescimento no substrato BC.

Pela análise da figura 5.6, para o substrato SM, observou-se que em análise geral, nenhuma linhagem se destacou, apresentando atividades baixas e semelhantes.

Em relação ao substrato FT, através da análise da figura 5.6, verificou-se que a linhagem *Pleurotus sp* (068) com a atividade de 0,21 U/mL no 10º dia de incubação. As demais linhagens apresentaram atividade nula ou não significativa.

De acordo com a figura 5.6, para o substrato farelo de arroz, destacou-se a linhagem *Pleurotus sp* (068) com a atividade de 0,29 U/mL no 10º dia de incubação, onde esta foi a maior atividade entre todos os substratos testados com as 6 linhagens. As demais linhagens apresentaram baixa atividade ou não significativa.

Para o substrato CA, pela análise do gráfico, observou-se que em geral, nenhuma linhagem se destacou, com atividade relativamente baixa e sem diferenciação.

Os materiais lignocelulósicos são eficientes substratos para os fungos basidiomicetos, com a produção de enzimas ligninolíticas e celulolíticas, possibilitando inúmeras aplicações nos processos industriais (POINTING, 2001). A maioria dos fungos da podridão branca produzem estas enzimas de modo a promover sua adaptação ao meio rico em lignoceluloses, como os substratos testados neste experimento.

Para a seleção dos melhores hidrolisados, buscou-se a triagem através da atividade enzimática de xilanase, devido às fontes lignocelulósicas usadas serem ricas em xilana (como o bagaço de cana e sabugo de milho), podendo assim ser hidrolisadas com maior eficiência na obtenção dos compostos oligossacarídicos como os xilooligossacarídeos. As demais enzimas estudadas também são parâmetros importantes para a escolha dos hidrolisados, visto que, para a degradação eficiente de uma matriz lignocelulósica, é necessária a atuação de

enzimas ligninolíticas, para degradarem a lignina que protege a estrutura hemicelulósica, como as próprias enzimas celulolíticas que auxiliam no processo de degradação da celulose. Abaixo será discutido o comportamento de cada grupo de enzimas mediante as associações fungo-substrato realizado no decorrer dos 30 dias de incubação.

A pesquisa de enzimas ligninocelulolíticas revelou a presença da enzima lacase, onde destacam-se as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) e *Pleurotus sajor-caju* (P1) utilizando-se como substrato farelo de arroz com as atividades de 5,32 U/L (25° dia) e 5,13 U/L (30° dia) respectivamente (Figura 5.1). Neste substrato as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* (PT) produziram atividades de lacase semelhantes as demais linhagens no período de 30 dias de incubação. Com o substrato bagaço de cana e sabugo de milho, destacou-se a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068 com atividade de lacase elevada para o primeiro substrato durante o decorrer dos 30 dias de incubação e também para o sabugo de milho, principalmente no 20° dia de incubação com 6,04 U/L. Trabalhos realizados por KUMARAN et. al. (1997), apresentaram para o fungo *Pleurotus sajor-caju* 10,6 U/L de atividade de lacase, em substrato lignocelulósico.

A enzima lacase é uma glicoproteína polifenoloxidase que contém cobre no seu sítio ativo e catalisa a redução de O₂ para água, com simultânea oxidação de substratos fenólicos. A catálise de substratos fenólicos e compostos modelos de lignina por lacase ocorrem via transferência de um elétron, conduzindo à geração de radicais fenoxila, que podem ser convertidos a quinonas (LEONOWICZ, 2001).

Para manganês peroxidase, os resultados obtidos revelaram a presença desta enzima em todas as condições estudadas. Para o substrato farelo de trigo (Figura 5.2), destacaram-se as linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC), *Pleurotus sajor-caju* (P1) e *Pleurotus sp* BCCB(068), com atividades de 71,92 U/L (30° dia), 63,67 U/L (20° dia) e 47,17 U/L (10° dia) respectivamente. Para o substrato farelo de arroz, a linhagem *Pleurotus sp* BCCB(068) apresentou uma produção satisfatória, em comparação com os demais substratos, onde no 15° dia foi obtida a maior atividade em relação as demais linhagens para este substrato (62,05 U/L). O fungo *Pleurotus tailândia* (PT) no 10° dia, apresentou atividade muito parecida

com o *Pleurotus sp* BCCB(068), com 14,43 U/L, sendo que para os demais substratos obteve atividade maior ou igual a esta linhagem. A maior atividade obtida para esta enzima foi produzida pela linhagem *Pleurotus sajor-caju* (PSC) utilizando como substrato casca de arroz no 5° dia de incubação foi de 98,37 U/L de atividade. A atividade de manganês peroxidase é produzida durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de carbono e nitrogênio no meio de cultura. É cataliticamente dependente de H₂O₂ e íons Mn (II), e α -cetoácidos que estabilizam a sua atividade oxidativa (VALASKOVÁ, 2006). Os substratos bagaço de cana, sabugo de milho e casca de arroz são ricos em lignina, demonstrando deste modo, que as linhagens apresentaram atividades enzimáticas ligninolíticas similares aos encontrados na literatura. Estes resultados foram também encontrados por VIKINESWARY et. al. (2005), em todos os resíduos agroindustriais testados para a produção de lacase, utilizando o fungo *P. sanguineos*, que revelou-se grande produtor desta enzima em 11 dias de fermentação sólida.

De acordo com a Figura (5.3) a atividade de β -glicosidase foi produzida somente pelas linhagens *Pleurotus sajor-caju* (PSC) *Pleurotus sajor-caju* (P1) e *Pleurotus sp* BCCB(068), onde esta última produziu a maior atividade desta enzima quando os substratos bagaço de cana (25° dia) e farelo de arroz (20° dia) com 0,83 U/mL, foram utilizados. As demais linhagens não apresentaram atividade significativa no período de 30 dias de incubação para nenhum dos cinco substratos testados. Estudos realizados por SILVA (2001), mostraram ausência de atividade desta enzima quando *Pleurotus spp.* foi cultivado nos substratos casca de arroz e bagaço de cana em fermentação submersa.

Os resultados com a enzima avicelase (Figura 5.4) mostrou pouca atividade desta enzima por todas as linhagens em relação aos substratos testados. Somente com o substrato farelo de arroz as linhagens produziram atividades melhores (5° dia de incubação), onde destacam-se as linhagens *Pleurotus sp* (P001), *Pleurotus sajor-caju* (PSC) e *Pleurotus sp* (9403) com atividade de 0,37 U/mL para as duas primeiras linhagens e 0,32 U/mL para a última.

De acordo com os resultados apresentados para a atividade de carboximetilcelulase (Figura 5.5), todas as amostras apresentaram atividade desta enzima, sendo que a maior foi produzida pela linhagem *Pleurotus sajor-caju* (PSC) em farelo de arroz com 0,37 U/mL no 5º dia de incubação. As enzimas carboximetilcelulase (endoglucanase), avicelase (exoglucanase) e β -glicosidase formam um sistema enzimático hidrolítico importante para a degradação da celulose (BAYER e LAMED, 1992). A celulose de plantas é composta por estruturas cristalinas e amorfas, sendo que a primeira é mais resistente à degradação microbiana (KARUNANANDAA et al. 1995). Estudos realizados por SILVA (2001), demonstraram que os substratos lignocelulósicos farelo de trigo, farelo de arroz, casca de arroz e bagaço de cana não foram boas fontes de carbono para a produção de enzimas celulolíticas pelas linhagens do gênero *Pleurotus*. REDDY et. al (2003), estudou a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizando substrato de resíduos lignocelulósicos de banana em fermentação semi-sólida, obtendo também baixa atividade celulolítica, o que foi comprovado através dos resultados obtidos neste experimento para este tipo de fungo.

Para a atividade de xilanase (Figura 5.6), a linhagem *Pleurotus sp* BCCB(068) apresentou a maior atividade entre todos os substratos com 0,29 U/mL após o crescimento no substrato farelo de arroz (10º dia de incubação), em geral, esta linhagem produziu atividade mais alta em relação as demais para os substratos restantes. A linhagem *Pleurotus tailândia* (PT) apresentou a segunda maior atividade para o substrato farelo de arroz (10º dia de incubação) com 0,24 U/mL, sendo que nos demais substratos esta linhagem não apresentou atividade significativa. As demais linhagens não apresentaram resultados significativos, assim como os outros substratos testados. Estes resultados ficaram bem abaixo aos obtidos por QINNGHE et al. (2004), onde obteve-se 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida, sob condições otimizadas.

De acordo com os resultados obtidos no estudo detalhado com o complexo enzimático pelas 6 linhagens nos diferentes substratos, foram escolhidas duas

linhagens para a continuidade do experimento: as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia (PT)*.

A linhagem *Pleurotus sp* BCCB(068) mostrou-se, através das atividades enzimáticas, com grande potencial degradador, onde através dos estudos para a obtenção de compostos oligossacarídicos, a principal fonte de xilooligossacarídeos provém da xilana, e esta linhagem apresentou a maior atividade entre todas as linhagens de xilanase (obtida da combinação com o substrato farelo de arroz no 10° dia de incubação) com 0,29 U/mL. Este fungo foi estudado em outras linhas de pesquisa de degradação onde mostrou-se com alto poder degradativo, sendo utilizado para processos de biorremediação (GORNÝ, 2005). Esta linhagem através de ensaios preliminares já havia demonstrado um potencial enzimático ligninocelulolítico acima dos demais, e de acordo com os resultados obtidos neste estudo, comprovou-se a sua condição de produtor de enzimas ligninocelulolíticas.

A linhagem *Pleurotus tailândia (PT)*, foi escolhida de acordo com os resultados obtidos nas atividades enzimáticas, onde procurou-se um perfil enzimático mais brando, com atividade enzimática não tão alta como a do fungo *Pleurotus sp* BCCB(068), mas também não tão baixa como os demais fungos estudados. Para este perfil, foi escolhido o substrato farelo de arroz no 10° dia de incubação.

Este fungo apresentou uma razoável atividade de xilanase para esta associação escolhida fungo-substrato (0,24 U/mL), em relação as demais linhagens estudadas.



Figura 5.7- As linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 (esquerda) e *Pleurotus tailândia* (direita) cultivadas sob fermentação submersa, tendo farelo de arroz como fonte de carbono no 10º dia de cultivo.

Para as linhagens, foi escolhida a associação com o substrato farelo de arroz com o tempo de incubação durante o período de 10 dias. Os resultados confirmam a maior atividade ligninocelulolítica dos fungos com este substrato, onde a composição em nutrientes do farelo de arroz, favorecem a produção de grandes quantidades de massa micelial, além de estimular a produção de diversas enzimas (HERRERA, 1995). Segundo LUH et al. (1991), o farelo de arroz não fermentado, apresenta aproximadamente 8% de celulose, 5% de lignina e elevado teor de hemiceluloses (38%), constituindo um material extremamente rico em nutrientes como amido, açúcares totais (glicose, frutose, sacarose e rafinose) e monossacarídeos como xilose, arabinose, galactose e ácidos urônicos que constituem a fração hemicelulósica. KARUNANANDAA et al. (1995), apontaram a xilose e arabinose como as maiores fontes de energia para *Cyathus stercoreus* e *P. sajor-caju* cultivados através de fermentação semi-sólida sobre resíduos da folha do arroz. Estes açúcares, não seriam usados apenas como substrato energético pelos fungos, mas também na produção de H_2O_2 , que é essencial para a atuação das enzimas ligninolíticas produzidas por estes.

5.2 Determinação dos hidrolisados lignocelulósicos

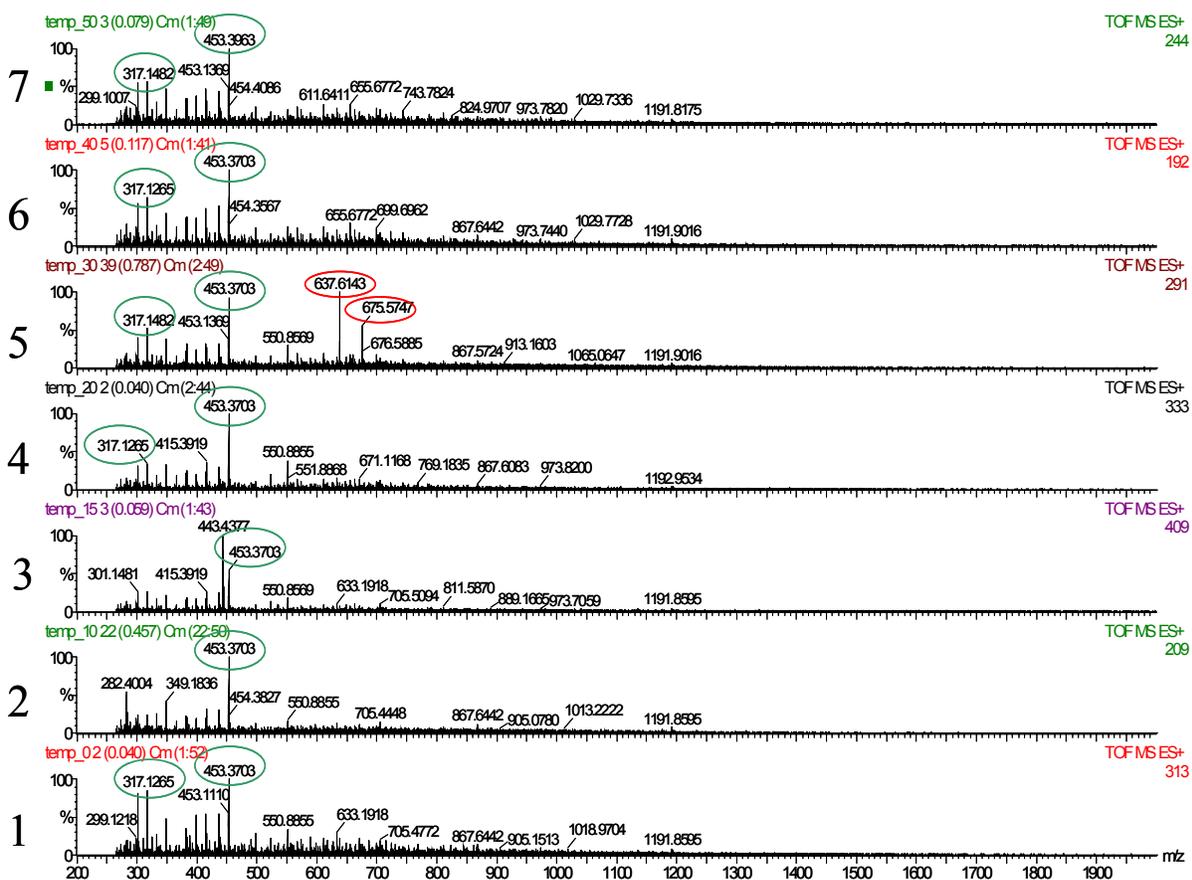


Figura 5.8- Espectros da varredura dos tempos de degradação do hidrolisado selecionado (*Pleurotus sp* BCCB068, cultivado em farelo de arroz, no período de 10 dias) em matriz hemicelulósica (xilana). O espectro 1 corresponde ao controle, os espectros 2, 3, 4, 5, 6 e 7 correspondem respectivamente aos tempos de degradação enzimática de 10, 15, 20, 30, 40 e 50 minutos respectivamente, na temperatura de 50°C.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.8, verificou-se através do espectro 1 (utilizado como padrão) a presença dos íons com m/z de 453 e m/z 317, que mostraram-se frequentes nos demais espectros durante os 50 minutos de degradação. Pode-se afirmar que estes íons são marcadores enzimáticos para a reação. O indicativo de modificação na matriz utilizada para degradação foi obtido no espectro 5 referente a 30 minutos, onde aparecem os íons de m/z 637 e m/z 675, indicando a modificação nos espectros estudados. A partir dos 30 minutos, verifica-se uma modificação maior na matriz, devido ao desaparecimento dos íons m/z 637 e m/z 675 que são de carga mais alta, levando a modificações na estrutura original da matriz de xilana, estas modificações

evidenciam a degradação promovida pelo complexo enzimático contido no hidrolisado estudado. Conforme os resultados apresentados, comprova-se a possível eficácia do complexo enzimático lignocelulolítico nas reações com a matriz hemicelulósica (espectro 5) no tempo de 30 minutos de contato a 50°C. Isso é evidenciado através dos íons de m/z 637 e m/z 675, indicando a formação de compostos de alto peso molecular que estão associados aos oligossacarídeos.

5.3 Planejamento experimental para atividade enzimática de xilanase e β-xilosidase

Realizou-se um planejamento experimental fatorial completo com 14 ensaios e 3 pontos centrais (17 ensaios), para avaliar as 3 variáveis independentes no estudo da produção de xilanase e β-xilosidase para as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus sp tailandia*: (x1) pH; (x2) temperatura de incubação (°C) e (x3) concentração de substrato (farelo de arroz) em gramas.

Tabela 5.1- Valores dos níveis codificados utilizados no planejamento completo 2³

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
pH	3,8	4,5	5,5	6,5	7,2
Temperatura °C	21,6	25	30	35	38,4
[] substrato (%)	1,4	3	5	10	11,6

As variáveis foram discretizadas em 5 níveis, de acordo com a Tabela 5.1. Foram estendidas as faixas de valores de pH, temperatura e concentração de substrato, estipulando valores abaixo e acima dos pontos centrais, para que se possa retirar a equação quadrática.

5.3.1 Otimização de atividade enzimática da linhagem *Pleurotus sp* BCCB068

Tabela 5.2- Matrizes com os valores codificados e as respostas da atividade enzimática de xilanase e β -xilosidase (U/mL).

Ensaio	x1	x2	x3	xilanase U/mL	β -xilosidase U/mL
1	-1	-1	-1	0,195	0,025
2	1	-1	-1	0,144	0,029
3	-1	1	-1	0,247	0,030
4	1	1	-1	0,154	0,021
5	-1	-1	1	0,123	0,048
6	1	-1	1	0,391	0,031
7	-1	1	1	0,092	0,034
8	1	1	1	0,092	0,028
9	-1,68	0	0	0,113	0,033
10	1,68	0	0	0,031	0,026
11	0	-1,68	0	0,401	0,027
12	0	1,68	0	0,017	0,038
13	0	0	-1,68	0,031	0,022
14	0	0	1,68	0,133	0,038
15	0	0	0	0,072	0,026
16	0	0	0	0,072	0,026
17	0	0	0	0,056	0,026

A Tabela 5.2 apresenta a matriz codificada do planejamento fatorial completo e as respostas de atividade enzimática, sendo x1: pH, x2: temperatura ($^{\circ}$ C) e x3: concentração de substrato (farelo de arroz) em gramas. Esses resultados foram analisados pelo software Statistica for Windows v.5.0, e assim pode-se determinar os coeficientes de regressão apresentados nas tabelas 5.3 e 5.5.

5.3.1.1 Atividade de xilanase

Através dos resultados obtidos no planejamento experimental, foi possível determinar os coeficientes de regressão e análise de variância que estão apresentados nas tabelas 5.3 e 5.4, respectivamente, para a enzima xilanase, utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

Tabela 5.3 - Coeficientes de regressão para a atividade de xilanase, utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

Fatores	Coeficientes regressão	Erro padrão	T(2)	p-valor	L. conf. -95%	L. conf. +95%
Média	0,063448	0,005134	12,3586	0,006484	0,041359	0,085538
x1 (Q)	0,014164	0,002654	5,3376	0,033354	0,002746	0,025581
x2 (L)	-0,066907	0,002411	-27,7513	0,001296	-0,077280	-0,056533
x2(Q)	0,062632	0,002654	23,6027	0,001790	0,051214	0,074049
x3(Q)	0,017801	0,002654	6,7083	0,021507	0,006384	0,029219
x1 x2	-0,038580	0,003150	-12,2475	0,006601	-0,052134	-0,025027
x1 x3	0,051440	0,003150	16,3301	0,003729	0,037887	0,064994
x2 x3	-0,048868	0,003150	-15,5135	0,004129	-0,062422	-0,035315

Onde: (x1): pH; (x2): temperatura °C; (x3): concentração de substrato (farelo de arroz) em percentagem.

Tabela 5.4 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de xilanase no processo utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

	SQ	gl	MQ	F(cal)	F(tab)
Regressão	0,157772	7	0,022539	4,15	3,29
Resíduos	0,048851	9	0,005427		
Falta ajuste	0,048662	7			
Erro puro	0,000159	2			
total	0,206623	16			

OBS: Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática

GL = grau de liberdade

MQ = média quadrática

Visto que:

$$F_{\text{cal}} = 4,15 > F_{\text{tab } 0,95,7,9} = 3,29 \quad R^2 = 0,76$$

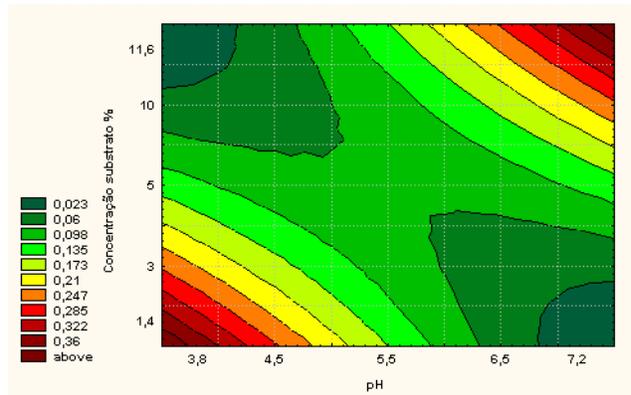
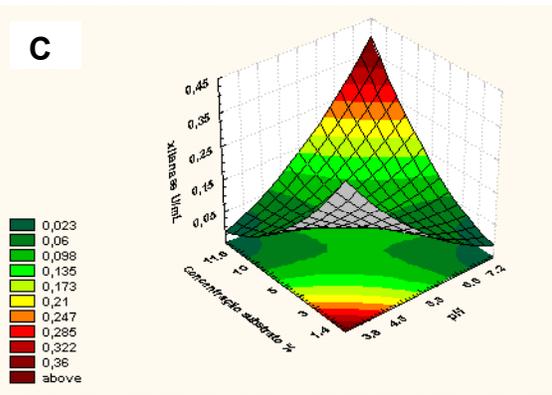
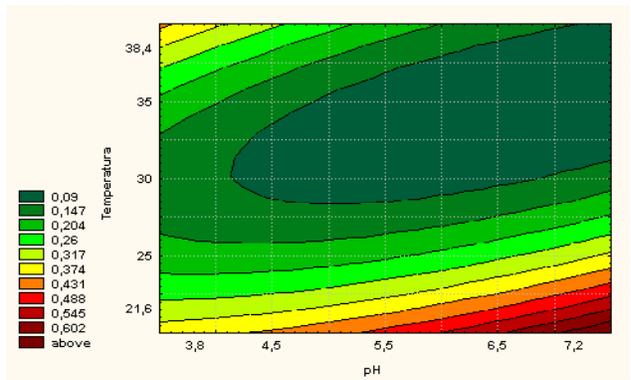
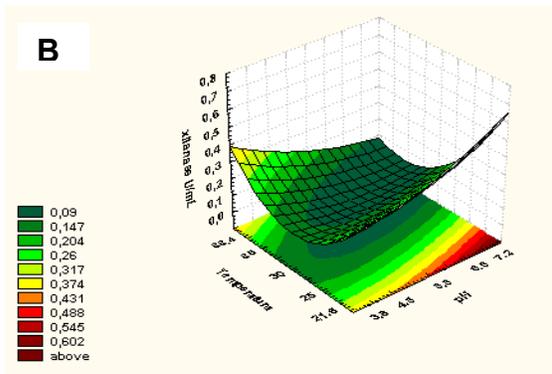
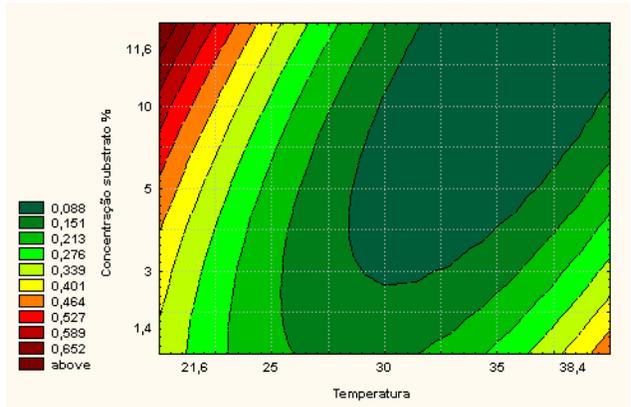
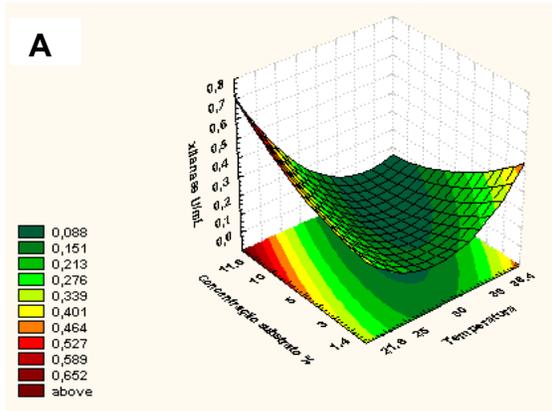


Figura 5.9 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de xilanas U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).

5.3.1.2 Atividade de β - xilosidase

As tabelas 5.5 e 5.6 apresentam os coeficientes de regressão e análise de variância, respectivamente, para β -xilosidase, utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

Tabela 5.5 – Coeficientes de regressão para a atividade de β -xilosidase, utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

Fatores	Coeficientes regressão	Erro padrão	T(13)	p-valor	L. conf. -95%	L. conf. +95%
Média	0,028541	0,001538	18,5555	0,0000	0,025218	0,031864
x1 (L)	-0,002912	0,001264	-2,30322	0,038428	-0,005644	-0,000181
x2 (Q)	0,001669	0,001295	1,28947	0,219706	-0,001127	0,004466
X3(L)	0,004606	0,001264	3,64303	0,002977	0,001875	0,007338

Onde: (x1): pH; (x2): temperatura °C; (x3): concentração de substrato (farelo de arroz) em percentagem.

Tabela 5.6 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de β -xilosidase no processo utilizando o fungo *Pleurotus sp* BCCB068.

	SQ	gl	MQ	F(cal)	F(tab)
Regressão	0,000442	3	0,00014	6,75	3,41
Resíduos	0,000284	13	0,00002		
total	0,000726	16			

OBS: Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática

GL = grau de liberdade

MQ = média quadrática

Visto que:

$F_{cal} = 6,75 > F_{tab 0,95,3,13} = 3,41$ $R^2 = 0,61$

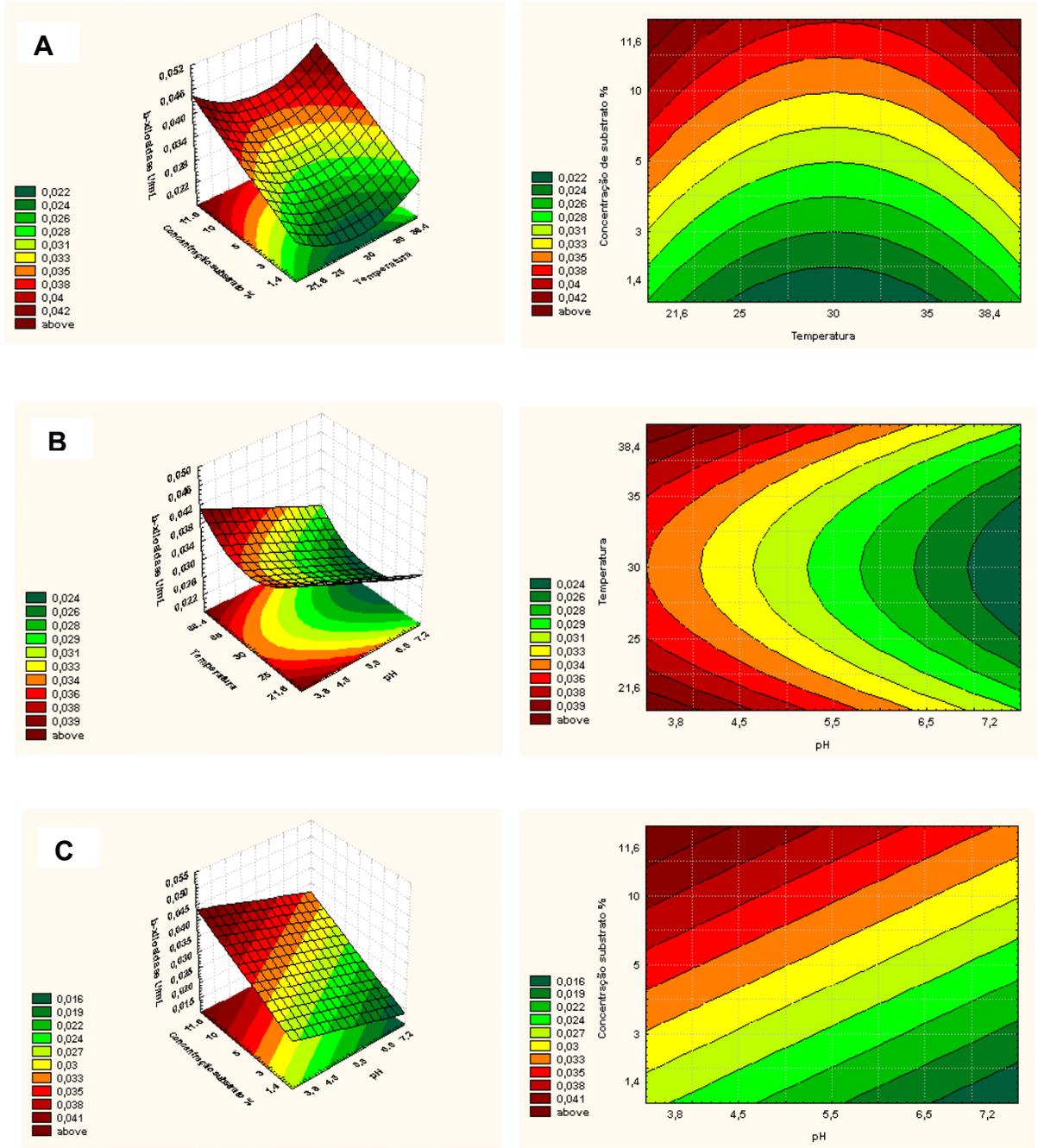


Figura 5.10 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de β -xilidase U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).

Os valores dos coeficientes de regressão (Tabelas 5.3 e 5.5) indicam quanto cada fator influencia na resposta estudada (neste caso, as atividades de xilanase e β -xilosidase). Quanto maior é o seu valor, maior é a sua influência, e um efeito positivo indica que ao passar de um valor mínimo a um valor máximo da variável, a atividade enzimática aumenta. Já um efeito negativo indica o contrário, ou seja, ao passar de um valor mínimo para o valor máximo, a atividade enzimática diminui.

O valor de t indica o quão grande é a variável em relação ao seu desvio. Assim, quanto maior o valor de t, maior a probabilidade da variável ser estatisticamente significativa.

O valor do coeficiente p está relacionado ao nível de significância da variável independente sobre a resposta em estudo. Normalmente é escolhido como intervalo de confiança o valor de 95%. Sendo assim, pode-se afirmar que para valores de p inferiores a 5%, a variável é considerada estatisticamente significativa.

Através destas tabelas, percebe-se que os parâmetros pH(Q), temperatura (L) e (Q), concentração de substrato(Q) e as interações pH x temperatura, pH x concentração de substrato e temperatura x concentração de substrato apresentaram valores de coeficientes de regressão significativos para a atividade de xilanase. Em relação a atividade de β -xilosidase, os coeficientes significativos foram o pH(L), temperatura (Q) e concentração de substrato(L), onde, um aumento em qualquer um desses coeficientes de valor positivo acarreta no aumento das atividades enzimáticas, enquanto os parâmetros pH (L) para xilanase e temperatura (L), interações pH x temperatura e temperatura x concentração de substrato para β -xilanase apresentaram valores negativos, indicando que um aumento nestes fatores acarreta na diminuição da atividade enzimática. Nas Tabelas 5.4 e 5.6, encontram-se os valores calculados e tabelados de F.

Eliminando-se os fatores não-significativos, obteve-se os coeficientes de regressão estatisticamente significativos, obtendo assim uma equação. Para a

validação desta equação foi realizado o teste F utilizando 95% de confiança, na análise de variância.

O valor de F da regressão em relação aos resíduos deve ser o maior possível, pois isso indica que a variação é explicada pela regressão e não pelos resíduos. Para que a regressão seja considerada estatisticamente significativa (ou seja, para que o modelo seja considerado preditivo), o $F_{\text{calculado}}$ deve ser maior que o F_{tabelado} .

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,76 para a atividade de xilanase e 0,61 para β -xilosidase, indicando que o modelo explicou em 76% e 61%, respectivamente, da variação dos dados observados.

O modelo apresentou regressão significativa ao nível de 95% de confiança (F calculado superior ao F tabelado). Sendo assim, o modelo ajustado da atividade de xilanase e β -xilosidase no processo foi considerado preditivo.

Os resultados apontaram para as condições ótimas de atividade de xilanase corresponderem à 20°C, pH de 7,5 e concentração de substrato 11,6%. O máximo de atividade enzimática foi de 0,4 U/mL, com pH de 5,5, temperatura de 21,6°C e concentração de substrato de 5% (ensaio 11). Este valor de atividade de xilanase foi maior que o valor obtido para a produção desta enzima em condições fixas estudadas anteriormente (27,5% maior). Para β -xilosidase, a atividade aumenta com o aumento da concentração de substrato, com o pH entorno de 3,8. O máximo de atividade enzimática foi de 0,048 U/mL, com pH de 4,5, temperatura de 25 °C e concentração de substrato de 10% (ensaio 5). Para os trabalhos posteriores, as condições de cultivo foram fixadas de acordo com estes dados de otimização para a obtenção dos XOS.

5.3.2 Otimização de atividade enzimática da linhagem *Pleurotus sp* tailandia

Tabela 5.7- Planejamento completo 2³ com 17 ensaios, para a linhagem *Pleurotus tailandia*

Ensaio	X1	X2	X3	Xilanase U/mL	β -xilosidase U/mL
1	-1	-1	-1	0,027	0,027
2	1	-1	-1	0,175	0,025
3	-1	1	-1	0,020	0,027
4	1	1	-1	0,154	0,028
5	-1	-1	1	0,277	0,041
6	1	-1	1	0,277	0,040
7	-1	1	1	0,036	0,042
8	1	1	1	0,690	0,039
9	-1,68	0	0	0,123	0,046
10	1,68	0	0	0,092	0,045
11	0	-1,68	0	0,103	0,025
12	0	1,68	0	0,072	0,027
13	0	0	-1,68	0,025	0,045
14	0	0	1,68	0,277	0,044
15	0	0	0	0,164	0,030
16	0	0	0	0,164	0,030
17	0	0	0	0,164	0,030

A Tabela 5.7 apresenta a matriz codificada do planejamento fatorial completo, totalizando 17 ensaios. As variáveis estudadas foram: x1: pH, x2: temperatura (°C) e x3: concentração de substrato (farelo de arroz) em gramas. As respostas analisadas foram atividade de xilanase (U/mL) e β -xilosidase (U/mL).

5.3.2.1 Atividade de xilanase

As tabelas 5.8 e 5.9 apresentam os efeitos estimados e análise de variância, respectivamente, para xilanase, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

Tabela 5.8 – Efeitos estimados para a atividade de xilanase, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

Fatores	Efeitos estimados	Erro padrão	T(13)	p-valor	L. conf. -95%	L. conf. +95%
Média	0,167059	0,027882	5,991704	0,000045	0,106824	0,227294
x1 (L)	0,129439	0,062215	2,080496	0,057821	-0,004969	0,263847
x3 (L)	0,194454	0,062215	3,125487	0,008042	0,060045	0,328862
x1 x2	0,160000	0,081288	1,968301	0,070735	-0,015613	0,335613

Onde: (x1): pH; (x3): concentração de substrato (farelo de arroz) em percentagem.

Tabela 5.9 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de xilanase no processo, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

	SQ	gl	MQ	F(cal)	F(tab)
Regressão	0,237502	3	0,079167	5,99	3,41
Resíduos	0,171803	13	0,013216		
total	0,409305	16			

OBS: Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática

GL = grau de liberdade

MQ = média quadrática

Visto que:

$$F_{\text{cal}} = 5,99 > F_{\text{tab } 0,95,3,13} = 3,41 \quad R^2 = 0,58$$

Devido ao valor de R^2 ficar abaixo de 0,60 e aos valores elevados nos desvios calculados entre o valor experimental e predito pelo modelo matemático, não foi possível elaborar os gráficos de superfícies de resposta para a atividade de xilanase, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*. Desta forma, foram considerados os valores dos efeitos estimados.

5.3.2.2 Atividade de β -xilosidase

As tabelas 5.10 e 5.11 apresentam os coeficientes de regressão e análise de variância, respectivamente, para β -xilosidase, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

Tabela 5.10 – Coeficientes de regressão para a atividade de β -xilosidase, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

Fatores	Coeficientes regressão	Erro padrão	T(13)	p-valor	L. conf. -95%	L. conf. +95%
Média	0,026972	0,002279	11,83624	0,000000	0,022049	0,031895
x1 (L)	0,005027	0,001499	3,35403	0,005180	0,001789	0,008265
x3 (L)	0,003904	0,001425	2,73907	0,016887	0,000825	0,006983
x3 (Q)	0,004673	0,001499	3,11814	0,008157	0,001436	0,007911

Onde: (x1): pH; (x3): concentração de substrato (farelo de arroz) em percentagem.

Tabela 5.11 - Análise de variância do modelo ajustado para a atividade de β -xilosidase no processo, utilizando o fungo *Pleurotus tailândia*.

	SQ	gl	MQ	F(cal)	F(tab)
Regressão	0,000682	3	0,000227	8,20	3,41
Resíduos	0,0,00036	13	0,000027		
total	0,001043	16			

OBS: Valores tabelados de F a $p \leq 0,05$.

SQ = soma quadrática

GL = grau de liberdade

MQ = média quadrática

Visto que:

$F_{cal} = 8,20 > F_{tab\ 0,95,3,13} = 3,41$ $R^2 = 0,65$

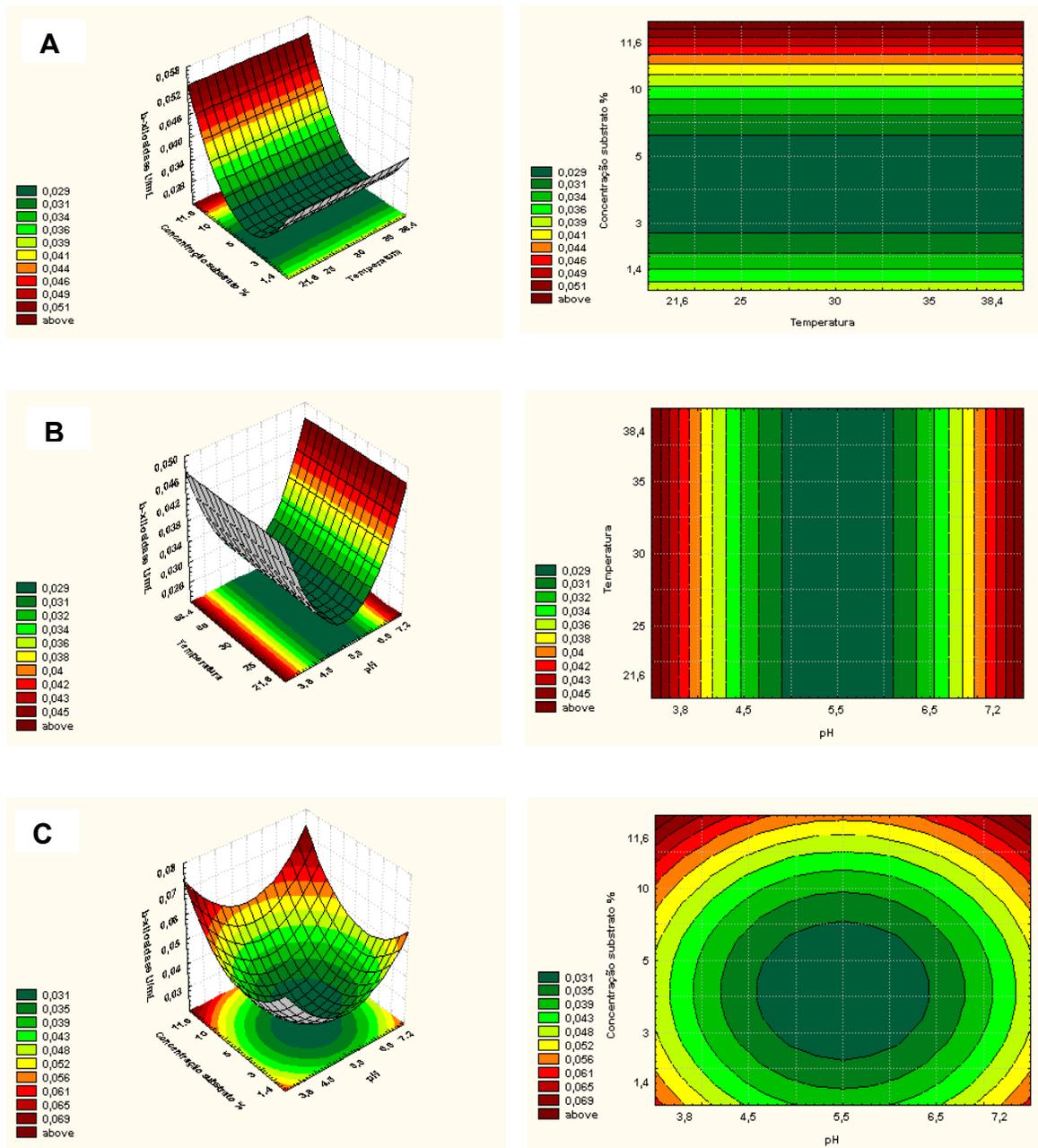


Figura 5.11 – Superfícies de resposta e curvas de contorno para atividade de β -xilidase U/mL em função da temperatura e concentração de substrato (A), temperatura e pH (B) e concentração de substrato e pH (C).

De acordo com a análise dos resultados (Tabelas 5.8 e 5.10), percebe-se que os parâmetros pH(L), e concentração de substrato(L) apresentaram valores de efeitos estimados (xilanase) e coeficientes de regressão (β -xilosidase) significativos. Os parâmetros significativos foram pH(L), concentração de substrato(L) e interação pH x temperatura, indicando que, um aumento em qualquer um desses fatores acarreta no aumento das atividades enzimáticas.

Eliminando-se os fatores não-significativos, obteve-se os coeficientes de regressão estatisticamente significativos para β -xilosidase, obtendo assim uma equação. Para a validação desta equação foi realizado o teste F utilizando 95% de confiança, na análise de variância. Na Tabelas 5.9 e 5.11, encontram-se os valores calculados e tabelados de F.

Para ambas, a regressão foi considerada estatisticamente significativa pois os modelos apresentaram o $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} (para xilanase $F_{\text{calculado}} 5,99 > F_{\text{tabelado}} 3,41$ e para β -xilosidase $F_{\text{calculado}} 8,20 > F_{\text{tabelado}} 3,41$).

O coeficiente de correlação (R^2) para o modelo ajustado foi de 0,58 para a atividade de xilanase e 0,65 para β -xilosidase, indicando que o modelo explicou em 58% e 65%, respectivamente, a variação dos dados observados. No caso do menor R^2 para a atividade de xilanase, provavelmente seja pela alta taxa de resíduos, provindos de erros nas amostragens. Porém levamos em consideração a reprodutibilidade para o modelo da atividade de β -xilosidase, utilizando os valores significativos do modelo para a otimização da atividade das enzimas.

O maior valor de atividade enzimática foi de 0,69 U/mL, com pH de 6,5, temperatura de 35°C e concentração de substrato de 10%. Este valor de atividade de xilanase foi bem maior que o valor obtido para a produção desta enzima em condições fixas estudadas anteriormente. Para β -xilosidase, a maior atividade enzimática foi de 0,046 U/mL, com pH de 3,8, temperatura de 30°C e concentração de substrato de 5%.

Para a linhagem *Pleurotus sp* BCCB068, o máximo de atividade enzimática foi de 0,4 U/mL, com pH de 5,5, temperatura de 21,6°C e concentração de substrato de 5% (ensaio 11). Este valor de atividade de xilanase foi 66,6% maior do que valor obtido para a produção desta enzima sob as condições fixas

estudadas anteriormente. Para β -xilosidase, a atividade aumenta com o aumento da concentração de substrato, com o pH entorno de 3,8. O máximo de atividade enzimática foi de 0,048 U/mL, com pH de 4,5, temperatura de 25 °C e concentração de substrato de 5% (ensaio 5).

Para a linhagem *Pleurotus tailandia* os resultados apontaram para as condições ótimas de atividade de xilanase corresponderam à 20°C, pH de 3,5 e concentração de substrato 11,6%. O maior valor de atividade enzimática foi de 0,69 U/mL, com pH de 6,5, temperatura de 35°C e concentração de substrato de 10% (ensaio 8). Este valor de atividade de xilanase foi bem maior que o valor obtido para a produção desta enzima em condições fixas estudadas anteriormente (rendimento de 300% a mais). Para β -xilosidase, a atividade aumenta com o aumento da concentração de substrato e com o pH entorno de 7,2 ou 3,8. O máximo de atividade enzimática foi de 0,046 U/mL, com pH de 3,8; temperatura de 30°C e concentração de substrato de 5% (ensaio 9).

Para os trabalhos seguintes de hidrólise em matriz de xilana, as condições de cultivo foram fixadas de acordo com os dados de otimização obtidos para os respectivos fungos, visando à obtenção de xilooligossacarídeos.

De acordo com os resultados obtidos no planejamento experimental, foi possível aumentar a atividade de xilanase e β -xilosidase nos ensaios para ambos os microrganismos estudados.

5.4 Hidrólise do material hemicelulósico e análise da degradação

5.4.1 Utilização de xilana como substrato fúngico sob fermentação submersa durante 40 dias de incubação

Para este experimento, foram utilizadas as linhagens selecionadas anteriormente (*Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailandia*), avaliando a degradação de xilana comercial, bem como os seus compostos formados.

5.4.1.1 Atividade enzimática e pH

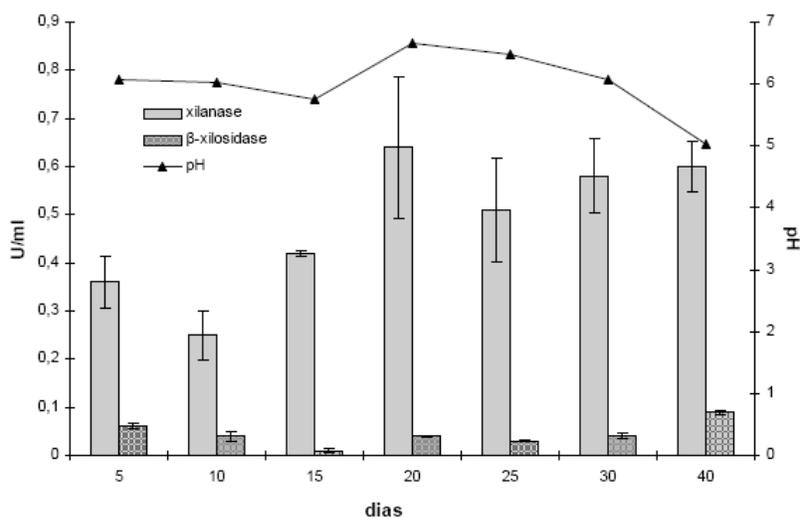


Figura 5.12- Atividades de xilanase, β -xilosidase e pH produzidos por *P. sp BCCB068* durante 40 dias sob fermentação submersa utilizando xilana como única fonte de carbono.

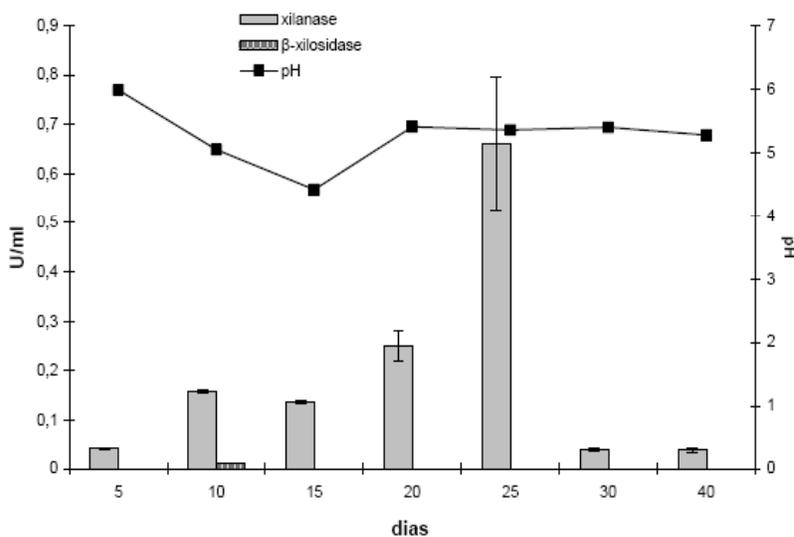


Figura 5.13- Atividades de xilanase, β -xilosidase e pH produzidos por *P. taiandia* durante 40 dias sob fermentação submersa utilizando xilana como única fonte de carbono.

Na Figura 5.12 a maior atividade de xilanase foi detectada no 20º dia e a de β -xilosidase no 40º. Os maiores valores de pH ocorreram no 20º dia e o menor no 40º dia de incubação. Na Figura 5.13 a maior atividade de xilanase foi detectada no 25º dia de incubação e a de β -xilosidase no 10º dia. Os maiores valores de pH foram verificadas 5º dia e o menor no 15º dia de incubação.

5.4.1.2 Análise da degradação de xilana e formação de compostos pelas linhagens fúngicas

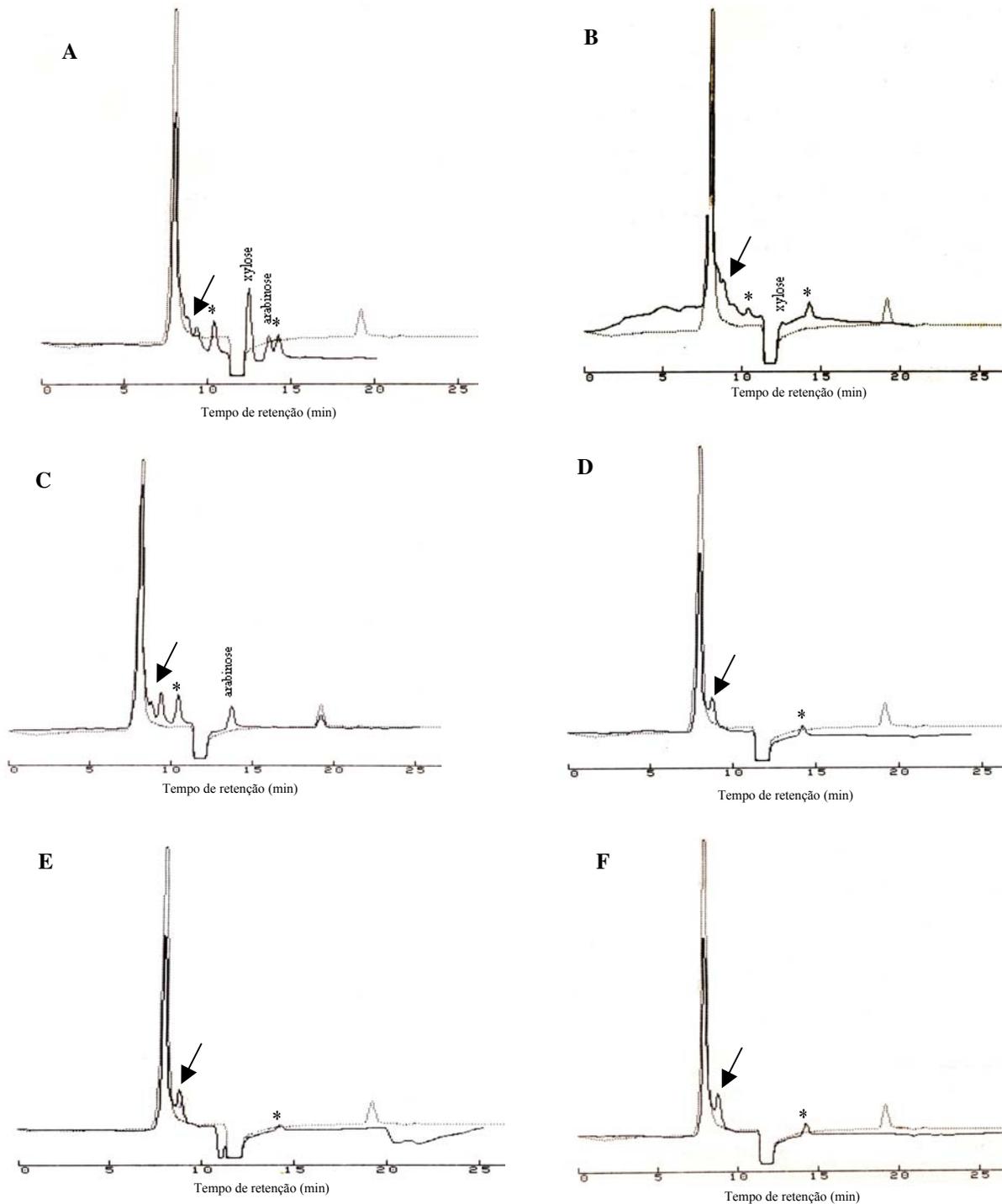


Figura 5.14- CLAE de *P. sp* BCCB068 cultivado em fermentação submersa para (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 25, (E) 30, (F) 40 dias, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle está apresentado como linha tracejada em todos os cromatogramas.

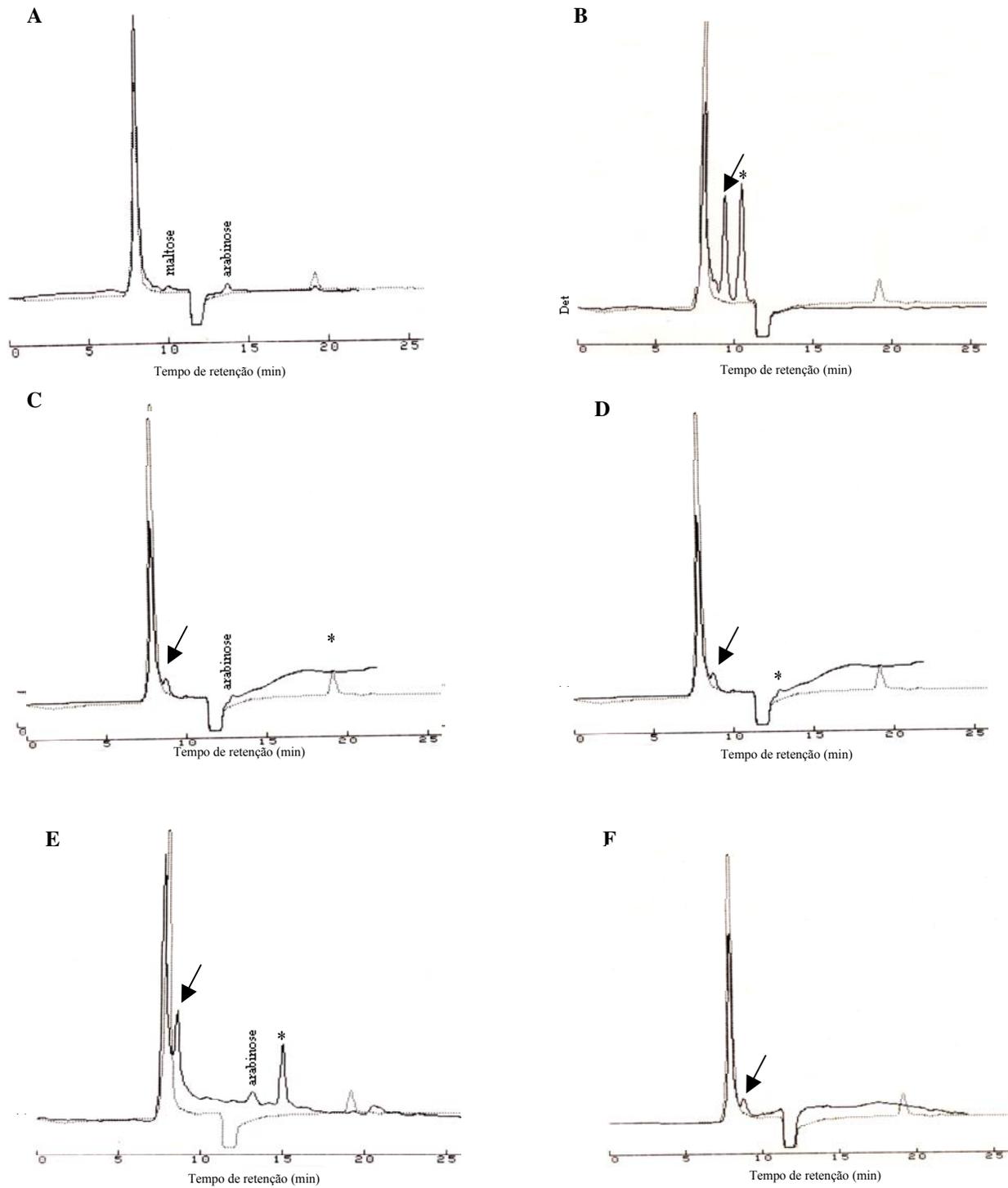


Figura 5.15- CLAE de *P. taiandia* cultivado em fermentação submersa para (A) 5, (B) 10, (C) 15, (D) 25, (E) 30, (F) 40 dias, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle está apresentado como linha tracejada em todos os cromatogramas.

Tabela 5.12- Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares por *P. sp* BCCB068 sob fermentação submersa.

Dias de Cultivo	5	10	15	20	25	30	40
% degradação de Xilana	70.1	55.0	42.8	75.1	72.7	66.9	67.2
Xilooligossacarídeos ^a	+	+++	++	+	+	+	+
Monômeros de açúcar	Arabinose ^c , Xilose ^d		Xilose ^d	Arabinose ^c , Xilose ^d		ND ^e	ND ^e
Metabólicos intermediários não identificados ^b	+	+++	++	+	+	++	++

^{a, b} Produção expressa em intensidade +/+/+/+ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{c, d} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^e não identificados

Tabela 5.13- Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares por *P. taiandia* sob fermentação submersa

Dias de Cultivo	5	10	15	20	25	30	40
% degradação de Xilana	ND ^g	65.0	70.2	73.6	56.2	58.4	61.2
Xilooligossacarídeos ^a	ND ^g	+++	++	+	++	+	+
Monômeros de açúcar	Arabinose ^c , Maltose ^d		Arabinose ^c , Xilose ^e	Arabinose ^c , Xilose ^e , Manose ^f		Manose ^f	Manose ^f
Metabólicos intermediários não identificados ^b	++	+	++	+	++	+++	+++

^{a, b} Produção expressa em intensidade +/+/+/+ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{c, d, e, f} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^g não identificados

A atividade de xilanase esteve presente praticamente em todo o período de cultivo, e as maiores atividades foram produzidas com 20°, 30° e 40° dias para a linhagem *P. sp* BCCB068: 0,64, 0,58 e 0,60 U/mL, respectivamente, como apresentado na Figura 5.14. Para a linhagem *P. tailandia*, a maior atividade de xilanase foi produzida no 20° dia (0,25 U/mL), contudo, valores muito baixos desta enzima foram mostrados durante este período. (Figura 5.15). Altas atividades de xilanase foram verificadas por GARZILLO et al. (1994) seguindo 16 dias de cultivo de *P. ostreatus*. Estudos conduzidos por SERMANNI et al. (1994) mostraram o efeito do crescimento de *P. ostreatus* 3004 e a digestibilidade em sabugo de milho com a produção de enzimas celulolíticas sob fermentação submersa, onde verificaram baixas atividades de xilanas. O sabugo de milho contém altos níveis de xilana (cerca de 33%), sendo muito utilizado como substrato para a produção de xilanas (QINNGHE et al. 2003). KALL et al. (1995) utilizaram compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos, incluindo peptona em condições otimizadas, obtendo significativo aumento da produção de xilanas pela linhagem *P. ostreatus*. Em nossos estudos, a xilana comercial foi utilizada como única fonte de carbono, sem nenhuma outra fonte nitrogenada de substrato, onde se obteve valores baixos de atividade enzimática em relação aos trabalhos destes autores, devido ao intuito de somente utilizar a atividade enzimática como parâmetro para a degradação da xilana. A atividade de β -xilosidase foi detectada desde o 5° dia de incubação, com a presença de monômeros provindos da degradação dos XOS, com valores entre 0,01 e 0,09 U/mL, com a melhor atividade produzida no 40 ° dia, conforme apresentado na figura 5.14.

Analisando os valores de pH, a linhagem *P. sp* BCCB068 apresentou uma variação de 5,03 a 6,66, e o fungo *P. tailândia*, de 4,42 a 5,99. Alguns estudos conduzidos por QINNGHE et al. (2003) demonstraram que *P. ostreatus* produziu alta atividade de xilanase em pH 5,4 com grande crescimento micelial para o mesmo fungo em pH 5,0 (FURLAN et al. 1997). Neste presente trabalho, os sobrenadantes de *P. tailândia* apresentaram maior atividade de xilanase (0,25 U/mL) em pH 5,41 com a presença de degradação da xilana (20° dia, tabela 5.13 e figura 5.15). Neste mesmo período, o fungo *P. sp* BCCB068 apresentou a maior taxa de degradação de xilana e a maior atividade de xilanase (0,64 U/mL) em pH

6,66 (Tabela 5.12 e Figura 5.14). BURLA et al. (1992) demonstraram uma alta produção de biomassa pela linhagem *P. ostreatus* com pH 6,0, utilizando meio basal suplementado com 0,2% de óleo de girassol e aveia, e estudos conduzidos por BAJPAI (1997) mostraram que este fungo produziu xilanases na faixa de pH entre 5,0 e 6,5.

A atividade de xilanase para *P. thailandia* foi menor do que a apresentada pelo *P. sp* BCCB068, mostrando baixos níveis de enzima no 5° dia (onde não foi detectada degradação de xilana), e nos 25, 30 e 40° dias de incubação, onde foram detectadas menores taxas degradativas de xilana (Tabela 5.13). Porém, a maior atividade de xilanase foi mostrada no 20° dia, acompanhada de altos níveis de degradação de xilana para este fungo (Tabela 5.13). O fungo *P. thailandia* não apresentou atividade para β -xilosidase, exceto no 10° dia (0,01 U/mL ; Figura 5.15). IEMBO et al. (2005) trabalharam com o fungo termófilo *Humicola grisea* sob condições otimizadas e encontrou valores consideráveis (12,98 U/mL) quando utilizou xilana comercial como fonte de carbono. O fungo *Streptomyces sp* CH7 após crescimento em xilana como substrato também apresentou alta quantidade de β -xilosidase: 26,3 e 6,6 U/mg de proteínas (PINPHANICHAKARN et al. 2004). Ambos os estudos realizados por estes autores mostraram a estabilidade desta enzima entre pH 6 e 9.

No geral, os fungos estudados foram capazes de hidrolisar a xilana e formar açúcares monômeros (xilose, arabinose, frutose, manose, frutose e outros não identificados), e oligossacarídeos como os indicados nas Tabelas 5.12 e 5.13. A linhagem *P. sp* BCCB068 mostrou considerável degradação de xilana já no 5° dia (70,1%), com a subsequente formação de monômeros e oligossacarídeos. A maior taxa de degradação foi detectada no 20° dia (75,1%), juntamente com a maior atividade de xilanase. Os monômeros de açúcares formados decresceram somente após o 15° dia, onde ocorreu a possível absorção destes através do metabolismo. Arabinose e xilose foram identificados como produtos da degradação de *P. sp* BCCB068, através da comparação destes com padrões de carboidratos (dados não mostrados). Em 10 dias de incubação verificou-se o pico característico de xilose e ausência de arabinose. Contudo, estes monômeros

foram crescendo em quantidade até o 15° dia devido a quebra dos XOS previamente formados. Após este período foi verificado o consumo destes produtos, porém após o 30° dia, novos produtos foram formados. Em relação ao pico padrão de xilana indicado na Figura 5.15, possivelmente seja pela formação de metabólicos intermediários com o mesmo tempo de retenção da xilana, entretanto, estes produtos de degradação também foram usados pelo fungo para crescimento e manutenção de seu metabolismo.

Para os resultados obtidos pela linhagem *Pleurotus tailandia*, somente no 5° dia que não apresentou hidrólise da xilana (Figura 5.15), porém, ocorreu significativa degradação nos dias seguintes. Alta taxa de degradação de xilana foram detectadas no 10° dia (Tabela 5.13), onde os XOS também foram formados, com gradual diminuição destes compostos após o 25° dia. Neste período ocorreu uma nova produção de oligossacarídeos e monômeros de açúcar, principalmente no 40° dia (Figura 5.15). Os monômeros de açúcar foram produzidos através da quebra dos xilooligossacarídeos e alguns compostos formados da degradação da xilana ficaram no mesmo tempo de retenção da xilana no cromatograma, causando uma sobreposição de picos, indicando um falso resultado para o pico padrão de xilana.

De acordo com os dados apresentados nos cromatogramas, ocorreu uma concomitante degradação da xilana e xilooligossacarídeos, com a assimilação de açúcares e outros produtos, mostrando a ação enzimática de xilanases e outras enzimas hidrolíticas sobre a fonte complexa de carbono. Estudos conduzidos por COTTA e ZELTWAGNER (1995), mostraram o uso de xilana como substrato para *B. fibrisolvens*, degradando cerca de 75% desta, com a produção de ácido-alcoois solúveis, e estes produtos foram utilizados por *B. ruminantum* para produção de XOS. Os produtos desta degradação geraram uma mistura de metabólicos intermediários de baixo peso molecular contendo vários compostos com diferentes níveis de polimerização (ex: xilose, arabinose e ácidos urônicos) de acordo com HESPELL e COTTA (1995). Os produtos provindos de hidrólise ácida de xilana formaram uma variedade de misturas de XOS, dependendo de uma série de enzimas xilanolíticas presentes no meio, e a degradação destes XOS produzidos

por xilanases foi melhor metabolizado que os de procedimentos de hidrólise ácida (COTTA e ZELTWAGNER, 1995).

Os fungos *P. sp* BCCB068 e *P. tailandia* foram capazes de degradar xilana em até 75% produzindo xilooligossacarídeos e vários monômeros de açúcar. Estes resultados mostram a promissora aplicabilidade em resíduos com alta concentração de hemicelulose que quando pré-delignificado constituem matrizes viáveis para a produção de oligossacarídeos. Porém, estudos complementares podem ser necessários para otimizar o processo de degradação e produção enzimática, onde estes fungos mostram grande potencial para futuros processos biotecnológicos.

5.4.2 Utilização dos hidrolisados selecionados em matriz celulósica e em xilana

5.4.2.1 Utilização dos hidrolisados em matriz de xilana

Para as degradações subseqüentes, foram utilizados os complexos enzimáticos provindos das fermentações das 2 linhagens escolhidas anteriormente, (*P. sp* BCCB068 e *P. Tailândia*), crescimento em farelo de arroz como fonte de carbono para a produção das enzimas lignocelulolíticas (10 dias de incubação). O perfil enzimático das linhagens pode ser verificado, de acordo com a Tabela 5.14:

Tabela 5.14- Perfil enzimático das linhagens *P. sp* BCCB068 e *P. tailandia* cultivados sob fermentação submersa utilizando farelo de arroz como única fonte de carbono durante 10 dias. (ND* – não detectado).

Enzima	<i>P. sp</i> BCCB068	<i>P. tailandia</i>
Avicelase	0,09 U/mL	0,05 U/mL
Carboximetilcelulase	0,07 U/mL	0,08 U/mL
β -glicosidase	0,62 U/mL	ND*
Lacase	1,60 U/L	2,37 U/L
Manganês Peroxidase	16,32 U/L	14,43 U/L
Xilanase	0,40 U/mL	0,69 U/mL
β -xilosidase	0,04 U/mL	0,04 U/mL

5.4.2.2 Análise da degradação da matriz de xilana e formação de compostos pelo complexo enzimático dos hidrolisados

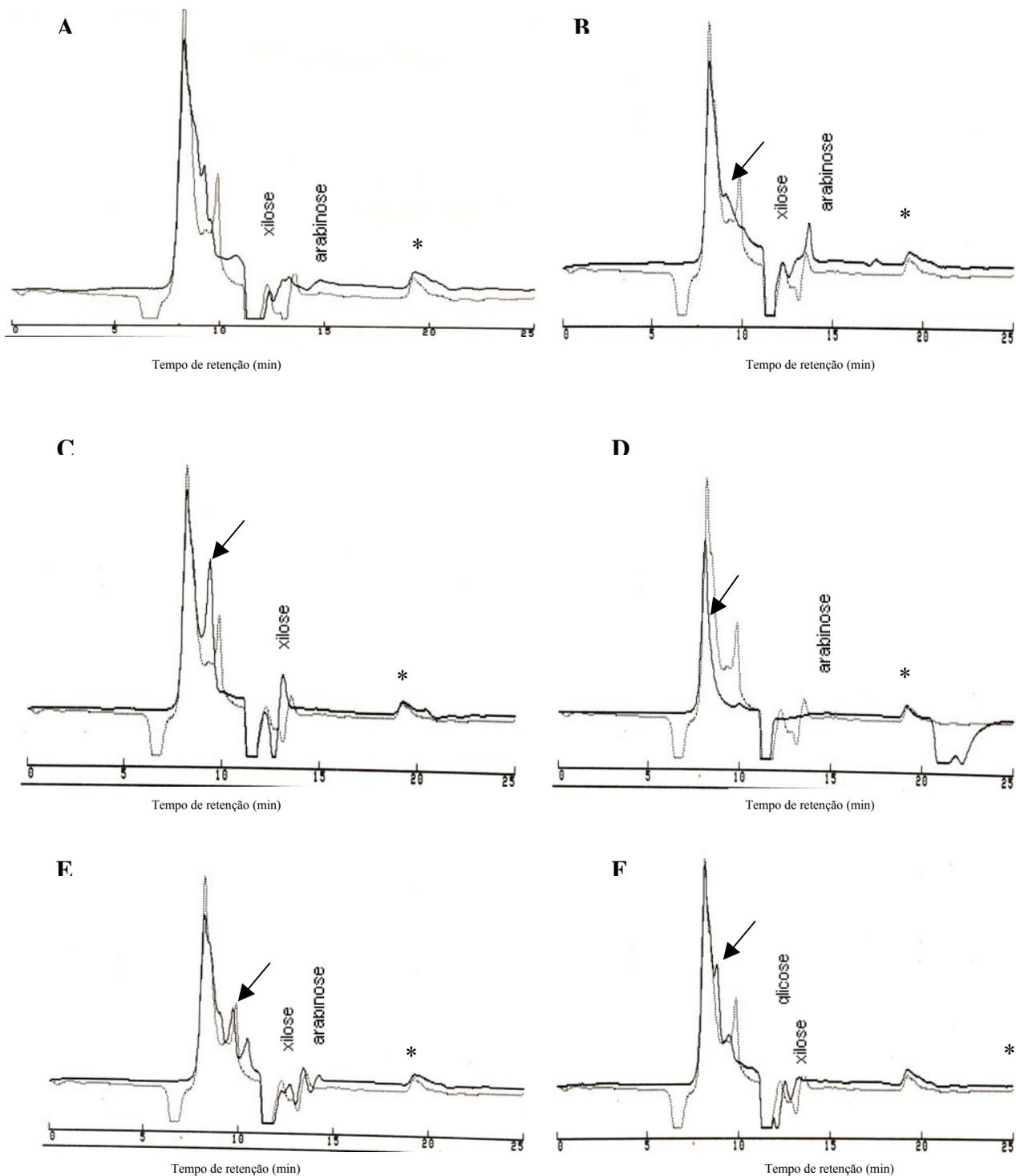


Figura 5.16- CLAE de *P.sp* BCCB068 hidrolisando matriz de xilana para (A) 5, (B) 20, (C) 25, (D) 30, (E) 40, (F) 50 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligosacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle está apresentado como linha tracejada em todos os cromatogramas.

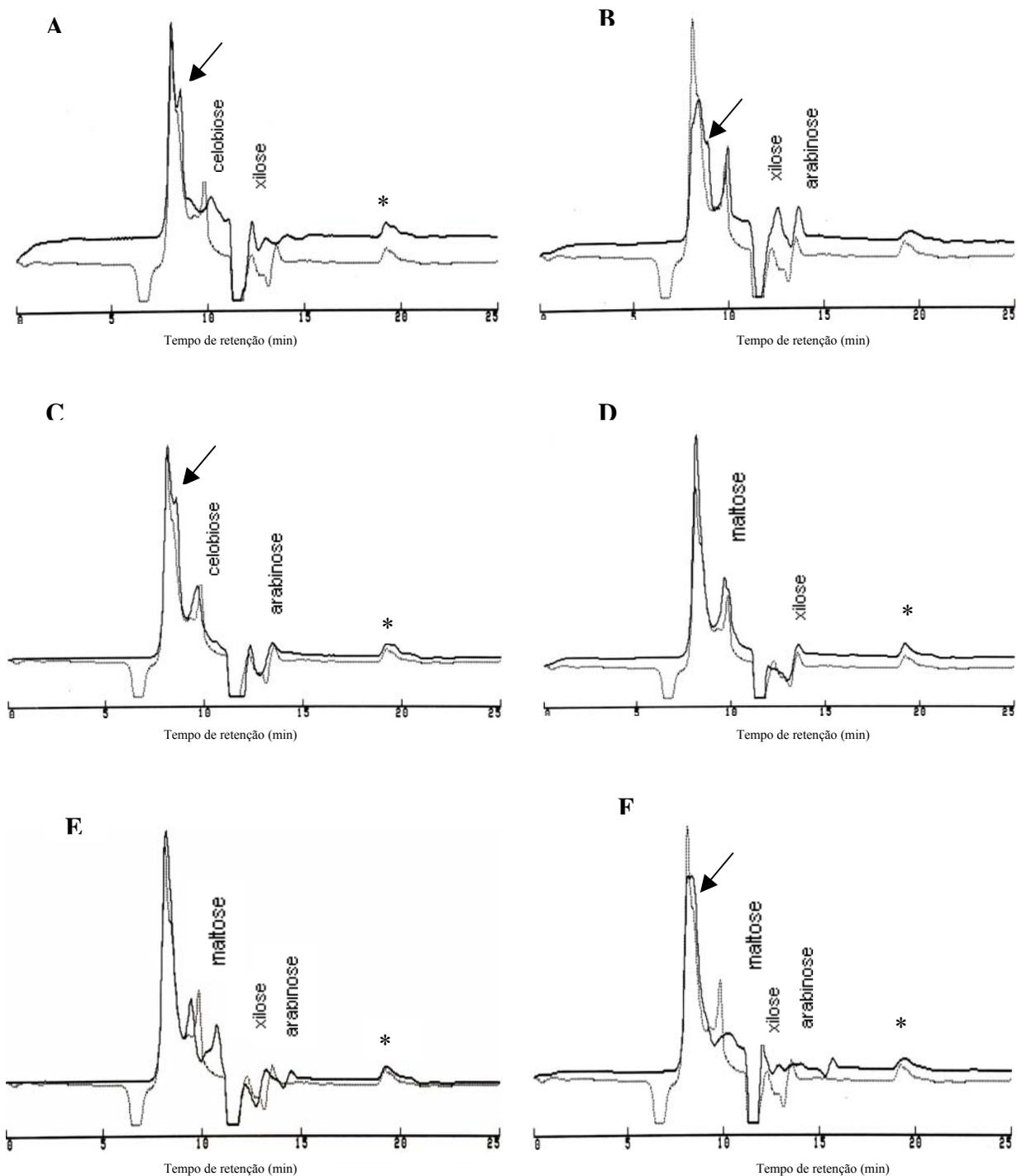


Figura 5.17- CLAE de *P. taiandia* hidrolisando matriz de xilana para (A) 5, (B) 15, (C) 30, (D) 40, (E) 50, (F) 60 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, xilooligosacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle está apresentada como linha tracejada em todos os cromatogramas.

Tabela 5.15- Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por *P. sp* BCCB068 no período de 60 minutos.

Minutos de reação	5	10	15	20	25	30	40	50	60
% degradação de Xilana	0%	0%	0%	14,9%	45,9%	6,64%	29,75%	53%	0%
XOS ^a				+++	++	+++	+	++	
Monômeros de açúcar	Xilose ^b , arabinose ^c	Xilose ^b , maltose ^d	Arabinose ^c , xilose ^b	Xilose ^b , arabinose ^c	Xilose ^b , arabinose ^c , celobiose ^e	Arabinose ^c , maltose ^d	Xilose ^b , frutose ^f , arabinose ^c	Glicose ^g , xilose ^b , arabinose ^c	Celobiose ^e , glicose ^g , xilose ^b , frutose ^f , arabinose ^c
Metabólicos intermediários não identificados ^h			++	+	+++			++	

^a Produção expressa em intensidade +/+/+/+ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{bcddefg} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^h não identificados

Tabela 5.16- Degradação de xilana, produção de xilooligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por *P. taiandia* no período de 60 minutos.

Minutos de reação	5	10	15	20	25	30	40	50	60
% degradação de Xilana	21,4%	0%	48,7%	0%	0%	54,59%	0%	55,81%	66,4%
XOS ^a	+++		+	+++	++	+++			++
Monômeros de açúcar	Xilose ^b , arabinose ^c , frutose ^d , maltose ^e	Xilose ^b , maltose ^e , celobiose ^f , frutose ^d , arabinose ^c	Arabinose ^c , xilose ^b , maltose ^e	Xilose ^b , arabinose ^c , celobiose ^f , maltose ^e	Xilose ^b , arabinose ^c , celobiose ^f , maltose ^e , glicose ^g	Arabinose ^c , maltose ^e , celobiose ^f , xilose ^b	Xilose ^b , frutose ^d , arabinose ^c , glicose ^g	Celobios ^f , xilose ^b , arabinose ^c	Maltose ^e , Glicose ^g , xilose ^b , frutose ^d , arabinose ^c
Metabólicos intermediários não identificados ^b	+++	++	+	+++	+	++	+++	+	+++

^a Produção expressa em intensidade +/+/+/+ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{bcddefg} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^h não identificados

Para a linhagem *P. thailandia*, a degradação iniciou no 5° minuto de reação, com 21,4% de degradação detectada (Tabela 5.13 e Figura 5.17). Estes valores aumentaram no 15° minuto, elevando a taxa degradativa para 48,7%, sendo que no 30° minuto de reação alcançou 54,59%. Nos 50 e 60° minutos, a reação alcançou avançado estágio de degradação com 55,81% e 66,4% respectivamente. Nos tempos 10, 20, 25 e 40 minutos ocorreu a formação de compostos intermediários que sobrepueram o pico padrão de xilana, impossibilitando assim a análise da taxa degradativa de xilana utilizada. Em relação aos compostos formados, ocorreram durante todo o processo hidrolítico a formação de compostos provindos da degradação da xilana, identificados como xilooligossacarídeos, assim como monômeros de açúcares derivados, como frutose, maltose, xilose, arabinose e celobiose (Tabela 5.16). A maior formação de XOS foi detectada logo no 5° minuto de hidrólise, formando dois compostos de diferentes cadeias, estes já desaparecem rapidamente no 10° minuto, reaparecendo no 15° e 20° minutos, tornando a desaparecer no 25° e reaparecendo com 30 e 60 minutos. Uma série de açúcares monômeros identificados e não identificados surgiram no decorrer dos 60 minutos de reação. Compostos como arabinose surgiram no 10° minuto, mantendo-se em quantidade até o 30° minuto, onde sua concentração aumentou significativamente até os 60 minutos. Estas concentrações oscilaram em decorrência da gradativa quebra da xilana e derivados, pelo complexo enzimático que atuou durante todo o processo. O mesmo ocorreu com a xilose que é também um produto da quebra dos XOS, e que esteve presente em praticamente todos os períodos de tempo da análise.

Para a linhagem *P. sp* BCCB068, a degradação da matriz de xilana iniciou somente no 20° minuto com uma taxa de 14,9% de degradação (Tabela 5.15 e Figura 5.16), onde aumentou significativamente no 25° minuto (45,9%), já no 30° minuto ocorreu sobreposição dos picos de xilana com os compostos formados com tempo de retenção próximos, não podendo ser realizado o cálculo de degradação. O mesmo ocorreu no 40° minuto. Com 50 minutos a degradação de xilana atingiu 53% (a maior degradação em todo o processo). A produção de xilooligossacarídeos iniciou no 20° minuto e estendeu-se até o 50° minuto.

Detectou-se também a formação de arabinose no 20° até o 60° minuto, o mesmo ocorrendo com a xilose. Outros compostos também foram formados, como a frutose, glicose e celobiose no decorrer da hidrólise nos 60 minutos de reação (Tabela 5.15).

Deste modo, ambos os hidrolisados degradaram a matriz de xilana, com as maiores taxas no 20° minuto para *Pleurotus sp* BCCB068 com 45,9% e *Pleurotus thailandia* com 53% no 50° minuto. CARVALHEIRO et al. (2004), obteve um índice degradativo parecido utilizando a hemicelulose de resíduos de cerveja como fonte degradativa. Em seu experimento, a degradação de hemicelulose foi de 61% através de autohidrólise, com a temperatura de 190°C após cinco minutos de reação produzindo xilooligossacarídeos.

A biodegradação de xilana depende basicamente de 2 classes de enzimas. As endoxilanases que são aptas para clivar a xilana formando os XOS, podendo ser degradados a xilose através das β -xilosidases. Ambas as classes de enzimas podem ser formadas por muitos microrganismos (VRIES e VISSER, 2001).

A formação de xilooligossacarídeos foi detectada também para ambos os ensaios realizados. A hidrólise de gliculoxilanas por endoxilanases provindas de fungos como *A. niger* resultam principalmente em xilobiose, xilotriose e xilose, onde a hidrólise de arabinoxilanas resultam principalmente em oligossacarídeos de cadeia curta (graus de polimerização abaixo de 3) e as β -xilosidases são altamente específicas para a degradação de xilooligossacarídeos abaixo de 4 graus de polimerização, de acordo com VRIES e VISSER (2001).

5.4.2.3 Análise da degradação de matriz de celulose e formação de compostos pelo complexo enzimático dos hidrolisados

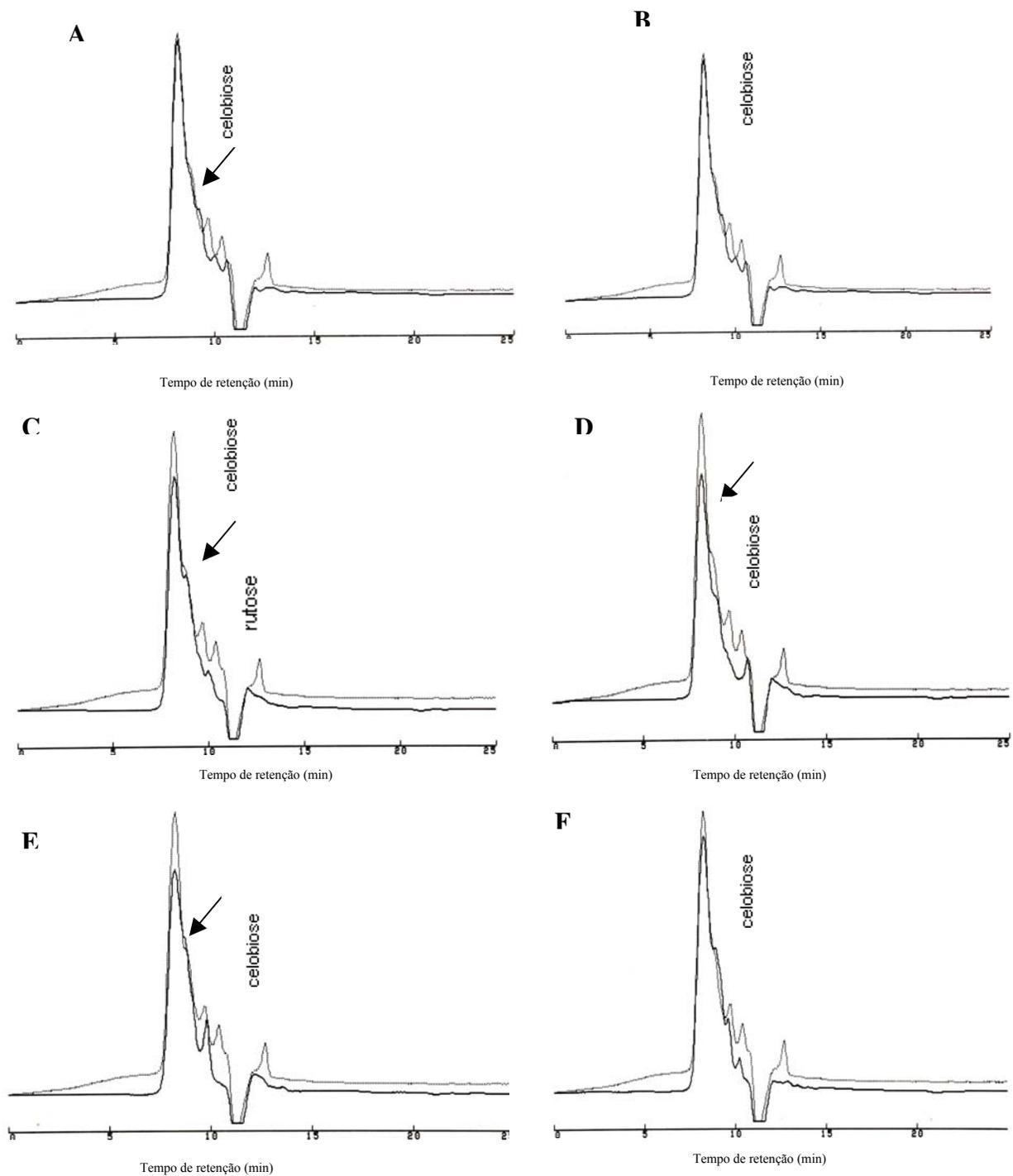


Figura 5.18- CLAE de *P. sp* BCCB068, hidrolisando matriz de CMC para (A) 5, (B) 20, (C) 25, (D) 30, (E) 40, (F) 60 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, oligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle está apresentado como linha tracejada em todos os cromatogramas.

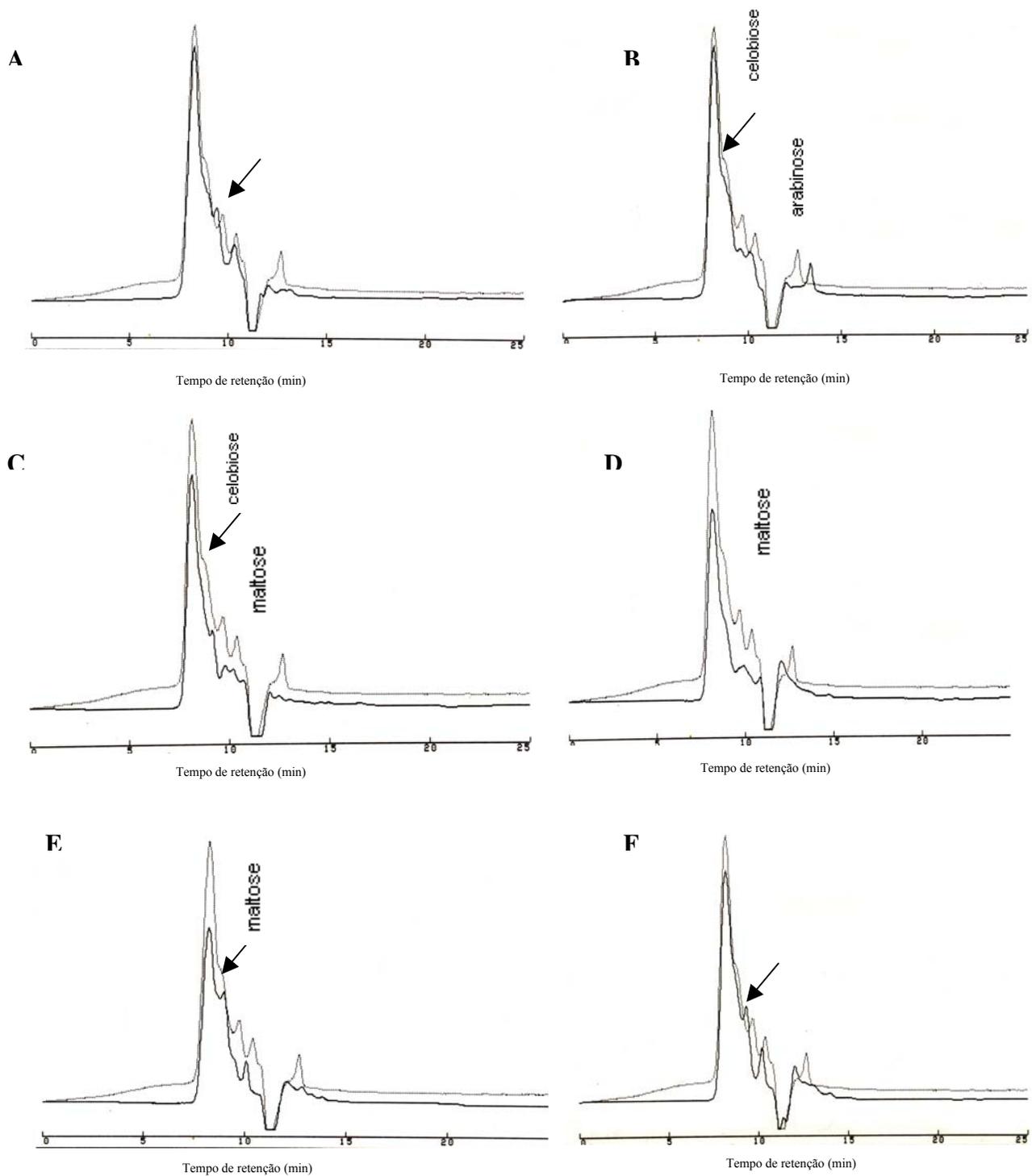


Figura 5.19- CLAE de *P. taiandia* hidrolisando matriz de CMC para (A) 5, (B) 15, (C) 20, (D) 30, (E) 40, (F) 50 minutos, respectivamente, indicando a presença de monômeros de açúcar, oligossacarídeos (seta) e outros não identificados açúcares ou produtos (*). O controle esta apresentado como linha tracejada em todos os cromatogramas.

Tabela 5.17- Degradação de CMC, produção de oligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por *P. sp* BCCB068 no período de 60 minutos.

Minutos de reação	5	10	15	20	25	30	40	50	60
% degradação de CMC	53%	0%	0%	6,25%	39,46%	50,08%	0%	54,83%	25,90%
Oligossacarídeos ^a	+++ Glicose ^b , frutose ^c , celobiose ^d	Maltose ^e	Maltose ^e	Celobiose ^d	Celobiose ^d , frutose ^c	Celobiose ^d	+++	Celobiose ^d , maltose ^e , frutose ^c	Celobiose ^d , xilose ^f , arabinose ^g
Monômeros de açúcar Metabólicos intermediários não identificados ^h	++	+	++	+++	+++	+	+	+	+

^a Produção expressa em intensidade +/++/+++ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{bcd,efg} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^h não identificados

Tabela 5.18- Degradação de CMC, produção de Oligossacarídeos e monômeros de açúcares do hidrolisado por *P. thailandia* no período de 60 minutos.

Minutos de reação	5	10	15	20	25	30	40	50	60
% degradação de CMC	22,9%	0%	23,23%	47,7%	29,57%	47,21%	59,9%	29,23%	39,91%
Oligossacarídeos ^a	++	++	+	+	+++	++	+++	+	+
Monômeros de açúcar Metabólicos intermediários não identificados ^b	+++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++

^a Produção expressa em intensidade +/++/+++ através da comparação das áreas dos picos nos cromatogramas

^{b,cd,e} Monômeros de açúcar identificados em comparação com os tempos de retenção dos carboidratos padrões dos cromatogramas previamente testados

^f não identificados

Para o fungo *P. sp* BCCB068, foi detectada a degradação da matriz de CMC (carboximetilcelulose) no 5° minuto de hidrólise, com uma elevada percentagem de degradação de 53% (Tabela 5.17, Figura 5.18). Estes níveis se repetiram no 30° minuto com 50,08% e no 50° minuto com a maior entre todas (54,83%). Os tempos 10, 15 e 20 minutos apresentaram sobreposição de picos, devido a produtos formados possuírem o tempo de retenção muito próximo ao do pico padrão de CMC, inviabilizando assim, a leitura da degradação. Com os produtos de degradação da CMC, formaram-se compostos oligossacarídicos, como também compostos monômeros identificados como celobiose, maltose e frutose, e vários compostos não identificados no experimento. A formação dos oligossacarídeos começou desde o 5° minuto, reaparecendo no 25°, 30° e 50° minuto.

Na hidrólise com *P. tailândia*, a degradação iniciou no 5° minuto com 22,9% de degradação da CMC, este índice foi para 23,23% no 15° minuto; para 47,9% no 20° minuto e 47,21% no 30° minuto, chegando a 60% no 40° minuto (Tabela 5.18 e Figura 5.19). A partir deste tempo, a taxa de degradação caiu devido à sobreposição de picos com tempo de retenção próximos ao do padrão de CMC. Foi detectado no decorrer dos tempos de reação, a formação de oligossacarídeos, assim como, a formação de monômeros de açúcar, sendo alguns identificados (celobiose, arabinose, maltose e xilose) e outros muitos não foram identificados. Os oligossacarídeos foram formados já no 5° minuto e estendeu-se até o final dos tempos de reação. Dos monômeros identificados, destaca-se a celobiose com grande quantidade no 15° minuto e maltose no 25°.

Basicamente, 3 classes de enzimas estão envolvidas na biodegradação de celulose. As endoglucanases, que hidrolizam celulose em glucooligossacarídeos. As celobiohidrolases, que liberam celobiose de celulose microcristalina. As β-glicosidases, que degradam os oligossacarídeos em glicose. Todas estas classes de enzimas tem sido frequentemente identificadas na maioria das espécies de fungos (SINGH et al. 1996). Tanto o hidrolisado da linhagem *Pleurotus tailândia* quanto o *Pleurotus sp* BCCB068 promoveram a degradação da matriz de carboximetilcelulose, onde ambas possuíam um complexo enzimático com as

principais enzimas degradativas determinadas (Tabela 5.14). Os hidrolisados com a maior taxa degradativa situaram-se no tempo de 50 minutos para *Pleurotus sp* BCCB068 (54,83% de degradação) e de 30 minutos para *Pleurotus tailandia* com 60% de degradação. Trabalhos conduzidos por SIEGER et al. (1995), utilizaram a linhagem *Agrobacterium sp* para degradar carboximetilcelulose, onde obteve oligômeros de CMC de diversos graus de polimerização, e formando também compostos como glicose e celobiose.

De acordo com os resultados obtidos nas degradações das matrizes de xilana e carboximetilcelulose, foram escolhidas 6 amostras para os testes seguintes de atividade prebiótica. A escolha foi baseada nas determinações de compostos oligossacarídicos obtidos nos cromatogramas. As amostras escolhidas foram:

- 3- Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação)**
- 4- Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação)**
- 5- Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação)**
- 6- Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação)**
- 7- *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias)**
- 8- *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias)**

Foram realizados testes preliminares com estes hidrolisados, aplicando-os para degradar os resíduos agroindustriais bagaço de cana e sabugo de milho, porém, não foram obtidos resultados positivos referentes à hidrólise destes compostos (dados não mostrados). Estudos anteriores no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (FEA-UNICAMP) apontaram experimentos com tempo de incubação maior que 40 dias, neste modelo de matriz, devido à dificuldade das estruturas altamente lignificadas existentes em cada resíduo.

5.4 Investigação “in vitro” dos efeitos dos compostos prébióticos em microrganismos Probióticos e sua ação sobre os Patógenos Seleccionados da Flora Intestinal Humana

5.4.1 Curvas de Crescimento – Culturas probióticas

5.4.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

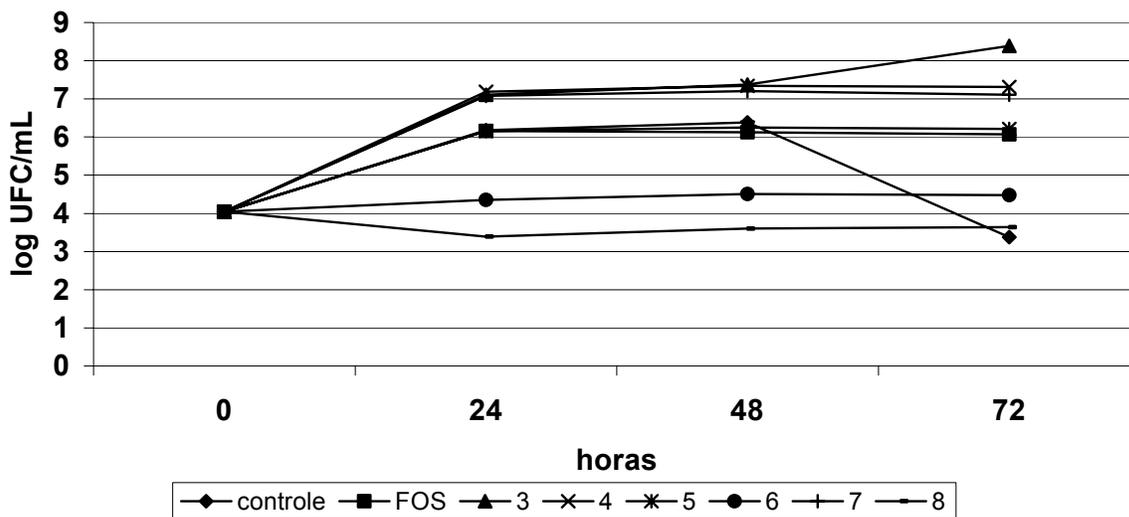


Figura 5.20- Crescimento da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.19 - Crescimento da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão
C. inicial	4,04 ^e	0,04	4,04 ^a	0,04	4,04 ^a	0,04
Controle	6,18 ^a	0,02	6,38 ^b	0,02	3,38 ^b	0,02
FOS	6,16 ^a	0,03	6,13 ^c	0,03	6,07 ^c	0,02
3	7,11 ^b	0,03	7,37 ^d	0,03	8,39 ^d	0,01
4	7,19 ^b	0,03	7,34 ^d	0,03	7,31 ^e	0,01
5	6,16 ^a	0,06	6,25 ^e	0,06	6,21 ^f	0,02
6	4,35 ^c	0,03	4,51 ^f	0,01	4,48 ^g	0,01
7	7,08 ^b	0,05	7,2 ^g	0,05	7,11 ^h	0,03
8	3,39 ^d	0,03	3,6 ^h	0,03	3,64 ⁱ	0,005

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

Os resultados apresentados na Figura 5.20 e Tabela 5.19, demonstrou o crescimento da cultura de *Lactobacillus acidophilus*, durante o período de 72 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

Para o estudo do crescimento em 24 horas, os resultados demonstraram que todos os tratamentos diferiram significativamente do controle, inclusive o crescimento com os FOS, com crescimentos maiores estatisticamente, com exceção da amostra 8 (3,39 UFC/mL) que apresentou um valor abaixo do controle (4,04 UFC/mL) e a amostra 5 que não diferiu estatisticamente dos FOS. Dentre as amostras com crescimentos maiores, destacam-se a número 3, 4 e 7 com os maiores crescimentos (7,11; 7,19 e 7,08 UFC/mL, respectivamente).

No estudo em 48 horas, os tratamentos 3, 4 e 7 cresceram significativamente em relação ao padrão de FOS, com 7,37, 7,34 e 7,20 UFC/mL respectivamente. As amostras 5, 6 e 8 apresentaram resultados abaixo dos FOS e controle, com 6,25; 4,51 e 3,60 UFC/mL, respectivamente. Os maiores crescimentos foram reportados pelas amostras 3 e 4 .

Em 72 horas, todos os tratamentos e o padrão de FOS foram maiores que a contagem inicial e o controle, sendo que as amostras 3, 4, 5 e 7 apresentaram crescimento maior que o padrão de FOS com 8,39; 7,31; 6,21 e 7,11 UFC/mL respectivamente. A amostra 6, mesmo tendo crescimento menor que o padrão de FOS, mostrou crescimento maior que a contagem inicial e controle, já a amostra 8 não demonstrou crescimento significativo novamente. As maiores taxas de crescimento da cultura *L. Acidophilus* foi apresentado pela amostra 3 com 8,39 UFC/mL, sendo este o maior valor alcançado em todo o experimento com esta linhagem.

5.4.1.2 *Lactobacillus plantarum*

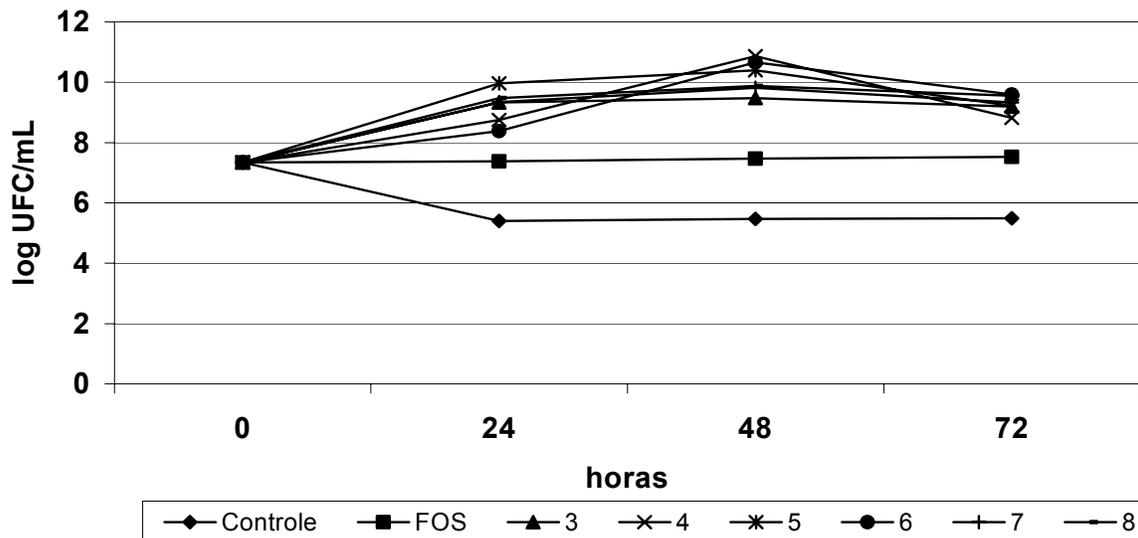


Figura 5.21- Crescimento da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.20 - Crescimento da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	LogUFC/mL Média	Desvio padrão	LogUFC/mL Média	Desvio padrão	LogUFC/mL Média	Desvio padrão
C. inicial	7,34 ^b	0,02	7,34 ^{ab}	0,02	7,34 ^b	0,02
Controle	5,40 ^a	0,06	5,49 ^a	0,02	5,49 ^a	0,01
FOS	7,38 ^b	0,04	6,81 ^{ab}	0,05	7,53 ^b	0,03
3	9,33 ^c	0,11	8,77 ^{bc}	0,10	9,19 ^c	0,15
4	8,75 ^{cd}	0,04	10,41 ^c	0,01	8,82 ^d	0,01
5	9,96 ^{ce}	0,77	10,39 ^c	0,03	9,22 ^c	0,16
6	8,38 ^f	0,04	10,65 ^c	0,04	9,59 ^e	0,05
7	9,34 ^{cde}	0,04	9,88 ^c	0,76	9,33 ^{ce}	0,02
8	9,47 ^{cde}	0,05	9,88 ^c	0,61	9,55 ^e	0,03

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

Figura 5.21 e Tabela 5.20 demonstram o crescimento da cultura de *Lactobacillus plantarum*, durante o período de 72 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

Na contagem com 24 horas de crescimento, o padrão de FOS não diferenciou-se significativamente da contagem inicial, porém todos os tratamentos estimularam o crescimento da cultura probiótica significativamente, com destaque para os tratamentos 3, 5, 7 e 8.

Para o crescimento em 48 horas, novamente o padrão com FOS não diferiu significativamente da contagem inicial, assim como a amostra 3. Porém os tratamentos 4,5,6,7 e 8 promoveram uma estimulação positiva no crescimento da cultura probiótica em relação à contagem inicial, com 10,41; 10,39; 10,65; 9,88 e 9,88 UFC/mL, respectivamente.

Com 72 horas de crescimento, os FOS não estimularam significativamente a cultura probiótica em relação à sua contagem inicial. Todos os tratamentos testados demonstraram estimulação de crescimento significativo tanto em relação ao controle, à contagem inicial de colônias e também para os FOS.

Deste modo, o experimento com *L. plantarum* mostrou que os tratamentos com os hidrolisados obtidos anteriormente, foram capazes de estimular prebioticamente esta cultura, em praticamente todos os tempos de análise, e com considerável desempenho frente ao padrão de FOS.

5.4.1.3 *Bifidobacterium bifidum*

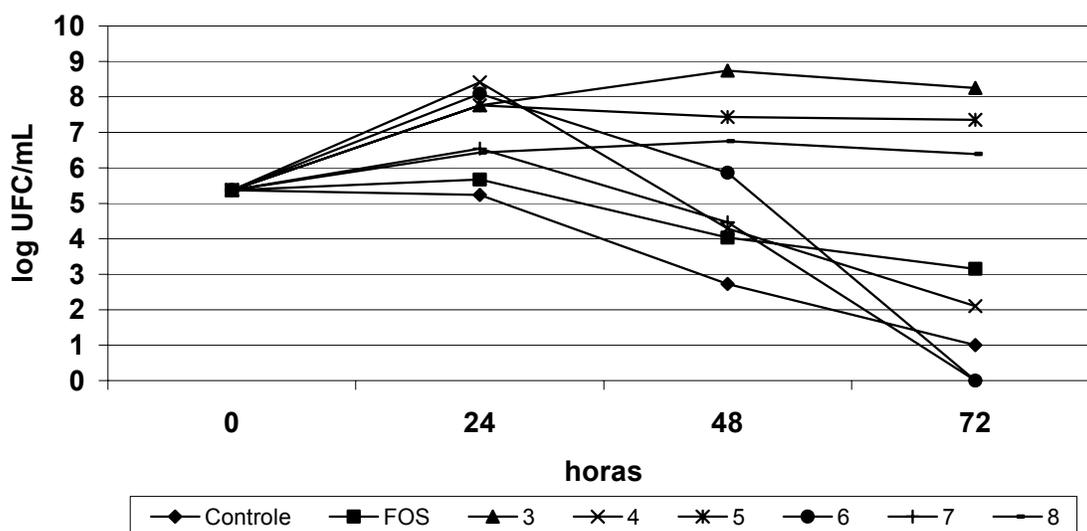


Figura 5.22- Crescimento da cultura *B. bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, sob condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.21 - Crescimento da cultura *B. Bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão
C. inicial	5,37 ^{ab}	0,07	5,37 ^a	0,07	5,37 ^{de}	0,07
Controle	5,24 ^a	1,69	4,40 ^a	0,51	1,00 ^a	0,005
FOS	5,67 ^{ab}	0,57	4,03 ^a	0,03	3,15 ^b	0,27
3	7,76 ^{bd}	0,60	8,74 ^b	0,53	8,25 ^c	0,15
4	8,41 ^{de}	0,04	4,29 ^a	0,71	4,29 ^d	4,39
5	7,76 ^{be}	0,56	7,43 ^{bc}	0,005	7,35 ^{ce}	0,04
6	8,09 ^{de}	1,18	5,86 ^{ac}	0,20	0 ^a	0
7	6,54 ^{abe}	0,65	4,47 ^a	0,55	0 ^a	0
8	6,43 ^{abe}	0,47	6,75 ^{ab}	0,58	6,39 ^e	0,03

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.22 e Tabela 5.21 demonstram o crescimento da cultura de *B. Bifidum*, durante o período de 72 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

Para o estudo do crescimento em 24 horas, o padrão de FOS não apresentou eficácia na estimulação do crescimento da cultura probiótica, não diferindo significativamente na análise estatística. As amostras 3,4,5 e 6 apresentaram um efeito positivo no crescimento da cultura *B. Bifidum*, isto demonstrado pela diferença significativa em relação à contagem inicial e também para o controle sem estimulação prebiótica, com o crescimento de 7,76; 8,41; 7,76 e 8,09 UFC/mL. Em comparação com o padrão de FOS (5,67 UFC/mL), as amostras 3,5,7 e 8 não obtiveram diferenciação significativa no crescimento, porém as amostras 4 e 6 se diferenciaram de modo significativo na estimulação do crescimento.

No ensaio da medida de crescimento em 48 horas, somente a amostra 3 estimulou o crescimento da cultura probiótica de modo significativo (8,74 UFC/mL), em comparação com a contagem inicial (5,37 UFC/mL) e também pelo controle sem estimulação de crescimento (4,40 UFC/mL). O padrão de FOS não apresentou resultados favoráveis de estimulação de crescimento da cultura probiótica, estando os seus resultados abaixo da média do controle sem estimulação, como também, para a contagem inicial da cultura de *B. bifidum*.

Em relação as 72 horas de crescimento, os tratamentos 3,5 e 8 estimularam de modo significativo o crescimento da cultura probiótica com 8,25, 7,35 e 6,39 UFC/mL, respectivamente, em relação ao controle sem estimulação (1,00 UFC/mL) e a contagem inicial com 5,37 UFC/mL. O padrão de FOS novamente não mostrou-se eficaz, tendo um crescimento abaixo do crescimento inicial, com a contagem de 3,15 UFC/mL. No decorrer das 72 horas de análise de crescimento dos tratamentos, somente a amostra 3 mostrou estimulação no crescimento da cultura *B. bifidum* nos 3 tempos de análise. As amostras 4 e 6 estimularam significativamente o crescimento em 24 horas, sendo que nas 72 horas, além da amostra 3, os tratamentos 5 e 8 apresentaram resultados favoráveis de estimulação da cultura probiótica.

5.4.1.4 *Lactobacillus reuteri*

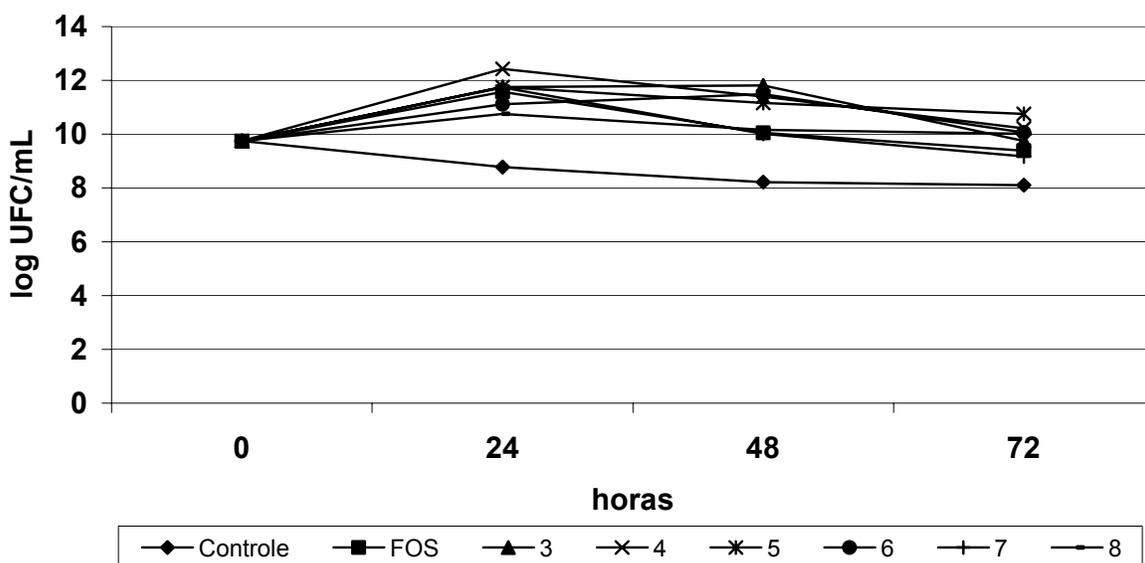


Figura 5.23- Crescimento da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.22 - Crescimento da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão
C. inicial	9,74 ^a	0,07	9,74 ^a	0,07	9,74 ^c	0,07
Controle	8,78 ^a	0,59	8,22 ^a	0,10	9,11 ^a	0,11
FOS	11,58 ^{bd}	0,04	10,05 ^b	1,25	9,39 ^b	0,08
3	11,76 ^{bd}	0,03	11,81 ^b	0,01	9,75 ^c	0,01
4	12,43 ^b	0,62	11,39 ^{bc}	0,09	10,22 ^d	0,02
5	11,76 ^{bd}	0,05	11,16 ^b	0,55	10,75 ^e	0,01
6	11,11 ^{bd}	0,56	11,48 ^b	0,10	10,06 ^{dg}	0,05
7	11,73 ^{bd}	0,02	10,01 ^b	1,11	9,17 ^f	0,07
8	10,76 ^{bd}	0,97	10,16 ^{bd}	0,14	10,02 ^{dg}	0,04

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.23 e Tabela 5.22 demonstram o crescimento da cultura de *L. reuteri*, durante o período de 72 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em

relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

Para a análise do crescimento da cultura probiótica em 24 horas, o padrão de FOS estimulou de modo significativo o crescimento com 11,58 UFC/mL, isto em comparação com o crescimento inicial (9,74 UFC/mL) e também com o controle sem estimulação (8,78 UFC/mL). O mesmo ocorreu com os tratamentos 3,4,5,6 e 7, que apresentaram uma significativa estimulação do crescimento da cultura com 11,76; 12,4; 11,76; 11,11; 11,73 e 10,76 UFC/mL, respectivamente. Em comparação com o padrão de FOS os tratamentos com estimulação positiva não diferiram estatisticamente deste.

Na análise do crescimento em 48 horas, os tratamentos 3 e 6 mostraram estimulação significativa da cultura probiótica com os valores de 11,81 e 11,48 UFC/mL, respectivamente, em comparação com a contagem inicial (9,74 UFC/mL) e o controle sem estimulação com 8,22 UFC/mL, sendo que somente a amostra 3 apresentou estimulação superior a do padrão de FOS, com as demais amostras não diferindo significativamente desta.

Para o experimento em 72 horas, o padrão de FOS não foi capaz de estimular significamente a cultura de *L. reuteri*, apresentando o valor de 9,39 UFC/mL, este mais baixo em comparação à contagem inicial da cultura probiótica com 9,74 UFC/mL. Em comparação com os tratamentos, o padrão de FOS obteve resultados de estimulação inferiores em relação as amostras 3,4,5,6 e 8, ficando somente a amostra 7 com estimulação de crescimento mais baixa do que o padrão de FOS.

5.4.1.5 *Lactobacillus pentosus*

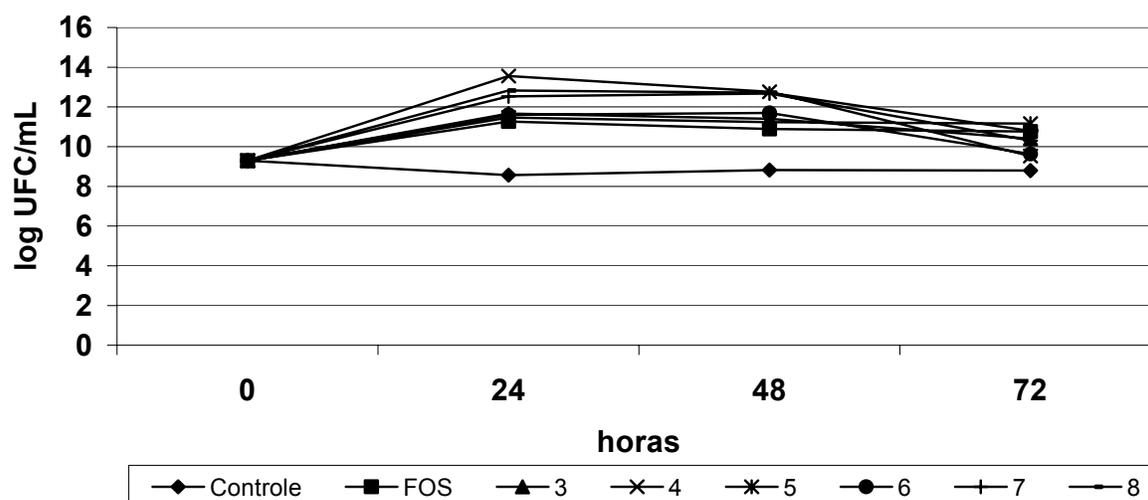


Figura 5.24- Crescimento da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 30°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.23 - Crescimento da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	24 horas		48 horas		72 horas	
	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão	LogUFC/mL	Desvio padrão
C. inicial	9,30 ^a	0,13	9,30 ^a	0,13	9,30 ^f	0,13
Controle	8,56 ^a	0,98	8,82 ^a	0,03	9,88 ^a	0,01
FOS	11,26 ^b	0,23	10,89 ^b	0,04	10,75 ^b	0,06
3	11,66 ^{bc}	0,03	11,40 ^{bc}	0,03	10,39 ^c	0,03
4	13,55 ^d	0,05	12,77 ^d	0,57	9,52 ^d	0,01
5	11,46 ^{bc}	0,07	11,23 ^{bc}	0,08	11,16 ^e	0,07
6	11,61 ^{bc}	0,05	11,69 ^c	0,02	9,64 ^d	0,03
7	12,53 ^{ce}	0,06	12,67 ^d	0,23	10,51 ^c	0,07
8	12,83 ^{de}	0,11	12,71 ^d	0,03	10,79 ^b	0,02

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.24 e Tabela 5.23 demonstram o crescimento da cultura de *L. pentosus*, durante o período de 72 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em

relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

Em relação aos ensaios em 24 horas, o padrão de FOS apresentou uma significativa estimulação da cultura probiótica com o valor obtido de 11,26 UFC/mL, sendo esta bem maior que o controle sem estimulação (8,56 UFC/mL) e a contagem inicial com 9,30 UFC/mL. Todos os tratamentos mostraram um efeito positivo de estimulação do crescimento da cultura, com os maiores valores para as amostras 4 e 8 com 13,55 UFC/mL e 12,83 UFC/mL, respectivamente. Em comparação com o padrão de FOS, os tratamentos 4,7 e 8 mostraram-se superiores a este, e os tratamentos 3,5 e 6 não diferiram significativamente destes.

Para os ensaios em 48 horas, o padrão de FOS novamente mostrou-se eficaz na estimulação do crescimento da cultura, com significativo crescimento desta (10,89 UFC/mL), em comparação com o controle sem estimulação (8,82 UFC/mL) e a contagem inicial da cultura com 9,30 UFC/mL. Os tratamentos mantiveram a estimulação significativa do crescimento da cultura probiótica, com destaque para as amostras, 4,7,e 8 com os valores de 12,77; 12,67 e 12,71 UFC/mL, respectivamente. Em comparação com o padrão de FOS, as amostras 4,6,7 e 8 mostraram uma estimulação superior em relação a este, e as amostras 3 e 5 não diferiram de modo significativo em relação a este padrão.

Em relação ao crescimento em 72 horas, o padrão de FOS mostrou-se positivo na estimulação do crescimento da cultura *L. pentosus*, com a contagem de 10,76 UFC/mL, em comparação ao controle não estimulado (9,88 UFC/mL) e à contagem inicial com 9,30 UFC/mL. Todos os tratamentos mostraram efeitos positivos significativos em relação a contagem inicial e controle sem estimulação. Destas, as amostras 3,5,7 e 8 apresentaram efeitos superiores ao padrão de FOS, sendo que as amostras 4 e 6 apresentaram efeito inferior de estimulação da cultura em relação a este padrão.

5.4.2 Curvas de Crescimento – Culturas patogênicas

5.4.2.1 *Salmonella enteritidis*

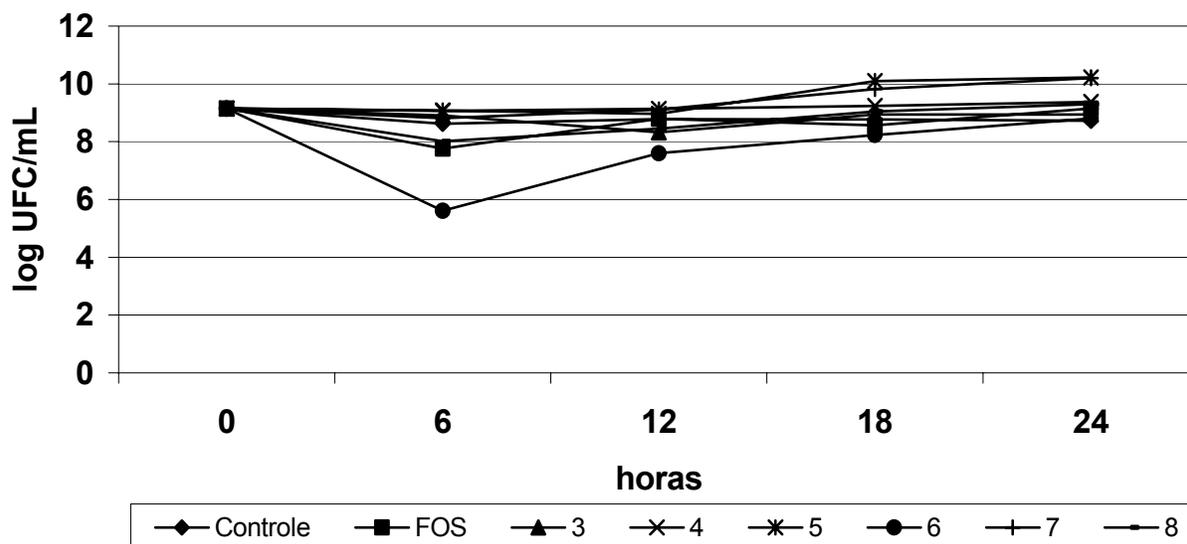


Figura 5.25- Crescimento da cultura *S. enteritidis*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, em condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.24 - Crescimento da cultura *S. enteritidis* no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	6 horas	12 horas	18 horas	24 horas
	LogUFC/mL	LogUFC/mL	LogUFC/mL	LogUFC/mL
	Média	Média	Média	Média
C. inicial	9,15 ^a ±0,26	9,15 ^a ±0,26	9,15 ^{ac} ±0,26	9,15 ^{ab} ±0,26
Controle	8,62 ^a ±0,26	8,78 ^a ±0,01	8,77 ^a ±0,15	8,72 ^a ±0,10
FOS	7,76 ^b ±0,09	8,79 ^a ±0,09	8,57 ^a ±0,04	9,15 ^{ab} ±0,08
3	8,91 ^a ±0,01	8,33 ^a ±0,40	8,94 ^a ±0,01	8,94 ^{ab} ±0,03
4	9,07 ^a ±0,07	9,14 ^a ±0,15	9,24 ^a ±0,09	9,38 ^b ±0,06
5	9,08 ^a ±0,14	8,96 ^a ±1,06	10,10 ^b ±0,17	10,22 ^c ±0,10
6	5,61 ^c ±0,06	7,60 ^a ±0,62	8,23 ^a ±0,48	8,86 ^{ab} ±0,03
7	8,82 ^{ad} ±0,56	9,12 ^a ±0,53	9,82 ^{bc} ±0,30	10,20 ^c ±0,15
8	8,02 ^{bd} ±0,04	8,45 ^a ±0,73	9,05 ^{ac} ±0,22	9,30 ^{ab} ±0,01

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.25 e Tabela 5.24 demonstram o crescimento da cultura de *S. enteritidis*, durante o período de 24 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

O padrão de FOS apresentou um efeito negativo na estimulação, durante as 24 horas de crescimento da cultura patogênica, com valores de crescimento menores do que o crescimento inicial durante as primeiras horas (7,76 UFC/mL), e não diferindo significativamente deste crescimento inicial nas demais horas (9,15 UFC/mL). Os tratamentos não apresentaram efeitos positivos na estimulação do crescimento da cultura patogênica durante as 24 horas, com exceção do tratamento 5 que estimulou positivamente o crescimento desta a partir de 18 horas (10,10 UFC/mL), estendendo esta estimulação até 24 horas de crescimento com 10,22 UFC/mL e do tratamento 7 que apresentou estimulação do crescimento da cultura significativa no ensaio de 24 horas (10,20 UFC/mL).

Durante todos os ensaios para a análise da estimulação da cultura patogênica *Salmonella enteritidis*, os resultados mostraram que no geral, tanto o padrão de FOS como os tratamentos, não apresentaram efeito de estimulação nesta cultura.

5.4.2.2 *Escherichia coli*

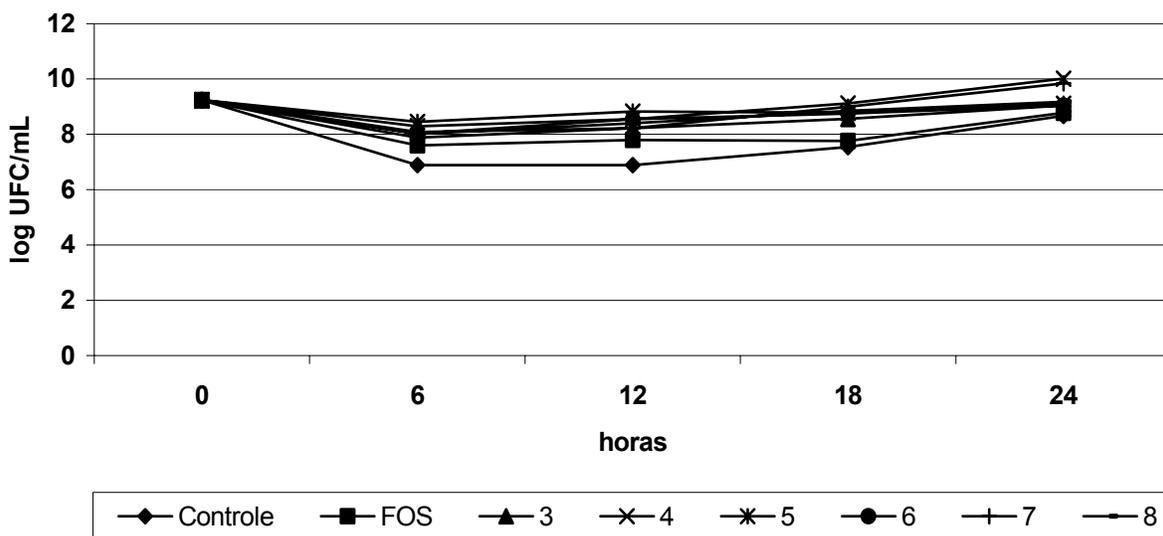


Figura 5.26- Crescimento da cultura *E. coli*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, em condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.25 - Crescimento da cultura *E. coli*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, com valores expressados em logUFC/mL com seus respectivos desvios.

	6 horas	12 horas	18 horas	24 horas
	LogUFC/mL	LogUFC/mL	LogUFC/mL	LogUFC/mL
	Média	Média	Média	Média
C. inicial	9,24 ^e ±0,23	9,24 ^c ±0,23	9,24 ^{bc} ±0,23	9,24 ^{ac} ±0,23
Controle	6,80 ^a ±0,64	6,88 ^a ±0,07	7,54 ^a ±0,30	8,67 ^a ±0,05
FOS	7,60 ^b ±0,31	7,80 ^{ab} ±0,09	7,76 ^b ±0,03	8,77 ^{ab} ±0,01
3	8,09 ^c ±0,08	8,22 ^{bc} ±0,19	8,56 ^c ±0,38	9,44 ^{bc} ±0,71
4	8,29 ^c ±0,05	8,54 ^{bc} ±0,25	9,11 ^c ±0,33	10,01 ^c ±0,02
5	8,45 ^{cd} ±0,01	8,82 ^c ±0,10	8,78 ^c ±0,15	9,14 ^{ac} ±0,13
6	8,02 ^c ±0,04	8,55 ^{bc} ±0,48	8,75 ^c ±0,10	9,04 ^{ac} ±0,08
7	7,88 ^{bc} ±0,02	8,22 ^{bc} ±0,64	8,99 ^c ±0,36	9,84 ^c ±0,005
8	8,01 ^c ±0,02	8,40 ^{bc} ±0,38	8,85 ^c ±0,09	9,07 ^{ac} ±0,11

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.26 e Tabela 5.25 demonstram o crescimento da cultura de *E. Coli*, durante o período de 24 horas, utilizando os tratamentos 3,4,5,6,7,8 em relação à contagem inicial, ao controle e ao padrão de FOS, que foram utilizados para comparação nos testes.

O padrão de FOS não apresentou efeito positivo na estimulação do crescimento da cultura patogênica, durante todo o experimento do crescimento deste microrganismo, com valores menores do que o crescimento inicial nas primeiras 18 horas e não diferindo significativamente deste crescimento inicial na análise de 24 horas (8,77 UFC/mL). Os tratamentos não apresentaram efeitos positivos na estimulação do crescimento da cultura patogênica durante as 24 horas, com exceção do tratamento 4 que estimulou positivamente o crescimento desta na análise da 24 horas (10,01 UFC/mL).

Durante todos os ensaios para a análise da estimulação da cultura patogênica *E. coli*, os resultados mostraram que no geral, tanto o padrão de FOS como os tratamentos, não apresentaram efeito de estimulação nesta cultura.

5.4.3 Análise de pH

5.4.3.1 Culturas probióticas

5.4.3.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

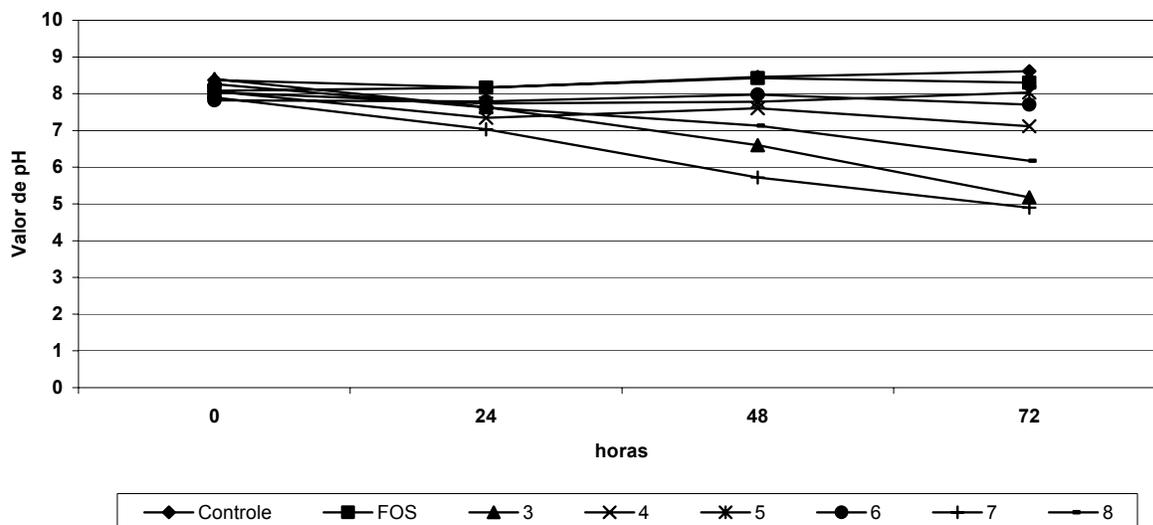


Figura 5.27- Valor de pH da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.26 – Valor de pH da cultura *L. acidophilus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,37 ^a ± 0,02	8,07 ^a ± 0,02	8,40 ^a ± 0,09	8,06 ^a ± 0,06	8,04 ^a ± 0,01	7,82 ^a ± 0,02	7,89 ^a ± 0,05	8,25 ^a ± 0,01
24	8,17 ^b ± 0,02	8,16 ^{ab} ± 0,02	7,63 ^b ± 0,23	7,34 ^b ± 0,34	7,73 ^a ± 0,03	7,79 ^a ± 0,02	7,03 ^b ± 0,02	7,62 ^b ± 0,04
48	8,45 ^{ac} ± 0,10	8,42 ^c ± 0,04	6,60 ^c ± 0,10	7,60 ^{ab} ± 0,10	7,78 ^a ± 0,25	7,98 ^b ± 0,03	5,72 ^c ± 0,04	7,13 ^c ± 0,15
72	8,61 ^c ± 0,06	8,29 ^{bc} ± 0,09	5,18 ^d ± 0,15	7,11 ^b ± 0,12	8,03 ^a ± 0,04	7,70 ^a ± 0,10	4,90 ^d ± 0,02	6,17 ^d ± 0,09

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.27 e Tabela 5.26 demonstram o valor de pH de *L. acidophilus*, durante o período de 0 a 72 horas, analisando o efeito dos tratamentos 3,4,5,6,7,8 e do padrão de FOS, que foi utilizado para comparação. Foi demonstrado nas amostras 3,4,7 e 8, uma queda significativa no valor do pH durante as 72 horas de cultivo da cultura probiótica, sendo que a amostra 7 alcançou o valor de 4,90

na 72^o hora de incubação. O padrão de FOS não demonstrou queda do pH em nenhum momento do estudo com esta cultura, assim como os tratamentos 5 e 6.

5.4.3.1.2 *Lactobacillus plantarum*

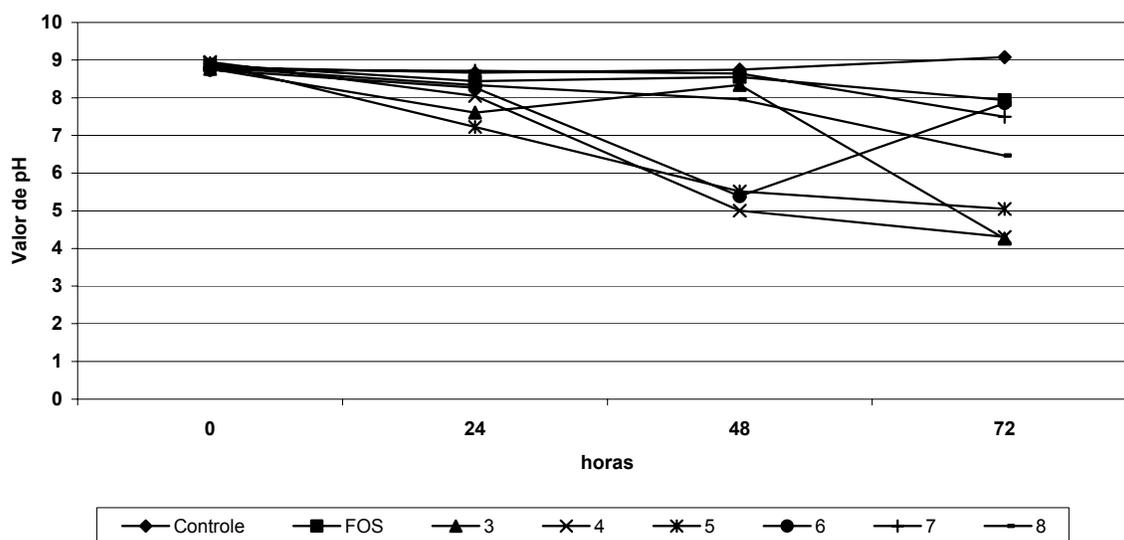


Figura 5.28- Valor de pH da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, a 37°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.27 – Valor de pH da cultura *L. plantarum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,81 ^a ± 0,16	8,87 ^a ± 0,10	8,77 ^a ± 0,11	8,95 ^a ± 0,08	8,91 ^a ± 0,13	8,74 ^a ± 0,15	8,73 ^a ± 0,15	8,80 ^a ± 0,10
24	8,66 ^a ± 0,05	8,44 ^a ± 0,05	7,60 ^b ± 0,10	8,04 ^b ± 0,05	7,22 ^b ± 0,11	8,26 ^a ± 0,25	8,72 ^a ± 0,30	8,33 ^a ± 0,35
48	8,74 ^a ± 0,15	8,55 ^a ± 0,35	8,34 ^{ab} ± 0,65	5,00 ^c ± 0,10	5,51 ^c ± 0,50	5,39 ^b ± 0,52	8,64 ^a ± 0,40	7,96 ^a ± 0,57
72	9,07 ^a ± 0,65	7,93 ^a ± 0,83	4,26 ^c ± 0,30	4,30 ^d ± 0,44	5,05 ^c ± 0,08	7,85 ^c ± 0,31	7,49 ^b ± 0,50	6,47 ^b ± 0,40

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.28 e Tabela 5.27, observa-se a estabilidade do pH mediante as 72 horas de cultivo da cultura *L. plantarum* nas amostras controle e com a amostra contendo o padrão de FOS, onde estes mostraram resultados que não diferiram significativamente entre si. Em

relação aos tratamentos utilizados, de um modo geral, todos promoveram um decréscimo nos valores de pH no meio de cultivo da cultura, sendo que destaca-se as culturas 3,4 e 5 com forte queda de pH no decorrer das 72 horas de incubação, onde estes chegaram a valores de 4,26; 4,30 e 5,05, respectivamente. As amostras 7 e 8 apresentaram queda significativa de pH somente na contagem de 72 horas.

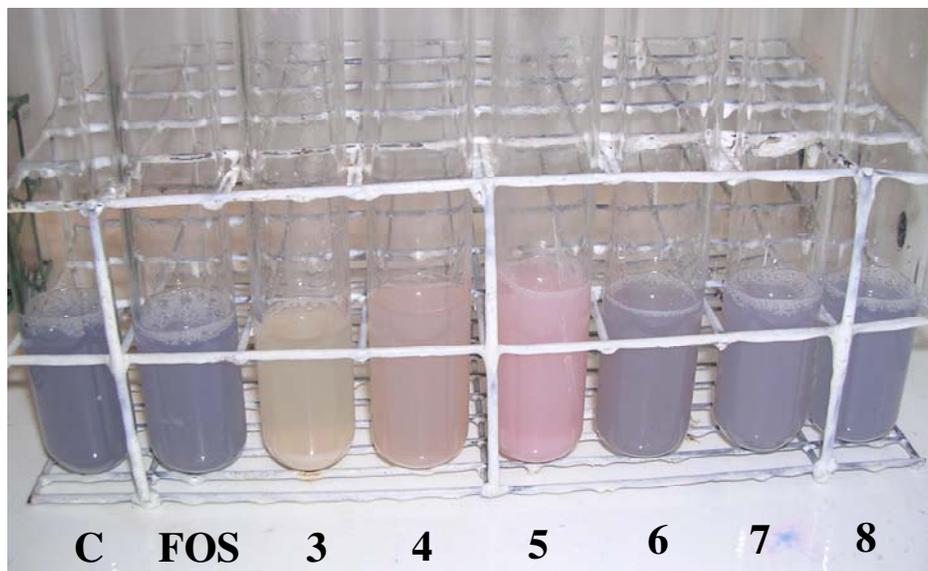


Figura 5.29 – Tubos com a cultura *L. plantarum*, no período de 72 horas de incubação, a 37°C, utilizando as seguintes amostras: (C) controle, (FOS) Frutooligossacarídeo, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias). O meio litmus milk possui um indicador de cor que varia de acordo com o pH, sendo a cor rosa atribuída a um meio ácido, amarelo/incolor corresponde a um pH neutro e a cor azul/roxa corresponde a um pH básico.

5.4.3.1.3 *Bifidobacterium bifidum*

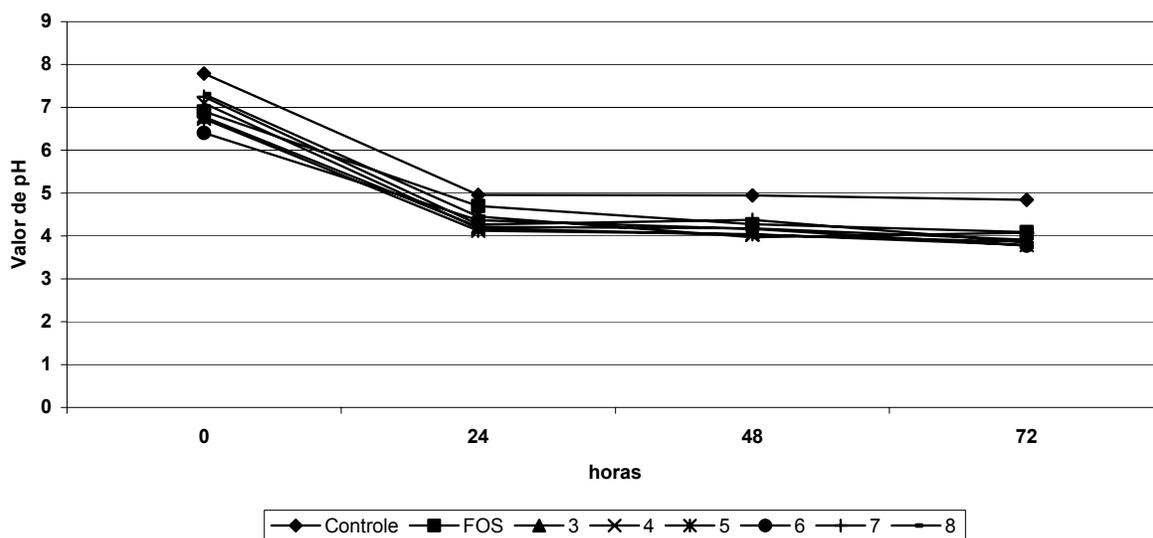


Figura 5.30- Valor de pH da cultura *B. bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, em 37°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.28 – Valor de pH da cultura *B. bifidum*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	7,78 ^a ± 0,22	6,90 ^a ± 0,10	6,78 ^a ± 0,25	7,09 ^a ± 0,10	6,73 ^a ± 0,11	6,40 ^a ± 0,10	7,24 ^a ± 0,01	7,30 ^a ± 0,30
24	4,95 ^b ± 0,05	4,69 ^b ± 0,17	4,21 ^b ± 0,09	4,17 ^b ± 0,15	4,12 ^b ± 0,11	4,36 ^b ± 0,05	4,26 ^b ± 0,03	4,45 ^b ± 0,15
48	4,94 ^b ± 0,09	4,27 ^c ± 0,03	4,18 ^b ± 0,02	4,03 ^{bc} ± 0,05	4,04 ^b ± 0,05	4,16 ^b ± 0,15	4,38 ^b ± 0,10	3,97 ^b ± 0,45
72	4,84 ^b ± 0,55	4,08 ^c ± 0,07	3,91 ^b ± 0,10	3,86 ^c ± 0,05	3,78 ^b ± 0,25	3,77 ^c ± 0,06	3,85 ^c ± 0,22	4,07 ^b ± 0,06

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

Em relação ao valor de pH dos ensaios utilizando a cultura *B. bifidum*, os resultados demonstraram que no período de 72 horas de incubação, o padrão de FOS teve forte queda de pH, chegando a 4,08, o controle também teve queda, porém menos acentuada, chegando a 4,84. Os tratamentos também tiveram queda significativa em seus valores de pH, tendo destaque as amostras 3, 4 e 5 com valores de pH de 3,91; 3,86 e 3,78 respectivamente, sendo estes valores relatados na análise de 72 horas de incubação da cultura probiótica.

5.4.3.1.4 *Lactobacillus reuteri*

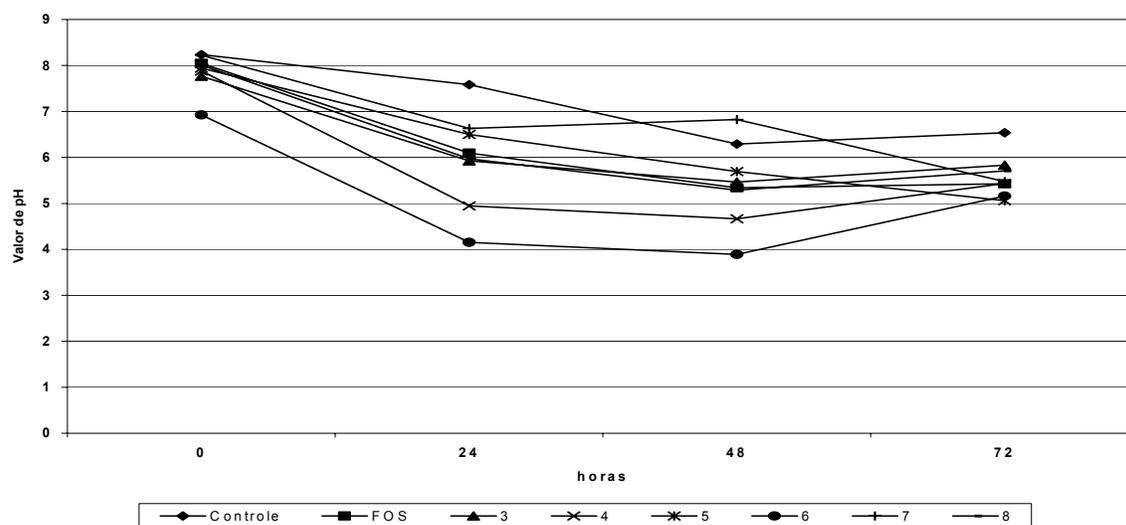


Figura 5.31- Valor de pH da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, em 37°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.29 – Valor de pH da cultura *L. reuteri*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,23 ^a ± 0,05	8,04 ^a ± 0,05	7,76 ^a ± 0,25	7,88 ^a ± 0,70	7,94 ^a ± 0,05	6,92 ^a ± 1,00	8,22 ^a ± 0,32	8,00 ^a ± 0,01
24	7,58 ^a ± 0,43	6,09 ^b ± 0,09	5,92 ^b ± 0,10	4,94 ^b ± 0,16	6,49 ^b ± 0,50	4,15 ^b ± 0,15	6,62 ^b ± 0,51	5,97 ^b ± 0,25
48	6,29 ^b ± 0,25	5,34 ^c ± 0,05	5,46 ^c ± 0,03	4,66 ^b ± 0,09	5,69 ^{bc} ± 0,43	3,89 ^b ± 0,25	6,82 ^b ± 0,02	5,28 ^c ± 0,25
72	6,53 ^b ± 0,03	5,42 ^c ± 0,20	5,83 ^{bc} ± 0,14	5,43 ^b ± 0,03	5,06 ^c ± 0,22	5,15 ^b ± 0,15	5,47 ^c ± 0,20	5,70 ^{bc} ± 0,01

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

De acordo com a Figura 5.31 e Tabela 5.29, todos os tratamentos apresentaram queda nos valores de pH no decorrer das 72 horas de incubação, tendo destaque a amostra 6, com queda significativa de pH em 48 horas de incubação com o valor de 3,89. Já a amostra com padrão de FOS também apresentou queda significativa em seus valores, além da amostra controle que também apresentou uma diminuição nos seus valores.

5.4.3.1.5 *Lactobacillus pentosus*

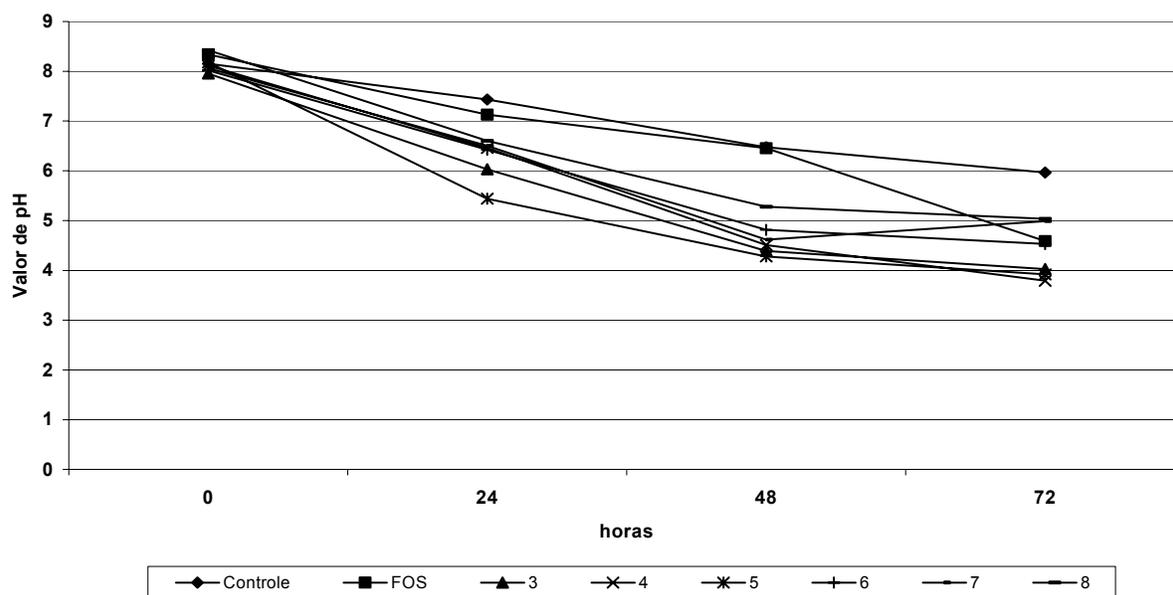


Figura 5.32- Valor de pH da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, em 30°C, em condições anaeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.30 – Valor de pH da cultura *L. pentosus*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,15 ^a ± 0,12	8,34 ^a ± 0,19	7,95 ^a ± 0,07	8,11 ^a ± 0,16	8,18 ^a ± 0,13	8,02 ^a ± 0,03	8,06 ^a ± 0,50	8,42 ^a ± 0,45
24	7,43 ^{ab} ± 0,57	7,12 ^b ± 0,14	6,03 ^b ± 0,05	6,46 ^b ± 0,05	5,44 ^b ± 0,16	6,42 ^b ± 0,25	6,50 ^b ± 0,50	6,60 ^b ± 0,14
48	6,47 ^{bc} ± 0,20	6,45 ^c ± 0,09	4,39 ^c ± 0,20	4,51 ^c ± 0,27	4,27 ^c ± 0,06	4,81 ^c ± 0,50	4,61 ^c ± 0,27	5,28 ^c ± 0,07
72	5,96 ^c ± 0,75	4,59 ^d ± 0,08	4,02 ^d ± 0,30	3,79 ^d ± 0,26	3,92 ^d ± 0,01	4,53 ^c ± 0,56	4,98 ^c ± 0,10	5,03 ^c ± 0,07

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

A Figura 5.32 e Tabela 5.30 apresenta forte queda no valor de pH para os tratamentos utilizados no período de 72 horas de incubação da cultura *L. pentosus*. Neste experimento destacaram-se as amostras 3,4 e 5 com forte queda nos valores de pH no decorrer das análises, chegando na 72^o hora com os valores de pH em 4,02; 3,79 e 3,92, respectivamente. A amostra padrão de FOS também apresentou valores significativos de queda forte no pH, com o valor de 4,59 nas

72 horas. O controle apresentou queda nos valores, porém de modo menos acentuado, em comparação com as demais amostras.

5.4.3.2 Culturas patogênicas

5.4.3.2.1 *Salmonella enteritidis*

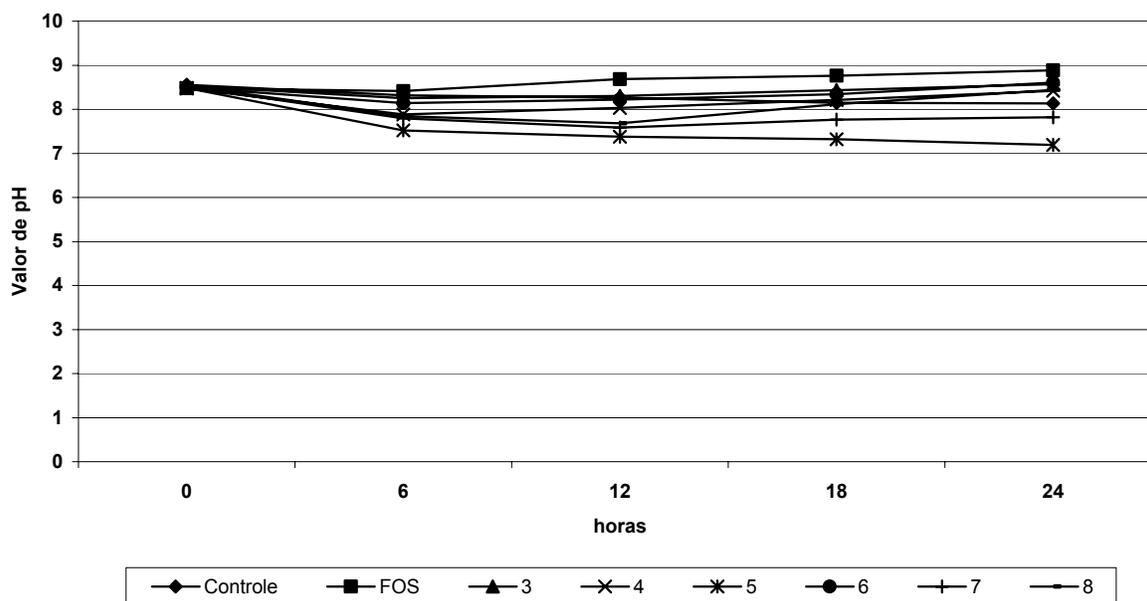


Figura 5.33- Valor de pH da cultura *S. enteritidis*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, em condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.31 – Valor de pH da cultura *S. enteritidis*, no período de 0, 6, 12 e 24 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,30 ^a ± 0,10	8,65 ^a ± 0,05	8,64 ^a ± 0,05	8,75 ^a ± 0,05	8,46 ^a ± 0,02	8,63 ^a ± 0,09	8,53 ^a ± 0,03	8,58 ^a ± 0,01
6	8,63 ^b ± 0,07	8,19 ^b ± 0,03	7,57 ^{bc} ± 0,07	7,41 ^b ± 0,01	7,31 ^b ± 0,09	8,29 ^b ± 0,06	8,12 ^b ± 0,02	7,89 ^b ± 0,09
12	8,82 ^{bc} ± 0,12	7,72 ^c ± 0,03	7,53 ^{bc} ± 0,15	7,34 ^b ± 0,05	7,40 ^{bc} ± 0,20	8,45 ^{ab} ± 0,04	8,01 ^{bc} ± 0,01	7,70 ^c ± 0,10
18	8,95 ^c ± 0,05	7,30 ^d ± 0,10	7,35 ^{bc} ± 0,10	7,37 ^b ± 0,04	7,65 ^{cd} ± 0,05	8,54 ^a ± 0,07	7,89 ^{cd} ± 0,10	7,62 ^c ± 0,02
24	9,13 ^c ± 0,03	7,16 ^e ± 0,06	7,28 ^c ± 0,05	7,37 ^b ± 0,07	7,88 ^d ± 0,11	8,55 ^a ± 0,15	7,79 ^d ± 0,09	7,60 ^c ± 0,03

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.33 e Tabela 5.31, as amostras demonstraram uma baixa oscilação nos valores de pH para a cultura patogênica *S. enteritidis*, no decorrer das 72 horas de incubação. O padrão de

FOS apresentou um leve declínio em seus valores de pH, chegando nas 72 horas de análise com o valor de 7,16, já o controle apresentou elevação em seus valores, chegando a 9,13 na 72^o hora de incubação. Para os tratamentos, a amostra 6 não mostrou diferença significativa em seus valores, reportando somente uma leve queda no pH na 24^o hora com valor de 8,29, porém no decorrer do tempo da incubação, estes valores voltaram a se elevar. Os demais tratamentos apresentaram discretos declínios em seus valores de pH.

5.4.3.2.2 *Escherichia coli*

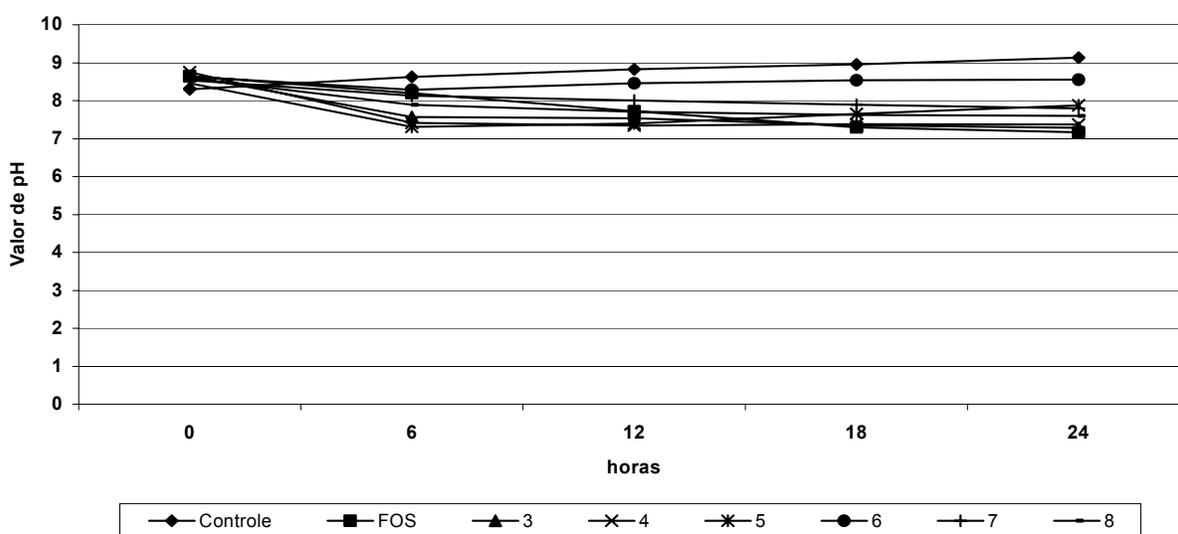


Figura 5.34- Valor de pH da cultura *E. coli*, no período de 0, 6, 12, 18 e 24 horas, a 37°C, em condições aeróbicas, utilizando as seguintes amostras: controle, FOS, (3) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + CMC (40 minutos de reação), (4) Hidrolisado de *Pleurotus tailandia* + xilana (30 minutos de reação), (5) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + CMC (30 minutos de reação), (6) Hidrolisado de *Pleurotus sp* BCCB068 + xilana (40 minutos de reação), (7) *Pleurotus sp* BCCB068 utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 30 dias), (8) *Pleurotus tailandia* utilizando xilana como fonte de carbono (incubação de 10 dias).

Tabela 5.32 – Valor de pH da cultura *E. coli*, no período de 0, 24, 48 e 72 horas, com seus respectivos desvios.

horas	Controle	FOS	3	4	5	6	7	8
0	8,55 ^a ± 0,05	8,47 ^a ± 0,08	8,53 ^a ± 0,12	8,47 ^a ± 0,06	8,48 ^a ± 0,16	8,49 ^a ± 0,15	8,52 ^a ± 0,06	8,53 ^a ± 0,09
6	8,32 ^b ± 0,06	8,41 ^a ± 0,04	8,25 ^b ± 0,02	7,88 ^b ± 0,01	7,52 ^b ± 0,02	8,14 ^b ± 0,04	7,79 ^b ± 0,09	7,84 ^b ± 0,08
12	8,26 ^b ± 0,07	8,68 ^b ± 0,04	8,30 ^b ± 0,01	8,03 ^{bc} ± 0,05	7,38 ^{bc} ± 0,10	8,22 ^b ± 0,03	7,58 ^b ± 0,41	7,68 ^{bc} ± 0,02
18	8,15 ^b ± 0,05	8,76 ^{bc} ± 0,03	8,43 ^{ab} ± 0,10	8,21 ^d ± 0,11	7,32 ^{bc} ± 0,10	8,34 ^{ab} ± 0,05	7,76 ^b ± 0,05	8,11 ^{bd} ± 0,01
24	8,13 ^b ± 0,01	8,88 ^{bc} ± 0,02	8,57 ^a ± 0,02	8,42 ^a ± 0,03	7,19 ^c ± 0,06	8,60 ^a ± 0,05	7,82 ^b ± 0,21	8,44 ^a ± 0,21

Médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de tukey.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5.34 e Tabela 5.32, as amostras apresentaram uma baixa oscilação nos valores de pH para a cultura patogênica *E. coli*, no decorrer das 72 horas de incubação. O padrão de FOS apresentou um leve aumento nos valores de pH da cultura, chegando nas 72 horas de análise com o valor de 8,88, já o controle apresentou baixa em seus valores, chegando a 8,13 na 72^o hora de incubação. Para os tratamentos, as amostras 3, 4, 5, 7 e 8 reduziram os seus valores de pH durante as 72 horas de incubação. Somente a amostra 6 apresentou os valores estáveis durante este período. Nenhum dos tratamentos influenciaram no aumento no pH durante este período de incubação.

Os resultados demonstram uma considerável estimulação nas culturas probióticas *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. pentosus* e *B. bifidum*, tanto a realizada pela amostra padrão com frutooligossacarídeos, como também pelos 6 tratamentos utilizados no experimento. Estas amostras são provindas da degradação de xilana como também de carboximetilcelulose, contendo uma grande gama de açúcares provindos desta degradação, tendo destaque os compostos xilooligossacarídeos e os celooligossacarídeos formados, de acordo com o estudo do controle dos tempos de fermentação e hidrólise enzimática.

A sobrevivência da bactéria probiótica no meio de fermentação depende das cepas utilizadas, interação entre as espécies presentes, condições de cultivo, composição química do meio, acidez final, conteúdo de sólidos, agentes promotores e inibidores do crescimento, concentração de açúcares, oxigênio dissolvido, níveis de inoculação, temperatura e tempo de incubação, além do tempo de estocagem (LOURENS-HAUTTINGH e VILJOEN, 2001).

O consumo dos substratos pelos microrganismos probióticos, geralmente vem acompanhado da queda do pH, através da formação de ácidos graxos de cadeia curta, como ácido propiônico, butírico, acético e láctico, que pode ocasionar uma leve inibição do crescimento da cultura (SCALABRINI et al. 1998; MACFARLANE e GIBSON, 1997).

Para a estimulação do crescimento de *L. acidophilus* em 72 horas, os tratamentos mostraram-se eficazes neste crescimento, com exceção da amostra 8 que não apresentou crescimento significativo. A estimulação do crescimento das

amostras 3,4,7 e 8 vieram acompanhadas da queda do pH de modo significativo neste período de incubação, as demais amostras não evidenciaram esta atividade. A linhagem *L. acidophilus* regula o consumo de açúcares, controlando a queda de pH, com o intuito de permitir um melhor desenvolvimento individual (TAMINE, et al. 1995).

O experimento com *L. plantarum* mostrou que os tratamentos, foram capazes de estimular prebioticamente esta cultura, em praticamente todos os tempos de análise, e com considerável desempenho frente ao padrão de FOS, onde as amostras 3,4 e 5 obtiveram forte queda no pH no decorrer das 72 horas de incubação. Este mesmo desempenho foi notificado no estudo com *L. pentosus*, onde todos os tratamentos estimularam o crescimento da cultura probiótica, com forte queda de pH durante as 72 horas de incubação, com estimulação superior ou igual a do padrão de frutooligossacarídeos.

Para o experimento com *B. bifidum*, as amostras 3,5 e 8 obtiveram crescimento significativo, além do padrão de frutooligossacarídeos. As demais amostras não mostraram crescimento significativo, onde os tratamentos 6 e 7 não apresentaram contagem na 72^o hora de incubação. Isso pode ter ocorrido devido ao fato estudado por LOURENS-HAUTTINGH e VILJOEN, (2001), onde reportaram em seu estudo que o pH à partir de 3,6 inibe o crescimento das bifidobactérias, sendo que o seu crescimento já é comprometido desde pH 5,0, com a faixa ótima de sobrevivência das bifidobactérias situa-se entre os valores de pH 5,5 - 6,0.

Estes resultados são similares aos obtidos por FOOKS e GIBSON, (2002), em estudo com estes microrganismos probióticos utilizando xilooligossacarídeos, FOS, inulina e a mistura entre estes, sendo que no geral, estas culturas probióticas fermentaram preferencialmente as fontes de carbono providas destes substratos, com crescimento considerável em 24 horas de incubação.

Em relação ao crescimento das culturas patogênicas *S. enteritidis* e *E. coli*, mostrou que tanto o padrão de frutooligossacarídeos como os tratamentos providos das hidrólises de xilana e carboximetilcelulose não estimularam o crescimento no decorrer de 24 horas de incubação, com exceção da amostra 5 que estimulou o crescimento de *S. enteritidis* e a amostra 4 que estimulou a

cultura de *E. coli*, ambas na 24^o hora de incubação. Este fato pode ser explicado possivelmente devido aos compostos de cadeia menor contida nestas amostras, provindos da hidrólise das matrizes xilana e carboximetilcelulose, como os monômeros formados neste processo, ao qual as culturas tiveram acesso para utilizar como fonte de carbono em seu crescimento. A atividade de pH demonstrou uma baixa oscilação para ambas as culturas no decorrer das 24 horas de incubação. Este resultado mostrou que o pH não influenciou na inibição do crescimento das culturas patogênicas, em estudos conduzidos por FOOKS e GIBSON, (2002), mostraram que um meio com pH de 4,0 ou abaixo inibe o crescimento de *S. enteritidis* completamente, e pH de 3,0 ou menor inibe completamente o crescimento da cultura de *E. coli*.

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível afirmar que as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* são capazes de degradar matrizes celulósicas e hemicelulósicas, formando compostos hidrolisados como oligossacarídeos XOS e celooligossacarídeos, com capacidade prebiótica comprovada pelos testes *in vitro*, através do estudo destes na estimulação de culturas probióticas e enteropatógenos da flora intestinal humana.

6 CONCLUSÕES

Todos os fungos testados produziram uma grande gama de enzimas lignocelulolíticas, utilizando os resíduos agroindustriais sabugo de milho, bagaço de cana, farelo de trigo, casca e farelo de arroz como fonte de carbono em fermentação submersa.

Das 6 linhagens de fungos basidiomicetos avaliadas, 2 foram selecionadas através das maiores atividades da enzima xilanase. Os fungos escolhidos foram *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia*. Para a produção do complexo enzimático, foi escolhida a melhor associação destes fungos, sendo a incubação em resíduo farelo de arroz, no período de 10 dias de fermentação submersa.

Os valores das atividades enzimáticas de xilanase e β -xilosidase das linhagens selecionadas puderam ser ampliadas através da utilização da ferramenta de planejamento experimental, onde através da otimização das variáveis de estudo, as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* aumentaram os seus valores de atividade de xilanase em 66,6% e 300%, respectivamente.

Os fungos *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* utilizaram a matriz de xilana como fonte de carbono, em fermentação de 40 dias de cultivo, degradando esta matriz em 73,6% no 20º dia para a primeira e 70,1% já no 5º dia de cultivo para a segunda linhagem, com produção de xilooligossacarídeos e seus monômeros.

Os hidrolisados mostraram-se capazes de hidrolisar até 66,4 % da xilana e 59,9% de carboximetilcelulose, formando compostos xilooligossacarídeos e celooligossacarídeos, respectivamente, além de vários monômeros de açúcares.

Tanto os fungos selecionados como os seus hidrolisados não foram eficazes na degradação dos resíduos agroindustriais bagaço de cana e sabugo de milho, no período proposto. Para estas matrizes recomenda-se ensaios com estes fungos em tempos maiores de incubação como 90 a 120 dias.

O teste de atividade prebiótica *in vitro* dos hidrolisados selecionados, demonstrou uma significativa estimulação das culturas probióticas estudadas, com efeitos comparáveis aos dos frutooligossacarídeos utilizados comercialmente, assim como os hidrolisados testados não foram capazes de estimular o crescimento das culturas enteropatogênicas estudadas, demonstrando deste modo a capacidade prebiótica destes hidrolisados.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as linhagens *Pleurotus sp* BCCB068 e *Pleurotus tailândia* apresentam grande potencial de degradação de matrizes celulósicas e hemicelulósicas e compostos com tratamento prévio de deslignificação para a produção de compostos prebióticos, possibilitando deste modo, a sua aplicação nos processos biotecnológicos, mediante estudos complementares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRICULTURE AND AGRI-FOOD CANADÁ. **Functional foods and nutraceuticals**. Disponível em <http://www.agr.gc.ca/food/nff/enutrace.html>. Acessado em 25 de abril de 2007.

ALMEIDA, E.M.; POLIZELI, M.L.T.M.; TERENCEI, H.F.; JORGE, J.A. Purification and biochemical characterization of β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 130, p. 171-176, 1995.

BAJPAI, P. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. **Advances in Applied Microbiology**, v.43, p.141-194, 1997.

BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomasa: Biocombustibles para el sector del transporte. **Energía**, v.161, p. 29-34, 2001.

BATAILLON, M.; CARDINALLI, N. A. P.; CASTILLON, N.; DUCHIRON, F. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase form *Bacillus* sp. Strain SPS-0. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 26, p. 187-192, 2000.

BAYER, E. A.; LAMED R. The cellulose paradox: pollutant *par excellence* and/or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**. v.3, p.171-188, 1992.

BERNET, M.; BRASSART, D.; NESSER, J.; SERVIN, A. Adhesion of human bifidobacterial strain to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59 (12): p.4121-4128, 1993.

BHAT, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology: review. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-383, 2000.

BHAT, M.K. Oligosaccharides as Functional Food Ingredients and their Role in Improving the Nutritional Quality of Human Food and Health. **Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.** 2, 787–802, 1998.

BIRSAN, C., P. JOHNSON, M. JOSHI, A. MACLEOD, L. MCINTOSH, V. MONEM, M.NITZ, D. R. ROSE, D. TULL, W. W. WAKARCHUCK, Q. WANG, R. A. J. WARREN, A.WHITHE, S. G. WITHERS. Mechanisms of cellulases and xylanases. **Biochem. Soc. Trans.** V.26, p.156–160, 1998.

BRODA, P. Biotechnology in the degradation and utilization of lignocellulose. **Biodegrad.** V.3, p.219-38, 1992.

BUJALANCE, C., MORENO, E., JIMENEZ-VALERA, M., RUIZ-BRAVO, A. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in

immunologically intact and immunocompromised mice. **In. J. of Food Microbiology**. v.113, p.28-34, 2007.

BURLA, G., GARZILLO, A.M., LUNA, M., ERCOLI CARDELLI, L., & SCHIESSER, A. (1992). Effects of different growth conditions on enzyme production by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. **Bioresource in Technology**, v.42, n.2, p.89-94, 1992.

BUSWELL, J.A.; ODIER, E. Lignin biodegradation. **CRC Crit. Rev. Biotechnol.** Vol. 6, n. 1, p. 1-60, 1987.

CAI, J., HUANG, S. ZENG, S. 'Studies on Conversion Corncocks Into Xylo-oligosaccharides by Fungi. **Weishengwuxue Tongbao**. v.24, p.91-94, 1997.

CALL, H.P. & MUCKE, I. History overview and applications of mediated ligninolytic systems especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). **J. Biotechnol.**, v.53, p.163-202, 1997.

CAMARERO, S.; RUIZ-DUENAZ, F.J.; SARKAR, S.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T. The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. **FEMS Microbiology Letters**. v.191, p.37-43, 2000.

CAMPBELL, J.M., FAHEY, G.C. Jr., WOLF, B.W. Selected Indigestible Oligosaccharides Affect Large Bowel Mass, Cecal and Fecal Short-Chain Fatty Acids, pH and Microflora in Rats. **J. Nutr.** v.127, p.130-136, 1997.

CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M.P.; PARAJÓ, J.C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M.. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**. v.91, p.93-100, 2004.

CARVALHO. G. Nutrição, probióticos e Disbiose. **Nutrição, Saúde & Performance**, ano 3, n.14, p. 36-37. 2001

CHANDRAKANT, P. & BISARIA, V.S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 301-309, 2000.

CHRISTOV, L.P. & PRIOR, B.A. Esterases of xylan-degrading microorganisms: production, properties and significance. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 460-475, 1993.

CLYDESDALE, F.M. Aproposal for the Establishment of Scientific Criteria for Health Claims for Functional Foods. **Nutr. Res.** v.55, p.413-423, 1997.

COLLADO, A.C., MERILUOTO, J., SALMINEN, S. *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**. v.15 n.4, p.570-575, 2006.

COTTA, M.A., & ZELTWANGER, R.L. Degradation and utilization of xylan by the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.61, n.12, p.4396-4402, 1995.

COUGHLAN, M.P. & HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: Biochemistry, molecular biology and application. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v.17, p. 259-289, 1993.

COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**. v.24, p.500-513, 2006.

COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulose materials and substrats for enzymatic conversion processes. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v.6, p. 95-123, 1976.

CRITTENDEN, R.G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligossaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, n.11, p.353-361, 1996.

CRITTENDEN, R.G.; TANNOCK, G.W. Probiotics: A critical review. **Horizon Scientific**. Wynonddhan, UK, p.141-156, 1999.

CUMMINGS, J. K.; MACFARLANE, G.; SULLIVAN, G.O. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(Suppl.), p.415-420, 2001.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. **Bioresource Technology**. v.98, p.1695-1699, 2007.

DEKKER, R. F. H. & RICHARDS, G. N. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, v. 32, p. 277 352, 1976.

DOHNALEK, M.I.H., OSTROM, K.M., HILTY, M.D. Use of Indigestible Oligosaccharides to Prevent Gastrointestinal Infections and Reduce Duration of Diarrhea in Humans, USA Patent US 5827526, 1998.

EBRINGEROVÁ, A. HEINZE, T.. Xylan and Xylan Derivatives - Biopolymers with Valuable Properties,. Naturally Occurring Xylans Structures, Isolation Procedures and Properties' in **Macromol. Rapid Commun**. v.21, p.542–556, 2000.

FAO-WHO. Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.

Working Group Rep. Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, Washington, DC, 2002.

FERREIRA, C. L.L., TESHIMA, E. Prebióticos , estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Ano III –n. 16 – set./out.p. 22-25, 2000.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v.9, p.53-61, 1999.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p.67-75, 2002.

FUJIKAWA, S. Effect of Xylooligosaccharide on Growth of Intestinal Bacteria and Putrefaction Products. **J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci**. v.44, p.37–40, 1991.

FUKUSHIMA, S. R.; HATFIELD, R. D. Espectros de duas formas de lignina obtidos por ressonância magnética nuclear. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 505 511, 2003.

FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. **Journal of applied Bacteriology**. V.66, p.365-378, 1989.

FURLAN, S.A., VIRMOND, L.J., MIERS, D.A., BONATTI, M., GERN, R.M.M., & JONAS, R. Mushroom strains able to grow at high temperatures and low pH values. **World Journal of Microbial Biotechnology**, v.13, n.6, p.689-692, 1997.

GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. **Trichoderma & Gliocladium – Enzymes, biological control and commercial applications**. Harman, G. F.; Kubicek, CP (Ed), Taylor & Francis, London, p. 311-342, 1998.

GALLAHER, D.D.; KHIL, J. The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. **Journal of nutrition**, v.129(Suppl.), p.1483-1487, 1999.

GARRO, A.S., VALDEZ, G.F., GIORI, G.S.. Temperature effect on the biological activity of *Bifidobacterium longum* CRL 849 and *Lactobacillus fermentum* CRL 251 in pure and mixed cultures grown in soymilk. **Food Microbiology**. v. 21, p.511-518, 2004.

GARROTE, G., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ , J.C. Mild Autohydrolysis: An Environmentally Friendly Technology for Xylooligosaccharide Production from Wood. **J. Chem. Technol. Biotechnol**. v.74, p.1101–1109, 1999.

GARZILLO, A. M. V., Di PAOLO, S., RUZZI, M., & BUONOCORE, V. Hydrolytic properties of extracellular cellulases from *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.476-481, 1994.

GIBSON, R.G.. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology** v. 18 p. 287-298, 2004.

GIMENEZ, P.M.A.. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogurtes**. Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 86 p.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology, New York, Ed. W.H. Freeman and Company, cap. 10, p. 335-357, 1995.

GORNY, M.F.R. Degradação de dioxinas e furanos policlorados por fungos basidiomicetos ligninolíticos e sua aplicação em processo de biorremediação. **UNICAMP**.Campinas, SP: [s.n], 2005.

GRAHAM, H.; LOWGREN, W.; PETTERSSON, D.; AMAN, P. Effect of enzyme supplementation on digestion of a barley/pollard based pig feed. **Nutrition Report International**, v. 38, p. 1073-1079, 1998.

GUGLIOTTA, A.M. & CAPELARI, M. Taxonomia de basidiomicetos.. **Zigomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas**, Bononi, V.L.R. (Org.), Instituto de Botânica, São Paulo, 184 p., 1998.

GUTIERREZ, A.N.; DEBARR, D.A.; MADDOX, S.I. Production of diacetyl from whey permeate using *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.81 n.2, p.183-184, 1996.

HARTEMINK, R.; VANLAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, Wageningen, v.383, p.367-374, 1997.

HASMANN, F. A.; CORTEZ, D. VIEIRA; PESSOA JR, A. ; ROBERTO, I. C. . Optimization of beta-xylosidase recovery by reversed micelles using response surface methodology.. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 153-160, 2003.

HERRERA, A.E.M. Produção e caracterização parcial de um composto de baixa massa molecular com atividade fenoxidásica, de *Thermoascus aurantiacus*. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas. 145p. 1995.

HESPELL, R.B., & COTTA, M. Degradation and utilization by *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c of xylan with different chemical and physical properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.8, p.3042-3050, 1995.

HOFRICHTER M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. v.30, p.454-466, 2002.

HOLT, J.G.; KEEG, N.R.; SNEATH, P. H.; STALEY & WILLIAM; S.S.T. Bergey **Manual of Determinative Bacteriology**. *Ninth edition*, William & Wilkins, Baltimore, U.S.A, 1994.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**. v.35, p.109-116, 2002.

HIDAKA, H. Effects of fructooligosaccharids on intestinal flora and human health. **Bifidobacterium Microflora**, Toio, v.5, p.37-50, 1986.

HIROYUKI, H., MASAYASU, T. TOSHIRO, S. Agent for Improving Glucose Tolerance Disorder, **Japanese Patent JP7324036**, (1995).

HYUN, C.; SHIN, H. Utilization of bovine plasma obtained from a slaughterhouse for economic production of probiotics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.86, n.1, p.34-37, 1998.

IEMBO, T.; SILVA, R.; PAGNOCCA, F.C.; GOMES, E. Production, characterization, and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. **Appl. Biochemistry and Microbiol**. v.38 n.6, 549-552, 2002.

IEMBO, T., AZEVEDO, M.O., Jr. BLOCK, C., FILHO, E.X.F. Purification and partial characterization of a new β -xylosidase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, n.9, p.949 – 957, 2005.

IMAIZUMI, K. NAKATSU, Y., SATO, M., SEDARNAWATI, Y., SUGANO, M. Effects of Xylooligosaccharides on Blood Scan. **LFRA Limited**, UK. Nakada, T. (1999). Bifidobacterium Bifidum Proliferation Promoting Composition Containing Xylooligosaccharide. USA Patent US 5939309, 1991.

JASKARI, J. KONTULA, P., SIITONEN, A., JOUSIMIES-SOMER, H., MATTILA-SANDHOLM, T., POUTANEN, K. Oat β -glucan and Xylan Hydrolysates as Selective Substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus Strains. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.49, p. 175–181, 1998.

JEONG, K.J., PARK, I.Y., KIM, M.S., KIM, S.C. High-level Expression of an Endoxylanase Gene from Bacillus Sp. in Bacillus Subtilis DB104 for the Production of Xylobiose from Xylan. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.50, p.113–118, 1998.

JOO, G. J., RHEE, I. K., KIM, S.O., RHEE, S. J. Effect of Dietary Xylooligosaccharide on Indigestion and Retarding Effect of Bile Acid Movement Across a Dialysis Membrane. **Han'guk Sikip'um Yongyang Kwahak Hoechi**. v.27, p.705– 711, 1998.

JUNG, H. G.; VOGEL, K. P. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 62, p. 1703-1712, 1986.

KALL, E.E.J., FIELD, J.A., & JOYCE, T.W. Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. **Bioresources in Technology**, v.53, n.2, p.133-139, 1995.

KANEKO, S.; SHIMASAKI, T.; KUSAKABLE, I. Purification and some properties of intracellular β -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger* 5-16. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 1161-1165, 1993.

KAO, Y., LIU, Y., SHYU, Y. Identification of *Lactobacillus* spp. In probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. **Food Research International**. v.40 p.71-79, 2007.

KARUNANANDAA, K.; VARGA, G. A.; AKIN, D. E., RIGSBY, L. L.; ROYSE, D. J. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in chemical composition and structure. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.55, p.179-199, 1995.

KAZUYOSHI, T. Production of Monosaccharide, Oligosaccharide and Solubilized Polysaccharide. **Japanese Patent JP 10117800**, 1998.

KAZUMITSU, S. Production of food and drink. **Japanese Patent JP 9248153**, 1997.

KIRK, T.K. & FARREL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**. v.41, p.465-505, 1987.

KOHARI, E.K.; AMAZONAS, M.A.L.A.; CARVALHO, F.J.P.C Potencial de crescimento micelial do fungo *Pleurotus sajor-caju* em serragem e casca de *Pinnus spp* e resíduo de infusão de erva-mate. In: **Workshop Sulamericano Sobre Usos Alternativos de Resíduos de Origem Florestal e Urbana**, Curitiba. **Anais**. Colombo: Embrapa-Florestas, p. 150-155, 1997.

KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. Microorganism and enzyme involved in the degradation of plant Fiber cell walls. In: ERIKSSON, K.-E.L., ed. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Advance. Bioch. Eg. Biotech.** v.57, p.45-125, 1997.

KUMARAN, S.; SASTRY, C.A.; VIKINESWARY, S.; Laccase, cellulose and xylanase activities during growth of *Pleurotussajor-caju* on sago " hampas". **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.13, p.43-49, 1997.

KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, p. 247-250, 1984.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G. NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 151-159, 1999.

LEONOWICZ, A.; CHO, J. LUTEREK, A.; WILKOLAZKA, A.; WOJTASWASILEWSKA, S.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J.; Fungal laccase: Properties and activity on lignin, J. **Basic Microbiol.** v.41, p.185-227, 2001.

LIZARDI, V.G.; RUBIO, H.R.; ESPUÑEZ, S.T.; CERVANTES, G.R.; CRUZ, M.P.; REYES, L.M.; ESPINOSA, A. A.; Cambio en la flora intestinal de ratones por la administración de bifidobacterias y jugos de girasol/Intestinal microflora changes in mice by bifidobacteria and sunflower juice. **Vet. México.** v.27, n.2, p.127-131, 1996.

LUH, B.S.; BARBER, S.; BARBER, C.B. Rice bran: chemistry and technology. In: LUH, B.S. **Rice-Utilization**, v.2, 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold. p.313-362, 1991.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.; PRETORIUS, I.S.. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 506–577, 2002.

LOO, J.V., CUMMINGS, J., DELZENNE, N., ENGLYST, H., FRANCK, A., HOPKINS, M., KOK, N., MACFARLANE, G., NEWTON, D., QUIGLEY, M., ROBERFROID, M., VAN VLIET, T. VAN DEN HEUVEL, E. Functional Food Properties of Non-digestible Oligosaccharides: a Consensus Report from the ENDO Project (DGXII-AIRIICT94- 1095). in **Brit. J. Nutr.** v.81, p.121–132, 1999.

LOURENS-HATTINGH. A. VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal.** v.11, p.1-17. 2001.

MACFARLANE, G.T.; GIBSON, G.R. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. **Gastrointestinal Ecosystems and Fermentation.** MACKIE, R.I; WHITE, B.A., Eds, p.269-318. Chapman and Hall, London, 1997.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Probiotics. **Best Practice e Research.** v.18, p.287-278, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRIMEN, P.; CRITTENDEN, R.; MONGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MARTEAU, P.; FLORIÉ, B. Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. **British Journal of Nutrition.** v.85 (Suppl. 1), p.817-821, 2002.

MARTÍNEZ, A.T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**. v.30, p.425-444, 2002.

MASAYASU, T., AKIRA, M., KOJI, M., TAKASHI, Y. Inhibitor of Vasodepressor and Vasopressor. **Japanese Patent JP 5194241**, 1993.

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

MODLER, H.W. (1994). Bifidogenic Factors-Sources, Metabolism and Applications. in **Int. Dairy J.** v.4, p.383-407, 1994.

MORALES, P.; MADARRO, A.; FLORES, A.; SENDRA, J. M.; PÉREZ – GONZALEZ, J. A. Purification and characterization of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 424-429, 1995.

NETO, S.L.M. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. São Paulo, 110 p. il. **Dissertação (mestrado)** -Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006.

NAKANO, H. Recente japanese development in the enzymatic production and application of oligossaccharides; apresentado no Seminar on enzyme and bacterial technology, 1998, Campinas. **Japan International Cooperation Agency**, [s.d.].

NITSCHKE, M.; UMBELINO, D. C. **Bol. SBCTA**, Campinas, v.36, n.1, p.27-34, 2002.

OKAZAKI, M., KODA, H., IZUMI, R., FUJIKAWA, S., MATSUMOTO, N. Effect of Xylooligosaccharide on Growth of Intestinal Bacteria and Putrefaction Products. **J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.** v.44, p.41-44, 1991

OKAZAKI, M., FUJIKAWA, S., MATSUMOTO, N. Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. **Bifidobacteria Microflora** v.9, p.77-86, 1990.

OIKI, K.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Growth-stimulating effects of natural rubber serum on *Bifidobacterium bifidum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.82, n.2, p.165-167, 1996.

ONISHI, N.; KIRA, I.; YOKOZEKI, K. Galactooligosaccharide production from lactose by *Sirobasidium magnum* CBS6803. **Letters in Applied Microbiology**. v.23, p. 253-256, 1996.

OUWEHAND, A., SALMINEN J. The health effects of culture milk products with viable and non viable bacteria. **International Dairy Journal**. p. 749-758, 1998.

OVEREND, R.P., CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosics by steam aqueous pretreatments. **Phil. Trans. R. Soc. Lond**, v. 321, p. 523-536, 1987.

PALMIERI, G.; GIARDINA, P.; BIANCO, C.; FONTANELLA, B.; SANNIA, G.; Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus* **Appl and Environmental Microbiology**. p.920-924, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresouce Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 81-87, 2000.

PARAJÓ, J.C., GARROTE, G., CRUZ., DOMINGUEZ, H.. Production of xylooligosaccharides by autohidrolysis of lignocellulosic materials. **Trends in Food Science & Technology**. v. 15 p.115-120, 2004.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xilitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresc. Technol.**, v. 65, p. 191-201, 1998.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal nutrition and health**. V. 6. n(1), p. 43-64, 1996.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1995. V.1, p. 343-64.

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v.33, n.2, p.385-390, 2003.

PELLERIN, P., GOSSELIN, M., LEPOUTRE, J.P., SAMAIN, E. DEBEIRE ,P. Enzymatic production of oligosaccharides from corn cob xylan. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, p.617-621, 1991.

PEREIRA JR, N. Biotecnologia de Hemicelulose. In: Enzitec 1999 – IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro. **Anais do Enzitec 99 - IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, v. 1, p. 1-5, 1999.

PINPHANICHAKARN, P., TANGSAKUL, T., THONGNUMWON, T., TALAWANICH, Y. & THAMCHAIPENET, A. Purification and characterization of *b*-xylosidase from *Streptomyces* sp. CH7 and its gene sequence analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.20, p.727–733, 2004.

POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.29, p.575-579, 2001.

POUTANEN, K.; RÄTTÖ, M.; PULS, J.; VIKARI, L. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. **J. Biotechnol.**, v. 6, p. 49-60, 1987.

PRADE, R.A. Xylanases: From biology to biotechnology. **Biotechnol. Gen. Eng. Rev.**, v. 13, p. 101-131, 1995.

PULS, J., SCHUSEIL, J. Chemistry of Hemicelluloses: Relationship Between Hemicellulose Structure and Enzymes Required for Hydrolysis. **Hemicellulose and Hemicellulases**, (Coughlan, M.P. and Hazlewood, G.P., eds), p. 1–27, Portland Press, London, UK, 1993.

PULS, J., ORNEMAN, A., GOTTSCHALK, D., & WIEGEL, J. Xylobiose and xylooligomers. **Methods in Enzimology**. v.160, p.528-536, 1988.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N. CHENG, J. QIUGANG, M.. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**. v.39, p. 561-1566, 2004.

RASTALL, A.R., GIBSON, G.R., HARSHARNJIT S.G., GUARNER, F., KLAENHAMMER, T.R., POT, B., REID, G., ROWLAND, I.R., SANDERS, M.E.. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**. v.52, p. 145-152, 2005.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; ELCHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, ed. 6, Editora Koogan. p.928, 2001.

REDDY, G;V., BABU, R., KOMARAIHAH, P., ROY, K.R.R.M., & KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process of Biochemistry**. v.38, p.1457-1462, 2003.

REGINATTO, V. Estudo das enzimas produzidas por *Trichoderma longibrachiatum* responsáveis pela degradação de material lignocelulósico. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 147p, 1992.

RINGLING, D. & VAN ALFEN, N.K. Extra and intracelular laccases of the Chestnut Blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. **Appl. Environ. Microbiol.** V.59, p.3634-3639, 1993.

RIZZATTI, A.C.S. Estudo das atividades xilanásica e β -xilosidásica produzida pelo fungo termotolerante *Aspergillus phoenicis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – FMRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, pp108, 2000.

ROBERFROID, M. B. Dietary fiber, inulin, and oligosaccharides: a review comparing their physiological effects. **Crit Rev Food Sci Nutr**, Cambridge, Inglaterra, v.33, n.2, p.103-108, 1993.

ROTHSCHILD, N., NOVOTNÝ, C., SASEK, V. & DOSORETZ, C.G. Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (Polyporus tulipiferae): isolation and characterization of lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**. v.31, p.627-633, 2002.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 42, n. 1, jan./mar., 2006

SAARELLA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J., MATTILASANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol.**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SACHSLEHNER, A.; NIDETZKY, B.; DULBE, K.D.; HALTRICH, D.. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Aclerotium rolfsii* **applied and Environmental Microbiology**. p.594-600, 1997.

SAITO, I.M. Produção de hidrolisados e fibras a partir de resíduo da industrialização da mandioca submetido a pré-tratamento hidrotérmico. Tese de doutorado. Unesp. 2005.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**. v.9, p.69-80, 1999.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.341- 347, 1998.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P., & MATEUZZI, D. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 39, p.213-219. 1998.

SCHEPPACH, W.; LUEHRS, H.; MENZEL, T. Beneficial health effects of low-digestible carbohydrate consumption. **British Journal of Nutrition**, v.85 (Suppl. 1), p.823-930, 2001.

SCHOEMAKER, H. E; HARVEY, P.J.; BOWEN, R. M.; PALMER, J. M. On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. **FEBS Letters**. v.183, p. 7-12, 1985.

SCHUCHARDT, U. e RIBEIRO, M.L. A Indústria Petroquímica no Próximo Século: Como Substituir o Petróleo como Matéria-prima? **Química Nova**. v.24, p.247-251, 2001.

SHAN, V. & NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Can. J. Microbiol.** v.48: p.857-870, 2002.

SHAO, W. & WIEGEL, J. Purification and characterization of two thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5848-5853, 1995.

SHISHIDO, K. The application of molecular genetics to oriental mushrooms. In: KINGHORN, J.R.; TURNER, G. (Eds) **Applied molecular genetics of filamentous fungi**. London: Blackie Academic and Professional, Chap.9, p.201-213, 1992.

SIEGER, C.H.N.; KROON, A.G.M.; BATELAAN, J.G.; VAN GINKEL, C.G. Biodegradation of carboxymethyl celluloses by *Agrobacterium* CM-1. **Carbohydrate Polymers**. v.27, n.2, 137-143, 1995.

SILVA, E.R. Biodegradação fúngica de resíduos agroindustriais para a produção de biomassa microbiana, enzimas ligninocelulolíticas e redução de fitatos. **UNICAMP**. Campinas, SP:[s.n], 2001.

SINGH, S.; BRAR, K.; SANDHU, D.K.; KAUR, A.; Isozyme Polymorphism of cellulases in *Aspergillus terreus*. **J. Basic Microbiol.** v.36, p.289-296, 1996.

SPIEGEL, J.E. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Techn**, Boston, v.48, p.85-89, 1994.

STAMFORD, T.L.M. Alimentos Probióticos – Uma Revisão. **Higiene Alimentar**. v. 14, n. 68-69, p. 41-50, 2000.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotech.** v.17, n(1), p.39-67, 1997.

SUWA, Y., KOGA, K., FUJIKAWA, S., OKAZAKI, M., IRIE, T. NAKADA, T. Bifidobacterium Bifidum Proliferation Promoting Composition Containing Xylooligosaccharide. **USA Patent US 5939309**, 1999.

SZKLARZ, G.D.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**. v.81, p.234-240, 1989.

TAEKO, I. Food and Drink Effective in Anti-obesity. **Japanese Patent JP 10290681**, 1998.

TAKAO, Y. YOSHIO, I.; KOICHI, N.; YASUSHI, N.; AKIRA, K.; YOSHINOBU, K. Production of Gruel-like Extract Containing Xylooligosaccharide and Food Containing the Extract and Production of Xylooligosaccharide. **Japanese Patent JP 8103287**, 1996.

TAMINE, A., MARSHALL, V., ROBINSON, R.. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**. v. 62 p. 151-187, 1995.

TIEN, M. & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science**. v.81, p.2280-2284, 1984.

TOMME, P.; WARREN, R.A.J.; MILLER, R.C.; KILBURN, D.G.; GILKES, N.R. Cellulose-binding domains: classification and properties. **ACS Symposium Series**. V618. p.143-163, 1995.

TOSHIO, I.; NORIYOSHI, I.; TOSHIKI, K.; TOSHIYUKI, N.; KUNIMASA, K. Production of Xylobiose. **Japanese Patent JP 2119790**, 1990.

TUOMELA, M., VIKMAN, M., HATAKKA, A. & ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. v.72, p.169-183, 2000.

VALASKOVÁ, V.; BALDRIAN, P.. Estimulation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. **Research in Microbiology**. v.157, p.119-124, 2006.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.

VÁZQUEZ, M.J., ALONSO, J.L., DOMINGUEZ, H., PARAJÓ, J.C.. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**. v. 11 p. 387-393, 2000.

VELAZQUEZ, M.; FEITARG, J. M. Isolation and partial physiological characterization of commercial strains of bifidobacteria. **Journal of Food Protection**. v.60, n(5), p.537-543, 1997.

VERELLEN, J.L.T.; BRUGGEMAN, G.; REENEN, V. A. C.; DICKS, T. M. L.; VANDAMME, E. Fermentation optimization of planaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. **Applied and Environmental Microbiology**. v.86, n(2), p.174-179, 1998.

VICENTE, N.E.V.; Biodegradação de bagaço de cana de açúcar por linhagens/espécie de *Pleurotus spp* e avaliação nutricional para ruminantes. **Tese de Doutorado**. Unicamp. Campinas, SP: [s.n.], 2002.

VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 13, p. 335-350, 1994.

VIKINESWARY, S.; NOORLIDAH, A.; RENUVATHANI, M.; SEKARAN, M.; PANDEY, A.; JONES, E.B.G.. Productivity of laccase in solid substrate

fermentation of selected agro-residues by *Pycnoporus sanguineus*. **Bioresource Technology**. v.97, p.171-177, 2005.

VRIES de, R.P; VISSER, J.; Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.65 n(4), p.497-522, 2001.

WITHERS, S. G. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses. **Carbohydr. Polym.** v.44, p.325–337, 2001.

WOLF, B.W., GARLEB, K.A., CAMPBELL, S.M., MEULBROEK, J.A., WHEELER, K.B., WALTON, J.E. Oral Rehydration Solution Containing Indigestible Oligosaccharides. USA Patent US 5733579, 1998.

WONG, K.K.Y.; TAN, L.U.L.; SADDLER, J.N. Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Rev.**, v. 52, p. 305-317, 1988.

WONG, K.K.Y. & SADDLER, J.N. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. **Hemicelluloses and Hemicellulases**. In: Coughlan, M.P. & Hazlewood, G.P. (Eds). Portland Press, London, 1993. p. 127-143.

WOOD, T.M. & GARCIA-CAMPAYO, V. 1994. Enzymes and mechanisms involved in microbial cellulolysis *In*: Ratledge, C. (Ed.). **Biochemistry of Microbial Degradation**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp.590, 1994.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P.R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**. v.23, p.62-68, 2007.

YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, Fukuoka, v.4, p.961-966, 1984.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, Kyungbug, v.19, p.107-117, 1996.

ZIEGLER, I. M.; HOLMGREN, A.; FORSLING, W.; LINDBERG, M.; RANHEIMER, M. Mechanism of the adsorption process of pinosylvin and some polyhydroxybenzenes onto the structure of lignin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 36, p. 65-72, 2004.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics In the Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies. **Int. Dairy J.** v.8, p.473–479, 1998.