



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**MANOELA MARTINS**

**OBTENÇÃO DE MICROCÁPSULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE  
XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DE PALHA DE CANA-DE-  
AÇÚCAR**

CAMPINAS

2020

**MANOELA MARTINS**

**OBTENÇÃO DE MICROCÁPSULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE  
XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DE PALHA DE CANA-DE-  
AÇÚCAR**

*Dissertação apresentada à Faculdade  
de Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do título de Mestra em  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS.*

Orientador: Prof. Dra. Rosana Goldbeck

Co-orientador: Prof. Dra. Ana Carla Kawazoe Sato

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO  
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA  
ALUNA MANOELA MARTINS E ORIENTADA  
PELA PROFESSORA DRA. ROSANA GOLDBECK

CAMPINAS

2020

**Agência de fomento e nº. de processo:** FAPESP, 2018/14223-5

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Martins, Manoela, 1995-  
M366o Obtenção de micropartículas simbióticas a partir de xilo-oligosacarídeos oriundos de palha de cana-de-açúcar / Manoela Martins. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Rosana Goldbeck.  
Coorientador: Ana Carla Kawazoe Sato.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Xilooligosacarídeos. 2. Microencapsulação. 3. Simbióticos. 4. Expressão heteróloga. 5. Hidrólise enzimática. I. Goldbeck, Rosana, 1982-. II. Sato, Ana Carla Kawazoe, 1980-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Obtaining synbiotic microparticles from xylo-oligosaccharides from sugarcane straw

**Palavras-chave em inglês:**

Xylo-oligosaccharides

Microencapsulation

Synbiotics

Heterologous expression

Enzymatic hydrolysis

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Rosana Goldbeck [Orientador]

Louise Emy Kurozawa

Taísa Magnani Dinamarco

**Data de defesa:** 12-02-2020

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <http://orcid.org/0000-0002-2679-4721>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6180398460240133>

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosana Goldbeck

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Orientadora

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Louise Emy Kurozawa

Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Membro Titular

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Taísa Magnani Dinamarco

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP (Ribeirão Preto)

Membro Titular

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

“Let food be thy medicine and medicine be thy food”

(Hippocrates)

## **AGRADECIMENTOS**

Créditos do trabalho realizado a todos os familiares e amigos que sempre me abençoaram e acompanharam ao longo dos meus caminhos trilhados.

Aos meus pais, Ariane e Wagner, por tudo o que fazem e têm feito por mim, pelo apoio e pela força, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos.

Ao Rogério, meu companheiro de vida, por todo auxílio, conselho e paciência, e por sempre estar do meu lado na batalha para atingir meus objetivos.

Às minhas orientadoras, professoras Dra. Rosana e Dra. Ana Carla, pelo voto de confiança para o desenvolvimento deste trabalho e pela admirável orientação e parceria.

Aos membros da banca examinadora, Professoras Dra. Taisa e Dra. Louise por todo auxílio, correções e sugestões que contribuíram para um melhor entendimento do trabalho realizado.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, aos professores pelos ensinamentos e aos funcionários pela ajuda e apoio.

Ao Professor Dr. Ogino e a Tokyo University of Agriculture and Technology, pela oportunidade e participação do programa La-CEP.

A todos os amigos e colegas de laboratório, por toda paciência, ensinamentos, parceria e companhia.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo n° 2018/14223-5, pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

## RESUMO

Resíduos agroindustriais, além de abundantes, são fonte de diversos componentes de interesse industrial, que podem ser explorados e utilizados para a produção de moléculas bioativas de alto valor agregado de maneira barata, renovável e sustentável. A palha da cana-de-açúcar gerada durante o processamento da cana é rica em xilana, passível da ação das enzimas xilanases para a produção de xilo-oligossacarídeos (XOS), de potencial prebiótico, melhorando a viabilidade de microrganismos probióticos em alimentos. O presente trabalho buscou aplicar o resíduo agroindustrial de palha da cana de açúcar para a produção de XOS por meio da ação de endoxilanase recombinante de *Cryptococcus flavescens* expressa constitutivamente em *Pichia pastoris* GS115, sendo os principais produtos de hidrólise xilobiose e xilotriose, XOS de cadeia curta com o maior potencial prebiótico, e estudar a associação destes componentes em matrizes de encapsulação de alginato e gelatina com bactérias probióticas, produzindo micropartículas simbióticas. A característica estrutural das matrizes obtidas foi avaliada por FT-IR, DRX, MEV e ensaios reológicos, e as micropartículas obtidas por gelificação iônica foram avaliadas quanto ao diâmetro e porosidade, sendo observada redução do tamanho dos poros e aumento de cristalinidade com a adição de 3% de XOS à matriz de alginato-gelatina, assim como intensificação das interações moleculares. A viabilidade dos probióticos foi analisada por ensaios “*in vitro*” de digestibilidade, bem como armazenamento refrigerado. A associação de probióticos e XOS oriundos da palha da cana promoveu maior sobrevivência dos *L. acidophilus* ao longo de todo o período de armazenamento. No ensaio de digestibilidade, os microgéis de alginato, gelatina e 3% XOS foram resistentes às condições gástricas, e permitiram a liberação gradual do organismo encapsulado no meio intestinal, seu sítio de ação, sendo observada uma redução na viabilidade de apenas 12,5%, já as micropartículas sem adição de XOS obtiveram queda de 31,55%. As avaliações morfológicas e físico-químicas mostraram que os microgéis foram eficientes para proteção dos microrganismos, garantindo a sobrevivência e viabilidade dos probióticos durante o processo de microencapsulação, resistência aos fluidos digestivos por simulação *in vitro* e estabilidade ao armazenamento.

**Palavras-chave:** Xilo-oligossacarídeos, Microencapsulação, Simbióticos, Expressão Heteróloga, Hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

Agroindustrial waste, besides being abundant, is a source of several components of industrial interest that can be explored and used to produce high value-added bioactive molecules in a cheap, renewable and sustainable way. Sugarcane straw generated during sugarcane processing is rich in xylan, susceptible to the action of xylanase enzymes for the production of prebiotic xyloligosaccharides, improving the viability of probiotic microorganisms in food. The present work aimed to apply the agroindustrial residue of sugarcane straw to the production of xylo-oligosaccharides through the action of recombinant *Cryptococcus flavescens* endoxylanase expressed in *Pichia pastoris* GS115, and study the association of these components in alginate and gelatin encapsulation matrices with probiotic bacteria, producing synbiotic microparticles. The main products of hydrolysis were xylobiose and xylotriose, short-chain XOS with the greatest prebiotic potential. The structural characteristic of the obtained matrices was evaluated by FT-IR, XRD, SEM and rheological tests. The microparticles obtained by ion gelation were evaluated for diameter and porosity, with a reduction in pore size and an increase in crystallinity with the addition of 3% XOS to the alginate-gelatin matrix, as well as intensification of molecular interactions. The viability of probiotics was analyzed by *in vitro* digestibility assays as well as refrigerated storage. The association of probiotics and XOS from sugarcane straw promoted greater survival of *L. acidophilus* throughout the storage period. In the digestibility assay, the alginate, gelatin and XOS 3% microgels were resistant to gastric conditions, and allowed the gradual release of the encapsulated organism in the intestinal environment, its site of action, with a reduction in viability of only 12.5%, and the microparticles without the addition of XOS had a drop of 31.55% in cells viability. The morphological and physical-chemical evaluations showed that the microgels were efficient for the protection of microorganisms, guaranteeing the survival and viability of the probiotics during the microencapsulation process, resistance to digestive fluids by *in vitro* simulation and storage stability.

**Keywords:** Xyloligosaccharides, Microencapsulation, Synbiotics, Heterologous Expression, Enzymatic Hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da estrutura da parede vegetal, adaptada de Santos et al., 2014.....	17
Figura 2: Estrutura de Arabinoglucoroxilana, geralmente encontrada em monocotiledôneas. Fonte: EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000. ....	18
Figura 3: Estrutura hipotética da xilana apresentando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanases. Adaptado de POLIZELI et al., 2005. ....	23
Figura 4: Mapa do vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen) utilizado para expressão heteróloga do Gene Xyn10cf.....	28
Figura 5: Relação entre glicólise e Via das Pentose Fosfato na geração de GAPDH. Adaptado de ÇALIK et al., 2015. ....	29
Figura 6: Estrutura esquemática dos Xilo-oligossacarídeos. Adaptado de CARVALHO et al. 2013. ...	33
Figura 7: Estrutura do Alginato, polímero utilizado nas matrizes de encapsulação. Fonte: BUREY et al. (2008). ....	40
Figura 8: Estrutura da tripla hélice da gelatina, material polimérico utilizado em matrizes de sistemas de encapsulação. Fonte: Burey et al. (2008).....	43
Figura 9: Esquema de interações entre alginato e gelatina. Fonte: LI et al. (2011). ....	43
Figura 10: Atividade Enzimática de endoxilanase obtida por expressão heteróloga em meio YPD e YPG. ....	59
Figura 11: Densidade Celular atingida pelas culturas de <i>P. pastoris</i> transformantes e não transformantes em meio YPD e YPG. ....	60
Figura 12: Densidade Celular e Atividade Enzimática de endoxilanase recombinante obtida no processo de batelada alimentada.....	61
Figura 13: Espectro FT-IR de Xilana extraída de palha de cana-de-açúcar e XOS oriundo de sua hidrólise.....	63
Figura 14: Quantificação de XOS após Hidrólise Enzimática de hemicelulose extraída da palha da cana empregando endoxilanase recombinante, a 50°C, 65°C e 70°C por 48 horas.....	65
Figura 15: Concentração de XOS obtido nos experimentos do DCCR. Observação: Xilotetraose (X4) não está apresentada na legenda por não ter sido quantificada em concentração significativa. ....	68
Figura 16: Superfície Resposta e curvas de contorno para a obtenção de XOS em função da concentração de endoxilanase e arabinofuranosidase .....	68
Figura 17: Curva de Escoamento das Soluções Biopoliméricas de Alginato 1%, Gelatina 1,5% e XOS (1, 3 e 5%). A legenda é apresentada na ordem, de cima para baixo.....	71
Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração Raio-X de Macrogeis, ampliação 500X..	73
Figura 19: Espectro FT-IR de Alginato, Gelatina e Blenda AG.....	74
Figura 20: Espectro FT-IR de formulações de alginato, gelatina e XOS de 1%, 3% e 5%.....	75
Figura 21: FT-IR de macrogeis obtidos pela interação de Alginato e XOS (1, 3 e 5%).....	77
Figura 22: Distribuição do Tamanho de partícula dos microgeis de alginato e alginato-gelatina com diferentes concentrações de XOS .....	79
Figura 23: Viabilidade Celular de <i>L. acidophilus</i> encapsulados ao longo de 28 dias de armazenamento. A legenda apresenta-se na ordem (de cima para baixo) em que aparece no gráfico.....	80
Figura 24: Microscopia Ótica da Micropartícula AGX3.....	82
Figura 25: Viabilidade Celular de <i>L. acidophilus</i> livres (Probiótico Livre) e encapsulados com prebiótico (AGX3) e sem prebiótico (AG), contabilizados em sua totalidade (AG e AGX3) e presentes no exterior das partículas (PE AG e PE AGX3), ou seja, liberados ao longo da simulação de digestibilidade devido a dissolução das partículas.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Vantagens e Desvantagens de Métodos de Pré-tratamento de material lignocelulósico. ....	21
Tabela 2: Faixa de valores utilizados para o DCCR. ....	51
Tabela 3: Composição Química de Palha de Cana-de-açúcar Deacetilada (CTBE BB-P048).....	62
Tabela 4: Matrix de DCCR e Concentração de XOS obtida .....	67
Tabela 5: Análise de Variância (ANOVA) para a concentração de XOS .....	67
Tabela 6: Validação experimental do modelo obtido por DCCR para a concentração de XOS.....	68
Tabela 7: Quantificação de XOS comercial utilizado para a caracterização dos macro e microgeis obtidos pela associação de XOS com alginato e alginato-gelatina. ....	69
Tabela 8: Viscosidade aparente das soluções biopoliméricas a uma taxa de deformação de $100s^{-1}$ e parâmetros de ajuste do modelo Herschel-Bulkley.....	70
Tabela 9: Distribuição do Tamanho de Partícula.....	79
Tabela 10: Eficiência do processo de encapsulação em relação à viabilidade dos probióticos.....	83

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Objetivo Geral .....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1. PAREDE VEGETAL E HEMICELULOSE .....	17
3.1.1. Pré-tratamento e Extração .....	20
3.2. ENZIMAS XILANOLÍTICAS.....	22
3.2.1. Endoxilanasas.....	24
3.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	26
3.3.1. Produção de Enzima .....	28
3.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	31
3.4.1. Prebióticos.....	32
3.4.1.1. <i>Xilo-oligossacarídeos</i> .....	33
3.4.2. Probióticos.....	36
3.4.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i> .....	37
3.5. MICROENCAPSULAÇÃO .....	38
3.5.1. Métodos de Encapsulação.....	38
3.5.2. Alginato .....	40
3.5.3. Gelatina .....	42
3.6. SIMBIÓTICOS .....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	45
4.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ENDO-1,4-XILANASE DE <i>C. flavescens</i> E PRODUÇÃO DE ENZIMA RECOMBINANTE .....	45
4.1.1. Expressão Heteróloga .....	45
4.1.1.1. <i>Extração dos Plasmídeos</i> .....	45
4.1.1.2. <i>Transformação em Pichia pastoris</i> .....	46
4.1.2. Produção da Enzima Recombinante .....	47
4.1.2.1. <i>Concentração de Enzima</i> .....	47
4.1.3. Metodologia Analítica.....	47
4.1.3.1. <i>Determinação da Proteína Total do Extrato Enzimático</i> .....	48

4.1.3.2.	<i>Determinação Qualitativa da Atividade Enzimática de Endoxilanase</i> .....	48
4.1.3.3.	<i>Determinação Quantitativa da Atividade Enzimática de Endoxilanase</i> .....	48
4.1.3.4.	<i>Determinação de Açúcares Redutores - 3,5-DNS (MILLER, 1959)</i> .....	48
4.1.3.5.	<i>Solução 2% (m/v) Xilana em 50mM tampão acetato de sódio (pH 5,3)</i> .....	49
4.2.	<b>EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE ORIUNDA DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS</b> .....	49
4.2.1.	<b>Extração da Xilana</b> .....	49
4.2.2.	<b>Caracterização da Hemicelulose</b> .....	50
4.2.2.1.	<i>Determinação de carboidratos</i> .....	50
4.2.3.	<b>Otimização da Produção de Xilo-oligossacarídeos</b> .....	51
4.2.4.	<b>Quantificação e Caracterização dos Xilo-oligossacarídeos</b> .....	52
4.3.	<b>DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE MACRO E MICROGEIS DE ALGINATO, GELATINA E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS</b> .....	52
4.3.1.	<b>Materiais</b> .....	52
4.3.2.	<b>Preparo de Soluções Biopoliméricas</b> .....	53
4.3.3.	<b>Análises das Soluções Biopoliméricas</b> .....	53
4.3.3.1.	<i>Ensaio Reológicos</i> .....	53
4.3.4.	<b>Avaliação dos Macrogeis</b> .....	53
4.3.4.1.	<i>Preparo dos Macrogeis por Difusão Salina</i> .....	53
4.3.4.2.	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i> .....	53
4.3.4.3.	<i>Difração Raio-X e FT-IR</i> .....	54
4.3.5.	<b>Avaliação dos Microgeis</b> .....	54
4.3.5.1.	<i>Preparo dos Microgeis</i> .....	54
4.3.5.2.	<i>Distribuição do Tamanho de Partícula</i> .....	55
4.4.	<b>OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DA PALHA DE CANA DE AÇÚCAR: VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> ENCAPSULADOS E SIMULAÇÃO DE DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i></b> .....	55
4.4.1.	<b>Materiais</b> .....	55
4.4.2.	<b>Ativação dos <i>Lactobacillus acidophilus</i></b> .....	56
4.4.3.	<b>Preparo de Soluções</b> .....	56
4.4.4.	<b>Produção das Micropartículas</b> .....	56
4.4.5.	<b>Caracterização das Micropartículas</b> .....	56

4.4.5.1.	<i>Viabilidade de Lactobacillus encapsulados sob armazenamento refrigerado</i> .....	56
4.4.5.2.	<i>Eficiência de Encapsulação</i> .....	57
4.4.5.3.	<i>Digestibilidade “in vitro”</i> .....	57
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
5.1.	<b>EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA</b> .....	59
5.2.	<b>EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANA</b> .....	62
5.3.	<b>OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS</b> .....	64
5.4.	<b>DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE MACRO E MICROGEIS DE ALGINATO, GELATINA E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS</b> .....	69
5.4.1.	<b>Caracterização de soluções biopoliméricas</b> .....	69
5.4.2.	<b>Avaliação dos Macrogeis</b> .....	71
5.4.3.	<b>Caracterização das micropartículas</b> .....	77
5.5.	<b>OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DA PALHA DE CANA DE AÇÚCAR: VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> ENCAPSULADOS E SIMULAÇÃO DE DIGESTIBILIDADE <i>in vitro</i></b> .....	80
5.5.1.	<b>Viabilidade Celular e Eficiência de Encapsulação</b> .....	80
5.5.2.	<b>Simulação de Digestão <i>in vitro</i></b> .....	83
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	86
7.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O processamento da cana-de-açúcar é responsável por grande parte da produção agrícola nacional, gerando subprodutos como bagaço e palha. Estes, por serem abundantes, representam fonte de matéria prima barata e renovável para produção sustentável de biomoléculas de alto valor agregado (GONÇALVES et al., 2012). São constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, materiais estruturais da parede celular (ZHANG; DONALDSON.; XIAOXUN, 2012).

A xilana é o principal componente da fração hemicelulósica da parede celular, representando até 35% da massa seca de resíduos agrícolas. Sua despolimerização depende da ação de um complexo enzimático variado, com destaque para endo- $\beta$ -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), que atuam na hidrólise da cadeia principal, catalisando a clivagem das ligações  $\beta$ -D-1,4- entre resíduos de xilose, formando xilobiose e xilo-oligossacarídeos (XOS), constituintes da fibra alimentar e parcialmente digeridos por humanos (CUI et al., 2008).

As porções não digeríveis dos XOS servem de alimentos para bactérias da flora intestinal (GIESE et al., 2011), atuando como prebióticos, estimulando crescimento e atividade de bactérias intestinais benéficas (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015), aumentando a produção de ácidos graxos voláteis antiulcerogênicos (VÁZQUEZ et al., 2000) e inibindo o crescimento de bactérias maléficas. Trata-se de uma fibra não digerível de baixa caloria que contribui, inclusive, para o retardamento da absorção de carboidratos, tendo sido relatado efeito benéfico sobre diabetes *mellitus* tipo 2 (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009; SHEU et al., 2008).

Dos organismos produtores de enzimas xilanolíticas, pretende-se explorar aqueles isolados do Bioma Brasileiro, aproveitando seu potencial. Dentre estes organismos, leveduras do gênero *Cryptococcus* têm sido amplamente estudadas a fim de se aumentar a eficiência da produção enzimática de xilanase e atividade hidrolítica (LOPES et al., 2011).

XOS oferecem vantagens quando comparados a outros oligossacarídeos em termos de estabilidade ao calor e meios ácidos (VÁZQUEZ et al., 2000), e efeitos benéficos de estimulação do crescimento de microrganismos probióticos, como *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium bifidum*, proporcionando benefícios para os sistemas digestivo e imunológico (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012; SUWA et al., 1999). Além disso, possuem sabor aceitável e não são cariogênicos (VÁZQUEZ et al., 2000). Essas características conduzem à potencial aplicação em alimentos simbióticos.

Visto que a bactéria probiótica deve ser protegida do meio adverso, a microencapsulação tem se mostrado método promissor para assegurar que uma quantidade adequada do microrganismo chegue ao seu sítio de ação, como o aumento de 22,81% da viabilidade de células encapsuladas em alginato obtido por Ribeiro e colaboradores (2014). Diversos estudos apontam a associação sinérgica de prebióticos e probióticos microencapsulados como ótimas estratégias para proporcionar melhor viabilidade ao microrganismo e estabilidade ao probiótico (CHÁVARRI et al., 2010; COOK et al., 2014).

Muitos polímeros vêm sendo usados como matriz para a elaboração de microcápsulas na indústria de alimentos, e, dentre eles, o alginato tem mostrado excelente biocompatibilidade, estabilidade em meio ácido e não toxicidade, promovendo proteção e controle de distribuição no trato gastrointestinal (COOK et al., 2011). Para contornar o problema dos poros, vários trabalhos avaliaram a interação do alginato com outros biopolímeros, como gelatina (DONG; WANG; DU, 2006; LI et al., 2011) e fruto-oligossacarídeos (SILVA et al., 2017), apresentando resultados satisfatórios na diminuição do tamanho dos poros, aumentando a eficiência de encapsulação, estabilidade e grau de proteção do organismo, devido a formação de ligações de hidrogênio e interações iônicas com o polímero, preenchendo os espaços intersticiais da matriz, tornando-a mais interconectada.

Neste sentido, acredita-se que a associação dos XOS com o alginato também proporcionará a redução dos tamanhos dos poros da matriz, garantindo estabilidade e viabilidade ao probiótico encapsulado. Ademais, devido às vantagens dos XOS já citados anteriormente, esta associação apresentará benefícios, por melhorar tanto o preenchimento dos espaços intersticiais da matriz quanto a viabilidade dos organismos encapsulados.

Em face disto, este trabalho buscou o aproveitamento do resíduo agroindustrial palha de cana, para produção de XOS e posterior desenvolvimento de partículas simbióticas passíveis de serem adicionadas em formulações alimentícias. Na primeira etapa do projeto, foi produzida a enzima xilanase a partir da expressão heteróloga de *Cryptococcus flavescens*. Esta enzima foi empregada na hidrólise da xilana da palha, produzindo XOS, agente prebiótico. A partir disso, foi realizado um estudo sobre a associação simbiótica dos XOS obtidos e bactérias probióticas, visando a produção de micropartículas simbióticas. Por meio de ensaios “*in vitro*”, foi analisada a digestibilidade das microcápsulas obtidas, avaliando resistência à hidrólise por enzimas do trato digestório, bem como o estímulo do crescimento das bactérias probióticas encapsuladas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Obter microcápsulas simbióticas a partir de xilo-oligossacarídeos (XOS) oriundos da palha da cana-de-açúcar.

### 2.2 Objetivos Específicos

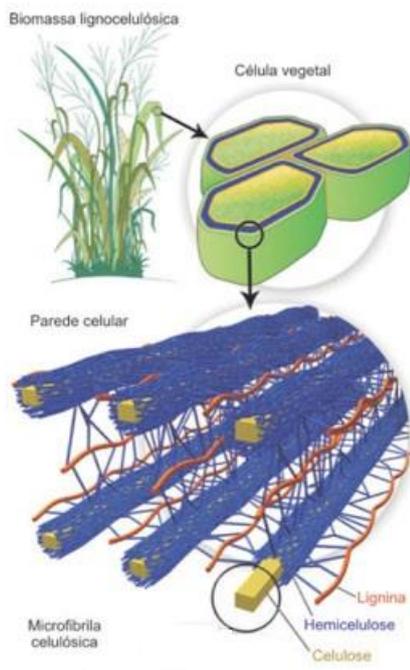
- Expressar o gene xilanolítico de *C. flavecens* LEB-AY10 em *Pichia pastoris*;
- Produzir a enzima de interesse;
- Produzir xilo-oligossacarídeos a partir da hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (hemicelulose de palha de cana de açúcar);
- Elaborar microcápsulas de alginato com atividade simbiótica contendo xilo-oligossacarídeos e *Lactobacillus*, e avaliar viabilidade e eficiência de encapsulação;
- Avaliar a influência dos XOS na viabilidade dos *Lactobacillus* ao longo da digestão “*in vitro*” das microcápsulas produzidas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. PAREDE VEGETAL E HEMICELULOSE

A ligninocelulose, principal componente da biomassa vegetal, está presente em diversos resíduos agroindustriais (bagaço, palha e cascas), cuja composição varia conforme o material. O maior constituinte é a celulose (40-50%), seguido de hemicelulose (20-30%) e lignina (10-15%), polissacarídeos que podem ser hidrolisados a produtos de interesse. O termo holocelulose se refere ao arranjo destes polissacarídeos que constituem a parede celular vegetal, estrutura complexa, responsável por conferir resistência física às plantas (WYMAN et al., 2005), cuja estrutura pode ser visualizada no esquema da Figura 1.

Figura 1: Esquema da estrutura da parede vegetal, adaptada de Santos et al., 2014.



A lignina é um polissacarídeo complexo fenólico e amorfo, constituído por unidades aromáticas, normalmente derivadas de fenilalanina. É um material hidrofóbico e altamente resistente à degradação química e biológica, apresentando resistência à hidrólise enzimática. Atua como matriz em torno da hemicelulose e celulose na parede celular das plantas, fornecendo rigidez e impermeabilidade (ANDREAUS, FILHO et al., 2008).

A celulose, o polissacarídeo de maior abundância na Terra, é um polímero cristalino altamente ordenado de celobiose. A justaposição de cadeias de celulose é mantida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Waals que mantêm o alinhamento paralelo da estrutura cristalina da microfibrila. Desta forma, a celulose é

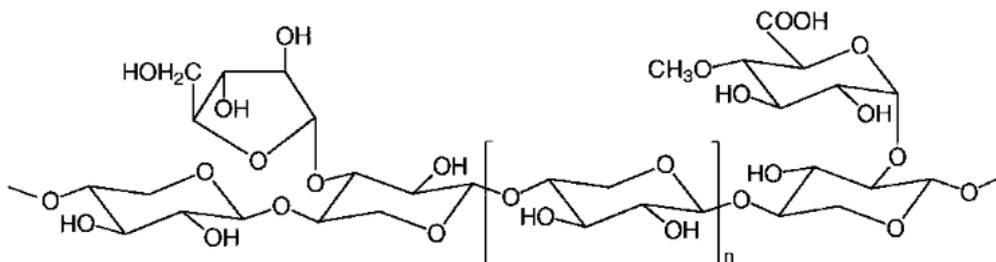
insolúvel em diversos solventes e apresenta baixa acessibilidade a ácidos e resistência à hidrólise enzimática (BALAT E BALAT, 2009).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, e suas classes são nomeadas de acordo com sua unidade de açúcar principal. Assim, se quando seu polímero é hidrolisado e libera xilose, denomina-se xilana, da mesma forma, há mananas, glucanas, arabinanas e galactanas. Porém, na natureza, geralmente a hemicelulose é uma estrutura complexa composta por mais de um polímero, sendo os mais comuns glucuranoxilanas, glucuronoarabinoxilanas, glucomananas e galactoglucomananas (POLIZELI et al., 2005).

Assim, a hemicelulose não é um componente químico bem definido, mas uma classe de componentes poliméricos das fibras das plantas, com propriedades particulares de cada composto, cuja diversidade estrutural é devido a sua funcionalidade na planta (POLIZELI et al., 2005). Estão localizadas principalmente na parede secundária, apresentando funções adesivas por formar ligações covalentes e não covalentes com a lignina, celulose e outros polímeros da parede celular essenciais a sua integridade. As xilanas são hetero-polissacarídeos de hemicelulose cuja cadeia principal é formada por  $\beta$ -D-xilopiranoses unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (BEG et al., 2001).

Em monocotiledôneas, como a cana de açúcar, consistem em cadeias lineares de resíduos de xilopiranosil unidos por ligações do tipo  $\beta$ -D-1,4, que geralmente podem ser substituídos por L-arabinofuranosil na posição 2' e/ou 3' e ácido urônico D-glucopiranosil ou o seu derivado 4-O-metil na posição 2' (KABEL et al., 2002), como ilustrado na Figura 2. Deve-se lembrar que em seu estado *in natura* apresenta-se parcialmente acetilada, tornando a etapa de pré-tratamento essencial se o objetivo é garantir uma boa extração desta hemicelulose (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

Figura 2: Estrutura de Arabinoglucoroxilana, geralmente encontrada em monocotiledôneas. Fonte: EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000.



A palha de cana-de-açúcar é um dos subprodutos do processamento de cana mais abundantes, composto por 30% de hemicelulose, sendo produzidos em torno de 140 kg (base seca) de palha por tonelada de colmo de cana-de açúcar processado. Antigamente, praticamente toda a palha era eliminada com a queimada antes da colheita, prática bastante utilizada no Brasil até a última década. Com o novo cenário de colheita de cana sem queima prévia, surge a possibilidade do aproveitamento desse material para complementar a produção de etanol em usinas alcooleiras (SANTOS et al., 2014), havendo também estudos relatando seu uso como fonte de celulose para produção de fibras têxteis (COSTA et al., 2013).

Entretanto, pouco foi explorada até o momento a aplicação de sua fração hemicelulósica. Desde a última década, os polissacarídeos de xilana tem atraído mais atenção visando aplicação dos polímeros de xilana isolados de subprodutos agroindustriais. A determinação de sua composição físico química é o que determina seu potencial uso em diferentes setores, alimentício ou não.

A variabilidade de açúcares constituintes da hemicelulose, ligações e estrutura glicosídicas, assim como os dois grupos hidroxil reativos na unidade de xilose da cadeia principal oferecem variadas possibilidades para modificações seletivas químicas e enzimáticas, criando um leque de oportunidades para exploração de valiosas propriedades da xilana (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

O aumento de conhecimento e disposição para o desenvolvimento de novos biopolímeros, além da abundante fonte de material derivado do processamento de materiais agroindustriais levará ao aumento de aplicação comercial de derivados de xilana.

O interesse em particular pelos polímeros de hemiceluloses se deve pela sua composição heterogênea, da qual, após hidrólise enzimática, pode-se obter oligossacarídeos de potencial prebiótico, como os celo-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos (GIESE et al., 2011). O desafio consiste no desenvolvimento de tratamento e coquetéis enzimáticos que tornem viável a desconstrução desse complexo e a sua bioconversão em oligossacarídeos de alto valor agregado (GONÇALVES et al., 2012).

### 3.1.1. Pré-tratamento e Extração

Devido a complexa estrutura da parede vegetal, ilustrada na Figura 1, a hemicelulose apresenta resistência à hidrólise enzimática. É crucial a etapa de pré-tratamento para tornar a biomassa menos recalcitrante e permitir o acesso das enzimas (GOLDBECK et al., 2016).

Diversos tratamentos estão disponíveis atualmente para fragmentar, solubilizar e hidrolisar e separar a celulose, hemicelulose e lignina, sendo classificados como métodos físicos (moagem, trituração, congelamento, irradiação), químicos, biológicos ou combinados. Os métodos físicos estão associados à redução do tamanho das partículas e da cristalinidade da matéria-prima, e são posteriormente combinados com outro(s) tratamento(s) (BRODEUR et al., 2011).

O principal objetivo é aumentar a superfície de contato acessível, descristalizar a celulose e remover hemicelulose e/ou lignina. As vantagens e desvantagens de alguns dos métodos mais aplicados são elencados na Tabela 1, adaptada de Brodeur e colaboradores (2011).

A xilana, tornou-se matéria prima potencial e apropriada para a produção do prebiótico xilo-oligossacarídeo. No processo de obtenção deste prebiótico, a xilana é primeiramente extraída da biomassa pré-tratada por método alcalino, o mais conveniente para recuperação de hemicelulose, combinado ou não com outro método, como o tratamento com vapor. Comparado com reagentes ácidos ou oxidativos, o tratamento alcalino parece ser o método mais efetivo para quebrar ligações éster entre lignina, hemicelulose e celulose, evitando a fragmentação dos polímeros de hemicelulose (GÁSPÁR et al., 2007).

O pré-tratamento alcalino do material lignocelulósico é eficiente para a remoção dos grupos acetila presentes, os quais são interferentes na obtenção de maiores rendimentos de XOS, além de ser prático, processado em condições brandas, sem geração de componentes tóxicos (CHANG; HOLTZAPPLE, 2000). A desacetilação tem como objetivo a remoção dos grupos acetila ligados diretamente a cadeia hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar, utilizando baixas concentrações de hidróxido de sódio, removendo grupos acetil e diferentes substituições de ácidos urônicos, aumentando a porosidade da biomassa, garantindo melhor disponibilidade de xilana para extração. É realizado a baixas temperaturas e não necessita reatores complexos (BRODEUR et al., 2011).

Tabela 1: Vantagens e Desvantagens de Métodos de Pré-tratamento de material lignocelulósico.

Método	Vantagens	Desvantagens
Alcalino	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficiente remoção de lignina;</li> <li>• Pouca formação de inibidores.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Custo dos reagentes;</li> <li>• Alteração na estrutura da lignina.</li> </ul>
Ácido	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto teor de glicose;</li> <li>• Solubilização de hemicelulose</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos custos dos ácidos;</li> <li>• Etapa de purificação;</li> <li>• Formação de inibidores;</li> <li>• Necessidade de equipamentos resistentes a corrosão.</li> </ul>
Vapor	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo-benefício;</li> <li>• Transformação de Lignina;</li> <li>• Solubilização de hemicelulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Degradação parcial de hemicelulose;</li> <li>• Catálise ácida necessária para tornar o processo mais eficiente com materiais de alto teor de lignina;</li> <li>• Geração de compostos tóxicos.</li> </ul>
Tratamento Hidrotérmico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficiente separação de hemicelulose;</li> <li>• Hidrólise de hemicelulose;</li> <li>• Não necessita catálise.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altos gastos de energia e custos;</li> <li>• Massa sólida remanescente com alto teor de celulose e lignina.</li> </ul>
Percolação com reciclo de amônia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Remove a maior parte de lignina;</li> <li>• Obtenção de alto teor de celulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto custo com energia e líquidos</li> </ul>
Fluido Supercrítico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa degradação dos açúcares;</li> <li>• Elevado custo-benefício;</li> <li>• Aumenta área disponível da celulose.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requer equipamentos que operem a altas pressões;</li> <li>• Não remove lignina e hemiceluloses.</li> </ul>

Adaptado de BRODEUR et al., 2011.

Outros pré-tratamento, como o hidrotérmico, podem levar a autocatálise da hemicelulose, gerando XOS. Entretanto, deve se ter em mente que a obtenção de XOS por hidrólise aplicando ácido concentrado e/ou sob elevadas temperaturas pode gerar compostos inibitórios indesejáveis (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009), como discutido a seguir no tópico 3.4.1.1.

A recuperação da hemicelulose depende da origem do material, incluindo o conteúdo total de lignina e sua interação com a matriz da parede celular (CHEN; LIU, 2007; WANG et al., 2010). Presença de maiores quantidades de lignina obstruem a xilana devido às ligações éster e éter com a matriz. A remoção de lignina anteriormente à extração da xilana permite maior recuperação. Até o momento, o empenho para se aumentar a eficiência de extração por aplicação de vapor ainda é limitada (AKPINAR et al., 2007), sendo a extração alcalina por NaOH ou KOH a mais utilizada por permitir elevada recuperação de hemicelulose com baixo teor de açúcares redutores e compostos indesejáveis, como hidroximetilfurfural.

A extração da xilana de subprodutos lignocelulósicos por alcalose permite a hidrólise de ligações de éster presentes na matriz lignocelulósica, seguida por extração em meio aquoso (RUZENE et al., 2008).

O material lignocelulósico resultante do pré-tratamento alcalino, no caso a palha de cana desacetilada, permite extração mais eficiente de hemicelulose, aumentando os rendimentos para obtenção de xilo-oligossacarídeos, por permitir melhor acessibilidade às enzimas xilanolíticas, apresentadas no item 3.2 a seguir. Tratamentos de baixa severidade da hemicelulose, como a hidrólise enzimática, são mais vantajosos para obtenção dos oligômeros, uma vez que tratamentos mais severos são mais eficazes para um maior rendimento de xilose (MOURE et al., 2006; NABARIATZ et al., 2007; TUOHY et al., 2003).

### **3.2. ENZIMAS XILANOLÍTICAS**

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico permite obter biomoléculas de alto valor agregado a partir das cadeias de oligossacarídeos de xilana provindas da hemicelulose (SINGH; BANERJEE; ARORA, 2015). É considerado um processo eficiente devido a seletividade e condições brandas de pH e temperatura para operação (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009). O perfil de oligossacarídeos obtido depende das enzimas utilizadas e da fonte do material.

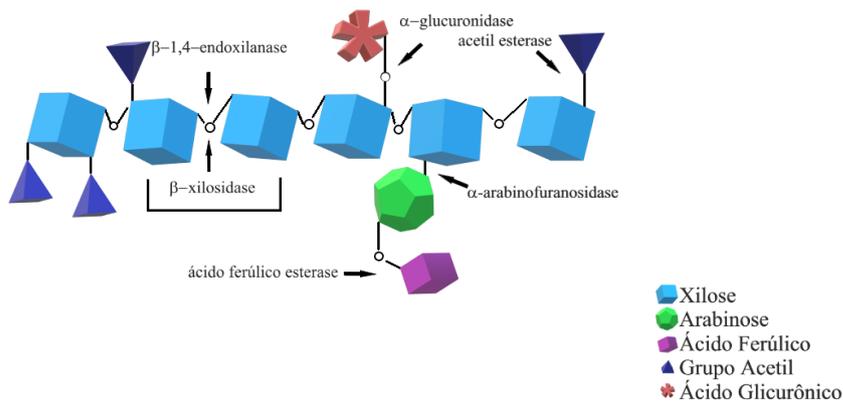
A hidrólise enzimática é mais conveniente por produzir menor quantidade de subprodutos indesejáveis e inibitórios, como o hidroximetilfurfural, e não requer equipamentos especiais (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009) e nem condições operacionais corrosivas (MARTINS et al., 2011).

Entretanto, devido à natureza heterogênea do substrato, a hidrólise enzimática da hemicelulose requer a ação de um repertório enzimático com diversas especificidades e

modos de ação (BEG et al., 2001), sendo importante o conhecimento da composição e da estrutura do material. Além disso, a hidrólise enzimática deve ser combinada com outro método de pré-tratamento, como a extração alcalina da hemicelulose, desde que em condições mais brandas, visando melhor disponibilidade do material à ação enzimática.

O sistema de hidrólise da xilana (Figura 3) é composto por um complexo de enzimas hidrolíticas (O-glicosidases hidrolases, EC 3.2.1.x), que agem cooperativamente na conversão da xilana:  $\beta$ -1,4-endoxilânase (E.C.3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidase (E.C. 3.2.1.37), acetilxilanaesterase (EC 3.2.1.72),  $\alpha$ -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidase (EC 3.2.1.139), ácido p-coumárico esterase (EC 3.1.1.-) e ácido ferúlico esterase (EC 3.2.1.73) (BEG et al., 2001).

Figura 3: Estrutura hipotética da xilana apresentando diferentes grupos substituintes com sítios de ataque por xilanasas. Adaptado de POLIZELI et al., 2005.



Como é possível observar, a endoxilânase age na cadeia principal da xilana, hidrolisando ligações  $\beta$ -1,4 entre os resíduos de xilose em xilo-oligossacarídeos variados, enquanto a  $\beta$ -xilosidase hidrolisa os xilo-oligossacarídeos em xilose. Essas duas enzimas são distintas e se diferem em síntese e localização intracelular. As demais enzimas representadas apresentam função cooperativa na hidrólise total da cadeia de xilana. As endoxilânases são secretadas ao meio, apresentando atividade extracelular, enquanto representativa atividade xilosidases são encontradas ligadas à parede celular do microrganismo (ÖZCAN et al., 1991).

As enzimas  $\alpha$ -arabinofuranosidase e a  $\alpha$ -glucuronidase removem, respectivamente, os substituintes arabinose e ácido 4-O-metil-glicurônico da cadeia de xilana. As esterases hidrolisam as ligações éster entre as unidades de xilose e ácido acético (acetil

xilana esterase) ou entre a cadeia lateral de resíduos de arabinose e ácidos fenólicos, como ácido ferúlico (ácido ferúlico esterase) (SAHA, 2003).

Uma das aplicações biotecnológicas da xilanase mais importante inclui a bioconversão de materiais lignocelulósicos e resíduos agroindustriais em produtos fermentativos para produção de biocombustível, além da utilização de hidrolisados para a clarificação de sucos e polpas (BEG et al., 2001; VIKARI et al., 1994), melhoramento da consistência de cervejas e da digestibilidade de rações animais (WONG et al., 1993).

Apesar de todo o complexo enzimático exercer importante papel na hidrólise da xilana, e devido à necessidade de introduzir as características deste grupo enzimático, as endoxilanasas apresentam maior potencial para obtenção de xilo-oligossacarídeos por atuarem na cadeia principal da xilana. Por este motivo, a presente pesquisa buscou dar continuidade aos estudos realizados com a endoxilanasase produzida por *Cryptococcus sp.* LEB-AY10, isolado do Bioma Brasileiro (ANDRADE, 2014; LOPES et al., 2011; MOTTA, 2008), por meio de sua expressão em hospedeiro heterólogo.

### 3.2.1. Endoxilanasas

As endoxilanasas são as únicas enzimas capazes de agir na cadeia principal de xilana, responsáveis pela clivagem das ligações glicosídicas ( $\beta$ -1,4) entre as unidades de xiloses, levando a formação de um açúcar hemiacetal e sua aglicona correspondente, liberando xilo-oligossacarídeos de variados graus de polimerização. São enzimas de atividade extracelular classificadas de acordo com sua estrutura primária e domínios catalíticos (COLLINS et al., 2005; ÖZCAN et al., 1991).

As xilanasas (EC3.2.1.8) estão relacionadas com as famílias 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16, 26, 30, 43, 44, 51 e 62 das hidrolases glicolíticas (GH), de acordo com CAZy (Carbohydrate Active Enzymes, <http://www.cazy.org>). As sequências classificadas nas famílias 16, 51 e 62 parecem ser enzimas bifuncionais contendo dois domínios catalíticos, porém as famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 possuem um domínio catalítico apenas, com verdadeira atividade de endo-1,4- $\beta$ -xilanasase (COLLINS et al., 2005).

Membros das famílias 5, 7, 8, 10, 11 e 43 diferem em suas propriedades físico-químicas, estrutura, modo de ação e especificidade. Geralmente, sua hidrólise pode resultar tanto na retenção (famílias GH 5, 7, 10 e 11) quanto na inversão (famílias GH 8 e 43) do centro anomérico do monômero do açúcar redutor do substrato (COLLINS et al., 2005).

As famílias 5, 7, 10 e 11 contêm enzimas que catalisam a hidrólise com retenção da configuração anomérica. Dois resíduos de ácido glutâmico responsáveis pelo mecanismo de catálise, indicando um mecanismo de duplo deslocamento, no qual um intermediário covalente é formado com a enzima e o grupamento glicosil e, em seguida, hidrolisado; e dois resíduos de ácido carboxílico localizados no sítio ativo são envolvidos na formação do intermediário, um catalisador ácido pela protonação do substrato, e o outro realiza ataque nucleofílico com liberação do grupo de saída e formação do intermediário  $\alpha$ -glicosil-enzima (inversão  $\beta$  para  $\alpha$ ). Na segunda etapa, o primeiro grupo carboxilato funciona como uma base geral, abstraindo um próton da molécula de água do nucleófilo, que ataca o carbono anomérico, levando a outra substituição, na qual o carbono anomérico novamente passa pelo estado de transição para dar origem a um produto de configuração  $\beta$  (inversão  $\alpha$  para  $\beta$ ) (COLLINS et al., 2005).

As xilanases podem ser aplicadas na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos para a formação de oligômeros conhecidos como Xilo-oligossacarídeos (XOS), os quais apresentam aplicação em produtos farmacêuticos, agrícolas, alimentícios e para alimentação animal. Entretanto, o complexo enzimático deve conter baixa atividade de exo-xilanase e  $\beta$ -xilosidase, para não produzir uma quantidade elevada de xilose, a qual inibe a produção dos XOS (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009).

A produção de xilanases por algumas espécies do gênero *Cryptococcus* já é descrita na literatura (MOROSOLI et al., 1993; PARACHIN et al., 2009; PETRESCU et al., 2000; SCORZETTI et al., 2000), entretanto, a produção de endoxilanase por *C. flavescens* foi primeiramente publicada por Lopes et al. (2011), sendo a linhagem identificada como *Cryptococcus sp.* LEB-AY10 na época da publicação.

A enzima é formada por 331 aminoácidos, tendo sua massa molecular estimada em 48kDa, podendo ser cerca de 11 kDa de glicosilação, sendo classificada como membro da família GH10. A termoestabilidade dessa enzima, que apresentou atividade ótima entre 62,5°C e 77,5°C em pH próximo de 5,3, foi o principal fator que motivou o presente trabalho a dar continuidade aos estudos de Andrade (2014) e Lopes et al. (2011) visando determinar sua potencial aplicação para produção de xilo-oligossacarídeos.

### 3.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA

O custo para obtenção das enzimas é um dos fatores que determinam a viabilidade econômica de um processo biocatalítico, podendo ser reduzido ao se determinar condições ideais para sua produção, pelo isolamento de cepas superprodutoras e pela construção de produtores eficientes utilizando técnicas de engenharia genética (BASARAN; OZCAN, 2008).

Avanços na biologia molecular e engenharia genética têm ampliado a área de aplicação de tecnologias de clonagem gênicas e DNA recombinante, oferecendo novas oportunidades de construção de microrganismos geneticamente modificados com um maquinário de enzimas selecionadas (BEG et al., 2001).

Sequência de aminoácidos, cristalografias de raio-X, dinâmica molecular e design computacional de enzimas fornecem informações que validam a relação entre sua estrutura e função, auxiliando no design de enzimas exigidas em processos industriais, proporcionando melhoria da estabilidade a temperaturas mais elevadas e pHs alcalinos (VERMA; SATYANARAYANA, 2012).

Genes que codificam diversas xilanases foram expressos em hospedeiros heterólogos a fim de atender fins comerciais, e as enzimas recombinantes mostraram propriedades equivalentes ou mesmo melhores que as enzimas nativas. A expressão heteróloga em leveduras proporciona vantagens em relação a expressão em bactérias ou fungos filamentosos, como capacidade de crescimento em densidades celulares elevadas e capacidade de secreção da enzima recombinante no meio de cultura, facilitando o processo de purificação. Além disso, não possuem toxinas e são reconhecidamente seguras (GRAS, generally recognized as safe) pela Food and Drug Administration (FDA) (AHMED et al., 2009).

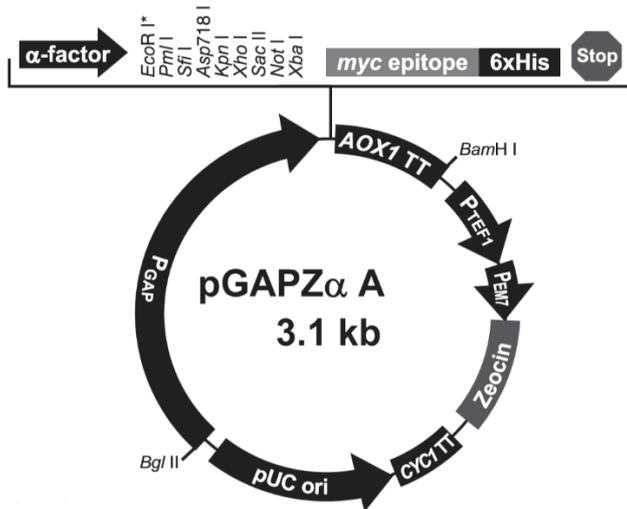
A levedura *Pichia pastoris* é considerada um excelente hospedeiro para expressão heterólogas, devido a: eficiência em secreção; elevada densidade celular alcançada em meio de cultura, o qual é de baixo custo; similaridade de técnicas necessárias para a manipulação genética com as técnicas empregadas em *Saccharomyces cerevisiae*, o modelo melhor caracterizado e já estabelecido como um organismo industrial; e aumento de escala industrial relativamente fácil (CREGG et al., 1999). Economicamente falando, para o desenvolvimento de aplicações comerciais, *P. pastoris* apresenta menores custos com licenças associadas a linhagens ou vetores (POTVIN et al., 2012).

A baixa produtividade específica de *P. pastoris* é compensada pela elevada densidade celular atingida em cultivo, garantindo eficiente produção de proteínas recombinantes, que, quando secretadas, apresentam facilidade de recuperação e purificação. O método de cultivo afeta diretamente a eficiência de produção e, portanto, a viabilidade econômica do processo. A cinética de produção da proteína recombinante é altamente dependente das condições de cultivo, carecendo análise econômica cuidadosa no momento de se desenhar o modelo do processo (POTVIN et al., 2012).

Diversos promotores indutivos e constitutivos foram identificados. Promotores constitutivos do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH),  $P_{GAP}$ , responsável pelo caminho da glicólise e gliconeogênese, é um dos promotores referência amplamente utilizado para expressão constitutiva de proteínas recombinantes. A GAPDH (EC 1.2.1.12) está constantemente expressa e em altos níveis, uma vez que ela está envolvida tanto na glicólise quanto na gliconeogênese.  $P_{GAP}$  é geralmente utilizado para a expressão de proteínas que não inibam ou que não sejam tóxicas ao crescimento de *P. pastoris*, visto que a produção de proteína recombinante é proporcional à quantidade de massa celular obtida (WATERHAM et al., 1997).

Os plasmídeos integrativos utilizados nos sistemas de expressão dirigidos por  $P_{GAP}$  são pGAPZ, para produção intracelular, e pGAPZ $\alpha$  (fator  $\alpha$  sinal para secreção de *S. cerevisiae*), para produção extracelular, com o marcador de resistência ao antibiótico Zeocina (CREGG, 1999). Além disso, podem ser utilizadas sequências adicionais no peptídeo C-terminal com o intuito de otimizar o processo *downstream*, como por exemplo uma sequência peptídica de poli-histidina (6xHis), ou uma sequência de reconhecimento de anticorpo (Figura 4). A adição destes peptídeos permite detecção e isolamento da proteína com técnicas e ferramentas simples, como kits de purificação. A sequência adicional deve exercer efeito mínimo sobre a estrutura terciária, não alterar a função biológica da proteína e permitir fácil purificação (LOGEZ et al., 2012).

Figura 4: Mapa do vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen) utilizado para expressão heteróloga do Gene Xyn10cf.



A preferência pelo uso de  $P_{GAP}$  ao invés de  $P_{AOX1}$ , promotor metanol oxidase, o mais utilizado industrialmente, é devido principalmente ao fato de sua expressão ser livre do uso de metanol, substituindo-o por fontes de carbono seguras e mais sustentáveis. Outro problema do metanol é a limitação do oxigênio dissolvido, o que reduz a proliferação celular (ÇALIK et al., 2015). Importante destacar que, ao optar-se por  $P_{GAP}$ , intensa investigação das condições de operação deve ser realizada, uma vez que não existe uma estratégia operacional bem definida.

### 3.3.1. Produção de Enzima

Devido ao rápido crescimento, meio de cultura barato e seu elevado grau de secreção de proteínas recombinantes no meio de fermentação, *P. pastoris* se tornou um sistema popular de expressão heteróloga, produzindo proteínas recombinantes funcional e estruturalmente corretas, especialmente as derivadas de organismos eucariotos (ÇALIK et al., 2015).

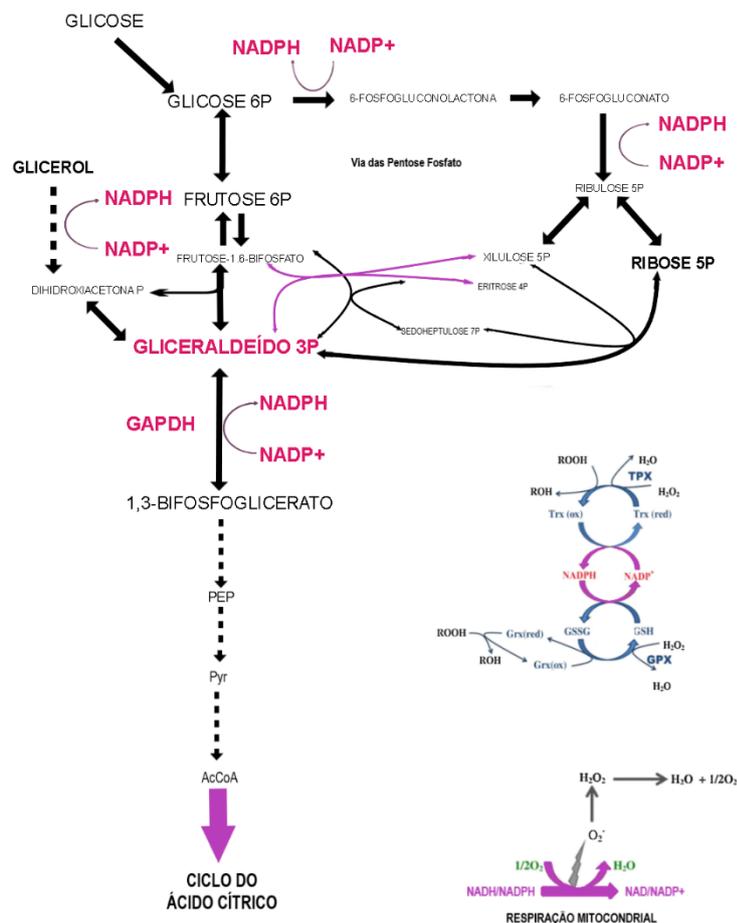
Recentemente, o promotor constitutivo GAP foi desenvolvido com níveis de expressão comparáveis com o promotor AOX1, e o metanol não é mais necessário para a indução da expressão da proteína recombinante. Proteínas humanas como angiostatina (ZHANG et al, 2007) hGM-CSF (PAL; KHUSHOO; MUKHERJEE, 2006) e Fab (GARCIA-ORTEGA et al., 2013) já foram expressas com sucesso utilizando o sistema de expressão  $P_{GAP}$ .

Porém, o nível de expressão varia significativamente dependendo da proteína a ser expressa e condições de cultivo. Como a produção de proteínas recombinantes é frequentemente elevada a nível transcricional, ela afeta diretamente o metabolismo primário

das células, fazendo-se necessário determinar parâmetros de otimização do processo fermentativo. Composição do meio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura e pH são parâmetros que influenciam a qualidade e a quantidade da produção da proteína recombinante (WATERHAM et al, 1997).

Em sistemas de expressão constitutiva, alta taxa de crescimento celular elevam a produção de proteína recombinante por direcionar a fonte de carbono para a formação de produto. Para se otimizar a produção, o fluxo molecular de carbono deve ser direcionado para o caminho da glicólise para acelerar a síntese de GAPDH. A relação entre o metabolismo central de carbono e o balanço redox pode ser observado na Figura 5 (ÇALIK et al., 2015).

Figura 5: Relação entre glicólise e Via das Pentose Fosfato na geração de GAPDH. Adaptado de ÇALIK et al., 2015.



As melhores fontes de carbono para P<sub>GAP</sub> são glicerol e glicose (ÇALIK et al., 2015). Devido ao menor custo do glicerol, comparado com a glicose, e dado não haver diferença significativa nos perfis de crescimento celular com ambas as fontes, de forma a não

haver um consenso sobre qual fonte é melhor, cultivos utilizando glicerol são geralmente mais atraentes economicamente (POTVIN et al., 2012).

Entretanto, há controversas, visto que a capacidade máxima de transferência de oxigênio é um dos fatores limitantes que podem influenciar no nível de expressão da proteína recombinante. A suplementação de ar em baixa escala é uma estratégia para se contornar o problema, porém, em escala industrial, põe em risco a segurança, além da viabilidade econômica. A literatura avalia este parâmetro considerando diversas fontes de carbono, e comparando-se glicose e glicerol, as melhores fontes para  $P_{GAP}$ , observa-se clara diferença: para glicose,  $0.022 \text{ mol O}_2 \text{ gX}^{-1}$  (BAUMANN et al., 2010), e para glicerol,  $0.043 \text{ mol O}_2 \text{ gX}^{-1}$  (SOLA et al., 2007), praticamente o dobro.

Além disso, embora o gene GAP seja constitutivamente transcrito tanto em meio de glicose quanto de glicerol, os níveis de mRNA em meio contendo glicerol são  $2/3$  dos níveis observados em células que cresceram em meio contendo glicose como fonte de carbono. Em sistemas de expressão constitutiva, alta taxa de crescimento celular elevam a produção de proteína recombinante por direcionar a fonte de carbono para a formação de produto. Para se otimizar a produção, o fluxo molecular de carbono deve ser direcionado para o caminho da glicólise para acelerar a síntese de GAPDH (WATERHAM et al., 1997). Partindo desta perspectiva, a glicose mostra importante vantagem sobre o glicerol.

A concentração de oxigênio dissolvido geralmente é mantida entre 20-30%, sob constante agitação. O requerimento de oxigênio depende da densidade celular: sob baixas densidades, um ambiente totalmente aeróbico pode ser alcançado apenas com a aeração do reator, e densidades mais elevadas podem resultar em um ambiente de hipóxia (ÇALIK et al., 2015; BAUMANN et al., 2011), o que leva ao acúmulo intracelular de NADPH devido a limitação da capacidade oxidativa, e portanto desbalanço redox (GARCIA-ORTEGA et al., 2013).

Um dos maiores problemas encontrados em sistemas de expressão de proteínas recombinantes por *P. pastoris* é a degradação proteolítica dos produtos. Das estratégias que podem ser aplicadas para minimizar o problema, a otimização das condições de temperatura e pH mostrou ser eficaz na redução da atividade de proteases e estabilização dos produtos recombinantes (POTVIN et al., 2012).

Em relação ao pH, a condição ótima é produto-dependente, e o pH da cultura pode afetar tanto a estabilidade da proteína recombinante quanto a atividade de proteases degradadoras do produto. O pH 6,0 mostrou-se ser a condição ótima em diversos estudos, nos

quais foi constatada a diminuição da atividade de proteases (ÇALIK et al., 2015; HU et al., 2008). A faixa de temperatura geralmente é restrita, entre 25°C e 30°C. Utilizar uma temperatura menor é uma estratégia para aumentar a solubilidade do oxigênio, o que em partes favorece o crescimento celular, além de diminuir a velocidade de reações intracelulares e, portanto, reduzir a atividade proteolítica, entretanto diminui a taxa de crescimento celular, reduzindo o nível de expressão da proteína recombinante (WATERHAM et al., 1997; ÇALIK et al., 2015).

A alimentação é realizada geralmente sob altas concentrações de substrato suplementada com uma solução de sais traço. A vazão deve ser calculada conforme balanço de massa para garantir conveniente consumo dos elementos (ZHANG et al., 2009).

A partir destas informações, é possível elaborar uma estratégia inicial visando a produção da proteína recombinante em escala de reator de bancada. Entretanto, intensa investigação das condições para otimização se faz necessária.

#### **3.4. ALIMENTOS FUNCIONAIS**

O aumento da consciência alimentar e a mudança de perfil do consumidor conduz a uma preferência por moléculas bioativas de origem natural para atuação como agentes terapêuticos para prevenção e manutenção da saúde. Estes compostos bioativos trabalham sob a premissa de que “a prevenção é melhor que a cura” e exibem benefícios aumentando qualidade e expectativa de vida aos consumidores regulares (SAARELA et al., 2002).

Devido às propriedades benéficas à saúde quando devidamente consumidos, a busca por alimentos com atributos adicionais ao seu perfil nutricional vem se intensificando, o que atrai maior atenção para novas tecnologias na indústria de alimentos que atendam à demanda, possibilitando o desenvolvimento de alimentos funcionais (SAAD, 2006).

Neste contexto, embora diversos compostos biologicamente ativos tenham sido testados, os prebióticos parecem ser os preferidos por demonstrar efeitos benéficos sobre diversas funções fisiológicas, como o estímulo seletivo ao crescimento de microrganismos que compõem a flora intestinal, melhoria na absorção de nutrientes, imunomodulação, propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas etc (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Muitos estudos estão sendo desenvolvidos a partir da associação destes ingredientes com probióticos para aplicação em uma maior variedade de alimentos. Os produtos de associação entre probióticos e prebióticos são conhecidos como simbióticos, uma

vez que os prebióticos potencializam a viabilidade de bactérias probióticas, por atuarem como substrato prontamente disponível para metabolização (SAAD, 2006).

### 3.4.1. Prebióticos

Componentes alimentares não digeríveis, os prebióticos possuem a capacidade de estimular seletivamente o crescimento de bactérias desejáveis no cólon intestinal, inibindo a proliferação de patógenos. Para serem classificados como prebióticos, estes componentes devem atender critérios, como: não ser hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal superior; atuar como substrato para um número limitado de bactérias benéficas presentes no cólon, estimulando seu crescimento e/ou metabolismo; favorecer a flora benéfica; além de promoverem benefícios à saúde do hospedeiro (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

São nutrientes indispensáveis, pois também contribuem para o aumento do volume fecal e redução no tempo de trânsito intestinal. Além disso, seu consumo contribui para produção de metabólitos essenciais, por atuarem como substratos na produção de ácidos graxos de cadeia curta, que auxiliam a nutrição das células do cólon (LOSADA; OLLEROS, 2002).

Carboidratos não digeríveis (oligo e polissacarídeos), peptídeos e certos lipídeos são candidatos a prebióticos, estimulando seletivamente bactérias benéficas residentes no cólon, como as bifidobactérias e lactobacilos, além da capacidade de inibir a multiplicação de patógenos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Apresentam maior atividade no intestino grosso, podendo também atuar sobre a microbiota do intestino delgado (SAAD, 2006).

O impacto dos prebióticos sobre a proliferação de bactérias benéficas no cólon intestinal é representado pela produção de metabólitos como o butirato, molécula que desempenha papel crítico da mucosa intestinal na prevenção de câncer de cólon de intestino (GULLÓN et al., 2011; TUOHY et al., 2005; SCOTT et al., 2014).

Fibras solúveis, como os xilo-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos, são componentes alimentares essenciais que estimulam a proliferação de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de inclusive atuarem como substrato para produção de metabólitos essenciais como ácidos graxos de cadeia curta, que auxiliam a nutrição celular no cólon (LOSADA; OLLEROS, 2002).

Embora oligossacarídeos estejam disponíveis como emulsificantes de baixa caloria desde os anos 80, os prebióticos baseados em oligossacarídeos têm ganhado muito

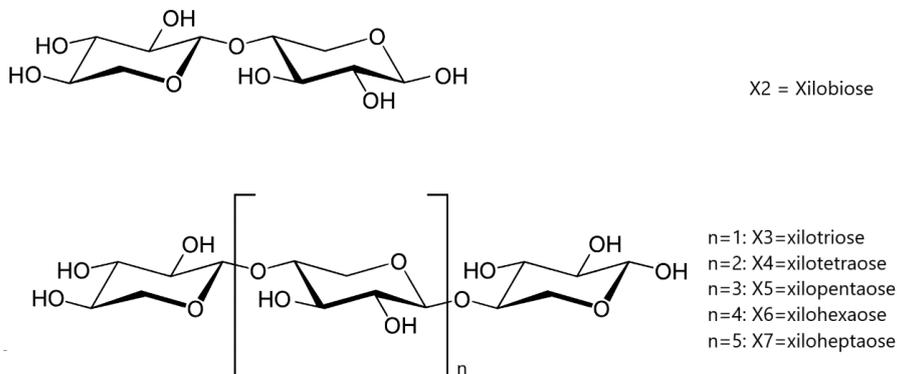
interesse recentemente devido à descoberta de benefícios multidimensionais. Dentre os compostos prebióticos, os xilo-oligossacarídeos (XOS) se mostram promissores, uma vez que estes podem ser provenientes de resíduos agrícolas de baixo custo, abundantes e renováveis na natureza.

### 3.4.1.1. Xilo-oligossacarídeos

Grande interesse tem atraído a produção a partir de fontes renováveis de xilo-oligossacarídeos (XOS), oligômeros de xilose de baixo grau de polimerização ( $DP < 20$ ), cujas unidades são unidas por ligações  $\beta$  1-4 (Figura 6) (SAHA, 2003), com a finalidade de se obter novos produtos adoçantes e funcionais a serem adicionados em formulações alimentícias de maneira barata e sustentável (FARYAR et al., 2015).

XOS derivados de diferentes matérias-primas podem se apresentar com uma cadeia lateral derivado de acetil, 4-O-metil ou arabinofuranosil, sendo, nesse caso, ser denominado XOS ramificados (AACHARY; PRAPULLA, 2008; SAMANTA et al., 2015).

Figura 6: Estrutura esquemática dos Xilo-oligossacarídeos. Adaptado de CARVALHO et al. 2013.



Possuem efeito prebiótico, visto que não são absorvidos nem hidrolisados na parte superior do trato gastrointestinal e estimulam seletivamente o crescimento de microrganismos no cólon benéficos a saúde (VÁZQUEZ et al., 2000), tendo sido relatada uma retenção de até 75% na viabilidade de bactérias probióticas incubadas sob refrigeração por quatro semanas (BRUNO et al., 2002).

Ademais, a pesquisa realizada por Chen e colaboradores (2012) evidenciou pela primeira vez a indução na produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e NO pelos XOS em macrófagos não estimulados e sua inibição dose-dependente em macrófagos estimulados por LPS (lipopolissacarídeo componente da membrana celular externa de

bactérias gram-negativas). Estes efeitos podem explicar as atividades imunomoduladoras dos XOS.

Evidências também mostram propriedade anticarcinogênica: a aplicação de XOS reduziu significativamente as lesões pré-cancerígenas induzidas por 1,2-dimetilidrazina em ratos, sendo sua suplementação mais eficiente que os fruto-oligossacarídeos na estimulação de probióticos (HSU et al., 2004).

Em uma pesquisa realizada por Gobinath e colaboradores (2010), ratos saudáveis e diabéticos foram submetidos a uma dieta contendo de 5 a 10% de XOS, exibindo significativo aumento na população de Bifidobactérias e Lactobacilos. O aumento da população da microflora foi acompanhado por diversas mudanças no trato intestinal, como a diminuição do pH fecal e aumento do peso fecal total. A redução do pH pode ser atribuída a produção de ácidos graxos de cadeia curta gerados pela fermentação seletiva dos prebióticos pelas bactérias benéficas da microflora (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

A quantidade ideal de XOS para que seus benefícios sejam efetivos depende de numerosos fatores. A dose recomendada segundo Oku e Sadako (2002) é de 0,12g por quilograma de peso corporal. Wang e colaboradores (2011) evidenciaram que uma dieta constituída por 5% de XOS alivia os sintomas do estresse oxidativo gerado por uma dieta rica em gordura, havendo significativa redução na atividade de glutathione oxidada e aumento na atividade de glutathione reduzida, glutathione peroxidase, catalase e dismutase no sangue, fígado e coração de ratos, além de ser observada também redução dos níveis de colesterol ruim e triglicerídeos. Em outro estudo, uma singela significativa redução de colesterol foi evidenciada em mulheres que consumiram regularmente 2,7g de XOS diário (NA; KIM, 2007).

Seja como ingredientes alimentícios ou modulando a função intestinal, o consumo de XOS pode ser capaz de aumentar a imunidade inata e proteger contra doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias crônicas. Em suma, contribuem para a manutenção da saúde gastrointestinal, redução do colesterol e melhoria da disponibilidade biológica de cálcio (CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012). Além disso, apresentam efeito de retardamento da hidrólise de carboidratos no trato digestivo, contribuindo para o controle dos níveis de açúcar do sangue (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009; SHEU et al., 2008; VÁZQUEZ et al., 2000).

A maioria dos XOS apresentam sabor e odor aceitáveis, além de serem não-cariogênicos e de baixa caloria. São estáveis em ampla faixa de temperatura e pH, de 2,5 a 8,

vantagem sobre outros oligossacarídeos não digeríveis, como fruto-oligossacarídeos, tornando possível sua incorporação em sucos ácidos, águas carbonatadas e produtos que passam por processo de aquecimento (VÁZQUEZ et al., 2000).

Além disso, o efeito de retardamento da hidrólise e absorção de carboidratos no trato digestivo controla os níveis de açúcar do sangue, podendo efetivamente ter aplicação em dietas controladas para diabéticos, por exemplo; e baseado no seu efeito prebiótico, alimentos simbióticos têm sido formulados (VÁZQUEZ et al., 2000).

Recentemente, nota-se um interesse crescente em novos prebióticos como XOS visando não apenas o consumo por humanos, mas também uma alternativa para o uso de antibióticos em animais de criação, como porcos e frangos, pois o uso em excesso de antibióticos aumentou linhagens de patógenos super-resistentes, e há possibilidade de se encontrar resíduos de antibióticos nas carnes (CASTRO-SOLLA et al., 2007; CARVALHO et al., 2013).

Atualmente não há grande preocupação relativa à quantidade máxima segura que se pode consumir ou adicionar em alimentos sem que surjam efeitos adversos devido ao histórico de consumo consistente e inerente benefício. Em modelos animais, dietas contendo uma faixa de 7 a 10% de XOS não exibiram qualquer efeito adverso (GOBINATH et al., 2010; HSU et al., 2004). E em outro estudo com humanos, relatou-se que os benefícios dos XOS são obtidos pelo consumo diário de 2 a 5g (KOBAYASHI et al., 1991).

A produção de XOS pode contribuir para a indústria de alimentos por ser um importante ingrediente funcional com múltiplos benefícios. XOS estão presentes naturalmente em alimentos como mel, broto de bambu, frutas e legumes, entretanto sua concentração é inadequada para exibir efeitos prebióticos. Por este motivo, sua produção a partir de resíduos agroindustriais representa uma adição no valor econômico destes produtos (SAMANTA et al., 2015).

Como o nome sugere, a precursora dos xilo-oligossacarídeos é a xilana. Este polissacarídeo constitui geralmente de 25 a 35% da biomassa seca lignocelulósica, podendo representar até 50% em alguns tecidos de grãos de cereais, e sua constituição varia com a fonte (SAHA, 2003).

Estudos sobre fontes de xilana são de grande importância para a descoberta de substratos ricos que aumentem a eficiência de produção de XOS, além de tornar o processo mais viável economicamente. Atualmente têm-se avaliado a extração de xilana de diversos resíduos e subprodutos lignocelulósicos. Dentre os diversos métodos, a extração alcalina,

podendo ser acoplada com o tratamento a vapor, resultou em uma recuperação maior que 90% do teor original de xilana presente nos biomateriais (SAMANTA et al., 2015). A extração alcalina utilizando 24% KOH e 1%  $\text{NaBH}_4$  de hemicelulose de palha de trigo recuperou 20,6% do total de massa seca do material (AKPINAR; ERDOGAN; BONSTANCI, 2009).

Seguindo este propósito, a obtenção de XOS a partir de biomassa lignocelulósica pode ser proveniente de processos físico (auto hidrólise sob elevadas temperatura e pressão), químico, empregando ácidos, e enzimático (SAMANTA et al., 2015). O processo enzimático apresenta a vantagem de ser operado em condições brandas, dispensando o uso de solventes, conferindo menor produção de subprodutos inibidores ao crescimento de probióticos, como hidroximetilfurfural. A preparação enzimática com baixa atividade de exoxilanasas e alta atividade de endoxilanasas possibilita maximização da obtenção de XOS, minimizando a produção de xilose.

Assim, XOS produzidos a partir de hidrolisados de hemicelulose aumentam a eficiência energética das matérias primas de usinas de conversão de material lignocelulósico, com o objetivo de alcançar relevante impacto econômico-ambiental em setores industriais de onde a matéria prima se origina.

### **3.4.2. Probióticos**

Bactérias probióticas são componentes bioativos passíveis de incorporação em alimentos, e, quando consumidas em quantidades adequadas, proporcionam benefícios que vão desde a regulação intestinal até prevenção de câncer. Bactérias lácticas são as mais importantes conhecidas e adicionadas em alimentos, principalmente bebidas lácteas. Por competirem no intestino com demais organismos, seus benefícios incluem ação contra infecções, estimulação do sistema imunológico, supressão de proliferação de organismos patogênicos, redução dos efeitos de intolerância à lactose, ação antimutagênica etc. (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; SAAD, 2006).

Para atingir os benefícios farmacêuticos, um alimento probiótico deve conter pelo menos  $10^6$  UFC/g ou a ingestão diária deve atingir um mínimo de  $10^8$  UFC, entretanto estes números variam de espécie para espécie (CHÁVARRI et al., 2010; DOUGLAS; SANDER, 2008).

Muitos estudos indicam que há redução de viabilidade destes organismos em produtos que contêm suas células livres (DE VOS et al., 2010), devido a condições de processamento, armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal (KALAISAPATHY, 2002). Providenciar uma proteção a estas células de forma a servir como

uma barreira contra as condições adversas do ambiente, como oscilações no pH, oxidação e desidratação, é, portanto, uma abordagem de interesse atual para garantir que os probióticos estejam metabolicamente estáveis e ativos tanto no produto quanto no hospedeiro para que seus benefícios sejam alcançados (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014).

#### **3.4.2.1. *Lactobacillus acidophilus***

*Lactobacillus* spp. são gram-positivas classificadas como bactérias anaeróbias facultativas. Este gênero contém cerca de 56 espécies, dentre as quais, uma das mais indicadas para dietas alimentares, *Lactobacillus acidophilus*. Estas bactérias são classificadas como anaeróbias e homofermentativas estritas, por produzirem ácido lático como resultado da fermentação de carboidratos, proteínas, vitaminas do complexo B, ácidos graxos livres e minerais. Apresentam 0,6 a 0,9  $\mu\text{m}$  de largura e 1,5 a 6,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, e são intolerantes à presença de sais. Crescem melhor em ambiente anaeróbico, pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 5,5 e 6,0, podendo resistir a pH inferiores a 4,0, e sua temperatura ótima de atuação se encontra entre 35 a 40°C (ANJUM et al., 2014; GOMES; MALCATA, 1999).

O ácido lático produzido cria um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos devido a redução do pH do meio. Além disso, *Lactobacillus acidophilus* produz um antimicrobiano natural, denominado bacteriocinas, que auxilia na manutenção da flora bacteriana saudável (ANJUM et al., 2014), tratando-se, portanto, de um organismo probiótico.

A adição destes organismos em alimentos está associada a benefícios à saúde, como diminuição do colesterol no sangue, do risco de mutagenicidade e carcinogenicidade, constipação, diarreia, intolerância à lactose, entre outros (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Por estes motivos, organismos probióticos vêm sendo empregados na formulação de alimentos funcionais. Entretanto, considerável diminuição da viabilidade durante processamento ou armazenamento destes alimentos, como variações de temperatura e pH, ou até mesmo durante a digestão, pela exposição à acidez gástrica e sais biliares, podem provocar redução na viabilidade, fazendo com que os probióticos não alcancem o cólon em quantidades suficientes para atribuição dos benefícios associados (PADILHA, 2013).

A técnica da microencapsulação confere maior proteção aos probióticos, sendo potencial solução para melhorar a viabilidade destes microrganismos em alimentos (DING; SHAH, 2009). Além disso, bactérias probióticas, quando encapsuladas, adquirem proteção às condições ácidas do estômago e também tolerância aos sais biliares (RAVULA; SHAH, 1999;

SULTANA et al., 2000), além de diminuir os efeitos tóxicos do oxigênio (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2003). García-ceja e colaboradores (2015) avaliaram a adição de microcápsulas probióticas de alginato e quitosana em diferentes formulações alimentícias, como leite, néctar de pêssago e geleia de amoras, mostrando que tais matrizes de alginato e quitosana proporcionaram melhor proteção dos probióticos sob armazenamento em temperaturas de refrigeração.

### **3.5. MICROENCAPSULAÇÃO**

A encapsulação é frequentemente procurada como forma de proteger os agentes probióticos em matriz inerte, e assim melhorar sua viabilidade e proporcionar uma liberação controlada no sítio de ação do trato digestivo. Diversos materiais podem ser adotados como matriz, a exemplo de carboidratos, lipídeos e polímeros. Esta técnica já é aplicada para proteção de inúmeros compostos bioativos em alimentos, com a finalidade de controlar reações oxidativas, mascarar odores e sabores, prover liberação sustentada do composto encapsulado e aumentar a vida de prateleira do produto (CHÁVARRI et al., 2010).

Em especial caso dos probióticos, sua aplicação se deve à necessidade de proteger os organismos das condições de processamento do alimento, como temperatura de operação, oxidação, armazenamento e desidratação ou secagem, e degradação no trato gastrointestinal (pH ácido do estômago e sais biliares do intestino) (ANAL; SINGH, 2007; CHÁVARRI et al., 2010).

A micropartículas são compostas por uma membrana semipermeável esférica, com diâmetro variando de alguns micrômetros até 1 mm, capaz de reter em seu interior as células (ANAL; SINGH, 2007). Em geral, seu pequeno tamanho pode reduzir problemas de transferência de massa, e os nutrientes podem difundir pela membrana. As células encapsuladas são então liberadas por mecanismos de ruptura, dissolução ou difusão pela parede da partícula (KAILASAPATHY, 2002).

#### **3.5.1. Métodos de Encapsulação**

O processo de encapsulação a ser escolhido deve levar em consideração a aplicação da microcápsula, o tamanho desejado, perfil de liberação e propriedades físico-químicas e biológicas, tanto do agente encapsulante quanto do encapsulado (COOK et al., 2012).

Diversas técnicas de encapsulação de probióticos são encontradas na literatura, entre as mais utilizadas estão à técnica de *spray-drying* e *spray-chilling*, que passam por processo de atomização (ANAL; SINGH, 2007).

Dos métodos de encapsulação, o *Spray-drying* é o mais comumente utilizado industrialmente por poder ser operado de maneira contínua (JACKSON; LEE, 1991). Desvantajosamente, a temperatura elevada não torna o processo adequado para a encapsulação de bactérias probióticas (KAILASAPATHY, 2002).

Uma alternativa é a da técnica de atomização, que envolve projetar o núcleo e o material de parede através de um bocal sob alta pressão, formando gotículas cujo diâmetro varia de 0,3mm a 3,0 mm, possibilitando a formação de hidrogeis pela difusão do agente através das gotas formadas, sem a utilização de emulsificantes e altas temperaturas (ZHANG et al., 2007b).

Os hidrogeis podem ser obtidos a partir de diferentes mecanismos, como gelificação iônica e gelificação a quente ou a frio. A gelificação consiste na reticulação dos grupos carboxílicos da cadeia polimérica do hidrocoloide, formando zonas de junção que são a base para a estrutura tridimensional dos géis, que é influenciada por parâmetros como temperatura, presença de íons e a própria estrutura polimérica (BUREY et al., 2008).

O processo de gelificação iônica ocorre por duas maneiras: gelificação interna ou externa, também denominada difusão. A gelificação interna envolve a dispersão da fase aquosa contendo o agente de reticulação em sua forma inativa e biopolímero. A ionização do agente reticulante, mediante redução do pH por adição de ácido, resulta na gelificação pela reação com o biopolímero (COOK et al., 2012; HU; AZADI; ARDEKANI, 2015).

Já na gelificação externa, os microgeis podem ser formados a partir da atomização ou extrusão da solução contendo o biopolímero e o agente reticulante ativo em solução salina, onde as gotas formadas pela atomização permanecem sob agitação por um determinado tempo. Como resultado, ocorre a difusão dos cátions divalentes presentes na solução salina através da superfície da gota, promovendo a formação de ligações cruzadas nas partículas (BUREY et al., 2008; ELLIS; JACQUIER, 2009).

Embora o método de gelificação interna proporcione melhor controle na entrega do agente reticulante, o que resulta na formação de uma matriz mais homogênea, a gelificação externa é um método mais simples que dispensa a utilização de solventes orgânicos, apresentando grande potencial de aplicação na área farmacêutica e alimentícia, sendo o

método de reticulação mais relevante para o alginato do ponto de vista biotecnológico e industrial (LI et al., 2015).

O processo de atomização seguido por gelificação iônica se apresenta como uma técnica interessante para produção de microgéis probióticos e/ou simbióticos, oferecendo estabilidade e resistência das matrizes, possibilitando sua incorporação em diversos produtos, sendo o tamanho das partículas dependente da viscosidade da solução de polímero obtida, do diâmetro do orifício do atomizador e da distância entre a saída do sistema e a solução de coagulação (ANAL; SINGH, 2007; KAILASAPATHY, 2002).

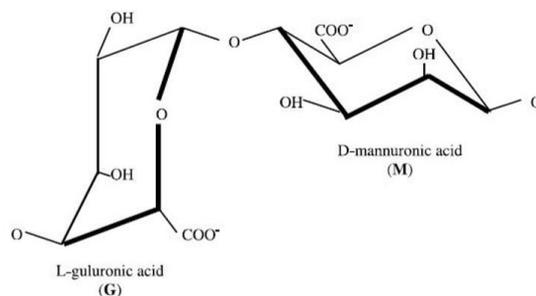
Assim, a utilização desta técnica com biopolímeros não tóxicos, comestíveis e biodegradáveis como alginato, gelana e xantana, possibilita a produção de hidrogéis carreadores de probióticos para inserção em diferentes sistemas alimentares (ZHANG et al., 2007).

### 3.5.2. Alginato

O alginato é um dos materiais mais utilizados em estudos de encapsulação de medicamentos e células vivas no combate a tumores (BHUIBAL; DE VOS; NICLOU, 2014), na produção de hidrogéis para liberação controlada de fármacos em mucosas (MOEBUS; SIEPMANN; BODMEIER, 2009), entre outras aplicações.

Também denominado algina, é um polissacarídeo de cadeia linear proveniente da parede celular de algas marinhas pardas e algumas bactérias, constituído por cadeias de dois monômeros de base,  $\beta$ -D-manuronila  $\alpha$ -L-guluronila, conectados por ligações glicosídicas entre seus carbonos 1 e 4 (Figura 7). A proporção destes dois monômeros varia com a sua fonte. A conexão destas cadeias de polímeros formada por cátions bivalentes e a subsequente formação do gel são dependentes desta proporção (ANAL; SINGH, 2007).

Figura 7: Estrutura do Alginato, polímero utilizado nas matrizes de encapsulação. Fonte: BUREY et al. (2008).



As partículas formadas pelo alginato são geralmente utilizadas especialmente para a encapsulação de células, e se dissolvem quando o cátion bivalente é removido. Suas vantagens incluem não toxicidade, não interferência na viabilidade celular e possibilidade de

reversão do processo, pois os íons de cálcio que formam a matriz cálcio-alginato podem ser sequestrados em meio básico, sendo substituídos por um metal monovalente ou próton, desligando as cadeias dos monômeros, solubilizando o alginato, proporcionando a liberação das células encapsuladas (SHAH, RAVULA, 2000).

Na extrusão, este polissacarídeo é atomizado em solução iônica de cloreto de cálcio, o qual precipita o alginato, formando as partículas, com boa estabilidade mecânica e facilidade de liberação das células encapsuladas quando suspenso em meio alcalino, o que significa que as partículas são capazes de permanecer íntegras em meio estomacal, sendo dissolvidas no ambiente alcalino do intestino, liberando os probióticos encapsulados em seu sítio de ação (KAILASAPATHY, 2002).

Microgéis de alginato produzidos por gelificação externa apresentam um gradiente de concentração devido ao processo de difusão, que se inicia na superfície da cápsula e causa resistência aos íons de  $\text{Ca}^{+2}$  subsequentes, resultando na formação de uma estrutura não homogênea, com a superfície mais concentrada. Estas estruturas possibilitam maior controle da transferência de massa, protegendo os compostos ativos (PUGUAN; YU; KIM, 2014).

Tais matrizes têm apresentado resistência a ação de enzimas da parte superior ao trato gastrintestinal, propriedades de barreira, resistência mecânica e coesão, mostrando-se um bom veículo para compostos bioativos, o que o torna bom candidato para a produção de hidrogéis carreadores de probióticos visando inserção em formulações alimentícias líquidas ou com maior atividade de água (MATALANIS; JONES; MCCLEMENTS, 2011; LI et al., 2015).

Em relação ao tamanho da partícula, Hansen e colaboradores (2002) relataram que partículas de diâmetro maior que 1mm geram uma textura grosseira que prejudica o transporte de nutrientes para o organismo, e partículas menores que 10  $\mu\text{m}$  não apresentam diferença significativa na proteção e aumento de viabilidade de organismos encapsulados comparados com células livres. Estes resultados indicam que as partículas precisam ter tamanho apropriado. Os melhores resultados na manutenção da viabilidade de probióticos encapsulados em alginato por extrusão foram obtidos com partículas entre 20 e 70  $\mu\text{m}$  de diâmetro (HANSEN et al., 2002).

As microcápsulas obtidas de alginato demonstraram proteger os probióticos das condições ácidas tanto de alimentos quanto do estômago (KAILASAPATHY, 2002; HANSEN et al., 2002; ANAL, SINGH, 2007). Entretanto, largos poros formados pela matriz

do biopolímero na parede das cápsulas reduzem a sua capacidade de barreira, e suas cápsulas são sensíveis a valores de pH extremos.

Desta maneira, busca-se a associação de outros polímeros à matriz de alginato a fim de promover maior estabilidade e proteção ao material encapsulado pela diminuição dos tamanhos dos poros. Atualmente, tem-se buscado a adição de prebióticos à matriz de alginato, pois são polissacarídeos capazes não apenas de reduzir o tamanho dos poros da matriz, mas também suplementar nutricionalmente o probiótico encapsulado, aumentando sua atividade (BRUNO et al., 2002). Fruto-oligossacarídeos já foram incorporados a microcápsulas de alginato e gelatina, apresentando resultados satisfatórios na diminuição de espaços intersticiais e na proteção do probiótico (SILVA et al., 2018).

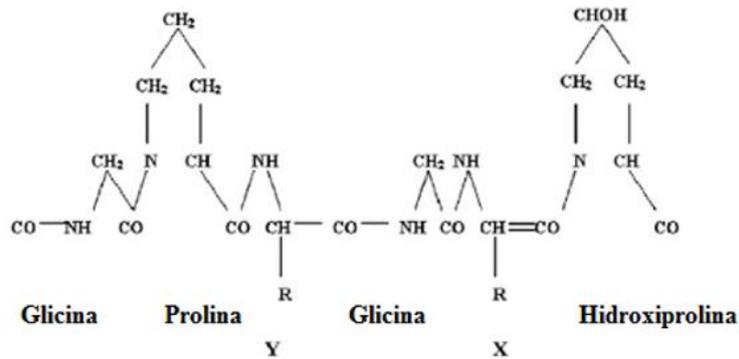
### **3.5.3. Gelatina**

A gelatina, obtida por hidrólise parcial do colágeno, proteína de tecidos conjuntivo e epitelial, é importante devido às suas propriedades gelificantes termo reversíveis, além de capacidade de formar membranas, biocompatibilidade e não toxicidade (LI et al., 2009). Devido a estas propriedades, a gelatina tem sido aplicada em formulações para encapsulação, por apresentar eficácia na melhoria do desempenho de materiais poliméricos (COOK et al., 2014; DONG; WANG; DU, 2006).

Constitui-se por cerca de 84% de proteína, 14% de umidade e 2% de cinzas. Da fração proteica, glicina, prolina e hidroxiprolina predominam e se unem por ligações peptídicas, formando sequências que se repetem ao longo da cadeia (Figura 8), a base para reticulação e formação de redes tridimensionais características (BUREY et al., 2008).

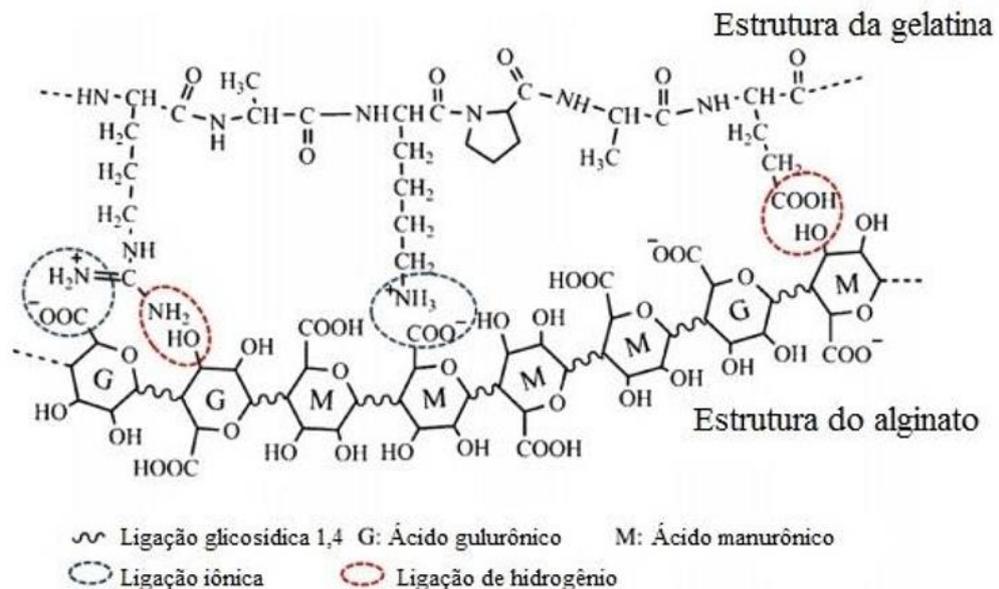
Devido ao seu caráter anfótero, a gelatina pode atuar em cooperação com polissacarídeos aniônicos como alginato (LI et al., 2009), especialmente em valores abaixo do seu ponto isoelético, quando apresenta carga positiva. A associação de alginato e gelatina para formação de matrizes poliméricas se deve às interações iônicas e ligações de hidrogênio, formadas pelos grupos carboxílicos e hidroxila presentes na estrutura de cada polímero (Figura 9).

Figura 8: Estrutura da tripla hélice da gelatina, material polimérico utilizado em matrizes de sistemas de encapsulação.  
Fonte: Burey et al. (2008).



Matrizes de alginato e gelatina têm sido reportadas pela capacidade de proteção de compostos sensíveis e liberação sustentada (DONG; WANG; DU, 2006), além de sua utilização na modulação da textura de alimentos (VORON'KO; DERKACH; IZMAILOVA, 2002). A concentração de gelatina utilizada em produtos alimentícios necessária para promover a gelificação varia de 1% a 5% (m/m), sendo a formação do gel afetada por esta concentração, assim como taxa de resfriamento e pH (BUREY et al., 2008).

Figura 9: Esquema de interações entre alginato e gelatina. Fonte: LI et al. (2011).



### 3.6. SIMBIÓTICOS

Visando o aumento da viabilidade de probióticos encapsulados, a associação com prebióticos vem sendo estudada, pois acredita-se que os prebióticos possam atuar como substrato para o microrganismo, promovendo sua proliferação. Os produtos formulados pela associação entre probióticos e prebióticos, são denominados simbióticos (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

A suplementação das microcápsulas com prebióticos proporciona uma fonte de carbono e nitrogênio que auxilia o crescimento de bactérias probióticas (ANAL; SINGH, 2007). A técnica de microencapsulação associada aos benefícios dos simbióticos vem sendo utilizada com o objetivo de promover a sobrevivência dos probióticos, quando expostos a condições de processamentos em alimentos, acidez, presença de oxigênio, garantindo maior viabilidade nos produtos onde são adicionados e durante a passagem pelo trato gástrico, por proporcionar um revestimento adequado de proteção, de modo que os probióticos atinjam o sítio de ação em quantidades adequadas (DOUGLAS; SANDERS, 2008).

Neste sentido, não somente a viabilidade à estocagem e processamento do alimento, mas também a funcionalidade dos probióticos deve ser explorada. Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando biopolímeros como alginato associados com outros compostos, para proteção de microrganismos probióticos. Além da incorporação em diferentes alimentos, para avaliação da resistência ao armazenamento, estudos de simulação de digestibilidade *in vitro* durante a passagem pelo trato gastrointestinal vem sendo desenvolvidos (URBANSKA; BHATHENA; PRAKASH, 2007; SOHAIL et al., 2011).

O alginato apresenta-se como um atrativo candidato para este estudo, devido a sua excelente biocompatibilidade, capacidade de formação de matrizes não tóxicas e baixo custo (CHAN; LEE; HENG, 2002).

Desta maneira, a microencapsulação é considerada uma ferramenta importante que melhora a viabilidade de probióticos em alimentos e sua distribuição no seu sítio de ação, devendo ser uma metodologia a ser explorada e otimizada. Uma das formas de aumentar o potencial de aplicação de microcápsulas probióticas é pela suplementação do sistema com prebióticos, como os xilo-oligossacarídeos (GIBSON et al., 2004; RODRIGUES et al., 2011), que possuem potencial de atuar não apenas no aumento da viabilidade celular dos probióticos encapsulados como também reduzir o espaço intersticial do material de parede das microcápsulas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE ENDO-1,4-XILANASE DE *C. flavescens* E PRODUÇÃO DE ENZIMA RECOMBINANTE

Neste trabalho foi utilizado o gene da enzima xilanase (*Xyn10Cf*) da levedura *Cryptococcus flavescens* LEB-AY10 (CCT 7725), isolada do Bioma Brasileiro. O mesmo encontra-se clonado no vetor de expressão pGAPZ $\alpha$ A em *Escherichia coli* DH10B e foi expresso em *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) X33 e GS115.

#### 4.1.1. Expressão Heteróloga

A expressão heteróloga do gene *Xyn10Cf* foi realizada de forma constitutiva em *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) linhagens X33 e GS115, para análise de expressão de proteínas recombinantes a partir de vetores com resistência à Zeocina como marcador de seleção. Foi utilizado o vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen), contendo o sinal de secreção fator- $\alpha$  (peptídeo N-terminal de *Saccharomyces cerevisiae*).

A enzima pura caracterizada apresentou atividade ótima de 62,5 a 77,5°C e maior estabilidade em pH próximo a 5,3. Os parâmetros cinéticos  $K_m$  e  $v_{max}$  utilizando xilana de bétula (birchwood) como substrato são de 4,13 g/L e 2,32 U/mL, respectivamente. Apresenta baixas atividades de  $\beta$ -xilosidase em 4- nitrofenil- $\beta$ -D-xilopiranosídeo (0,02 U/mg) e de celulase em carboximetilcelulose (0,99 U/mg), e seus produtos de hidrólise da xilana são, principalmente, xilobiose e xilotriose (ANDRADE, 2014).

##### 4.1.1.1. Extração dos Plasmídeos

A extração de plasmídeos foi realizada conforme princípio de lise alcalina proposto por Bimboim e Doly (1979): *E. coli* contendo os plasmídeos e que se encontra armazenada a -80°C foi reativada em 3 mL de caldo Luria Bertani com baixo teor de sal (LS LB, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl, pH 7,5) contendo 25 mg/L Zeocina. As culturas foram incubadas a 37°C e 250 RPM por 14 horas.

Após esse período, 1,5mL foram transferidos para microtubos e centrifugados a 13,000g por cinco minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em 100 $\mu$ L de solução gelada composta por EDTA 10 mM (pH 8), Tris-HCl 50 mM (pH 8) e RNase A 100 $\mu$ g/mL. Incubou-se os tubos a 37°C por 15 minutos e adicionou-se

200 µL de solução NaOH 0,2M e SDS 1%, homogeneizada por inversão. Em seguida, adicionou-se 150 µL de solução acetato de potássio 3M (pH 5,5 ajustado com acético glacial) gelada e os tubos foram mantidos em banho de gelo por 20 min. Centrifugou-se a 15,000g por 20 minutos a 4°C e transferiu-se o sobrenadante para outro tubo, ao qual adicionou-se 1 mL de etanol absoluto gelado. Após mistura por inversão, centrifugou-se novamente, descartando os sobrenadantes e lavando os pellets com 200 µL de etanol 70% (gelado). Após a evaporação completa do etanol, os pellets foram ressuspensos em 50 µL de água Milli-Q. O conteúdo de DNA plasmidial foi quantificado em NanoDrop.

#### 4.1.1.2. *Transformação em Pichia pastoris*

O preparo das células competentes de *P. pastoris* e a transformação foram realizados de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante (Invitrogen). Em síntese, 40 µL de células foram misturados com 5 µg de plasmídeo linearizado com a enzima BspHI (5'...T<sup>^</sup>CATGA...3', New England Biolabs) e purificado por diálise com filtro de membrana de PVDF 0.45µm Millipore em cubetas de 0,2 cm geladas, e mantidos em banho de gelo por cinco minutos.

A eletroporação foi realizada no equipamento Gene Pulser (BioRad), utilizando os parâmetros 2000 V, 25 µF e 200 Ω. Após transformação, as células foram rapidamente ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e incubadas a 30°C por duas horas. Alíquotas de 100µL foram plaqueadas em YPDSA (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose, 1M sorbitol, 2% ágar) contendo 100 µg/mL de Zeocina.

Após 2 dias de incubação a 30°C, algumas colônias foram isoladas em novas placas YPDSA 100 µg/mL de Zeocina. A confirmação da transformação foi determinada pela presença de atividade enzimática da endoxilanase recombinante pelo ensaio de hidrólise com xilana de bétula (itens 4.1.3.2 e 4.1.3.3).

A seleção do melhor clone foi realizada pela quantificação da atividade enzimática, por *screening* em caldo YPD (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicose), utilizando Erlenmeyers aletados, e a atividade enzimática ao longo do tempo de incubação do melhor clone selecionado foi analisada em meio YPD e YPG (1% extrato de levedura, 2% peptona, 2% glicerol).

#### **4.1.2. Produção da Enzima Recombinante**

A produção da enzima recombinante foi realizada empregando o clone selecionado na etapa anterior em batelada alimentada no biorreator de mistura BioFlo III® (New Brunswick Scientific), utilizando dorna de 3L, de acordo com as condições de operação propostas pela Invitrogen, com modificações.

O inóculo foi crescido em Erlenmeyer aletado de 500mL contendo 50mL de meio YPD (1% Extrato de Levedura, 2% Peptona, 0,00004% Biotina, 2% Glicose), a 30°C e 200RPM overnight.

Atingida a OD<sub>600</sub> de 4, o inóculo foi transferido para o fermentador contendo 1,2L de meio constituído por 40g/L de Glicose, 20g/L de peptona, 10g/L de extrato de levedura e 5% de antiespumante C, previamente esterilizado a 121°C por 20 minutos. Adicionou-se 0,8% de solução traço de sais (6g/L CuSO<sub>4</sub>, 0,08g/L KI, 3g/L MnSO<sub>4</sub>, 0,2g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,02g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5g/L CoCl<sub>2</sub>, 20g/L ZnCl<sub>2</sub>, 65g/L FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2g/L biotina, 5mL/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%) esterilizada por filtração em membrana da Millipore de PES 0,22 µm (XIE et al., 2005). A batelada foi realizada a 30°C, pH 6,0 controlado por alimentação com hidróxido de amônio 30%, mantendo-se a concentração de oxigênio dissolvido entre 20% e 30% (condição mantida com uma aeração de 0,1vvm de oxigênio).

Após 24h da batelada, foi iniciada a fase de alimentação com 50% m/v de glicose contendo 1,2% v/v de solução traço de sais a uma taxa de 15mL/h.L por 60 horas. Alíquotas foram retiradas duas vezes ao dia para acompanhamento de densidade ótica e atividade enzimática. Ao fim do processo, as células foram separadas por centrifugação a 1300g por 5 minutos, e o sobrenadante utilizado na determinação de atividade enzimática (item 4.1.3.3).

##### **4.1.2.1. Concentração de Enzima**

Após a fermentação em biorreator de bancada, o sobrenadante foi concentrado por ultrafiltração usando ultrafiltro centrífugo Amicon® (Millipore, 10kDa) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.1.3. Metodologia Analítica**

As determinações analíticas foram realizadas em triplicata para cálculo de desvio padrão. Foram utilizados os softwares Excel® e STATISTICA® 8.0 para análise dos resultados obtidos através do teste de comparação múltipla de médias Tukey a 5% de significância.

#### **4.1.3.1. Determinação da Proteína Total do Extrato Enzimático**

O conteúdo proteico do extrato enzimático foi determinado pelo método de Lowry modificado por Layne (1957), utilizando soroalbumina bovina como padrão e as soluções:

(A) 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 0,02% tartarato duplo sódio e potássio em 0,1 N NaOH;

(B) 0,5g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada acrescida de 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado;

(C) 50 mL de solução A acrescido de 1 mL de B, preparada no dia.

A seguinte mistura de reação foi preparada e incubada: 0,1mL de amostra foi diluída em 0,5mL de solução C, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido da adição de Folin Ciocalteau diluído 1:2 em água destilada. A mistura foi mantida em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, foi realizada a leitura de absorbância a 750 nm.

#### **4.1.3.2. Determinação Qualitativa da Atividade Enzimática de Endoxilanase**

Para determinação da presença ou ausência de atividade, 20  $\mu\text{L}$  de amostra de extrato enzimático foram adicionados a 80  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,3) e 100  $\mu\text{L}$  2% (m/v) de Xilana de Bétula (Sigma) (concentração final de sólidos de 1%) em microplaca de 96 poços de 2,2 mL. A microplaca foi incubada em banho-maria a 70°C por 2h. Após esse período, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do reagente de DNS, e a mistura foi fervida por 5 min e levada ao banho de gelo. As amostras contendo enzima ativa foram identificadas por diferença de coloração e submetidas a ensaios de quantificação (item 4.1.3.3).

#### **4.1.3.3. Determinação Quantitativa da Atividade Enzimática de Endoxilanase**

A atividade de endoxilanase recombinante foi estimada através da determinação de açúcares redutores (4.1.3.4). Para isso, 20 $\mu\text{L}$  de extrato enzimático foram adicionados a 80  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio 50nM (pH 5,3) mais 100  $\mu\text{L}$  de solução 2% (m/v) de Xilana de Bétula (Sigma) (para uma concentração final de 1%) (item 4.1.3.5) e incubados a 50°C (BAILEY et al., 1992) por 5 minutos. Após esse período, procedeu-se com a quantificação de açúcares redutores.

#### **4.1.3.4. Determinação de Açúcares Redutores - 3,5-DNS (MILLER, 1959)**

Para determinação de açúcares redutores foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de amostra (água para o branco) em 50  $\mu\text{L}$  de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em placa de 96 poços, aquecida a 98°C por 5 minutos e resfriadas em banho de gelo, seguida da adição à 0,8 mL de

solução 0,05 M de tartarato de sódio e potássio. Absorbância foi determinada em espectrofotômetro modelo DU 640 (Beckman Coulter) a 540 nm (QINNGHE et al., 2004; MILLER, 1959).

A curva padrão, a partir da qual se determinou a atividade enzimática, foi construída utilizando soluções de 1% (m/v) xilana de bétula com diferentes concentrações de D-xilose. Uma unidade de atividade (U) da xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de D-xilose por minuto de reação a 50°C.

Para o branco da enzima, incubou-se a solução de xilana sem o extrato enzimático, e para o branco do substrato, a enzima foi incubada sem a adição da solução de xilana, sendo o volume ajustado com tampão acetato de sódio.

#### **4.1.3.5. Solução 2% (m/v) Xilana em 50mM tampão acetato de sódio (pH 5,3)**

A Solução 2% (m/v) de Xilana de Bétula (Sigma) em 50mM tampão acetato de sódio (pH 5,3) foi preparada de acordo com a metodologia proposta por Bailey (1992). O tampão foi preparado com a adição de 35,2mL de 0,2M acetato de sódio com 14,8mL de 0,2M ácido acético, ajustando-se o pH para 5,3 pela adição de ácido acético ou hidróxido de sódio. 2g de Xilana de Bétula (Sigma) foi homogeneizada em 80mL de tampão acetato de sódio a 60°C e aquecida até o ponto de ebulição, utilizando agitador magnético. Em seguida a mistura foi mantida sob agitação lenta para resfriar, e posteriormente o volume foi completado para 100mL. Esta solução foi estocada a 4°C por no máximo uma semana.

## **4.2. EXTRAÇÃO E HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE ORIUNDA DE RESÍDUO LIGNOCELULÓSICO DE PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA OBTENÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

A biomassa lignocelulósica pré-tratada de palha de cana-de-açúcar desacetilada (com aproximadamente 10% de umidade) foi cedida pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE, e triturada em moinho de facas tipo Willye.

### **4.2.1. Extração da Xilana**

A xilana foi extraída de acordo com o método descrito por Zilliox e Debeire (1998), com modificações. Palha de cana desacetilada Mesh 60 (até 0,250 mm de diâmetro de partícula) foi imersa em água a 60°C por 16 horas em banho agitado. Posteriormente, extraiu-se a hemicelulose com 17 mL de KOH 24% incluindo NaBH<sub>4</sub> 1% (m/v) para cada 2g de

palha, por seis horas a 35°C em banho agitado. O extraído foi centrifugado a 3200 RPM por 10 minutos seguido de filtração a vácuo em papel Whatman 1. O ponto isoelétrico da xilana foi atingido pela neutralização com ácido acético glacial até pH 5,0. A hemicelulose foi precipitada pela adição de 10 volumes de etanol gelado. O precipitado foi separado, após repouso *overnight*, por centrifugação a 3200g por 10 minutos, lavado com água destilada para remoção do excesso de etanol, centrifugado novamente e ressuspensionado em tampão de acetato de sódio pH 5,3. Amostras foram secas em estufa a 95°C para determinação da massa seca contida na solução e concentração de sólidos. A porcentagem de xilana recuperada foi calculada usando a fórmula a seguir (Equação 1):

$$\text{Recuperação (\%)} = (\text{peso seco xilana extraída (g)}) / (\text{teor hemicelulose da amostra (g)}) * 100 \quad (1)$$

#### **4.2.2. Caracterização da Hemicelulose**

A caracterização da hemicelulose extraída foi determinada de acordo com NREL (SLUITER et al., 2008b) por hidrólise com ácido sulfúrico 72% (m/v): amostras secas (300 mg) foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% (0,3 mL) a 30°C durante uma hora, seguido de diluição até uma concentração de 4% (m/v) por adição de 84 mL de água destilada. A mistura foi autoclavada a 121°C por uma hora, arrefecida e filtrada. O conteúdo hidrolisado foi filtrado à vácuo em cadinho de filtração previamente seco e pesado, e o conteúdo filtrado foi analisado quanto à carboidratos arabinose, glicose e xilose, de acordo com ASTM (2007).

##### **4.2.2.1. Determinação de carboidratos**

Os carboidratos, xilose, glicose e arabinose, presentes no filtrado da hidrólise ácida foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o cromatógrafo Dionex® (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4 x 250 mm) e uma coluna de proteção Carbopac PA-1 (4 x 50 mm), bomba GP50, detector eletroquímico ED40 e um detector de índice de refração que adotou um gradiente linear de A (água Milli-Q), B (NaOH 250 mM), C (NaOAc 1 M, NaOH 100 mM) e D (água Milli-Q) utilizando o software PEAKNET. A taxa de fluxo foi constante de 0,3mL/min, com volume de injeção de 50 µL e tempo de corrida de 57 minutos. Amostras foram filtradas (1,5 mL) diretamente em vials utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,22 µm (Millex). As áreas de pico integradas foram ajustadas com base em padrões

comprados da Megazyme®. A fração hemicelulósica foi definida como a soma dos teores de xilose e arabinose.

#### 4.2.3. Otimização da Produção de Xilo-oligossacarídeos

A produção de XOS foi obtida empregando a enzima recombinante descrita no tópico anterior (4.1), e uma concentração de 1% (m/v) de sólidos (hemicelulose extraída de palha de cana-de-açúcar), em tampão acetado de sódio 50mM pH 5,3, temperatura de 50°C, 65°C e 70°C por 48 horas. As amostras foram incubadas sob agitação a 150RPM. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de tempo, inativadas (99°C, 15 minutos) e centrifugadas (13000 g, 15 min, 4°C).

A concentração de endoxilanase empregada para a conversão de hemicelulose em XOS foi otimizada pelo desenvolvimento de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual também foi avaliada a associação sinérgica da endoxilanase recombinante com  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GH51) (*Aspergillus ninger* - Megazyme®), que apresentou atividade em torno de 300 U/mL. O DCCR consistiu de 11 experimentos, sendo 3 repetições no ponto central, utilizando como variáveis independentes as duas enzimas empregadas, partindo da concentração de saturação da endoxilanase e a faixa de concentração otimizada para a arabinofuranosidase por Ávila (2020), de 0 a 25mg/g de substrato, ou 0 a 891U por grama de substrato (U/g substrato), mantendo-se as mesmas condições de hidrólise (1% de sólidos, pH 5,3 por 48h a 65°C).

A Tabela 2 informa os parâmetros utilizados para os experimentos. O efeito de cada variável independente foi determinada utilizando o software online Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br/>). A resposta avaliada foi o teor de XOS obtido.

Tabela 2: Faixa de valores utilizados para o DCCR.

Variável (U/g de substrato)	-1,41	-1	0	1	1,41
Endoxilanase	0	70	235	400	468
Arabinofuranosidase	0	128	444	760	891

Hemicelulose não convertida foi precipitada pela adição de 10 volumes de etanol. O hidrolisado rico em XOS foi quantificado em HPLC (item 4.2.4.), e o resultado expresso como conversão de hemicelulose (%) de acordo com a composição da hemicelulose extraída quantificada, e posteriormente concentrado em rotaevaporador.

#### **4.2.4. Quantificação e Caracterização dos Xilo-oligossacarídeos**

A quantificação de compostos resultantes da hidrólise enzimática da biomassa foi feita por cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD), utilizando o cromatógrafo Dionex® DX-500 (Sunnyvale, CA, Estados Unidos) equipado com a coluna Carbopac PA-1 (4 x 250 mm) e uma coluna de proteção Carbopac PA-1 (4 x 50 mm), bomba GP50, detector eletroquímico ED40 e um detector de índice de refração que adotou um gradiente linear de A (Milli-Q), B (NaOH 250 mM), C (NaOAc 1M, NaOH 100 mM) e D (Milli-Q) utilizando o software PEAKNET. A taxa de fluxo foi constante de 0,3mL/min, com volume de injeção de 50 µL e tempo de corrida de 57 minutos. As amostras foram eluídas utilizando um gradiente 40% de B e 30% A e D por 36 minutos, e em seguida a coluna foi limpa com 100% de C por 6 minutos e estabilizada com a condição inicial por mais 15 minutos. Amostras foram filtradas (1,5 mL) diretamente em vials utilizando membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com poro de 0,22 µm (Millex). As áreas de pico integradas foram ajustadas com base em padrões comprados da Megazyme® xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentaose (X5) e xilohexaose (X6).

Adicionalmente, os espectros infra-vermelho (FT-IR) de amostras de XOS e xilana extraída da palha de cana seca a vácuo (65°C por 24h) foram analisados na Tokyo University of Agriculture and Technology, pelo espectrofotômetro JASCO FT/IR-4100, Japão utilizando pratos de KBr a temperatura ambiente. O espectro foi medido de 4000-750cm<sup>-1</sup> a uma resolução de 8cm<sup>-1</sup> (BIANG et al., 2013; TAHERZADEH et al., 2015).

### **4.3. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE MACRO E MICROGEIS DE ALGINATO, GELATINA E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

#### **4.3.1. Materiais**

Para o preparo dos sistemas biopoliméricos foram utilizados gelatina suína Tipo A, Bloom 280 (Gelco, Pedreira – SP, Brasil), alginato (Danisco, Landerneau - França) e xilooligossacarídeos comerciais (Xi'an Lyphar Biotech Co. LTD - China). Utilizou-se CaCl<sub>2</sub> dihidratado (Dinâmica - Química contemporânea Ltda. CAS 10035-04-8) para o preparo da solução reticulante. Os demais materiais utilizados foram de grau analítico.

### **4.3.2. Preparo de Soluções Biopoliméricas**

Para a produção das soluções biopoliméricas contendo gelatina 1,5% (m/m), o pó de gelatina foi adicionado em água deionizada aquecida a 45°C, sob constante agitação por 15 minutos. Posteriormente a solução foi resfriada a 25°C antes da adição de alginato 1% (m/m) e XOS a 0%, 1%, 3% e 5% (m/m). As soluções foram mantidas sob agitação constante até completa homogeneização e estocadas overnight a 25°C antes da caracterização e preparo dos microgéis.

### **4.3.3. Análises das Soluções Biopoliméricas**

#### ***4.3.3.1. Ensaios Reológicos***

O comportamento de escoamento das soluções foi avaliado em Reômetro (TA Instruments, AR1500ex, New Castle, DE, USA) equipado com geometria de cone placa ( $d = 40$  mm;  $1,58^\circ$ , gap  $53\mu\text{m}$ ). Para as soluções de XOS puras, utilizou-se a geometria cilindros concêntricos (raio do rotor externo:  $17,53\text{mm}$ , interno:  $16,02\text{mm}$ , raio do estator interno:  $15,10\text{mm}$ , altura do cilindro imerso:  $58\text{mm}$  e gap  $500\mu\text{m}$ ). O experimento foi realizado em temperatura fixa de 25°C controlada com sistema Peltier. O comportamento reológico foi caracterizado por curvas de escoamento em um intervalo de taxa de deformação, variando de 0 a 1000 (1/s). As propriedades reológicas a altas deformações para soluções contendo XOS em concentrações 1,0% (X 1), 3,0% (X 3) e 5,0% (m/m) (X 5), alginato 1% (m/m) (A) e gelatina 1,5% (m/m) (G) puras, e suas misturas (AG, AX1, AX3, AX5, AGX1, AGX3, AGX5) foram ajustadas ao modelo Herschel-Bulkley (Equação 2).

$$\sigma = \sigma_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (2)$$

### **4.3.4. Avaliação dos Macrogeis**

#### ***4.3.4.1. Preparo dos Macrogeis por Difusão Salina***

As soluções biopoliméricas produzidas conforme descrito na seção 4.3.2 foram transferidas para membranas de diálise (SnakeSkin Dialysis Tubing, 3500, Pierce, Rockford, IL, USA) onde permaneceram em contato com a solução reticulante de cloreto de cálcio 150mM a temperatura ambiente por 9 dias (SILVA et al., 2016), tempo em que se obteve completa gelificação. Os macrogeis foram retirados das membranas e cortados perpendicularmente e analisados, conforme descrito a seguir.

#### ***4.3.4.2. Microscopia Eletrônica de Varredura***

As amostras de macrogeis foram preparadas para a microscopia de acordo com a metodologia descrita por Vilela, Cavallieri e Cunha (2011), com algumas modificações.

Pedaços dos macrogeis com aproximadamente (5mm x 5mm x 10mm) foram fixados por 24 horas em tampão glutaraldeído (2,5%) e cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.2) com a finalidade de minimizar modificações estruturais durante os tratamentos de secagem posteriores, e fraturados em nitrogênio líquido, seguido por duas lavagens em tampão cacodilato. Posteriormente prosseguiu-se com a desidratação com lavagens em soluções de concentração crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%), por 20 minutos para cada concentração. A desidratação foi finalizada com três lavagens em etanol 100% seguida pela secagem em ponto crítico (Balzers Critical Point Dryer CPD03).

As amostras foram fixadas em porta-espécimens metálicos e metalizadas com liga de ouro por 200 segundos em Sputter Coater (Balzers Sputter Coater SCD 050), para serem então observadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6510 - Tokyo, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japão). As imagens foram captadas com aceleração de voltagem de 10 kV (TAHERZADEH et al., 2015).

#### **4.3.4.3. Difração Raio-X e FT-IR**

Amostras dos macrogeis foram secos a vácuo a 65°C até peso constante (24h) e analisados por difração de raio-X (Rigaku X-ray Diffractometer Rint 2100 VPC/N, Software PDXL2). A radiação Cu K $\alpha$  (1.542 Å), operando a temperatura ambiente, foi gerada a 40kV e 30mA, e a intensidade relativa obtida sob faixa angular de 5 a 40°, passo 0,02. O espectro infra-vermelho foi obtido com o espectrômetro JASCO FT/IR-4100 utilizando pastilhas de KBr, na Tokyo University of Agriculture and Technology, Japão (BIANG et al., 2013; TAHERZADEH et al., 2015).

#### **4.3.5. Avaliação dos Microgéis**

##### **4.3.5.1. Preparo dos Microgéis**

Micropartículas foram produzidas de acordo com LI et al. (2009) com algumas modificações. As soluções biopoliméricas foram transferidas para bico atomizador (Labmaq do Brasil Ltda, Ribeirão Preto-SP) de diâmetro de 0,7 mm com o auxílio de bomba peristáltica (Masterflex, modelo 7518-00) ajustada em 0,12mL/s, sendo atomizadas em solução de cloreto de cálcio 150 mM a temperatura ambiente. A altura entre o bico atomizador e a solução de CaCl<sub>2</sub> foi fixada a 15 cm, e a pressão do compressor a 1 bar g, enquanto a taxa de fluxo de ar comprimido no bico foi fixada ao máximo possível (1,2 m<sup>3</sup>/h) a fim de evitar respingos da solução salina. As partículas gelificadas foram mantidas sob agitação em solução por 30 minutos e posteriormente filtradas em peneira com abertura de

0,053 mm (PERRECHIL, SATO e CUNHA, 2011). Prosseguiu-se com a avaliação do tamanho médio das partículas obtidas.

#### 4.3.5.2. *Distribuição do Tamanho de Partícula*

A distribuição de tamanho das partículas foi determinada por difração a Laser, em equipamento Mastersizer S (Malvern Instruments Ltda, Reino Unido) utilizando acessório Hydro 2000S (Malvern Instruments Ltda, Reino Unido). As partículas foram dispersas em água destilada até a obtenção de obscuração a laser superior a 7%. O diâmetro médio das partículas foi determinado através do parâmetro  $D[3,2]$ , conforme a Equação 3.

$$D_{3,2} = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^n n_i \cdot d_i^2} \quad (3)$$

onde  $d_i$  é o diâmetro das partículas ( $\mu\text{m}$ ) e  $n$  é o número de partículas.

### 4.4. **OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DA PALHA DE CANA DE AÇÚCAR: VIABILIDADE DE *L. acidophilus* ENCAPSULADOS E SIMULAÇÃO DE DIGESTIBILIDADE *in vitro***

#### 4.4.1. **Materiais**

Para os sistemas de encapsulação foram utilizados gelatina suína Tipo A, Bloom 280 (Gelco, Brasil) e alginato (Danisco, França). O organismo probiótico empregado foi a cultura de *Lactobacillus acidophilus* (Chr. Hansen, Dinamarca), e como prebiótico incorporado à matriz de encapsulação utilizou-se solução concentrada de xilo-oligosacarídeos obtidos pela hidrólise da hemicelulose da palha de cana, cujos resultados serão apresentados na seção 5.3. Como solução salina, foi utilizado cloreto de cálcio dihidratado (Dinâmica - Química contemporânea Ltda. CAS 10035-04-8).

Para o preparo dos fluidos gastro-intestinais simulados, utilizou-se pepsina porcina 3200-4500 U/mg (P6887), pancreatina 8 x USP (P7545) e extrato de bile 160mM (B8631) extraídos de suínos, fornecidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

Testes preliminares foram conduzidos com XOS comercial para observação de diferenças significativas entre os materiais. Demais ingredientes utilizados foram de grau analítico.

#### **4.4.2. Ativação dos *Lactobacillus acidophilus***

A cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 foi inoculada em 10mL de meio MRS a 37°C por 18 horas. A cultura resultante foi transferida para 90 mL de meio MRS e incubada novamente sob as mesmas condições. A cultura foi colhida por centrifugação 2800g por nove minutos e lavada duas vezes com 30 mL de citrato de sódio 2% m/v. O sobrenadante foi descartado e a cultura lavada com 30 mL de água destilada e submetida a centrifugação sob as mesmas condições. O material coletado foi transferido para as soluções de biopolímero, cujo preparo encontra-se descrito a seguir.

#### **4.4.3. Preparo de Soluções**

Pó de gelatina foi adicionado à água deionizada aquecida a 45°C e mantido sob agitação por 20 minutos, seguido de resfriamento a 25°C antes da adição do alginato 1% (m/m) e diferentes concentrações de XOS (1%, 3% e 5%). As soluções foram estocadas *overnight* antes da adição de *L. acidophilus*.

Realizou-se diluições seriadas da blenda em água peptonada 0,1% (m/v) seguida de aliquotagem em triplicata de microgotas de 20µL em placa MRS ágar para contagem de formação de colônia por grama de células livres inicialmente adicionadas aos biopolímeros.

#### **4.4.4. Produção das Micropartículas**

As micropartículas foram preparadas pelo método de extrusão molecular em atomizador com 0,7mm de diâmetro (Labmaq do Brasil Ltda, Brasil) usando bomba peristáltica (modelo 7518-00, Masterflex, EUA) a 0,12mL/s. A solução foi atomizada a temperatura ambiente com CaCl<sub>2</sub> 150mM. A distância entre o bico do atomizador e a solução de CaCl<sub>2</sub> foi mantida a 15cm, e a pressão do compressor fixada a 1 bar, com vazão de ar de 1,2m<sup>3</sup>/h (PERRECHIL, SATO, CUNHA, 2011). As micropartículas foram mantidas em CaCl<sub>2</sub> por meia hora para gelificação, filtradas em peneira de 0,053mm de diâmetro e enxaguadas com água destilada antes de serem transferidas para frascos esterilizados sob armazenamento refrigerado a 4°C.

#### **4.4.5. Caracterização das Micropartículas**

##### ***4.4.5.1. Viabilidade de *Lactobacillus* encapsulados sob armazenamento refrigerado***

A viabilidade dos microrganismos encapsulados foi acompanhada ao longo de 28 dias de armazenamento em frascos estéreis a 4°C. Para enumerar quantidade de células viáveis, 1g de micropartículas foi quebrada em 10 mL de solução de citrato de sódio a 0,06

mol/L, pH  $8,18 \pm 0,02$ , com agitação por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  para liberação dos microrganismos. A enumeração foi realizada de acordo com a técnica de contagem de microgotas de  $20\mu\text{L}$  da solução de micropartícula diluída em água peptonada 0,1% em placas contendo meio MRS ágar 1,5%. Após adsorção, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas em ambiente anaeróbico. Os resultados foram expressos em UFC/g.

#### **4.4.5.2. Eficiência de Encapsulação**

A eficiência de encapsulação foi calculada como descrito por Chávarri e colaboradores (2010), de acordo com a Equação 4, para se avaliar capacidade de retenção dos organismos no interior da partícula durante o processo de gelificação em relação à concentração de organismos presentes na solução biopolimérica usada na encapsulação.

$$\text{EE (\%)}: \frac{N}{N_0} * 100\% \quad (4)$$

onde N é o número de células viáveis liberadas pela homogeneização com citrato de sódio e  $N_0$  é o número de células livres adicionadas inicialmente à matriz de biopolímero, durante a produção das micropartículas.

#### **4.4.5.3. Digestibilidade “in vitro”**

Os testes de digestibilidade “in vitro” foram realizados em triplicata de acordo com a metodologia descrita por Minekus et al. (2014) em termobloco (Modelo DBH-S, Loccus Biotecnologia) a 1500RPM e  $37^{\circ}\text{C}$ . Como controle, probióticos livres e encapsulados em microcápsulas de alginato e gelatina sem XOS foram incubadas nas mesmas condições. Todo o procedimento foi realizado assepticamente em câmara de fluxo laminar.

Fluido gástrico simulado e fluido intestinal simulado foram preparados nas concentrações eletrolíticas proposta por Minekus et al. (2014), juntamente com as enzimas, cloreto de cálcio e água. A relação entre volume de alimento e fluidos simulados foi de 1:1 (v/v).

De acordo com Minekus et al. (2014), a simulação bucal pode ser omitida para alimentos líquidos, devido ao curto tempo de residência na boca. No entanto, antes de serem transferidos para etapa de simulação gástrica, 2g de microgéis foram diluídos em 8mL de água, de modo a reproduzir a diluição dos alimentos na etapa bucal (HOEBLER et al., 2002).

O volume de amostra diluída na etapa bucal foi misturado a 7,5mL de fluido gástrico simulado, adicionado de 1,6mL de pepsina 25000U/mL, para obtenção de 2000

U/mL ao final da mistura, 5 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0,3M e 0,695 $\mu$ L de água, ajustando-se o pH para 3,0 com HCl 6M ao final da mistura, que foi incubada à 37°C por duas horas.

Na fase intestinal, 20mL de fase gástrica foi misturada à 11mL de solução de fluido intestinal simulado adicionado de 2,5 mL de extrato de bile 160 mM, para obtenção de uma concentração de 10 mM no final da mistura, e 5mL de pancreatina 800 U/mL para concentração final de 100U/mL. Adicionou-se 40 $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 0,3 M e 1,31mL de água ao final da mistura que teve o pH 7 ajustado com o auxílio de solução de NaOH 1M antes da incubação das amostras por mais duas horas à 37°C.

As microcápsulas foram diluídas em água na proporção 1:4 para reproduzir a diluição do alimento na fase oral da digestão (HOEBLER, 2002), e 10 mL de cada solução foi incubada por duas horas com 10 mL de fluido gástrico simulado (pH 3,0). Em seguida, 20 mL da fase gástrica foi misturada com 20 mL de fluido intestinal simulado (pH 7,0). As amostras foram incubadas a 37°C por duas horas com agitação constante. Contagens foram realizadas em intervalos de meia hora, durante quatro horas de incubação.

A quantificação de células liberadas ao longo do trato gastrointestinal foi determinada pela técnica de contagem de placa, conforme descrito no item 4.4.5.1, em triplicata. Foi realizada a contagem tanto das células presentes do exterior das partículas, por diluição seriada em água peptonada 0,1%, quanto no interior por meio da liberação dos probióticos de dentro da partícula em solução de citrato de sódio 0,06M (pH 8,2) por 45 min, seguido de diluição seriada em água peptonada, tendo em mente manter-se os mesmos fatores de diluição para todas as amostras.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

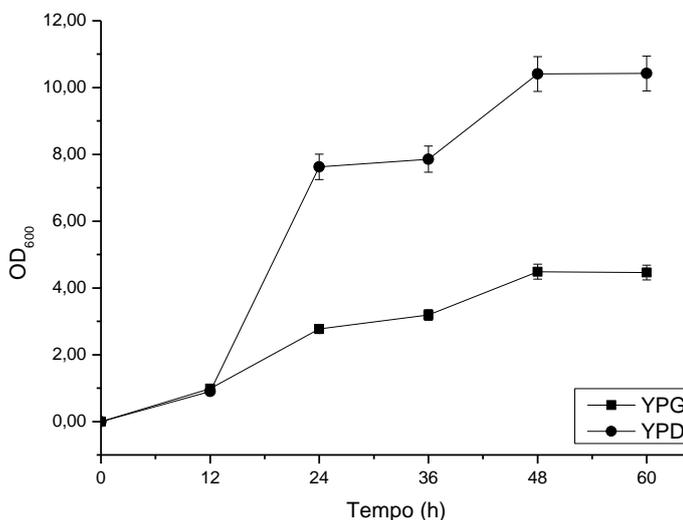
### 5.1. EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A seleção dos clones foi feita pela resistência a Zeocina e pela atividade enzimática extracelular calculada conforme descrito nos itens de 4.1.3.2 e 4.1.3.3 das culturas incubadas em tubos tipo Falcon de 50mL por 24h. Os clones que apresentaram atividade qualitativa foram selecionados para acompanhamento da produção da enzima por 60h.

Das células da linhagem X33 transformadas que apresentaram resistência a Zeocina, não foi observada atividade enzimática qualitativa nem presença da proteína em SDS-PAGE (dado não apresentado), tanto no meio intra quanto extracelular, provavelmente devido a modificações pós-traducionais inadequadas.

Já quanto à linhagem GS115, o clone selecionado com maior atividade no *screening* em Erlenmeyer apresentou atividade de 4,84U/mL após 24 horas de incubação, resultado coerente com o da literatura (ANDRADE, 2014), e foi utilizado para a avaliação da atividade enzimática por tempo de incubação em meio complexo YPD e YPG, para determinação da melhor fonte de carbono a ser adotada para a batelada alimentada em biorreator de bancada (Figura 10).

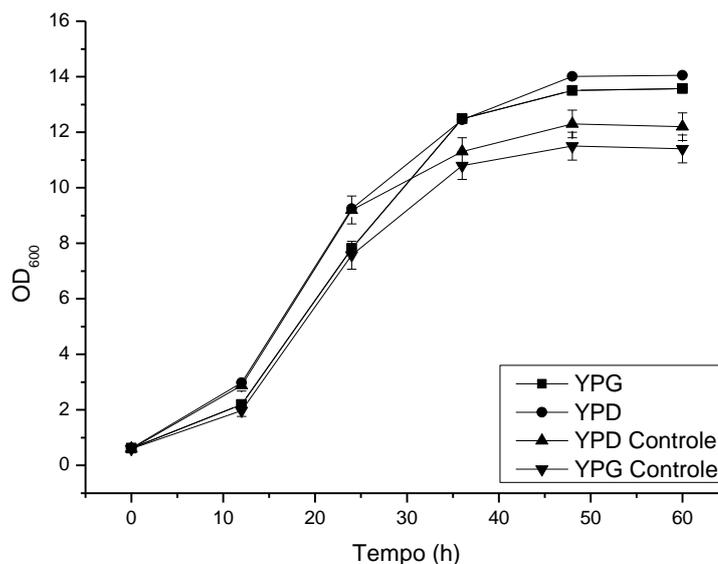
Figura 10: Atividade Enzimática de endoxilanase obtida por expressão heteróloga em meio YPD e YPG.



O monitoramento da atividade enzimática pelos níveis de açúcares redutores no meio é um método simples e rápido, que apesar de não ser tão preciso quanto métodos cromatográficos, foi útil para estimar a quantidade de enzima presente no meio quando não se dispunha de kits enzimáticos.

O meio complexo contendo glicose como fonte de carbono foi mais favorável à produção de xilanase. A atividade máxima atingida foi de 10,4U/mL após 60 horas de fermentação (Figura 10), atividade significativamente maior da obtida em meio contendo glicerol. A maior capacidade máxima de transferência de oxigênio (BAUMANN et al., 2010) assim como o fluxo molecular de carbono para o caminho da glicólise, acelerando e aumentando a síntese de GAPDH (WATERHAM et al., 1997) podem ter sido os fatores para a diferença observada na atividade enzimática superior obtida para o meio contendo glicose como fonte de carbono. Ao mesmo tempo, não foram observadas diferenças significativas no crescimento das culturas transformadas e não transformadas, tanto em meio contendo glicose quanto glicerol (Figura 11), resultado útil para se mensurar o estresse metabólico que a célula transformada pode ter sofrido pela inserção do gene heterólogo (LOOSER et al., 2015).

Figura 11: Densidade Celular atingida pelas culturas de *P. pastoris* transformantes e não transformantes em meio YPD e YPG.

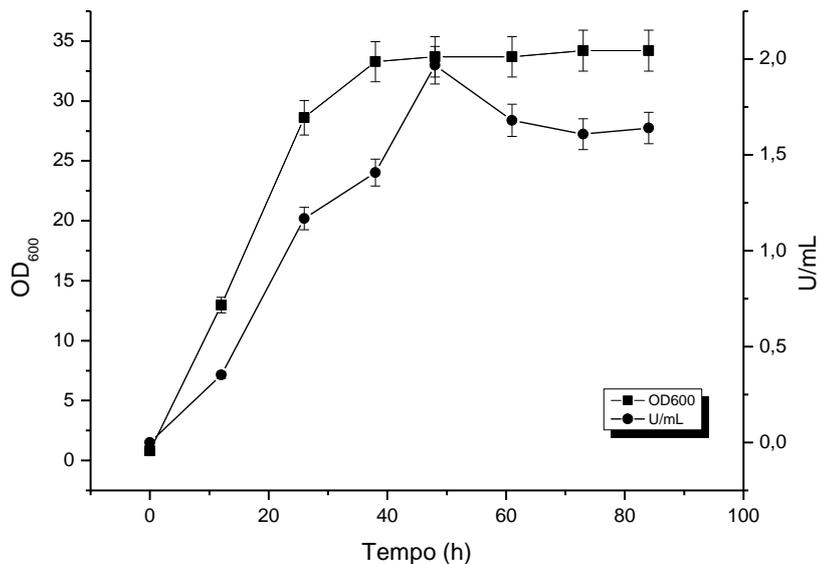


A fermentação em biorreator de bancada foi conduzida por 84 horas, tempo estabelecido anteriormente (ANDRADE, 2014) como o de produtividade máxima da enzima recombinante. Entretanto, como pode ser observado na Figura 12, o nível de expressão apresentou-se aquém do obtido em Erlenmeyer, evidenciando a necessidade otimização deste bioprocessos.

Importante mencionar que, embora baixa, a atividade enzimática só foi obtida em meio em que foi realizada a suplementação com oxigênio, mantido a 20%, demonstrando novamente (visto resultado obtido para meio com glicerol, na Figura 10) que a oxigenação é um fator importante a ser otimizado no processo, uma vez que não foi possível manter o

oxigênio dissolvido a 20% apenas com o controle de aeração e agitação sem a suplementação do ar com oxigênio puro. Além disso, uma intensa agitação, que atingiu 700RPM em meio sem a suplementação, na tentativa de se manter o nível de oxigênio dissolvido, eleva o estresse sofrido pelas células, podendo causar lise celular e parada de crescimento, com liberação de proteases intracelulares (LOOSER et al., 2015).

Figura 12: Densidade Celular e Atividade Enzimática de endoxilanase recombinante obtida no processo de batelada alimentada.



O pico de atividade enzimática foi após 48 horas do início do processo, indicativo de lise celular e liberação de proteases intracelulares ao meio. Células altamente prejudicadas tendem a parar o crescimento, morrer e lisar, o que gera problemas na operação do biorreator devido à formação de espuma (como observada) e liberação de proteases intracelulares. Células transformadas para a expressão de uma proteína heteróloga geralmente apresentam taxa máxima de crescimento significativamente menores, devido ao estresse metabólico gerado (LOOSER et al, 2015).

As condições de cultivo durante o *screening* em Erlenmeyer diferem significativamente das condições para a produção em biorreatores, portanto, nem sempre o melhor clone selecionado em Erlenmeyer, mesmo em condições otimizadas, pode ser o com melhor viabilidade para a produção em maior escala, e a translação dos resultados do *screening* em Erlenmeyer para as condições de um biorreator de bancada é uma tarefa laboriosa. Entretanto, realizar o *screening* dos clones transformantes em condições industriais nem sempre é uma opção viável (LOOSER et al, 2015; MATTANOVICH et al., 2004).

Ao fim do processo, as células foram separadas por centrifugação e o sobrenadante filtrado e concentrado 20 vezes, obtendo-se um extrato enzimático concentrado com 198,44U/mL, contendo 2,51  $\mu\text{g}$  de proteína total por  $\mu\text{L}$  de extrato, o qual foi devidamente diluído para os ensaios de hidrólise de hemicelulose da palha da cana e cálculo de atividade relativa descritos no tópico 5.2 a seguir. O extrato foi utilizado sem purificação de forma a economizar uma etapa que encarece o processo em larga escala.

## 5.2. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE XILANA

A palha, um dos mais abundantes subprodutos do processamento da cana-de-açúcar, geralmente é utilizada na coprodução de etanol ou devolvida ao solo por falta de utilidade comercial. Portanto, a utilização desta palha para propósitos industriais possui grande importância econômica. Nesse sentido, o desenvolvimento de processo de produção de biomoléculas a partir de subprodutos agroindustriais, o primeiro critério é a disponibilidade da matéria prima em termos de conteúdo de xilana *vis a vis* sua extratibilidade do material (SAMANTA et al., 2015).

Os resultados determinados para a composição da palha de cana deacetilada são apresentados na Tabela 3, realizado no CTBE. A metodologia aplicada de Sluiter et al. (2008) permitiu a caracterização do material, nas condições de 190°C por 20 minutos em uma concentração 10% (m/m). Os dados podem ser encontrados no banco do CTBE sob referência número BB-P048.

O material apresenta 96,66%  $\pm$  0,02% de matéria orgânica, dos quais 32,42%  $\pm$  1,00% hemicelulose, indicando potencial aplicação do material para produção de XOS devido a sua fração rica de xilana. Assim como outros subprodutos agroindustriais, celulose e hemicelulose são os componentes predominantes, constituindo 75,66%  $\pm$  1,44% de peso seco.

Tabela 3: Composição Química de Palha de Cana-de-açúcar Deacetilada (CTBE BB-P048)

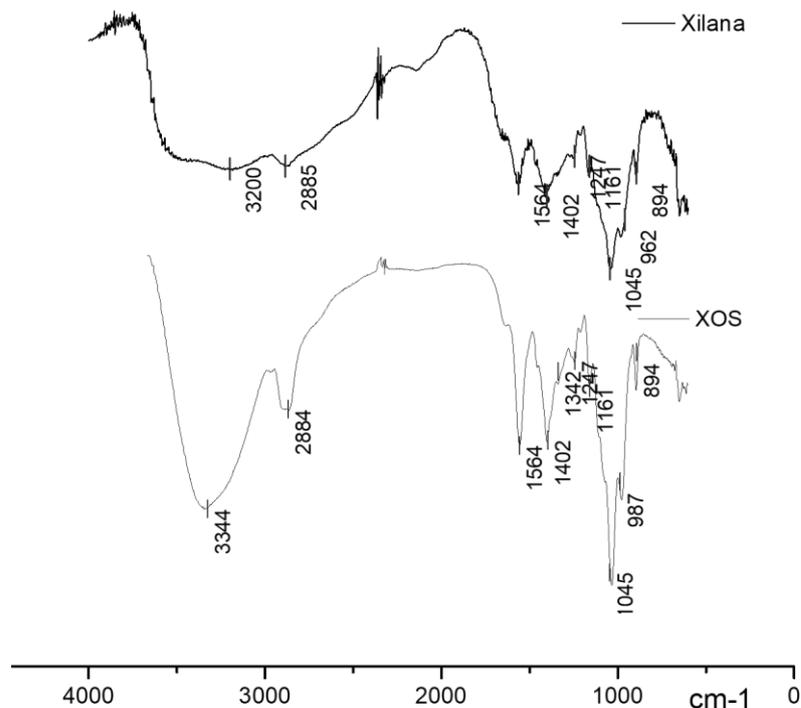
COMPONENTE* (%)	PALHA DEACETILADA
<b>CELULOSE</b>	43,24 $\pm$ 0,44
<b>HEMICELULOSE</b>	32,42 $\pm$ 1,00
<b>ACETIL</b>	00,23 $\pm$ 0,02
<b>LIGNINA</b>	20,85 $\pm$ 0,57
<b>CINZAS</b>	03,34 $\pm$ 0,02

\*Os dados são Médias  $\pm$  DP (n = 3), reportados como % da composição.

A palha deacetilada apresentou-se adequada para o desenvolvimento do trabalho e obtenção dos xilo-oligossacarídeos a partir de hidrólise enzimática, pois a eliminação de grupamentos acetil e menor teor de lignina permitem melhor rendimento de extração de hemicelulose, garantindo o processo de obtenção de xilo-oligossacarídeos mais produtivo.

A recuperação da xilana da palha obtida após extração alcalina foi de  $76,92 \pm 1,35\%$ . O material utilizado no presente trabalho, devido ao pré-tratamento, possui baixo teor de acetato e ácido urônico, confirmado pela ausência de sinal a  $1730 \text{ cm}^{-1}$ , no espectro de infra-vermelho (Figura 13), o que pode ter contribuído para uma mais elevada recuperação de xilana.

Figura 13: Espectro FT-IR de Xilana extraída de palha de cana-de-açúcar e XOS oriundo de sua hidrólise.



A Figura 13 ilustra o espectro infra-vermelho obtido comparativamente para a xilana extraída da palha de cana-de-açúcar e XOS oriundos de sua hidrólise, cujos resultados são descritos no próximo item. O perfil observado na região compreendida entre  $1200$  e  $900 \text{ cm}^{-1}$  é típico de oligômeros e polímeros de arabinoxilanas com baixo grau de ramificação, indicado pela presença de pico a  $968 \text{ cm}^{-1}$  (ROBERT et al., 2005). A presença de cadeias laterais de arabinose é evidenciada pelo pico a  $1161 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao alongamento C=O e C-O-C com contribuições de hidroxilas (PENG et al., 2009). O máximo de absorção a  $1045 \text{ cm}^{-1}$  é indicativo das ligações glicosídicas típicas de xilanas, sendo o pico a  $894 \text{ cm}^{-1}$

característico do domínio das ligações glicosídicas tipo  $\beta$  entre as unidades de açúcar. A ausência de sinal a  $1730\text{ cm}^{-1}$ , característico de grupo carbonila, implica a ausência de grupos acetil, removidos durante o pré-tratamento da palha e clivados durante a extração alcalina da hemicelulose (BIAN et al., 2013).

No material extraído, não foram detectados níveis de açúcares redutores. Após a caracterização, a pureza de hemicelulose da massa extraída foi de  $88,6\pm 1,44\%$ , sendo  $75,10\pm 0,65\%$  referente às unidades de xilose e  $13,50\pm 0,79\%$  arabinose, além disso foi identificado um teor de  $5,01\pm 0,53\%$  de glicose referente a decomposição de lignina, e massa remanescente de cinzas. Sabe-se que esta glicose é oriunda de lignina pois, no processo de extração, a celulose não é solúvel em hidróxido de potássio. Embora o álcool não precipite a lignina, as ligações éster e éter entre os as cadeias de xilana e lignina fazem com que uma pequena fração de lignina seja extraída juntamente (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000).

A adaptação da metodologia de extração de xilana sugerida por Zilliox e Debeire (1998), que consistiu em separar em duas etapas distintas a neutralização e a precipitação, permitiu um aumento de 50% para 98% o rendimento de extração da massa total de hemicelulose. A adição de ácido acético separadamente do etanol gelado garante atingir o exato ponto isoelétrico da xilana, que varia com a fonte, otimizando sua precipitação. Portanto, a xilana obtida da palha de cana por extração alcalina permitiu elevada recuperação de xilana livre de açúcares redutores, comprovando potencial para obtenção de xilo-oligossacarídeos.

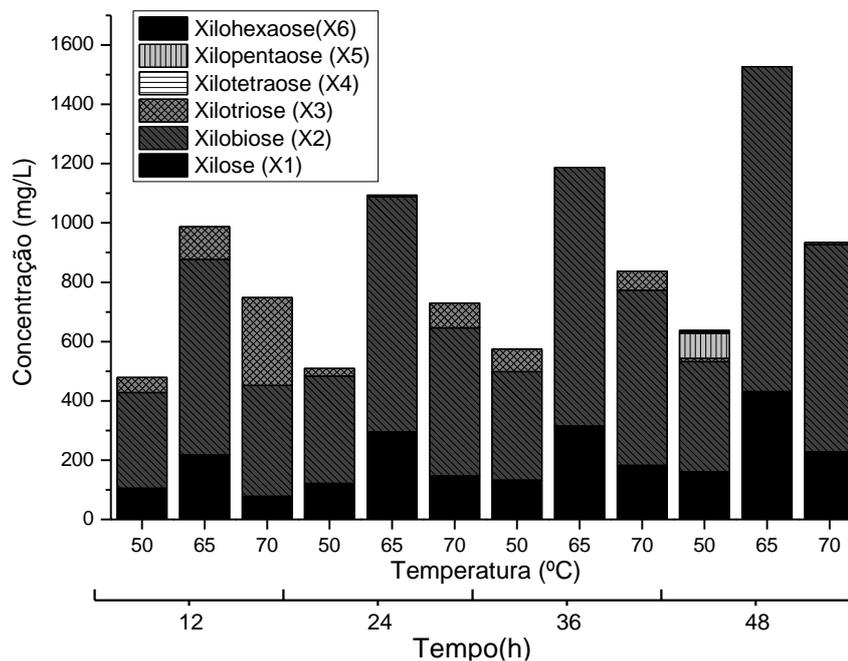
### **5.3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS**

A concentração enzimática foi determinada por testes de saturação de 30 minutos a  $50^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$ , em tampão de acetato de sódio  $50\text{mM}$  pH 5,3, utilizando a solução de xilana extraída da palha conforme descrito no item 4.2.1, mantendo-se a concentração de sólidos a 1%. A partir deste resultado, o extrato enzimático foi devidamente diluído em tampão de acetato  $50\text{mM}$  pH 5,3. A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.1.3.3., alterando-se apenas a temperatura. A atividade de saturação por grama de substrato (xilana extraída de palha de cana-de-açúcar) foi 130U a  $50^{\circ}\text{C}$ , 200U a  $65^{\circ}\text{C}$  e 40U a  $70^{\circ}\text{C}$ .

Os xilo-oligossacarídeos resultantes de 48h de hidrólise a  $50^{\circ}\text{C}$  (temperatura média adotada para enzimas xilanolíticas),  $65^{\circ}\text{C}$  e  $70^{\circ}\text{C}$  da xilana extraída da palha de cana, empregando a concentração de saturação da enzima, foram quantificados e caracterizados por

cromatografia de íons (Figura 14) para a observação do perfil de hidrólise. A 65°C, constatou-se maior concentração embora menor variedade de XOS. A 70°C, um teor de XOS menor do que a 65°C foi obtido, provavelmente devido ao curto tempo de meia vida da enzima nesta temperatura, estimado de 11,21h a 70°C para a enzima não purificada produzida por *C. flavecens* (LOPES et al., 2011), e aproximadamente 60 horas a 65°C para a enzima purificada (ANDRADE, 2014).

Figura 14: Quantificação de XOS após Hidrólise Enzimática de hemicelulose extraída da palha da cana empregando endoxilanase recombinante, a 50°C, 65°C e 70°C por 48 horas



É sabido que enzima não purificada contida em extrato enzimático apresenta maior tempo de meia vida devido ao efeito termoprotetor dos demais peptídeos presentes no meio (LOPES et al., 2011). Maior conversão para XOS foi observada a 65°C, com queda a 70°C. Ambas temperaturas se encontram dentro da faixa de temperatura ótima previamente estabelecida por Andrade (2014), cuja superfície de resposta apresenta melhores níveis de atividade entre 62,5°C e 77,5°C para pH 5,3. Fatores de termoestabilidade e tempo de meia vida cooperaram para melhores níveis de conversão da hemicelulose a 65°C, temperatura que permite, ao final das 48h de hidrólise que a enzima ainda se apresenta com 100% da atividade.

Os principais produtos obtidos foram xilobiose e xilotriose. Apesar de a xilobiose não ser considerada um oligossacarídeo por possuir mínimo grau de polimerização, é considerada um xilo-oligossacarídeo para fins alimentícios (VÁZQUEZ et al., 2000). Importante mencionar que os microrganismos probióticos tem preferências por XOS de

cadeia curta, como demonstrado por Moura et al., (2007). Além disso, xilanases termoestáveis são mais interessantes para produção de XOS do que xilanases mesofílicas, uma vez que o seu uso pode reduzir o tempo de hidrólise devido ao aumento da temperatura, além de reduzir probabilidade de contaminação (TENG et al., 2010). Tais informações fortalecem o potencial de aplicação da enzima para obtenção de XOS de elevado efeito prebiótico.

Os rendimentos da produção foram calculados para cada 12 horas de hidrólise, conforme Figura 14. De acordo com o gráfico de rendimentos, a conversão máxima de xilana em xilose foi de 6,16% (545,77mg/L), e em XOS (X2 a X5) foi de 12,81% (1134,97mg/L). Os principais produtos de hidrólise (xilobiose e xilotriose) são os tipos mais frequentes produzidos a partir de materiais lignocelulósicos (CARVALHO et al., 2013), e este resultado apresenta-se de acordo com o esperado para enzimas da família GH10, uma vez que os XOS produzidos por membros desta família são menores do que aqueles produzidos por xilanases da família GH11 (BIELY et al., 1997; MASLEN et al., 2007).

Maiores níveis de conversão do material foram alcançados ao se otimizar a concentração de endoxilanase adicionada da associação de GH51 arabinofuranosidase de *Aspergillus niger* (Megazyme®) (ÁVILA et al., 2020), para remoção das unidades de arabinose da cadeia principal de xilose, aumentando a quantidade de material disponível para hidrólise pela endoxilanase.

Para o DCCR, as enzimas endoxilanase e arabinofuranosidase foram as variáveis independentes para análise do sinergismo entre as duas enzimas. A variável resposta foi a concentração de XOS total obtido após as 48h de hidrólise a 65°C (Figura 15). A matriz dos ensaios e as respostas obtidas estão representadas na Tabela 4.

Ambas as enzimas tiveram efeito positivo ( $p < 0,10$ ) na produção de XOS, em concordância com os resultados obtidos por Ávila (2020). Novamente, os principais produtos de hidrólise foram xilobiose (X2) e xilotriose (X3), e não foi quantificado teor significativo de xilotetraose (X4). E analisando os efeitos da interação de endoxilanase com arabinofuranosidase, observa-se que os experimentos com pouca ou ausência de arabinofuranosidase apresentaram os maiores teores de xilohexose.

Tabela 4: Matrix de DCCR e Concentração de XOS obtida

	Concentração de XOS (mg/L)											
	Endo(U/g)	Ara(U/g)	(X1)	(X2)	(X3)	(X5)	(X6)	XOS	% conversão			
1	70	(-1)	128	(-1)	1139,8	1552,7	0	9,6	0	1562,3	30,50	
2	400	(+1)	128	(+1)	1489,9	2584,8	0	55,7	31,5	2672	46,97	
3	70	(-1)	760	(-1)	1209,1	1523,4	0	46,6	7,4	1577,4	31,45	
4	400	(+1)	760	(+1)	2448	3883	94	17,6	76,2	4070,8	73,58	
5	0	(-1,41)	444	(0)	0	17,8	0	0	0	17,8	0,20	
6	469	(+1,41)	444	(0)	1841,4	3347,8	259	53,4	8,7	3668,9	62,19	
7	235	(0)	0	(-1,41)	1041,9	1554,3	0	7,5	144,5	1706,3	31,02	
8	235	(0)	891	(+1,41)	1498,6	3315,7	132,4	46,4	43	3537,5	56,84	
9	235	(0)	444	(0)	1482,5	3315,3	170,6	47,1	45,7	3578,7	57,12	
10	235	(0)	444	(0)	1493,2	3315,5	166,7	43,5	46,4	3572,1	57,17	
11	235	(0)	444	(0)	1488,6	3316	168,6	48,3	40,2	3573,1	57,13	

Todos os parâmetros foram significativos, sendo gerado um modelo para a obtenção de XOS, com variação explicada  $R^2$  96,43% e F calculado maior que F tabelado (Tabela 5). A reprodutibilidade (baixo desvio) dos ensaios na condição do ponto central permitiu que fossem analisados os efeitos das variáveis. O modelo codificado obtido é apresentado na Equação 5.

$$[XOS] = 3574,63 + 1095,82e - 806,15e^2 + 500,42a - 416,83a^2 + 345,92ea \quad (5)$$

,onde [XOS] é a concentração de XOS em mg/L, “e” é o coeficiente codificado para endoxilânase e “a” o coeficiente para arabinofuranosidase.

Tabela 5: Análise de Variância (ANOVA) para a concentração de XOS

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcalc/Ftab	$R^2$
Regressão	15958389,6	5	3191678		
Resíduos	590466,081	5	118093,2	7,833846	96,43%
Total	16548855,6	10			

A Figura 16 apresenta a superfície resposta do modelo gerado, que foi validado sob as mesmas condições de hidrólise, utilizando as concentrações otimizadas obtidas para as enzimas. Foi obtida na validação experimental (Tabela 6) uma concentração de XOS dentro da prevista pelo modelo, com uma conversão total de hemicelulose de  $72,56\% \pm 4,22$ . Xilobiose (X2) representou 93% do total de XOS produzido, seguido de Xilotriose (X3) (4%), e o remanescente por Xilopentose e Xilohexose, não sendo novamente quantificado em teor significativo de Xilotetraose (X4).

Tabela 6: Validação experimental do modelo obtido por DCCR para a concentração de XOS

	U/g de substrato	[XOS] Predito (mg/L)	[XOS] Validado (mg/L)
Endoxilanase	370	4299,17±317,62	4162,6±29,04
Arabinofuranosidase	730		

Figura 15: Concentração de XOS obtido nos experimentos do DCCR. Observação: Xilotetraose (X4) não está apresentada na legenda por não ter sido quantificada em concentração significativa.

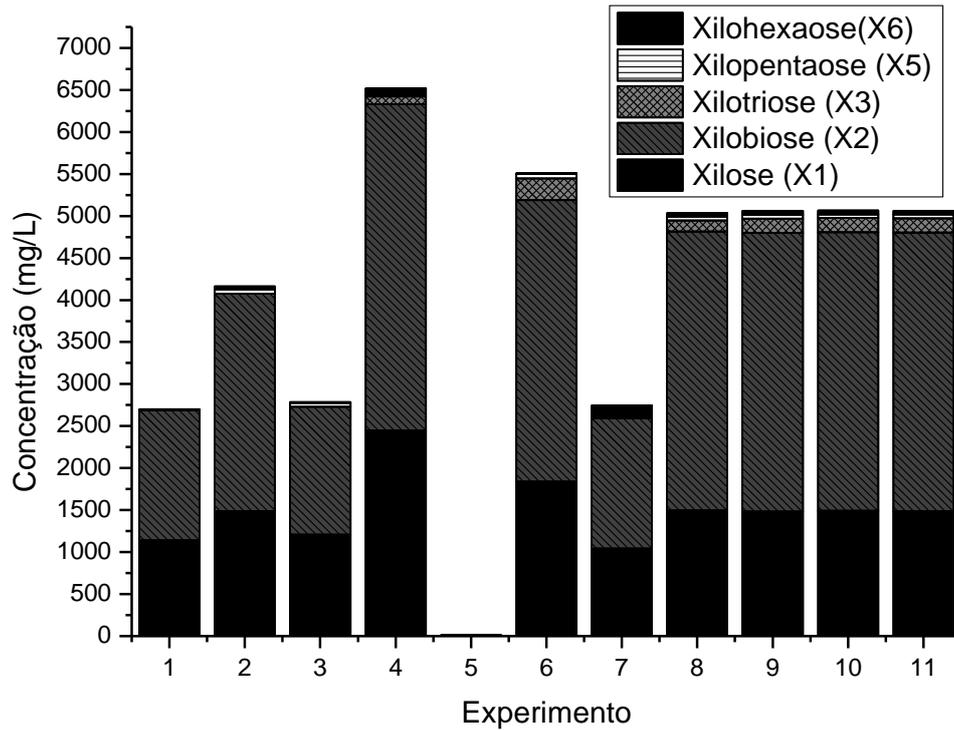
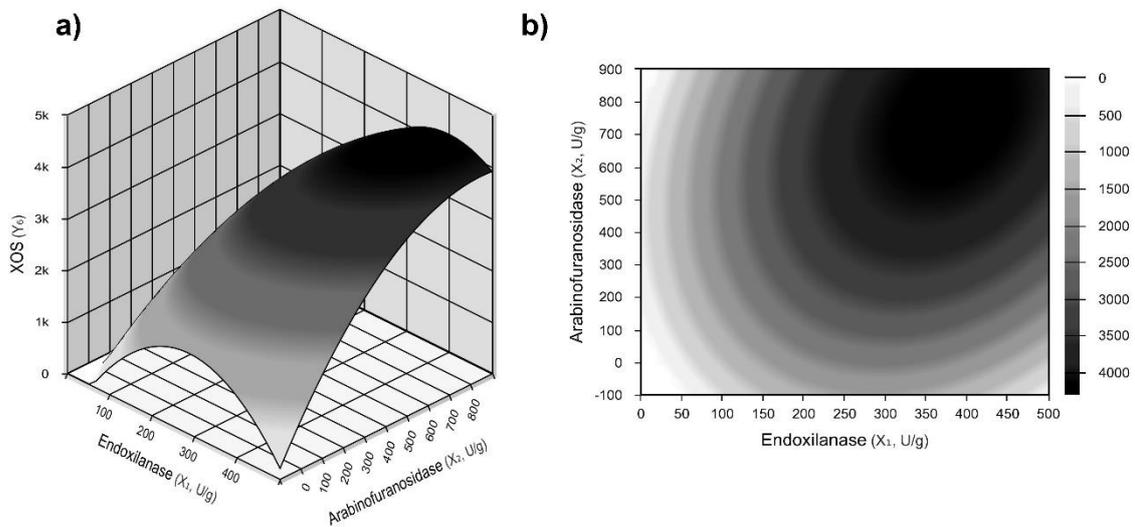


Figura 16: Superfície Resposta e curvas de contorno para a obtenção de XOS em função da concentração de endoxilanase e arabinofuranosidase



## 5.4. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE MACRO E MICROGEIS DE ALGINATO, GELATINA E XILO-OLIGOSSACARÍDEOS

Para melhor compreensão dos resultados obtidos, quantificou-se o material XOS comercial utilizado nesta etapa do trabalho quanto aos diferentes graus de polimerização presentes no material, seguindo a mesma metodologia descrita em 4.2.4 (Tabela 7).

*Tabela 7: Quantificação de XOS comercial utilizado para a caracterização dos macro e microgeis obtidos pela associação de XOS com alginato e alginato-gelatina.*

	Xilose	Xilobiose	Xilotriose	Xilotrealose	Xilopentose	Pureza
% (m/m)	0	24,54	33,86	12,30	3,59	74,29

### 5.4.1. Caracterização de soluções biopoliméricas

A adição de XOS às soluções biopoliméricas não causaram alteração significativa no pH das soluções, que permaneceu em torno de 6 para todas as formulações. A curva de titulação de potencial zeta das soluções puras de alginato e gelatina demonstram que nesta faixa de pH, o alginato apresenta carga negativa ( $\sim -40$  mV), e a gelatina está próxima de seu ponto isoelétrico. A adição de XOS não altera significativamente a carga superficial das soluções, uma vez que os polímeros de XOS não apresentam carga.

Utilizou-se o modelo Herschel-Bulkley para a caracterização das soluções puras de XOS, as quais foram caracterizadas como fluidos newtonianos, apresentando valor de  $n$  igual a 1 e tensão residual igual a 0, sendo soluções de açúcares pouco concentrados. As soluções de alginato e gelatina puras apresentaram características pseudoplásticas compatíveis com as relatadas na literatura (MANCINI; MORESI; SAPPINO, 1996; MA et al., 2014). A uma taxa de deformação de  $100\text{s}^{-1}$ , as soluções registraram os valores de viscosidade aparente apresentados na Tabela 8.

Os resultados da adição de XOS ao sistema biopolimérico alginato-gelatina ajustados pela lei da potência (tensão residual igual a 0), apresentados na Tabela 8, registraram redução na viscosidade aparente (Figura 17) quando da associação de XOS, sendo observada para estes casos crescente viscosidade aparente proporcional à concentração de XOS, ou seja, proporcional a concentração de sólidos. Comparativamente, o estudo de Zhang e colaboradores (2019) demonstrou que o aumento na concentração de XOS em formulações

com goma arábica também resultou em maiores índices de consistência (k), que indica maior viscosidade aparente das soluções, devido ao aumento do teor de sólidos da solução.

As propriedades termoplásticas e higroscópicas atribuídas aos XOS podem ser empecilhos para a aplicação de XOS em formulações alimentícias, podendo ocasionar problemas operacionais e deterioração do produto durante o processo de secagem e armazenamento (ZHANG et al., 2019). Por serem oligossacarídeos de baixo peso molecular, sua adição em formulações normalmente resulta na redução no índice de consistência, aumentando o índice de comportamento, o que reduziria o perfil pseudoplástico do fluido por aproximar de fluido newtoniano (maior valor de n). A capacidade de absorção de água dos XOS geralmente leva a um aumento do teor de água entre as moléculas, aumentando a distância entre elas, o que reduz a viscosidade aparente (DIMITRELI et al., 2005).

Tabela 8: Viscosidade aparente das soluções biopoliméricas a uma taxa de deformação de  $100s^{-1}$  e parâmetros de ajuste do modelo Herschel-Bulkley.

	Viscosidade aparente a $100s^{-1}$ (Pa.s)	k(Pa.n <sup>s</sup> )	n(-)	R <sup>2</sup>
<b>A</b>	0,157 <sup>a*</sup>	0,585±0,040 <sup>a*</sup>	0,715±0,001 <sup>a*</sup>	0,991
<b>G</b>	0,041 <sup>b</sup>	0,267±0,010 <sup>b</sup>	0,593±0,001 <sup>b</sup>	0,991
<b>1% XOS</b>	0,002 <sup>c</sup>	0,002±0,000 <sup>c</sup>	1±0,000 <sup>c</sup>	0,992
<b>3% XOS</b>	0,002 <sup>c</sup>	0,002±0,000 <sup>c</sup>	1±0,000 <sup>c</sup>	0,992
<b>5% XOS</b>	0,002 <sup>c</sup>	0,002±0,000 <sup>c</sup>	1±0,000 <sup>c</sup>	0,992
<b>AG</b>	0,922 <sup>d</sup>	17,972±0,020 <sup>d</sup>	0,355±0,001 <sup>d</sup>	0,999
<b>AGX1</b>	0,381 <sup>e</sup>	2,385±0,130 <sup>e</sup>	0,602±0,001 <sup>e</sup>	0,992
<b>AGX3</b>	0,433 <sup>f</sup>	3,192±0,110 <sup>f</sup>	0,566±0,001 <sup>f</sup>	0,992
<b>AGX5</b>	0,619 <sup>g</sup>	6,218±0,260 <sup>g</sup>	0,499±0,001 <sup>g</sup>	0,994
<b>AX1</b>	0,156 <sup>a</sup>	0,524±0,030 <sup>a</sup>	0,737±0,001 <sup>h</sup>	0,991
<b>AX3</b>	0,157 <sup>a</sup>	0,537±0,030 <sup>a</sup>	0,733±0,001 <sup>i</sup>	0,991
<b>AX5</b>	0,158 <sup>a</sup>	0,559±0,030 <sup>a</sup>	0,725±0,001 <sup>j</sup>	0,991

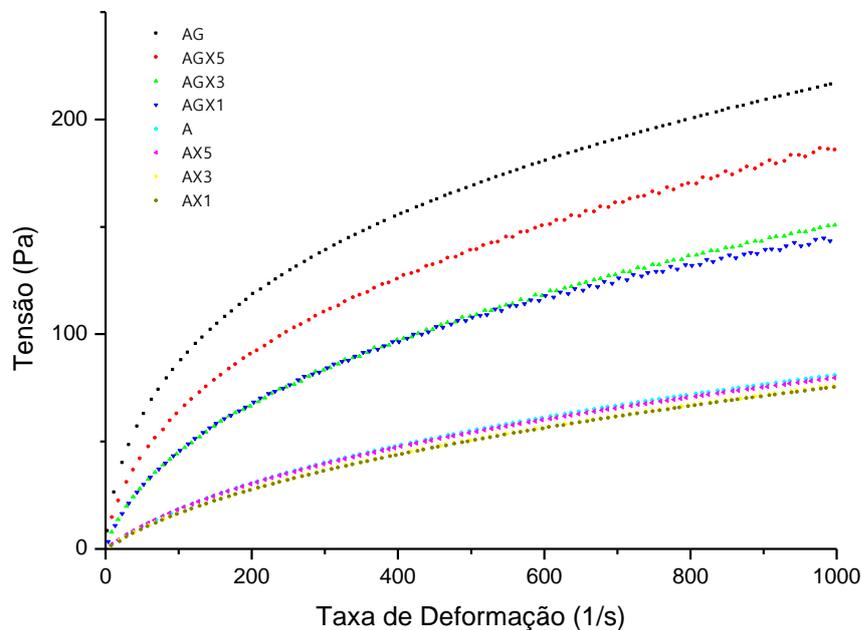
Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si a um nível de 5% de significância pelo Teste Tukey.

O menor índice de comportamento (n), representando um comportamento mais pseudoplástico, observado para as formulações de alginato, gelatina e concentrações crescentes de XOS possivelmente indica maiores interações entre as cadeias poliméricas nestas concentrações. A adição de XOS em requeijão cremoso com baixo teor de gordura do

estudo de Ferrão e colaboradores (2018) levou a uma diminuição do índice de consistência, e aumento do índice de comportamento, indicando importante papel dos XOS na redução da consistência de produtos com baixo teor de gordura (FERRÃO et al., 2018). Ao mesmo tempo, como observado na Figura 17, maiores valores de índice de consistência foram obtidos com o aumento do conteúdo sólido do fluido, indicando correlação positiva entre a viscosidade aparente (Tabela 8) e a concentração de sólidos. Resultados similares foram relatados por Zhang e colaboradores (2019), com formulações constituídas com concentrações crescentes de XOS e goma arábica.

Tal comportamento pseudoplástico das formulações de alginato, gelatina e XOS pode ser interpretado como resultado da formação de uma estrutura interna mais rígida, com ligações cruzadas e estiramento das cadeias poliméricas que ficam expostas a interações intermoleculares mais intensas com o aumento na taxa de deformação (MA et al., 2014). Os resultados obtidos para as curvas de escoamento das soluções biopoliméricas podem ser melhor compreendidos com as análises realizadas com os macrogeis obtidos destas soluções.

Figura 17: Curva de Escoamento das Soluções Biopoliméricas de Alginato 1%, Gelatina 1,5% e XOS (1, 3 e 5%). A legenda é apresentada na ordem, de cima para baixo.



#### 5.4.2. Avaliação dos Macrogeis

A associação de oligossacarídeos às matrizes biopoliméricas de sistemas de encapsulação vem sendo estudada com a finalidade de aumentar a resistência e reduzir a porosidade dos microgeis de forma a diminuir a fuga dos compostos encapsulados,

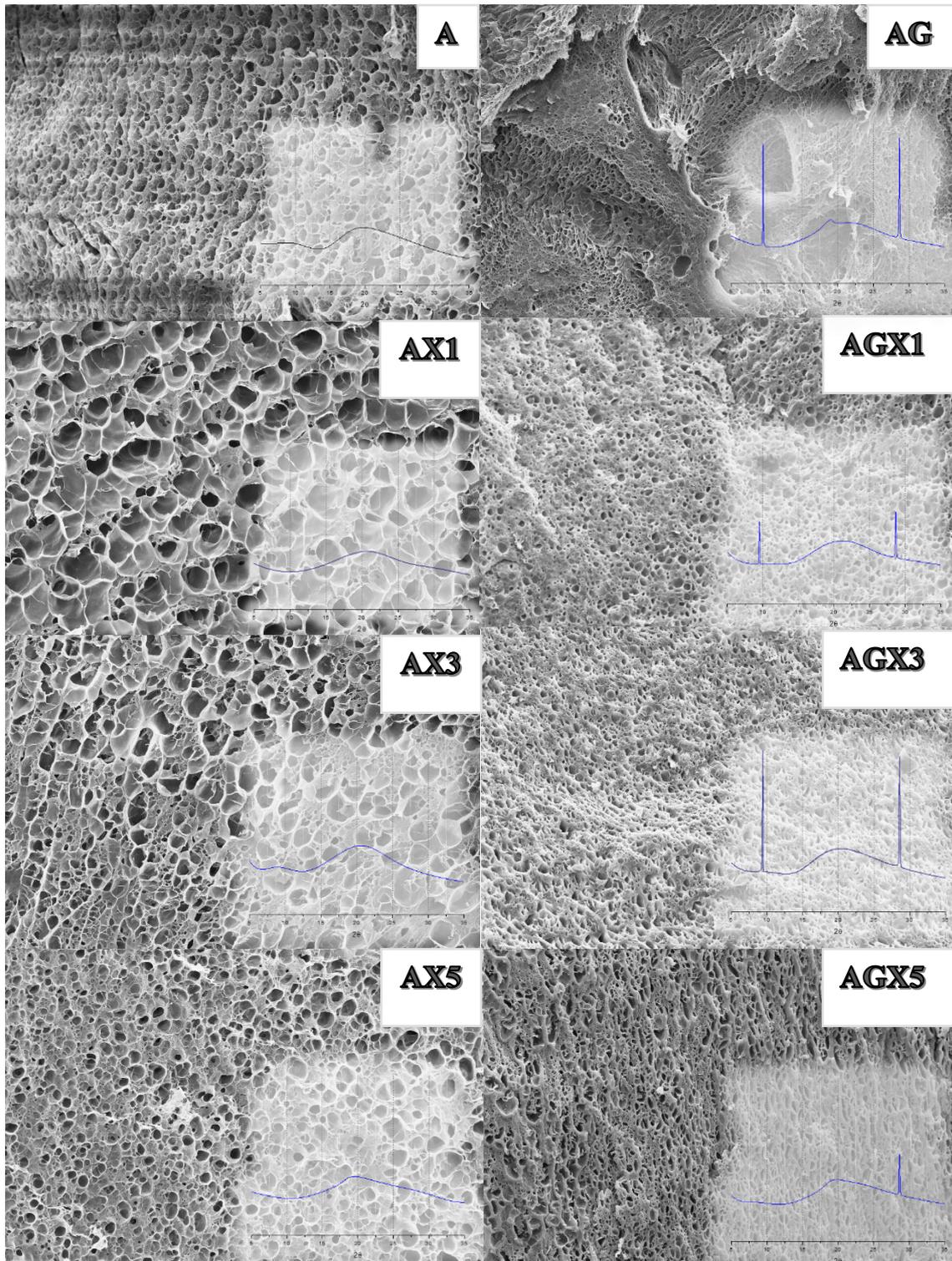
colaborando para sua liberação controlada (PHOEM; CHANTHACHUM; VORAVUTHIKUNCHAI, 2015). A avaliação da estrutura formada pela associação de alginato, gelatina e XOS foi realizada com a finalidade de analisar a cristalinidade, interações intermoleculares e porosidade em relação à capacidade de proteção de compostos ativos encapsulados.

A partir dos resultados obtidos por MEV, a adição de XOS à formulação constituída apenas por alginato resultou em uma estrutura com maior porosidade. Contudo observa-se diminuição do tamanho dos poros com o incremento da concentração de XOS. Por outro lado, para as formulações de alginato e gelatina, a adição de XOS resultou na diminuição da porosidade até certo ponto, constatando-se que a formulação AGX3 (alginato 1%, gelatina 1,5% e XOS 3%) resultou em partículas com a menor porosidade, resultado de uma estrutura mais coesa, em concordância com o difratograma obtido (Figura 18). Já para a formulação com 5% de XOS, observa-se um aumento na porosidade.

O difratograma do macrogel obtido puramente por alginato apresentou picos suaves a  $2\theta=13^\circ$  e  $2\theta=23^\circ$ , característicos do material. A gelatina utilizada para a produção das soluções biopoliméricas apresentou um difratograma (imagem não apresentada) característico de material parcialmente cristalino, com pico suave localizado a  $2\theta=22^\circ$ , resultado coerente com o reportado na literatura (DONG, WANG, DU, 2006).

Formulações compostas por alginato e XOS demonstraram ausência da banda  $2\theta=13^\circ$ , o que sugere redução da organização molecular, com diminuição da cristalinidade. Pelo perfil de difração da associação alginato-gelatina, observou-se intensificação da banda suave a  $2\theta=23^\circ$ , e dois novos picos se destacam a  $2\theta=9^\circ$  e  $2\theta=27^\circ$ , os quais podem ser explicados pela forte interação entre os polímeros e íons de cálcio, resultando na formação de uma estrutura mais cristalina e organizada. Os mesmos novos picos, com menor intensidade, entretanto, foram reportados para membranas constituídas por alginato e celulose, para as quais a interação do alginato com os íons de cálcio demonstrou facilitar a cristalização da celulose (YANG et al., 2000). Por outro lado, os difratogramas obtidos por Dong e colaboradores (2006) para a blenda de alginato e gelatina não apresentaram o mesmo perfil de cristalinidade, porém vale mencionar que tais formulações permaneceram pouco tempo em contato com a solução de cloreto de cálcio e passaram por sonicação, além do emprego de maior concentração de sólidos, detalhes da metodologia que desempenham influência na força de interação entre os polímeros e organização da estrutura.

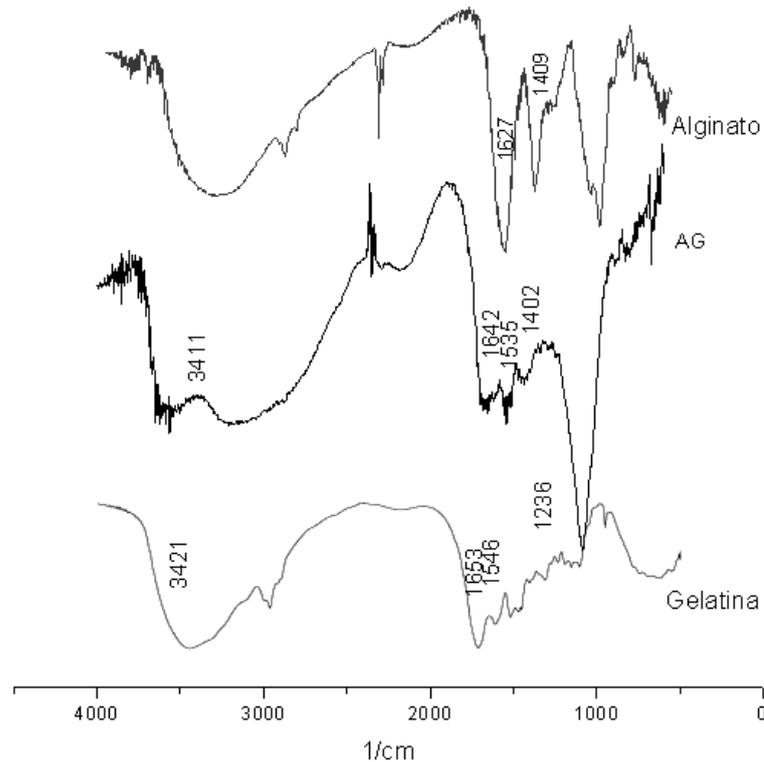
Figura 18: Microscopia Eletrônica de Varredura e Difração Raio-X de Macrogeis, ampliação 500X.



Escala:  $\square$  20  $\mu\text{m}$

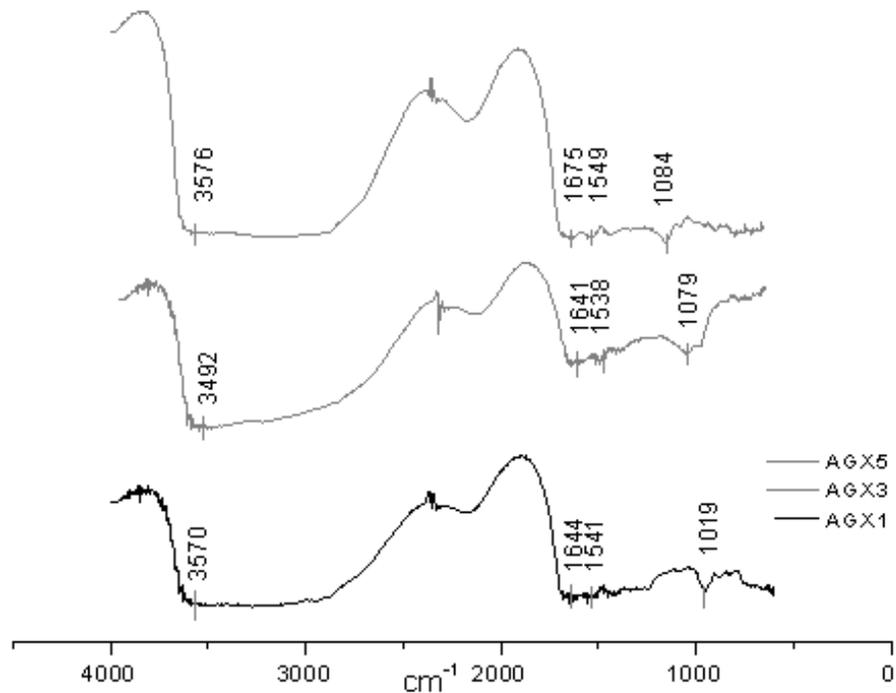
Comparando-se formulações de alginato e gelatina com adição de XOS, é observada intensificação de ambos os picos para a formulação com 3% de XOS, enquanto que a 5% observa-se redução da banda a  $2\theta=27^\circ$ , e ausência do pico a  $2\theta=9^\circ$ . Somado à análise das interações intermoleculares por FT-IR, este resultado permite a conclusão de que há enfraquecimento estrutural para a formulação AGX5.

Figura 19: Espectro FT-IR de Alginato, Gelatina e Blenda AG.



A Figura 19 apresenta o espectro FT-IR da solução de gelatina pura (1,5% m/m), do macrogel obtido de alginato puro e do macrogel obtido pela blenda alginato e gelatina. A respeito do macrogel de alginato puro, as bandas em  $1627\text{ cm}^{-1}$  e  $1409\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas, segundo a literatura (HUANG et al., 1999), ao alongamento assimétrico e simétrico do grupamento  $-\text{COO}$ , respectivamente. Pelo espectro das formulações de alginato e gelatina, as duas bandas características da gelatina, a  $1653\text{ cm}^{-1}$  e  $1546\text{ cm}^{-1}$  (XIAO et al., 2001), são deslocadas para comprimento de onda menores, o que indica mudança estrutural por aumento de ligações entre os polímeros, ao mesmo tempo em que a banda de absorção ao redor de  $3500$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , referente a ligações N-H e -OH, é deslocada para menor comprimento de onda, em torno de  $3411\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo um aumento de ligações de hidrogênio, o que indica forte interação molecular entre os polímeros (DONG, WANG, DU, 2006), cujo esquema foi apresentado na Figura 9.

Figura 20: Espectro FT-IR de formulações de alginato, gelatina e XOS de 1%, 3% e 5%



Em relação às formulações de alginato e gelatina com adição de XOS (Figura 20), observa-se ligeiro deslocamento das bandas características da gelatina para uma região de menor comprimento de onda para as formulações com XOS, entretanto, nota-se que com o incremento da concentração de XOS (AGX5), começa a haver um deslocamento destas bandas para uma região de maior comprimento de onda, de 1640 para 1675 $\text{cm}^{-1}$ , ou seja, enfraquecendo as interações, resultado coerente com o difratograma obtido.

Tais resultados sugerem que as interações moleculares são aumentadas com a associação dos oligômeros de XOS até certa concentração. Ao mesmo tempo, não houve novas bandas características para as formulações com adição dos prebióticos, o que permite concluir que não houve reação química óbvia entre os polímeros.

Ivanovska e colaboradores (2012) estudaram o efeito da adição de fruto-oligossacarídeos em diferentes concentrações em microcápsulas de alginato e quitosana por FT-IR, sugerindo a existência de ligações de hidrogênio entre os polímeros, concluindo que maiores concentrações de fruto-oligossacarídeos (mais de 5% m/v) podem levar a mudanças conformacionais na estrutura do alginato, resultando na perda de íons de cálcio ligados aos grupos carboxílicos, o que poderia ser relacionado aos resultados observados nas análises de DRX e MEV para a formulação AGX5. Além disso, os géis de alginato e gelatina com

concentrações mais elevadas de FOS proporcionaram a formação de poros maiores (SILVA, 2016; IVANOVSKA et al., 2012), resultado também observado na imagem de MEV para AGX5, o qual pode estar associado à diminuição das interações intermoleculares entre os polímeros.

A associação de alginato com prebióticos já foi reportada por Chen et al. (2005) e De Araújo Etchepare et al. (2016) como alternativa para contornar limitações na matriz porosa de alginato após o processo de gelificação, o que facilita a difusão de compostos pela matriz, podendo provocar maior exposição dos ativos, e conseqüentemente menor proteção. Tais descrições corroboram com os resultados obtidos para adição de XOS à matriz biopolimérica de alginato e gelatina, nos quais as estruturas obtidas apresentaram poros menores e estrutura mais cristalina.

A fim de compreender a interação da cadeia polimérica do alginato com os XOS, a Figura 21 apresenta o espectro para os macrogeis obtidos pela associação destes polímeros. Nota-se que a banda característica do alginato referente ao alongamento assimétrico do grupamento  $-COO$  é deslocada para menor comprimento de onda, ou seja, possível maior interação, enquanto que a referente ao alongamento simétrico é deslocada para região de maior comprimento. O incremento da concentração de XOS, assim como nas demais análises, sugerem enfraquecimento de interações, evidenciado pelo descolamento de ambas as bandas para região de maior comprimento de onda e redução da intensidade do sinal, assim como da banda compreendida na região de  $3000$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , indicando diminuição de ligações de hidrogênio.

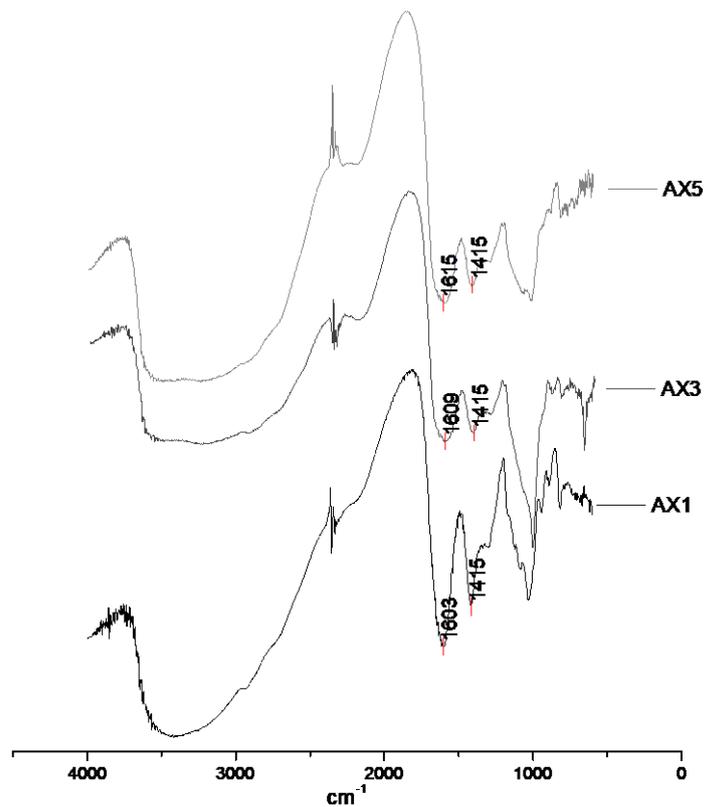
Devido a interação dos XOS com o alginato se dar na região responsável pela formação de quelato com os íons de cálcio, há uma competição das moléculas de XOS com estes íons, o que diminui a quantidade de grupamentos carboxílicos disponíveis para interação com o cálcio, resultando na formação de uma estrutura mais fraca e com poros maiores.

Por outro lado, a forte interação entre os polímeros de alginato e gelatina já foi reportada e esquematizada (Figura 9), havendo ligações iônicas e de hidrogênio entre as cadeias poliméricas. Esta conformação das cadeias gera uma região com um grupo carboxílico das unidades de ácido gulurônico livre, disponível para interação com polímeros de cadeia curta. Visto que os XOS utilizados para o preparo dos macrogeis são constituídos majoritariamente por xilobiose e xilotriose, tais cadeias curtas podem ser capazes de ocupar o

espaço intermolecular gerado pela interação do alginato com a gelatina, resultando em uma estrutura mais coesa e com menores poros.

Entretanto, como já mencionado anteriormente, o excesso destes polímeros entre as cadeias de alginato e gelatina competem com os íons de cálcio, inibindo a interação responsável pela gelificação, o que causa perda de íons pela matriz, enfraquecendo a estrutura, constatado pelos resultados obtidos para os macrogeis com 5% de XOS (AGX5).

Figura 21: FT-IR de macrogeis obtidos pela interação de Alginato e XOS (1, 3 e 5%)



### 5.4.3. Caracterização das micropartículas

A composição biopolimérica determina as características estruturais, influenciando no tamanho e na esfericidade das partículas produzidas por extrusão. Os perfis reológicos ditam as respostas mecânicas das soluções submetidas a deformação e a estabilidade da estrutura formada por gelificação.

Características inerentes ao material, como higroscopicidade e rugosidade, podem alterar negativamente a textura de um alimento, ocasionar problemas operacionais e de armazenamento, e diminuir o tempo de prateleira do produto. A encapsulação é uma tecnologia que vem sendo buscada como alternativa para se contornar estes problemas, uma

vez que a associação polimérica pode conduzir a respostas mecânicas diferenciadas (ZHANG et al., 2019).

Sendo este processo de gelificação externa por difusão de íons  $\text{Ca}^{+2}$  para o interior das gotas atomizadas, o conhecimento da área superficial das partículas é importante, deste modo o Diâmetro médio de superfície, também conhecido como Diâmetro médio de Sauter foi medido, por relacionar a área superficial por unidade volumétrica da fase dispersa (PINTO, 2006).

Avaliando os resultados para  $D[3,2]$  apresentados na Tabela 9 e Figura 22, observamos que a adição de XOS variando de 1 a 5 % aos sistemas biopoliméricos promoveu aumento significativo do tamanho das partículas. Entretanto não se observa diferença significativa no diâmetro médio de partículas entre as formulações com a adição de XOS (AX1, AX3, AX5 e AGX1, AGX3, AGX5).

A diferença na pressão osmótica entre a solução biopolimérica e a solução salina pode ocasionar difusão de água para o interior da partícula simultaneamente com a difusão dos íons de cálcio, tornando-a menos densa, o que pode ocasionar o aumento no tamanho do diâmetro das partículas (HU; AZADI; ARDEKANI, 2015). A característica higroscópica atribuída aos XOS (DIMITRELI et al, 2005) pode contribuir para este aumento da difusão de água para o interior da partícula, em concordância com os resultados obtidos pelos ensaios reológicos, nos quais observa-se redução da viscosidade aparente (Tabela 8). Evidência disso é o resultado do ensaio reológico (seção 695.4.1) para as formulações AX1, AX3 e AX5 associado com o tamanho de partículas obtidos, sendo estas formulações a apresentarem os maiores valores de diâmetro e as menores viscosidades.

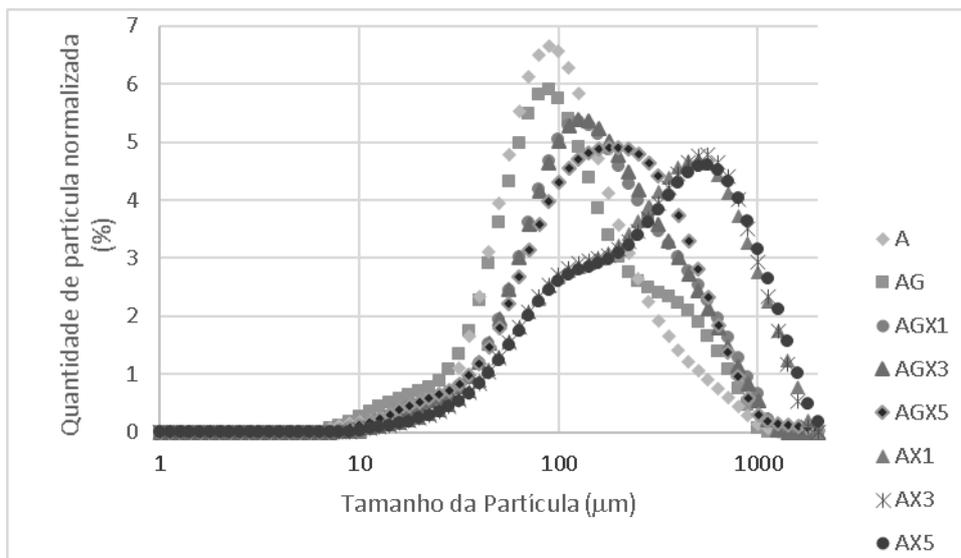
O aumento do diâmetro das partículas pode atrapalhar a distribuição celular no interior da partícula, por aumentar a área de difusão de componentes como gases, prejudicando a instalação de um ambiente anaeróbico requerido pelo organismo encapsulado (OMAR, 1993). Entretanto, o tamanho obtido para as formulações AGX1, 3 e 5 se encontra dentro da faixa capaz de proporcionar proteção aos probióticos (maior que  $10\mu\text{m}$  e menor que 1 mm de diâmetro) (HANSEN et al., 2002). Além disso, deve-se associar esta medida com a porosidade obtida, uma vez que são complementares para garantir boa distribuição celular e taxa de difusão de componentes, como o oxigênio, o qual apresenta efeitos tóxicos.

Tabela 9: Distribuição do Tamanho de Partícula

Formulação	D[3,2] ( $\mu\text{m}$ )	Span
A	76,031 $\pm$ 0,493 <sup>a</sup>	2,550 $\pm$ 0,077
AX1	147,337 $\pm$ 0,844 <sup>b</sup>	2,697 $\pm$ 0,121
AX3	147,777 $\pm$ 0,829 <sup>b</sup>	2,633 $\pm$ 0,138
AX5	152,640 $\pm$ 0,316 <sup>b</sup>	2,754 $\pm$ 0,103
AG	69,984 $\pm$ 1,012 <sup>c</sup>	3,554 $\pm$ 0,193
AGX1	96,351 $\pm$ 0,374 <sup>d</sup>	2,852 $\pm$ 0,182
AGX3	97,295 $\pm$ 1,691 <sup>d</sup>	2,439 $\pm$ 0,063
AGX5	98,759 $\pm$ 1,241 <sup>d</sup>	2,572 $\pm$ 0,195

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si a um nível de 5% de significância pelo Teste Tukey.

Figura 22: Distribuição do Tamanho de partícula dos microgéis de alginato e alginato-gelatina com diferentes concentrações de XOS

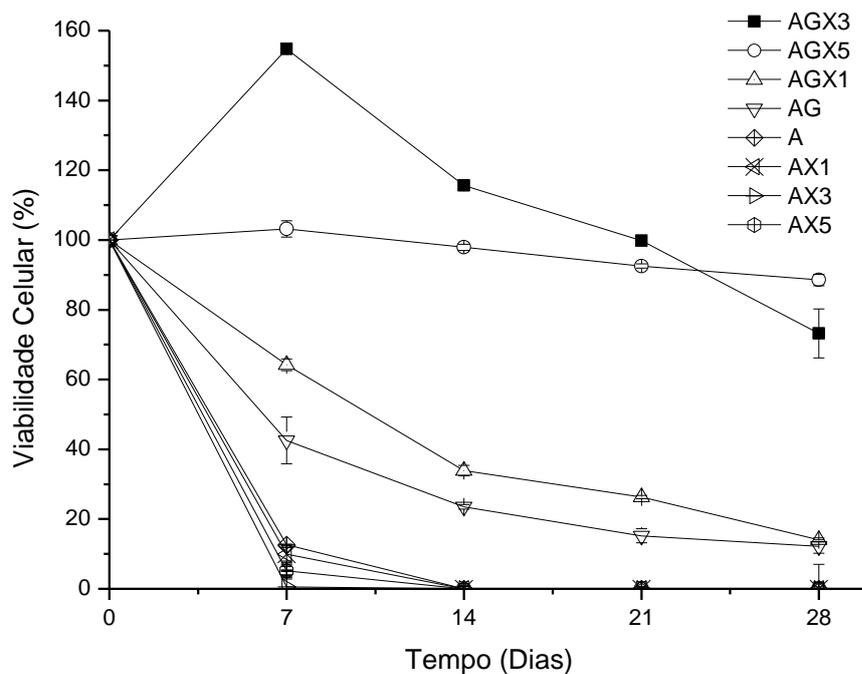


## 5.5. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS A PARTIR DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS ORIUNDOS DA PALHA DE CANA DE AÇÚCAR: VIABILIDADE DE *L. acidophilus* ENCAPSULADOS E SIMULAÇÃO DE DIGESTIBILIDADE *in vitro*

### 5.5.1. Viabilidade Celular e Eficiência de Encapsulação

Após ensaios preliminares utilizando XOS comerciais, a produção das micropartículas simbióticas foi conduzida empregando os XOS oriundos da hidrólise da palha da cana. Os resultados apresentados no teste de viabilidade dos microrganismos encapsulados armazenados sob refrigeração (Figura 23) mostram que matrizes contendo xilo-oligosacarídeos foram eficientes para a manutenção da viabilidade de *L. acidophilus*.

Figura 23: Viabilidade Celular de *L. acidophilus* encapsulados ao longo de 28 dias de armazenamento. A legenda apresenta-se na ordem (de cima para baixo) em que aparece no gráfico.



A contagem de UFC/g de probióticos nos microgeis de alginato e gelatina adicionados de 5% XOS manteve-se estável ao longo de 28 dias de armazenamento. Aos 7 dias de armazenamento dos microgeis formulados com 3% XOS apresentaram um índice de sobrevivência superior a 100%, resultado que sugere o consumo de XOS em um meio favorável à proliferação das células. A matriz de alginato, gelatina e XOS foi eficiente portanto para proteção e manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o período avaliado.

Entretanto, micropartículas de alginato e XOS (sem gelatina) se mostraram pouco eficientes na manutenção da viabilidade celular do probiótico, proporcionando sobrevivência inferior à obtida pelas micropartículas de alginato sem XOS. Os poros maiores gerados por estas formulações (vide seção 5.4.2) criaram ambiente desfavorável para a manutenção da viabilidade dos probióticos. Além disso, estas micropartículas apresentaram o maior diâmetro, em comparação com as demais formulações, prejudicando a distribuição celular no interior da cápsula por aumentar a área de difusão de componentes que podem apresentar toxicidade, como o oxigênio (OMAR, 1993). Embora o XOS exerça efeito prebiótico, a toxicidade do oxigênio a estes organismos já é conhecida, mas seu mecanismo ainda não foi completamente compreendido, e características da partícula como tamanho dos poros e diâmetro determinam o grau de proteção do organismo a este fator (TALWALKAR e KAILASAPATHY, 2003).

A sinergia em relação à formação da matriz de encapsulação pela interação de XOS com os materiais de parede das micropartículas de alginato e gelatina demonstra possibilitar uma melhor proteção e viabilidade dos microrganismos durante maiores períodos de armazenamento, devido não apenas à ação prebiótica do XOS como fonte de substrato mas também devido às interações intermoleculares que permitem a obtenção de uma matriz mais organizada e com menores poros, como observado nos resultados apresentados na seção 5.4.

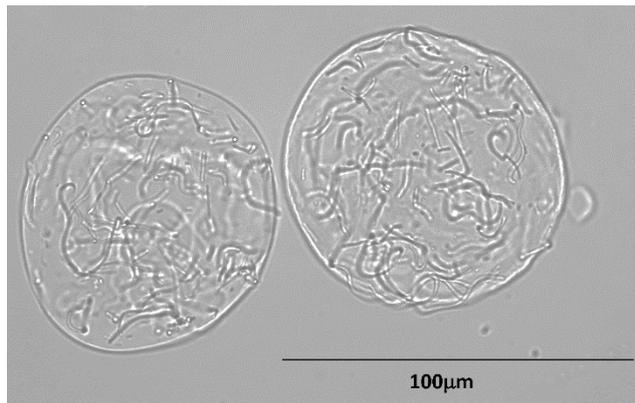
Em relação à formulação AGX5, embora os resultados de caracterização da micropartícula sugiram redução da força estrutural por diminuição das interações intermoleculares entre os polímeros, podemos inferir que a manutenção da viabilidade celular durante o tempo observado se deu em grande parte à ação prebiótica dos XOS, além da capacidade de proteção das células encapsuladas. A maior concentração do prebiótico, somado às características da micropartícula permitiu uma condição suficiente para manter a viabilidade dos probióticos encapsulados. A formulação AGX3, embora tenha apresentado as melhores características estruturais e os melhores resultados de viabilidade, apresentou ao final dos 28 dias de armazenamento, uma sutil queda na viabilidade, que pode ser atribuída à quantidade insuficiente de substrato para garantir a manutenção da viabilidade celular.

Sultana e colaboradores (2000) observaram tendência similar para microcápsulas probióticas de alginato e amido de milho resistente, uma vez que a sinergia durante a gelificação proporciona a formação de uma matriz mais resistente, conferindo proteção adicional às bactérias encapsuladas, uma vez que o amido resistente age como substrato para probióticos, aumentando sua sobrevivência.

Os microgéis de alginato e gelatina contendo prebióticos foram capazes de manter viabilidade dos *L. acidophilus* pelo período avaliado. Tais resultados se encontraram dentro dos requisitos estabelecidos pela FAO/WHO (2002) para que os probióticos exerçam benefícios aos consumidores. Hansen et al. (2002) e García-ceja et al. (2015) reportaram que a microencapsulação com alginato é eficiente para proteção de probióticos em alimentos, comparados aos *L. acidophilus* livres.

A incorporação de gelatina e XOS ao sistema biopolimérico composto por alginato, melhorou a sobrevivência dos *L. acidophilus*, uma vez que o XOS exerce ação de substrato, contribuindo para manutenção da viabilidade dos probióticos encapsulados. Os resultados obtidos anteriormente para a formulação AGX3 corroboram com o obtido para a viabilidade dos probióticos encapsulados. A Figura 24 apresenta a morfologia da micropartícula desta formulação.

Figura 24: Microscopia Ótica da Micropartícula AGX3



De acordo com Krasaekoopt e Watcharapoka (2014) a eficiência do processo de microencapsulação não depende do tipo ou concentração de prebióticos adicionados, porém, sua presença pode proporcionar variações na resistência e no tamanho das cápsulas, conseqüentemente afetando o número de células aprisionadas. Tais variações são relacionadas a força estrutural devido às interações intermoleculares obtidas entre os polímeros. Para as formulações testadas, a eficiência de encapsulação não apresentou relação com o tamanho das partículas, conforme resultados da Tabela 10, entretanto, a força das interações entre os polímeros mostrou afetar a eficiência de células aprisionadas.

Das formulações sem a presença de gelatina, AX1 apresentou maior eficiência em relação a AX3 e AX5, e, de acordo com os resultados da Figura 21, foi a formulação a sofrer o menor enfraquecimento, evidenciando o impacto da força intermolecular. Durante o processo de gelificação, o perfil higroscópico dos XOS associado a sua competição com os íons de

cálcio com os grupamentos carboxílicos da cadeia de alginato aumenta a difusão de água para o interior da partícula, elevando seu diâmetro, e reduz a velocidade de gelificação da matriz, desta forma há a saída de organismos por pressão osmótica, resultando na baixa eficiência de encapsulação. Quanto menor a força de interação das cadeias poliméricas durante a gelificação, retardando o processo, menor a eficiência de encapsulação, como observado para as formulações AX3 e AX5, que apresentaram as menores interações moleculares e perfil amorfo, resultando nas menores eficiências de encapsulação (Tabela 10). Por outro lado, as formulações com gelatina, que apresentaram estrutura mais cristalina (Figura 18), obtiveram ótima eficiência, não apresentando diferença significativa entre as formulações (AG, AGX1, AGX3 e AGX5).

Tabela 10: Eficiência do processo de encapsulação em relação à viabilidade dos probióticos.

Formulação	EE(%)
A	98,67±0,02 <sup>a*</sup>
AX1	47,48±0,67 <sup>b</sup>
AX3	26,69±4,62 <sup>c</sup>
AX5	17,06±0,73 <sup>d</sup>
AG	99,61±2,70 <sup>a</sup>
AGX1	97,64±2,65 <sup>a</sup>
AGX3	97,66±0,33 <sup>a</sup>
AGX5	95,57±1.62 <sup>a</sup>

\*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

### 5.5.2. Simulação de Digestão *in vitro*

Géis de alginato de cálcio são amplamente estudados para aplicações alimentícias e farmacêuticas. O copolímero na presença de íons de cálcio forma a chamada junção “*egg-box*”, onde  $\text{Ca}^{2+}$  age como ponte catiônica entre a sequência aniônica rica em ácido gúlrônico ao longo da cadeia polimérica (GEORGE, ABRAHAM, 2006).

Reportou-se que géis de alginato de cálcio são capazes de proteger moléculas bioativas do ambiente ácido do estômago. Estudos sobre o comportamento dos géis de alginato no trato gastrointestinal mostraram que eles tendem a encolher sob condições ácidas e distendem em ambientes alcalinos (HOAD et al., 2009). Esta característica tem importante consequência para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, que deve proteger o material encapsulado do ambiente estomacal e entregá-lo no intestino. Com a associação de

polímeros, como, no caso, prebióticos, aos géis de alginato, pretende-se preservar e melhorar esta característica de proteção a condições ácidas, além do já mencionado melhoramento na resistência da matriz e redução da porosidade, a fim de garantir a manutenção da viabilidade dos compostos encapsulados.

Como a quantidade de  $-\text{COO}^-$  no alginato é quase equivalente a quantidade de  $-\text{NH}_3$  da gelatina em torno do  $\text{pKa}$  do alginato (3,5~3,6), as cadeias macromoleculares encolhem, reduzindo o teor de água intermolecular, o que resulta na diminuição do tamanho dos poros do sistema. Este encolhimento dependente do pH resulta na redução da taxa de difusão das enzimas digestivas, retardando a digestão (DONG, WANG, DU, 2006; CHAN, NEUFELD, 2009). Por outro lado, a expansão das cadeias em pH mais elevado leva a perda de cátions de cálcio e aumento do tamanho dos poros, facilitando a difusão pela partícula.

Desta forma, a elaboração de uma matriz coesa com diâmetro pequeno de poros determina a eficiência do processo de digestão e liberação. Com base nos resultados obtidos de caracterização dos macrogeis obtidos da associação de alginato, gelatina e XOS (vide seção 5.4.2), adotou-se a concentração de 3% de XOS para a elaboração das micropartículas simbióticas a serem analisadas por digestão *in vitro*, relacionando com o perfil de viabilidade e liberação dos microrganismos.

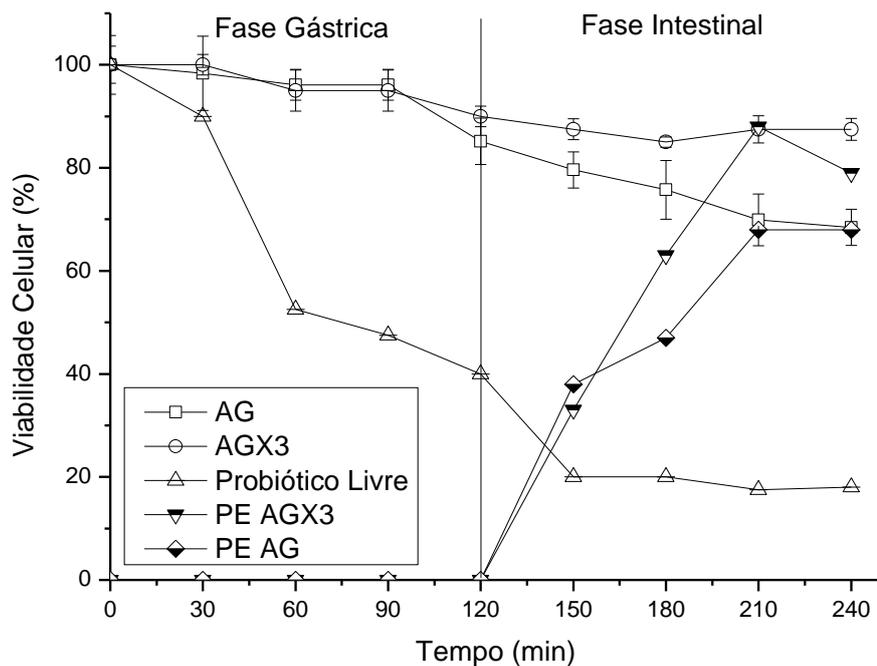
Micropartículas de alginato e gelatina se mostraram mais eficientes para a proteção dos microrganismos do ambiente ácido estomacal, como esperado (Figura 25). Entretanto, não foi constatada diferença significativa entre as micropartículas com e sem adição de XOS. Durante a fase gástrica da simulação, constatou-se redução de 14,9% na viabilidade celular para AG e 10% para AGX3 em relação à contagem de células inicial, e não foram contabilizados microrganismos presentes no exterior das partículas, ou seja, não houve liberação dos microrganismos nesta fase da simulação.

Durante a fase intestinal, contabilizou-se gradual aumento de microrganismos no meio externo das micropartículas, constatando que as mesmas desempenham seu papel na liberação controlada. Quanto à contagem total de organismos, dentro e fora das partículas, foi apresentada ligeira queda na viabilidade celular, sendo que os organismos encapsulados com XOS apresentaram viabilidade superior. Esta queda de viabilidade pode ser atribuída à intolerância a sais biliares e também à toxicidade do oxigênio presente no ambiente aeróbico no qual foi realizado o ensaio (GOMES, MALCATA, 1999). Um resultado mais realista poderia ser obtido se as amostras fossem incubadas nas mesmas condições anaeróbicas encontradas no trato intestinal.

Notável é o efeito protetor das micropartículas para garantir que maior quantidade de probióticos chegue viável ao intestino, sendo observado que neste ambiente no tempo 210 minutos (uma hora e meia de contato com a fase intestinal) houve total liberação dos organismos, sendo 87,5% da quantidade inicial de microrganismo encapsulado para a formulação AGX3 (com 3% XOS) e 68,45% para a formulação AG (sem o prebiótico).

Por ser estritamente dependente do pH, as micropartículas de alginato possuem elevada taxa de dissolução em meio alcalino. Em contato com o meio alcalino, os íons de cálcio se difundem para o meio, solubilizando a matriz de alginato, o que libera o conteúdo encapsulado. Uma proposta para reduzir a taxa de dissolução das partículas seria recobri-las com carga positiva, por meio da associação com polímeros como a quitosana (IVANOVSKA, 2012). O aumento de carga positiva na superfície da partícula diminui a interação eletrostática de enzimas pancreáticas positivas com as cargas negativas do alginato, aumentando a interação com a mucosa intestinal, o que melhoraria o tempo de residência, possibilitando uma liberação mais controlada do material encapsulado, aumentando o tempo de residência das micropartículas, caso seja interessante para, por exemplo, estabelecer uma concentração constante de probiótico no ambiente intestinal, possibilitada pela liberação mais gradual dos organismos encapsulados (por um tempo superior a 1,5h).

Figura 25: Viabilidade Celular de *L. acidophilus* livres (Probiótico Livre) e encapsulados com prebiótico (AGX3) e sem prebiótico (AG), contabilizados em sua totalidade (AG e AGX3) e presentes no exterior das partículas (PE AG e PE AGX3), ou seja, liberados ao longo da simulação de digestibilidade devido a dissolução das partículas.



## 6. CONCLUSÃO

A utilização de vetores de expressão é uma ferramenta eficaz para produção em larga escala de enzimas de interesse. Faz-se necessário estudos sobre o caminho de glicosilação das diferentes linhagens dos hospedeiros, que determina a funcionalidade da enzima expressa, de forma a se adotar a que permita maior atividade. A endoxilanase termorresistente recombinante apresentou potencial aplicação para produção de xilo-oligossacarídeos, visto seu perfil de hidrólise, confirmando sua funcionalidade, mesmo sem purificação (etapa que encarece o processo). Foi possível obter um extrato concentrado com 198,44U/mL, entretanto sua produção carece otimização.

A extração alcalina da arabinoxilana oriunda da palha de cana permitiu recuperação de 77,6% do conteúdo original de hemicelulose, com teor de 88,6% de pureza. Uma conversão maior que 70% na condição de 65°C e 48h foi conseguida, empregando endoxilanase recombinante em sinérgica associação com arabinofuranosidase, otimizada por delineamento experimental, cujos produtos principais de hidrólise foram xilobiose e xilotriose. Termorresistência da endoxilanase empregada permite que a hidrólise seja testada em amplas condições, sem que haja perda de atividade, possibilitando experimentação para otimizar a produção de XOS.

Foi constatado efeito sinérgico da associação de XOS à matriz polimérica de alginato e gelatina, demonstrado pelo aumento de cristalinidade e intensificação das interações intermoleculares. A avaliação das propriedades estruturais permite a conclusão de que a adição de 3% (m/m) de XOS à matriz resultou na formação de um gel mais coeso e com menor porosidade, comparado às demais formulações, incluindo sem adição de XOS.

A adição de 3% XOS à matriz de alginato e gelatina demonstra potencial aplicação para encapsulação de probióticos, visto a redução do tamanho dos poros da matriz e aumento da cristalinidade, além do próprio efeito prebiótico, que contribuem para proteção e manutenção da viabilidade celular. Tal resultado permite reduzir a taxa de difusão de compostos pela matriz, o que aumenta o grau de proteção do ativo encapsulado.

A formulação com 3% de XOS manteve condições favoráveis para a viabilidade de *L. acidophilus* tanto para o armazenamento refrigerado acompanhado por 28 dias quanto para proteção ao ambiente gastrointestinal, sendo esta formulação a apresentar melhor resistência e menor tamanho de poros, permitindo que 87,5% dos probióticos se mantivessem

viáveis ao fim do ensaio de digestibilidade *in vitro*. Tais resultados são promissores para aplicação de componentes que necessitem proteção das condições ácidas gástricas e liberação lenta e gradual, possibilitando investigações para veiculação de bioativos que necessitem de microcápsulas com maior resistência. Além disso, a própria suplementação com prebiótico apresenta efeito benéfico quando consumido por estimular a proliferação da microbiota benéfica intestinal.

Em suma, a utilização da fração hemicelulósica de resíduos agroindustriais para obtenção de xilo-oligossacarídeos é uma estratégia que se mostra promissora quando acompanhada da utilização de ferramentas de engenharia metabólica. O produto de interesse, além dos diversos benefícios atribuídos ao seu consumo regular, permite manter viabilidade de organismos probióticos adicionados em formulações alimentícias, melhorando sua estabilidade, tanto pela sua atuação como substrato de consumo imediato, quanto pela interação com polímeros, contribuindo para o desenvolvimento de uma matriz de sistema de encapsulação de maior resistência, capaz de proteger organismos probióticos de condições desfavoráveis a sua sobrevivência.

## 7. REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Corn-cob-induced endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase of *Aspergillus oryzae* MTCC 5154: production and characterization of xylobiose from glucuronoxylan. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3981-3988, 2008.
- ANDREAS, J.; FERREIRA FILHO, E.X.; BON, E. P. D. S. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. In: **Biocatalysis and bioenergy**. New Jersey: Copyright, p. 197-229, 2008.
- AHMED, S.; RIAZ, S.; JAMIL, A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 19-35, 2009.
- AKPINAR, O., OZLEM, A.K., KAVAS, A., BAKIR, U., YILMAZ, L. Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. **J. Agric. Food Chem.** v. 55, p. 5544-5551, 2007.
- AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Enzymatic production of xylo-oligosaccharide from selected agricultural wastes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 2, p. 145-151, 2009.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in food science & technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.
- ANDRADE, C. C. P., 2014. Produção, purificação e caracterização de xilanase termoestável produzida por *Cryptococcus flavescens* e expressão em *Pichia pastoris*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ANJUM, N.; MAQSOOD, S.; MASUD, T.; AHMAD, A.; SOHAIL, A.; MOMIN, A. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 54, n. 9, p. 1241-1251, 2014.
- ASTM. Standard test method for determination of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography E1758-01. **ASTM International**, v. i, n. Reapproved, p. 1-5, 2007.
- ÁVILA, P. F. et al. Xylooligosaccharides production from a sugarcane biomass mixture: Effects of commercial enzyme combinations on bagasse/straw hydrolysis pretreated using different strategies. **Food Research International**, v. 128, p. 108702, 2020.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **J. Biotechnol.**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.
- BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.
- BASARAN, P.; OZCAN, M. Characterization of beta-xylosidase enzyme from a *Pichia stipites* mutant. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 38-43, 2008.

BAUMANN, K., ADELANTADO, N., LANG, C., MATTANOVICH, D., FERRER, P. Protein trafficking, ergosterol biosynthesis and membrane physics impact recombinant protein secretion in *Pichia pastoris*. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 93, 2011.

BAUMANN, K., CARNICER, M., DRAGOSITS, M., GRAF, A. B., STADLMANN, J., JOUHTEN, P., FERRER, P. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 141, 2010.

BEG, Q., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., & HOONDAL, G. S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.

BHUJBAL, S. V.; DE VOS, P.; NICLOU, S. P. Drug and cell encapsulation: Alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 67-68, p. 142-153, 2014.

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

BIELY, P.; VRSANSKÁ, M.; TENKANEN, M.; KLUEPFEL, D. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. **Journal of Biotechnology**, v. 57, n. 1-3, p. 151-166, 1997.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BRODEUR, G., YAU, E., BADAL, K., COLLIER, J., RAMACHANDRAN, K. B., & RAMAKRISHNAN, S. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. **Enzyme research**, v. 2011, 2011.

BRUNO, F. A.; LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N. P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium spp.* in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2740-2744, 2002.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 48, n. 5, p. 361-377, 2008.

ÇALIK, P., ATA, Ö., GÜNEŞ, H., MASSAHI, A., BOY, E., KESKIN, A., ... & ÖZDAMAR, T. H. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: from carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical engineering journal**, v. 95, p. 20-36, 2015.

CARVALHO, A. F. A., DE OLIVA NETO, P., DA SILVA, D. F., PASTORE, G. M. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and

production by chemical and enzymatic hydrolysis. **Food Research International**, v. 51, n. 1, p. 75-85, 2013.

CASTRO-SOLLA, L., MAERTENS, L., MAROUNEK, M., PINHEIRO, V., FREIRE, J., & MOURÃO, J. L. Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. In: **World Rabbit Science**. World Rabbit Science. ICTA. UPV, 2007.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental Factors Affecting Biomass Enzymatic Reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 5–38, 2000.

CHAN, A.W.; NEUFELD, R.J. Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 6119-6129, 2009,

CHAN, L.; LEE, H.; HENG, P. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **Int J Pharm**, v. 242, n. 1-2, p. 259-262, 2002.

CHAPLA, D., PANDIT, P., SHAH, A. Production of xylo-oligosaccharides from corncobxylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v.115, p. 215-221, 2012.

CHÁVARRI, M., MARAÑÓN, I., ARES, R., IBÁÑEZ, F. C., MARZO, F., & VILLARÁN, M. d. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 185–189, 2010.

CHEN, H. H., CHEN, Y. K., CHANG, H. C., LIN, S. Y. Immunomodulatory effects of xylooligosaccharides. **Food Science and Technology Research**, v. 18, n. 2, p. 195-199, 2012.

CHEN, H. Z., LIU, I. Y. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. **Bioresour Technol**. v. 98, p. 666–676, 2007.

CHEN, K.-N.; CHEN, M.-J.; LIU, J.-R.; LIN, C.-W.; CHIU, H.-Y. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 5, p. M260-M266, 2005.

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

COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. Production and evaluation of dry alginate-chitosan microcapsules as an enteric delivery vehicle for probiotic bacteria. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2834–2840, 2011.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **J Control Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012.

COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of a symbiotic into PLGA/alginate multi particulate gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 466, n. 1, p. 400–408, 2014.

COSTA, S. M., MAZZOLA, P. G., SILVA, J. C. A. R., PAHL, R., PESSOA, A., COSTA, S. A. Use of sugar cane straw as a source of cellulose for textile fiber production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n.1, p. 189–194, 2013.

CREGG, J. M. Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: FERNANDEZ, J. M.; HOEFFLER, J. P. (Eds.). **Gene expression systems**. New York: Academic, p. 157–191, 1999.

CUI, F.; LI, Y.; LIU, Z.; ZHAO, H.; PING, L.; PING, L.; YANG, Y.; XUE, Y.; YAN, L. Optimization of fermentation conditions for production of xylanase by a newly isolated strain, *Penicillium thiersii* ZH-19. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 721–725, 2008.

DE ARAÚJO ETCHEPARE, M.; RADDATZ, G. C.; DE MORAES FLORES, É. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; BARIN, J. S.; FERREIRA GROSSO, C. R.; DE MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

DE CARVALHO, D. M., MARTÍNEZ-ABAD, A., EVTUGUIN, D. V., COLODETTE, J. L., LINDSTRÖM, M. E., VILAPLANA, F., SEVASTYANOVA, O. Isolation and characterization of acetylated glucuronoarabinoxylan from sugarcane bagasse and straw. **Carbohydrate polymers**, v. 156, p. 223-234, 2017.

DE VOS, P., FAAS, M. M., SPASOJEVIC, M., & SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

DIMITRELI, G.; THOMAREIS, A. S.; SMITH, P. G. Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 4, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **J Food Sci**, v. 74, n. 2, p. M53-61, 2009.

DONG, Z., WANG, Q., & DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v. 280, n. 1–2, p. 37–44, 2006.

DOUGLAS, L. C., SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 108, n. 3, p. 510–521, 2008.

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

ELLIS, A.; JACQUIER, J. C. Manufacture of food grade  $\kappa$ -carrageenan microspheres. **Journal of Food Engineering**, v.94, n. 3–4, p. 316-320, 2009.

FAO/WHO, W. G. O. D. G. F. T. E. O. P. I. F. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada 2002.

FARYAR, R. et al. Production of prebiotic xylo-oligosaccharides from alkaline extracted wheat straw using the K80R-variant of a thermostable alkali-tolerant xylanase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 1-10, 2015.

FERRÃO, L.L. et al. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. **Food research international**, v. 107, p. 137-147, 2018.

GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined *lactobacilli* encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 482-489, 2015.

GARCIA-ORTEGA, X., FERRER, P., MONTESINOS, J. L., VALERO, F. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. **Biochemical engineering journal**, v. 79, p. 172-181, 2013.

GÁSPÁR, M.; KÁLMÁN, G.; RÉCZEY, K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1135-1139, 2007.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 1, p. 1-14, 2006.

GIBSON, G. R., PROBERT, H. M., VAN LOO, J., RASTALL, R. A., & ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J Nutr**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIESE, E. C. HIROSI, T., DA SILVA, M. D. L. C., DA SILVA, R., BARBOSA, A. M. Production, properties and applications of oligosaccharides. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683-700, 2011.

GOBINATH, D., MADHU, A. N., PRASHANT, G., SRINIVASAN, K., PRAPULLA, S. G. Beneficial effect of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats. **British Journal of Nutrition**, v. 104, p. 40–47, 2010.

GOLDBECK, R., GONÇALVES, T.A., DAMÁSIO, A. R. L., BRENELLI, L. B., WOLF, L. D., PAIXÃO, D. A. A., ROCHA, G.J.M., SQUINA, F.M. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagasse saccharification and xylooligosaccharides production. **J. Mol. Catal. B. Enzym**, v. 131, p. 36-46, 2016.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4–5, p. 139-157, 1999.

GONÇALVES, T. A. et al. Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylo-oligosaccharides. *Bioresource technology*, v. 119, p. 293-299, 2012.

GULLÓN, P., GONZÁLEZ-MUÑOZ, M.J., PARAJÓ, J.C. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes, **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, 2011.

HANSEN, L.T; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L; PAULSON, A.T. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 35-45, 2002.

HOAD, C.; RAYMENT, P.; COX, E.; WRIGHT, P.; BUTLER, M.; SPILLER, R. et al. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, part 2: *in vivo* characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 833-839, 2009.

HOEBLER, C., LECANNU, G., BELLEVILLE, C., DEVAUX, M. F., POPINEAU, Y., & BARRY, J. L. Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 389–402, 2002.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2–3, p. 109-116, 2002.

HSU, C. K., LIAO, J. W., CHUNG, Y. C., HSIEH, C. P., CHAN, Y. C. Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesion development in rats. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 1523–1528, 2004.

HUANG, R. Y. M.; PAL, R.; MOON, G. Y. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol–water and isopropanol–water mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 160, n. 1, p. 101-113, 1999.

HU, Y.; AZADI, G.; ARDEKANI, A. M. Microfluidic fabrication of shape-tunable alginate microgels: Effect of size and impact velocity. **Carbohydrate Polymers**, v. 120, p. 38-45, 2015.

HU, X. Q., CHU, J., ZHANG, Z., ZHANG, S. L., ZHUANG, Y. P., WANG, Y. H., ... & YUAN, Z. Y. Effects of different glycerol feeding strategies on S-adenosyl-l-methionine biosynthesis by PGAP-driven *Pichia pastoris* overexpressing methionine adenosyltransferase. **Journal of biotechnology**, v. 137, n. 1-4, p. 44-49, 2008.

Invitrogen Corp, San Diego, CA (1998) A manual of methods of expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*.

IVANOVSKA, T. P.; MLADENOVSKA, K.; KAVRAKOVSKI, Z.; BOGDANOVSKA, L.; GROZDANOV, A.; POPOVSKI, E.; PETRUSHEVSKA-TOZI, L. Effect of prebiotic content on functional and physicochemical properties of *Lactobacillus casei* loaded chitosan-Ca-alginate microparticles. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, v. 58, p. 45 - 52, 2012.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensm. Wiss. Technol**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

KABEL, M. A., CARVALHEIRO, F., GARROTE, G., AVGERINOS, E., KOUKIOS, E., PARAJÓ, J. C., VORAGEN, A. G. J. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, n. 1, p. 47-56, 2002.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39-48, 2002.

KRASAEOKOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 761-766, 2014.

KOBAYASHI, T., OKAZAKI, M., FUJIKAWA, S., KOGA, K. Effect of xylooligosaccharides on feces of men. **Journal of Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry**, 65, 1651–1653, 1991.

LI, J.; HE, J.; HUANG, Y.; LI, D.; CHEN, X. Improving surface and mechanical properties of alginate films by using ethanol as a co-solvent during external gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 208-216, 2015.

LI, X. Y.; CHEN, X. G.; CHA, D. S.; PARK, H. J.; LIU, C. S. Microencapsulation of a probiotic bacteria with alginate-gelatin and its properties. **J Microencapsul**, v. 26, n. 4, p. 315-324, 2009.

LI, Y.; JIA, H.; CHENG, Q.; PAN, F.; JIANG, Z. Sodium alginate–gelatin polyelectrolyte complex membranes with both high water vapor permeance and high permselectivity. **Journal of Membrane Science**, v. 375, n. 1–2, p. 304-312, 2011.

LOGEZ, C., ALKHALFIOUI, F., BYRNE, B., & WAGNER, R. Preparation of *Pichia pastoris* expression plasmids. In: **Recombinant Protein Production in Yeast**. Humana Press, 2012. p. 25-40.

LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1177-1193, 2015.

LOPES, F., MOTTA, F., ANDRADE, C.C.P., RODRIGUES, M.I., MAUGERI-FILHO, F. Thermostable xylanases from non-conventional Yeasts. **J. Microb. Biochem. Technol.** v. 3, p. 36–42, 2011.

LOSADA, M. A.; OLLEROS, T. Towards a healthier diet for the colon: the influence of fructooligosaccharides and lactobacilli on intestinal health. **Nutrition Research**, v. 22, n. 1–2, p. 71–84, 2002.

MA, J.; LIN, Y.; CHEN, X.; ZHAO, B.; ZHANG, J. Flow behavior, thixotropy and dynamical viscoelasticity of sodium alginate aqueous solutions. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 119–128, 2014.

MANCINI, M.; MORESI, M.; SAPPINO, F. Rheological behavior of aqueous dispersions of algal sodium alginates. **Journal of Food Engineering**, v. 28, n. 3–4, p. 283–295, 1996.

MARTINS, D. A. B.; PRADO, H. F. A.; LEITE, R. S. R.; FERREIRA, H.; MORETTI, M. M. S.; SILVA, R.; GOMES, E. Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production. In: MR. SUNIL KUMAR (Ed.). **Integrated Waste Management**, v. 2. 1. ed. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p. 319–360.

MASLEN, S. L.; GOUBET, F.; ADAM, A.; DUPREE, P.; STEPHENS, E. Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 5, p. 724–35, 2007.

MATALANIS, A.; JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1865–1880, 2011.

MATTANOVICH, D., GASSER, B., HOHENBLUM, H., SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeasts. **Journal of biotechnology**, v. 113, n. 1–3, p. 121–135, 2004.

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

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. **Food & function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

MOEBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Alginate–poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 1, p. 42–53, 2009.

MOROSOLI, R.; ZALCE, E.; DURAND, S. Secretion of a *Cryptococcus albidus* xylanase in *Pichia stipitis* resulting in a xylan fermenting transformant. **Current Genetics**, v. 24, n. 1–2, p. 94–9, 1993.

MOTTA, F. B. Triagem, seleção produção e caracterização da enzima xilanase a partir de leveduras silvestres. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

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

MOURA, P.; BARATA, R.; CARVALHEIRO, F.; GÍRIO, F.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; ESTEVES, M.P. In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 6, p. 963–972, 2007.

NA, M. H., KIM, W. K. Effects of xylooligosaccharide intake on fecal bifidobacteria, lactic acid and lipid metabolism in Korean young women. **Korean Journal of Nutrition**, v. 40, p. 154–161, 2007.

OMAR, S. H. Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 40, n. 2-3, p. 173-181, 1993.

OKU, T., SADAOKO, N. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, p. 1253–1261, 2002.

ÖZCAN, S.; KÖTTER, P.; CICIARY, M. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 190-195, 1991.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vitro**. 2013. Mestrado. Tecnologia de alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAL, Y.; KHUSHOO, A.; MUKHERJEE, K. J. Process optimization of constitutive human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 650-657, 2006.

PARACHIN, N. S.; SIQUEIRA, S.; FARIA, F. P.; TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. Xylanases from *Cryptococcus flavus* isolate I-11: Enzymatic profile, isolation and heterologous expression of CfXYN1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, n. 1-3, p. 52–57, 2009.

PENG, F. Ren, J. L., XU, F., BIAN, J., PENG, P., SUN, R. C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PERRECHIL, F. A.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L.  $\kappa$ -Carrageenan–sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. **Journal of food engineering**, v. 104, n. 1, p. 123-133, 2011.

PETRESCU, I.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; CHESSA, J.-P.; NTARIMA, P., CLAEYSSSENS, M.; DEVREESE, B.; MARINO, G.; GERDAY, C. Xylanase from the psychrophilic yeast *Cryptococcus adeliae*. **Extremophiles**, v. 4, n. 3, p. 137–144, 2000.

PHOEM, A.; CHANTHACHUM, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. Preparation of Eleutherine americana-Alginate Complex Microcapsules and Application in *Bifidobacterium longum*. **Nutrients**, v. 7, n. 2, p. 831, 2015.

PINTO, L. **Efeito das condições de operação e da geometria do reator sobre a distribuição de tamanhos de partícula de uma polimerização em suspensão** 2006. Mestrado Mestre em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENZI, H. F.; JORGE, J. A., & AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577-591, 2005.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91-105, 2012.

PUGUAN, J. M. C.; YU, X.; KIM, H. Characterization of structure, physico-chemical properties and diffusion behavior of Ca-Alginate gel beads prepared by different gelation methods. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 432, p. 109-116, 2014.

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, n. 11, p. 1561–1566, 2004.

RIBEIRO, M.C.E., CHAVES, K.S., GEBARA, C., INFANTE, F.N.S., GROSSO, C.R.F., GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431, 2014.

ROBERT, P., MARQUIS, M., BARRON, C., GUILLON, F., SAULNIER, L. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7014-7018, 2005.

RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A., PEREIRA, C. I., GOMES, A. M., MALCATA, F. X., & FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. Campinas-SP: Cárita Editora, 2012. 352 p.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. Gut bacteria and health foods—the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 99–117, 2002.

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

SAMANTA, A. K. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: production and applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2015.

SANTOS, F. A., DE QUEIROZ, J. H., COLODETTE, J. L., MANFREDI, M., QUEIROZ, M. E. L. R., CALDAS, C. S., SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.

SCORZETTI, G.; PETRESCU, I.; YARROW, D.; FELL, J. W. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 153–157, 2000.

SCOTT, K.P., MARTIN, J.C., DUNCAN, S.H., FLINT, H.J. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, *in vitro*, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 87, n. 1, p. 30–40, 2014.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 139, 2000.

SHEU, W. H. H., LEE, I. T., CHEN, W., CHAN, Y. C. Effects of xylo-oligosaccharides in type 2 diabetes mellitus. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 54, n. 5, p. 396–401, 2008.

SILVA, K. C. G. **Produção De Microgeis Simbióticos De Gelatina-Alginato E Simulação Da Liberação Controlada Em Condições Gastrointestinais**. 2016. Mestrado Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas.

SILVA, K. C. G.; SATO, A. C. K. Biopolymer gels containing fructo-oligosaccharides. **Food Research International**, v. 101, p. 88–95, 2017.

SILVA, K. C. G., CEZARINO, E. C., MICHELON, M., & SATO, A. C. K. Symbiotic microencapsulation to enhance *Lactobacillus acidophilus* survival. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 503–509, 2018.

SINGH, R. D.; BANERJEE, J.; ARORA, A. Prebiotic potential of oligosaccharides: a focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, n. 1, p. 19–30, 2015.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., & CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Laboratory analytical procedure**, v. 1617, p. 1-16, 2008.

SLUITER, A et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 12 / 08 / 2006 Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Proce. **Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP-51042623**, p. 1–14, 2008b.

SOHAIL, A.; TURNER, M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **Int J Food Microbiol**, v. 145, n. 1, p. 162-168, 2011.

SOLA, A., JOUHTEN, P., MAAHEIMO, H., SANCHEZ-FERRANDO, F., SZYPERSKI, T., FERRER, P. Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates. **Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 281-290, 2007.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1–2, p. 47-55, 2000.

SUWA, Y., KOGA, K., FUJIKAWA, S., OKAZAKI, M., IRIE, T., NAKADA, T. ***Bifidobacterium bifidum* proliferation promoting composition containing xylooligosaccharide**. U.S. Patent n. 5,939,309, 17 ago. 1999.

TAHERZADEH, Hossein et al. Fabrication of Microporous Film and Microspheres Hybrids. **Open Journal of Organic Polymer Materials**, v. 5, n. 02, p. 51, 2015.

TALWALKAR A.; KAILASAPATHY K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. **Aust. J. Dairy Technol.** 58: 36-39, 2003.

TENG, C.; YAN, Q.; JIANG, Z.; FAN, G.; SHI, B. Production of xylooligosaccharides from the steam explosion liquor of corncobs coupled with enzymatic hydrolysis using a thermostable xylanase. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7679–7682, 2010.

TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692–700, 2003.

TUOHY, K. M., ROUZAUD, G. C. M., BRUCK, W. M., GIBSON, G. R. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics-assessment of efficacy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 1, p. 75-90, 2005.

URBANSKA, A. M.; BHATHENA, J.; PRAKASH, S. Live encapsulated *Lactobacillus acidophilus* cells in yogurt for therapeutic oral delivery: preparation and in vitro analysis of alginate-chitosan microcapsules. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 9, p. 884-893, 2007.

VÁZQUEZ, M.; ALONSO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Xylo-oligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, 2000.

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

VIKARI, L.; KANTELINEN, A.; SUNDQUIST, J.; LINKO, M. Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2-3, p. 335–350, 1994.

VILELA, J. A. P.; CAVALLIERI, Â. L.F.; DA CUNHA, R. L. The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate–gellan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1710-1718, 2011.

VORON'KO, N. G.; DERKACH, S. R.; IZMAILOVA, V. N. Rheological Properties of Gels of Gelatin with Sodium Alginate. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 790-794, 2002.

WANG, J., et al. Simple quantitative analysis of *Escherichia coli* K-12 internalized in baby spinach using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Int. J. Food Microbiol.** v. 44, p. 147–151, 2010.

WANG, J. et al. Wheat bran xylooligosaccharides improve blood lipid metabolism and antioxidant status in rats fed a high-fat diet. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 3, p. 1192-1197, 2011.

WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V.; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, n. 1, p. 37–44, 1997.

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

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E. Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. **Renewable Energy**, 2005.

XIAO, C., LIU, H., LU, Y., ZHANG, L. Blend films from sodium alginate and gelatin solutions. **J. Macromol. Sci. - Pure Appl. Chem.**, v. 38, n. 2, p. 317-328, 2001.

XIE, J.; ZHOU Q.; DU, P.; GAN, R.; YE, Q. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enzyme Microb Tech.**, v.36, p. 210-216, 2005.

YANG, G., ZHANG, L., PENG, T., ZHONG, W. Effects of Ca<sup>2+</sup> bridge cross-linking on structure and pervaporation of cellulose/alginate blend membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 175, n. 1, p. 53-60, 2000.

ZHANG, A. L., ZHANG, T. Y., LUO, J. X., CHEN, S. C., GUAN, W. J., FU, C. Y., LI, H. L. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* by high-density cell culture. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 117-122, 2007.

ZHANG, H.; TUMARKIN, E.; SULLAN, R. M. A.; WALKER, G. C.; KUMACHEVA, E. Exploring Microfluidic Routes to Microgels of Biological Polymers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, n. 5, p. 527-538, 2007b.

ZHANG, A. L., LUO, J. X., ZHANG, T. Y., PAN, Y. W., TAN, Y. H., FU, C. Y., & TU, F. Z. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1611-1619, 2009.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A. A.; XIAOXUN, M. A. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 913-919, 2012.

ZHANG, L. et al. Spray-dried xylooligosaccharides carried by gum Arabic. **Industrial Crops and Products**, v. 135, p. 330-343, 2019.

ZILLIOX, C., DEBEIRE, P. Hydrolysis of wheat straw by a thermostable endoxylanase: adsorption and kinetic studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 58-63, 1998.