

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Influência dos Parâmetros Reacionais na Produção Enzimática de Xilo-oligossacarídeos com Potencial Prebiótico

Elida Simone Guido¹, Jéssica Teixeira da Silveira¹ e Susana Juliano Kalil¹

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Caixa Postal 474 – 96203-900 Rio Grande – RS – E-mail: elidaguido23@hotmail.com

RESUMO

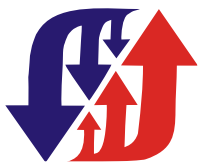
O presente trabalho investigou os efeitos dos seguintes parâmetros reacionais: concentração de substrato, relação enzima:substrato, pH e temperatura, visando maximizar a produção de xilo-oligossacarídeos (XOs) potencialmente prebióticos obtidos por hidrólise enzimática da xilana de madeira de faia. Os resultados mostraram que a concentração de xilana de faia e a temperatura foram os parâmetros que mais influenciaram no rendimento de XOs de menor grau de polimerização (X2+X3), sendo que, na melhor condição de hidrólise (6,0% de xilana de faia, 133 U/g de endo-xilanase, pH 5,5 e 60°C) foram produzidos cerca de 18,0 mg/mL de xilobiose (X2) e xilotriose (X3) e menos de 1,0 mg/mL de xilose. Os hidrolisados com tais propriedades possuem potencial prebiótico e são promissores para aplicações em alimentos.

Palavras-chave: xilo-oligossacarídeos; prebióticos; endo- β -1,4-xilanase; xilana de madeira de faia; parâmetros reacionais.

INTRODUÇÃO

Os xilo-oligossacarídeos (XOs) são oligômeros não digeríveis constituídos por 2 a 10 unidades de xilose ligadas em β -1,4, e apresentam variações no tipo e na proporção de grupos substituintes, dependendo da fonte da matéria-prima e do processo de obtenção (Carvalho *et al.*, 2013; Kabel *et al.*, 2002). Os XOs são reconhecidos como prebióticos, já que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas, tais como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Além dos efeitos benéficos à saúde, os XOs possuem uma maior estabilidade à temperatura e ao pH no processamento de alimentos funcionais (Wang *et al.*, 2009; Moure *et al.*, 2006). Estes compostos podem ser produzidos por diferentes processos, que incluem a auto-hidrólise (Nabarlatz *et al.*, 2007) e a hidrólise ácida ou enzimática das xilanas (Akpinar *et al.*, 2010) de materiais lignocelulósicos, sendo que na indústria biotecnológica são obtidos preferencialmente por via enzimática e a principal enzima envolvida é a endo- β -1,4-xilanase.

XOs com grau de polimerização (GP) entre 2 e 5 são preferidos na produção de alimentos funcionais porque são consumidos por bactérias probióticas (Kiran; Akpinar; Bakir, 2013), com xilobiose (X2) e xilotriose (X3) apresentando maior efeito prebiótico (Gullón *et al.*, 2011). Os parâmetros reacionais da hidrólise enzimática podem influenciar no rendimento e no grau de polimerização dos XOs e, portanto, devem ser estudados a fim de maximizar a produção dos bioprodutos de interesse. Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da concentração de substrato, da relação enzima:substrato (E:S), do pH e da temperatura na obtenção de XOs de menor GP potencialmente prebióticos.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Enzima e determinação da atividade enzimática

No estudo foi utilizada a endo- β -1,4-xilanase comercial de *Thermomyces lanuginosus*, com grau alimentar. A atividade de endo- β -1,4-xilanase foi determinada segundo o método de Bailey, Biely e Poutanen (1992), usando xilana de madeira de faia (1% (m/v)) como substrato. Os açúcares redutores liberados na reação enzimática foram quantificados através do método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de xilose por min, nas condições do ensaio (pH 5,3 e 50°C).

Hidrólise da xilana de faia e produção de XOs

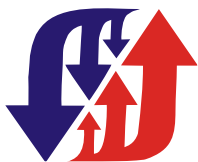
As reações de hidrólise enzimática, feitas em duplicata, foram realizadas em reatores encamisados, com agitação mecânica de 180 rpm. O sistema reacional foi composto por xilana de madeira de faia dissolvida em tampões citrato ou fosfato de sódio 50 mM e enzima, totalizando um volume de 50 mL. As quantidades de substrato e enzima adicionadas, o pH e a temperatura da reação foram estabelecidos de acordo com o estudo dos efeitos dos parâmetros reacionais na produção de XOs. Alíquotas de 2,0 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos e a reação enzimática foi parada pelo aquecimento do meio à 100°C por 5 min. As amostras foram centrifugadas (10.000g por 10 min), filtradas (membranas de 0,22 μ m) e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, para determinar o GP e a concentração de XOs e xilose.

Estudo dos efeitos de parâmetros reacionais na produção de XOs

O efeito da concentração de substrato na produção de XOs foi estudado através da realização de hidrólises enzimáticas, variando a concentração de xilana de faia (1,0 à 6,0%), sendo fixados a carga de enzima (300 U), o pH (5,3) e a temperatura (50°C). O efeito da carga de endo- β -1,4-xilanase foi avaliado pela variação da relação enzima:substrato (133 e 266 U/g) em diferentes concentrações de xilana (4,5 e 6,0%) e foram fixados o pH (5,3) e a temperatura (50°C). O efeito do pH foi investigado variando-se o pH do meio (4,5, 5,5 e 6,5) com 6,0% de xilana de faia e 133 U/g de endo- β -xilanase, mantido à 50°C. O efeito da temperatura (40, 50 e 60°C) foi estudado utilizando 6,0% de xilana, 133 U/g de enzima e pH de 5,5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os parâmetros reacionais da hidrólise enzimática foram avaliados visando estabelecer as condições que conduzem a máxima conversão da xilana de faia para XOs, principalmente xilobiose e xilotriose, e menor geração de xilose. Conforme pode-se observar na Figura 1A, o aumento da concentração de xilana de faia de 1,0 para 6,0% resultou em um incremento da concentração de XOs de menor GP (X2+X3) de $3,2 \pm 0,0$ para $14,6 \pm 0,1$ mg/mL, sem um acréscimo considerável no teor de xilose. A produção de XOs totais (X2 à X5) mostrou um comportamento semelhante ao dos XOs de GP 2 a 3, alcançando $15,8 \pm 0,1$ mg/mL no meio com 6,0% de substrato. O percentual de conversão da xilana de faia para X2+X3, assim como para XOs totais, sofreu uma ligeira diminuição com o aumento da concentração de substrato, mas devido aos valores promissores obtidos com 4,5 e 6,0% de xilana, as duas concentrações foram avaliadas empregando relações enzima:substrato de 133 e 266 U/g.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

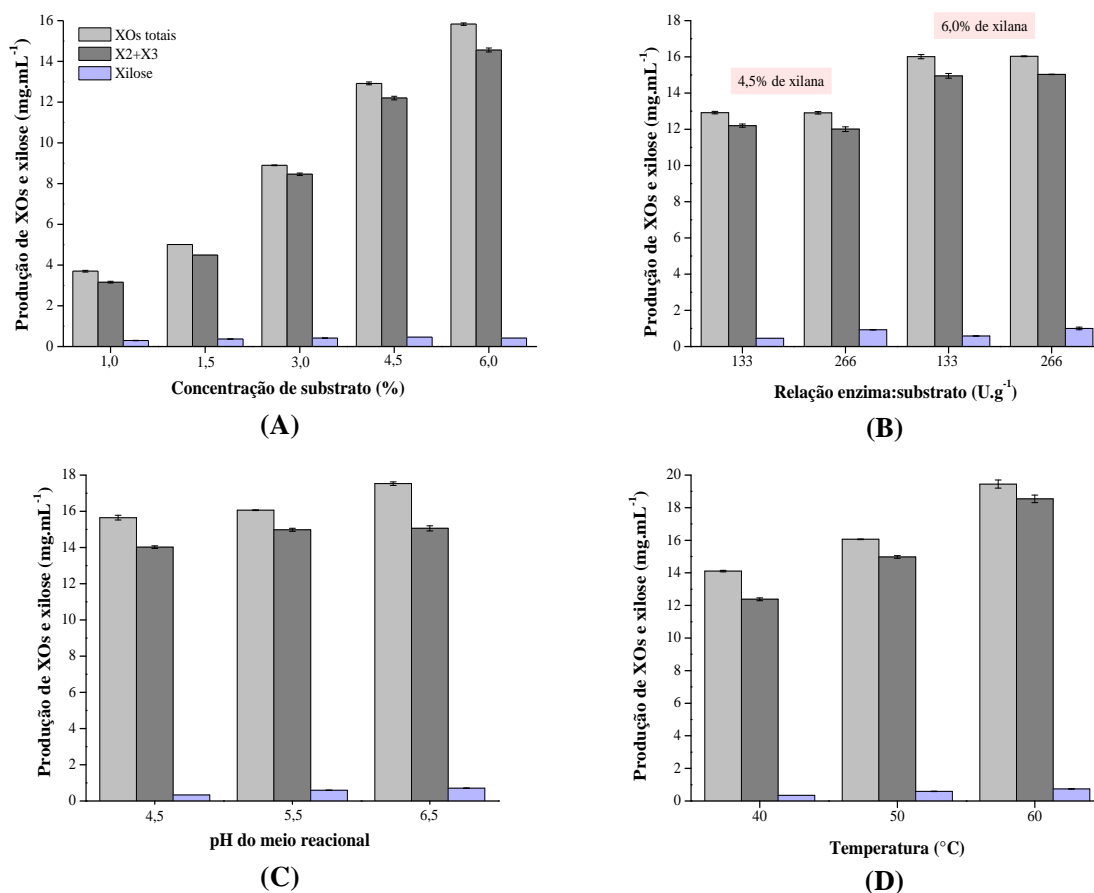
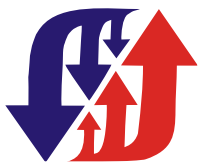


Figura 1. Efeito da concentração de substrato (A), da relação enzima:substrato (B), do pH (C) e da temperatura (D) na produção de XOs totais (■), de xilobiose + xilotriose (■) e de xilose (■) em 24 h de hidrólise enzimática (produção máxima).

O aumento da relação E:S para ambas as concentrações de xilana de faia (4,5 e 6,0%) resultou no incremento da produção de X2, mas liberou uma maior quantidade de xilose. A produção de X2+X3 e XOs totais não foi afetada pelo aumento da relação E:S (Figura 1B). Quando se utilizou 4,5% de xilana e 133 U/g de enzima foram produzidos $12,2 \pm 0,1$ mg/mL de X2+X3 e cerca de 0,5 mg/mL de xilose, e com 6,0% de xilana de faia e a mesma relação E:S alcançou-se $14,9 \pm 0,1$ mg/mL de X2+X3 e houve pouca geração de xilose (0,6 mg/mL). Com base nos resultados, foi escolhida a condição de 6,0% de xilana de faia e relação E:S de 133 U/g para avaliar os efeitos dos demais parâmetros reacionais sobre a produção de XOs.

Com relação ao efeito do pH (Figura 1C), verificou-se que a menor concentração de X2+X3 foi obtida em pH 4,5 ($14,0 \pm 0,1$ mg/mL) e as maiores produções foram observadas nos pHs de 5,5 e 6,5 ($15,0 \pm 0,1$ e $15,1 \pm 0,1$ mg/mL, respectivamente), sendo que não houve diferença significativa entre eles. A máxima liberação de xilose ocorreu no pH de 6,5, sendo assim, o pH de 5,5 foi selecionado para dar sequência ao estudo. Convém ressaltar, que o pH de 5,5 é o ótimo para a endo- β -1,4-xilanase de *T. lanuginosus*, e outros trabalhos relatam máxima produção de XOs neste valor de pH (Aachary; Prapulla, 2009; Akpinar *et al.*, 2010). A quantidade de XOs de menor GP produzidos a 40°C foi igual a $12,4 \pm 0,1$ mg/mL, que aumentou para cerca de 18,0 mg/mL a 60°C (Figura 1D). Na temperatura de 50°C, a produção



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

de X₂+X₃ atingiu 15,0 ± 0,1 mg/mL e a de XOs totais alcançou 16,1 ± 0,0 mg/mL. O aumento da temperatura de 40 para 60°C resultou em um leve incremento na liberação de xilose, mas produziu uma maior quantidade de XOs de menor GP e aumentou o percentual de conversão da xilana para XOs. A temperatura ótima da endo-β-xilanase de *T. lanuginosus* é de 75°C, o que justifica a sua elevada capacidade catalítica em temperaturas mais altas.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, é possível afirmar que o estudo dos efeitos de parâmetros reacionais da hidrólise enzimática possibilitou maximizar a produção de XOs de menor GP, que são potencialmente prebióticos, com pouca geração de xilose. A concentração de xilana e a temperatura exerceram maior influência na produção destes oligossacarídeos. Os valores de XOs obtidos (18,5 ± 0,2 mg/mL de X₂+X₃) nas condições determinadas (6,0% de xilana de faia, 133 U/g de endo-xilanase, pH 5,5 e 60°C) são bastante promissores e, ainda, podem ser incrementados em tempos de hidrólise mais longos.

Agências de Fomento: Os autores agradecem à CAPES, à FAPERGS e ao CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aachary AA, Prapulla SG. 2009. Value addition to corncob: Production and characterization of xylooligosaccharides from alkali pretreated lignin-saccharide complex using *Aspergillus oryzae* MTCC 5154. *Bioresour Technol* 100:991-995.
- Akpınar O, Erdogan K, Bakir U, Yilmaz L. 2010. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT-Food Sci Technol* 43:119-125.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J Biotechnol* 23:257-270.
- Carvalho AFA, Neto PO, Silva DF, Pastore GM. 2013. Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Res Int* 51:75-85.
- Gullón P, González-Muñoz MJ, Parajó JC. 2011. Manufacture and prebiotic potential of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. *Bioresour Technol* 102:6112-6119.
- Kabel MA, Carvalheiro F, Garrote G, Avgerinos E, Koukios E, Parajó JC, Gírio FM, Schols HA, Voragen AGJ. 2002. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr Polym* 50:47-56.
- Kiran EU, Akpınar O, Bakir U. 2013. Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins. *Food Bioprod Process* 91:565-574.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.
- Moure A, Gullón P, Domínguez H, Parajó JC. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Proc Biochem* 41:1913-1923.
- Nabarlatz D, Torras C, Garcia-Valls R, Montane D. 2007. Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. *Sep Purif Technol* 53:235-243.
- Wang J, Sun BG, Cao YP, Tian Y. 2009. Enzymatic preparation of wheat bran xylooligosaccharides and their stability during pasteurization and autoclave sterilization at low pH. *Carbohydr Polym* 77:816-821.