



XOS DE JATOBÁ: POTENCIAL PREBIÓTICO PARA A INDÚSTRIA DE ALIMENTOS ATRAVÉS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Daniel Vitor Cavalcante Aquino¹

daniel.vitor@upe.br

Emerson Pequeno de Souza¹

emerson.pequeno@upe.br

Natalie Emanuelle Ribeiro Rodrigues¹

natalie.rodrigues@upe.br

Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque²

priscilla.albuquerque@upe.br

¹Universidade de Pernambuco-UPE Campus Garanhuns

²Instituto de Ciências Biológicas

INTRODUÇÃO

Polissacarídeos são carboidratos complexos formados por várias unidades de monossacarídeos e são classificados como gomas ou mucilagens. O polissacarídeo do tipo xiloglucana foi extraído das sementes de *Hymenaea courbaril* (conhecida como jatobá) e amplamente caracterizado (Arruda *et al.*, 2015) por nosso grupo de pesquisa. Ele foi reportado como um polímero constituído por glicose, xilose e galactose na proporção de 4:3:2, com ação espessante e estabilizante; suas propriedades farmacológicas, porém, ainda não foram estudadas. Portanto, sua utilização como substrato para a produção de oligossacarídeos compostos por xilose, ou seja, xiloooligossacarídeos (XOS), via hidrólise enzimática e posterior avaliação de suas atividades biológicas representam uma inovação para a pesquisa científica.

Prebióticos são substratos seletivamente utilizados por microrganismos presentes no hospedeiro com capacidade de conferir benefícios para a saúde (Gibson *et al.*, 2017) por meio de eficientes atividades antioxidantes (Wang *et al.*, 2021), antimicrobianas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (Sun *et al.*, 2018). Eles encontram aplicação em diversas indústrias, desde a área da saúde até a de alimentos (Wang *et al.*, 2021); por exemplo, prebióticos contribuem para o tratamento de distúrbios intestinais ao modular o microbioma intestinal, influenciar o crescimento e desenvolvimento celular e reduzir os riscos de formação de neoplasia de cólon (Shanahan, 2016). XOS tem recebido destaque na literatura por atuarem com função prebiótica; esta versatilidade, portanto, torna os XOS substâncias promissoras para diversas aplicações, em destaque a indústria alimentícia.

A viabilidade de produção e isolamento de enzimas utilizando fermentação líquida submersa com fungos do gênero *Aspergillus* (Bedade *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2020) representa uma fonte eficiente para a obtenção de enzimas hidrolíticas, a exemplo das enzimas que realizam hidrólise de polissacarídeos. Por isso, a produção de XOS a partir da hidrólise com xilanase, especialmente utilizando fungos *Aspergillus* em fermentação submersa, é uma abordagem inovadora. Essa estratégia permite a produção sustentável de prebióticos com grande potencial biotecnológico, principalmente na indústria alimentícia, promovendo práticas sustentáveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

As vagens de *H. courbaril*, coletadas no Agreste Meridional de Pernambuco, foram utilizadas para extrair xiloglucana, seguindo a metodologia de Arruda *et al.* (2015). O rendimento de extração foi calculado como a razão entre a massa final de polissacarídeo (Mf) e a massa inicial de sementes (Mi), expresso como percentual. O conteúdo total de carboidratos e proteínas no precipitado final foi determinado pelos métodos do fenol ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) e ácido bicinconílico (Smith *et al.*, 1985), respectivamente.

Microorganismos de *Aspergillus oryzae* da Micoteca da Universidade de Pernambuco foram usados para produzir xilanase. Os microrganismos foram cultivados em meio BDA inclinado e



incubados em Czapek a 30°C por 72h. Para fermentação submersa, utilizou-se a metodologia de Ahamed (2008), enquanto a análise da atividade da xilanase foi realizada de acordo com Gomes *et al.* (1992) com algumas modificações. A mistura de 0,5 mL de xilana birchwood (Fluka) e 0,5 mL de extrato enzimático foi incubada a 37°C. A xilose equivalente (açúcar redutor) gerada durante a análise foi estimada usando o método do ácido 3,5- dinitrosalicílico (Miller, 1959).

As reações para obtenção dos XOS foram conduzidas em reatores encamisados de mistura contendo 75 mL da mistura reacional composta por 2,25g de xiloglucana e 200 U/g de xilanase proveniente da linhagem de *Aspergillus* com maior capacidade produtiva. Amostras foram retiradas em intervalos predefinidos (12, 24, 36 e 48 h), inativadas a 100°C para desativar a enzima, centrifugadas a 10.000 g/10°C por 10 min, e os sobrenadantes filtrados em filtros PVDF com poros de 0,22µM. Os filtrados foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para determinar o rendimento de produção dos XOS e o teor de xilose nos hidrolisados. A análise cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna HPX-87P, e a conversão de xiloglucana em XOS foi calculada usando a seguinte equação = (XOS totais em g / Xiloglucana inicial em g) x 100. A análise estatística foi realizada com o programa Statistica 6.0 da StatSoft, Inc.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento da extração de xiloglicana foi de $72 \pm 5\%$ (p/p) em relação ao peso seco das sementes de *H. courbaril*, sendo $81 \pm 7\%$ desta massa de teor de polissacarídeo; não foram detectadas proteínas pelo método do ácido bicinconílico (Smith *et al.*, 1985). Considerando que diferentes tempos de extração para xiloglucana foram comparados e demonstraram rendimentos que variaram de 5,4 a 40,8% (Kai & Petkowicz, 2010), defendemos que nossa metodologia nos permitiu atingir um alto rendimento de extração, inclusive superior a trabalhos semelhantes com as sementes de *H. courbaril*, por exemplo como 15,5% (Busato *et al.*, 2009), 38% (Lucyszyn *et al.*, 2009) e 1,7 e 6,1 % a partir das sementes de *Tamarinds indica* (Limsangouan *et al.*, 2020).

A atividade da xilanase foi de 6,61 U/ml após 72 h. Pode-se considerar que a concentração de substrato fixada foi eficiente e resultou em uma boa atividade enzimática quando comparada com outras produções que utilizaram concentrações maiores. No estudo de Kalim *et al.* (2023) com *Bacillus Pumilus* BS131, por exemplo, os autores relataram valores de atividade de $6,73 \pm 0,98$ UI/ml com concentração de substrato de 4%. De acordo com Gautério *et al.* (2020), a produção máxima de xilanase por *Aureobasidium pullulans var. melanigenum* a 2% de concentração de substrato foi de 39,2 U/ml. A taxa de conversão total de xiloglucana em XOS não variou ao longo dos diferentes tempos de hidrólise (12, 24, 36 e 48 h), sugerindo que a enzima atingiu um estado estacionário e não foi capaz de aumentar a taxa de hidrólise ao longo do tempo. Ainda, foi possível observar que 70% do material analisado por CLAE foi detectado no tempo de retenção de aproximadamente 10 min, o que sugere que a xiloglucana não foi hidrolisada como o esperado; em aproximadamente 12 min de tempo de retenção, os XOS puderam ser observados com aproximadamente 10% de conteúdo em relação à xiloglucana. Os demais 20% de conteúdo foram relacionados a moléculas pequenas como xilose, xilobiose e xilotetrose.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, podemos dizer que a enzima xilanase não conseguiu hidrolisar completamente a xiloglucana de *H. courbaril* em XOS, mantendo uma taxa de conversão constante ao longo dos diferentes tempos de hidrólise. A maior parte da xiloglucana permaneceu intacta, com apenas 10% sendo convertida em XOS e o restante em açúcares menores, como xilose, xilobiose e xilotetrose. Isto sugere que a hidrólise foi limitada, possivelmente devido a fatores intrínsecos da enzima ou condições experimentais. Contudo, a utilização das sementes de *H. courbaril* foi capaz de produzir efetivamente o XOS utilizando o método de hidrólise enzimática, abrindo uma nova opção para futuras pesquisas científicas na área.

PALAVRAS-CHAVE: XOS. Prebióticos. Hidrólise enzimática.



AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UPE, ao CNPq e à FACEPE pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Referências

- ARRUDA, I.R.S. *et al.* Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds. **Int. J. Biol. Macromol.**, 73: 31–38, 2015.
- BEDADE, D. *et al.* Extracellular xylanase production from a new xylanase producer *Tuber maculatum* mycelium under submerged fermentation and its characterization. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, 11, 288-293, 2017.
- CARVALHO, A.F.A. *et al.* Improvement of some chemical and biological methods for the efficient production of xylanases, xylooligosaccharides and lignocellulose from sugar cane bagasse. **Biomass Bioenerg.**, 143, 105851, 2020.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Anal. Chem.** 28(3), 350–356, 1956.
- FARIAS, M.D.P. Xyloglucan from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds as encapsulating agent of L-ascorbic acid. **Int. J. Biol. Macromol.**, 107: 1559-1566, 2018.
- GIBSON, G. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, 14: 491–502, 2017.
- GOMES, I. *et al.* Production of cellulase and xylanase by a wild strain of *Trichoderma viride*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 36: 701-707, 1992.
- KALIM, B. *et al.* Modulating the production of xylanase by *Bacillus pumilus* BS131 through optimization using waste fiber sludge. **Brazil. J. Biol.**, 83, e243874, 2023.
- LIMSANGOUAN, N. *et al.* High-pressure processing of tamarind (*Tamarindus indica*) seed for xyloglucan extraction. **LWT**. 134, 110112, 2020.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31, 426– 428, 1959.
- SHANAHAN, F.; SHEEHAN, D. Microbial contributions to chronic inflammation and metabolic disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, 19(4): 257-62, 2016.
- SMITH, P.K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.** 150, 76-85, 1985.
- SUN, B. Polysaccharides as vaccine adjuvants. **Vaccine**, 36: 5226–5234, 2018.
- WANG, Y. *et al.* Selective removal of lignin with sodium chlorite to improve the quality and antioxidant activity of xylo-oligosaccharides from lignocellulosic biomass. **Bioresour.**, 337: 125506, 202