

## AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PREBIÓTICA E ANTIOXIDANTE DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS LIGNOCELULÓSICOS

**Palavras-chave:** Endoxilanase, Hidrólise Enzimática, Probióticos, Xilana

**Autor:** João Rafael Fernandes Baptista FEA – UNICAMP

**Co-autores:** Manoela Martins; Marcos F. da Silva – UNICAMP

**Orientador:** Rosana Goldbeck FEA – UNICAMP

### INTRODUÇÃO

Os xilo-oligosacarídeos (XOS) são ingredientes funcionais de grande interesse e aplicações industriais. Estes oligômeros normalmente são obtidos a partir de materiais lignocelulósicos, preferencialmente por hidrólise enzimática e são definidos como oligômeros de 2 a 6 unidades de xilose interligadas através de ligações glicosídicas. Apresentam atividade prebiótica, imunorreguladora e antioxidante, além de alta estabilidade a uma ampla faixa de temperatura e pH, sabor adocicado e poder emulsificante.  $\beta$ -1,4 (SCOLFORO, SILVA, 2013; UYENO, et al., 2013).

Os resíduos agroindustriais, além de abundantes, são constituídos majoritariamente por lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina), tornando fonte barata e sustentável para a produção destes prebióticos via extração de hemicelulose e hidrólise enzimática empregando, principalmente, endoxilanasas, que atuarão no esqueleto de xilose que constitui a hemicelulose destes materiais (MARTINS et al., 2020). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de XOS a partir dos resíduos casca de soja e casca de milho e investigar as suas propriedades prebióticas e antioxidantes.

### METODOLOGIA DA PESQUISA

#### Extração da Hemicelulose

Os materiais lignocelulósicos de casca de soja e de milho foram triturados e a fração hemicelulósica extraída utilizando 5% KOH. O licor, contendo a fração hemicelulósica, foi separado por centrifugação, e neutralizado com ácido acético até pH 5.0- 5,5. Adicionou-se 3 volumes de etanol, e o material foi estocado a 4 °C overnight para precipitação da hemicelulose. Após este período, os sólidos foram separados por centrifugação e secos em estufa a 60 °C (ÁVILA et al., 2021).

#### Hidrólise Enzimática da Hemicelulose Extraída

Os ensaios de hidrólise foram realizados utilizando o coquetel comercial Shearzyme (Novozymes ®) que contém endoxilanase, conforme a metodologia proposta por Goldbeck, et al. (2016). Os efeitos da temperatura e do pH na hidrólise da xilana foram estudados através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

#### Avaliação do Efeito Prebiótico

Cepas de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* foram cultivadas em meio MRS por 72 h e em seguida foram inoculados, substituindo a fonte de carbono principal (glicose) pelos xilo-oligosacarídeos obtidos da hidrólise enzimática da xilana extraída das cascas de soja. Foram retiradas alíquotas em triplicata nos tempos de 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h para determinação do crescimento bacteriano através de leitura espectrofotométrica a 600 nm. Para controle, foram utilizados XOS e FOS comerciais.

#### Determinação da Atividade Antioxidante e Fenóis Totais

Para a reação de captura de radicais de DPPH, a solução contendo XOS foi adicionada a solução de DPPH incubada no escuro por 2 h, seguida de leitura a 517 nm. O ensaio de capacidade antioxidante total (CAT) foi realizado adicionando-se solução fosfo-molibdênio à de XOS a 95 °C por 90 min, resfriadas e lidas a 695 nm. Os fenóis totais foram quantificados pelo método Folin-ciocalteu.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## Caracterização de biomassa

**Tabela 1** - Composição lignocelulósica da casca de milho e soja “*in natura*”.

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Extrativos (%)	Cinzas (%)	Total (%)
Casca de Milho	30,06±2,9	30,33±2,31*	27,64±1,3	12,92±2,9	0,10±0,1	101,05
Casca de Soja	40,72±0,9	29,36±2,31**	19,88±1,3	9,67±0,22	4,07±0,1	104,72

\*dos quais: 24,83% de xilose e 5,5% de grupos arabinose

\*\*dos quais: 23,71% de xilose e 5,65% de grupos arabinose.

Nota-se pela Tabela 1, principalmente, a similaridade na quantidade de hemicelulose entre os dois compostos, entretanto, há uma notável diferença no teor de lignina entre as amostras, o que prejudica a hidrólise da biomassa. A maior fração hemicelulósica é constituída por unidades de xilose, e 5,5 % por unidades de arabinose. O material extraído apresentou pureza de 76% e 67%, o que corresponde à uma boa recuperação, 85% e 71% de hemicelulose presente inicialmente na casca de soja e milho, respectivamente.

## Hidrólise enzimática de xilana extraída

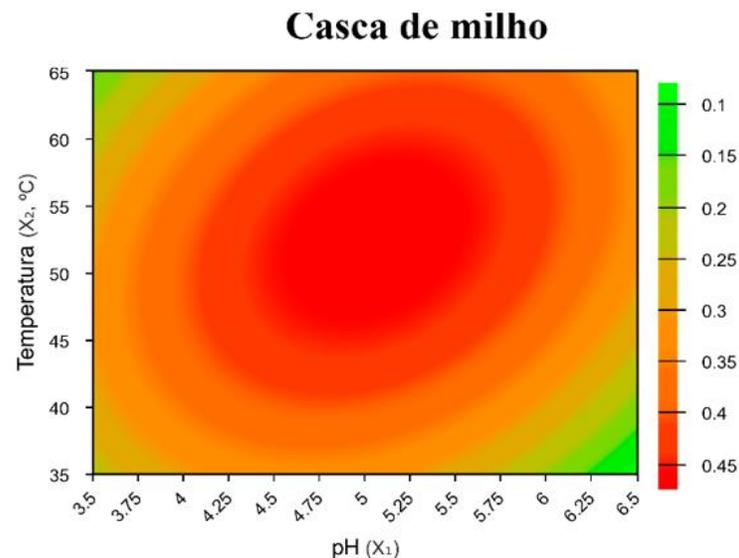
Observa-se na Tabela 2 que há grande influência de pH alcalinos na redução da concentração de XOS, assim como o aumento da temperatura. O ponto central (pH 5,0 e 50 °C) em ambos os substratos foi aquele em que se obteve a maior concentração de XOS final. A casca de soja obteve as maiores concentrações finais em comparação com a casca de milho. Uma das hipóteses é devido ao maior teor de lignina presente na casca de milho em comparação a casca de soja. Dessa forma, foi construído um modelo reparametrizado e o R<sup>2</sup> (coeficiente de correlação) foi acima de 90% em ambas as amostras.

**Tabela 2** – Concentração de XOS de acordo com os ensaios em 48h.

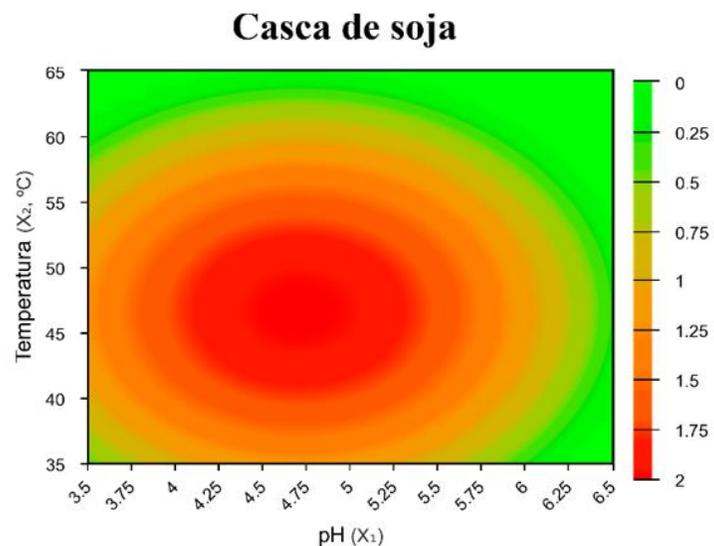
Ensaio	Temperatura (°C)	pH	XOS de casca de soja (mg/L)	XOS de casca de milho (mg/L)
1	40	4	1620	340
2	40	6	120	240
3	60	4	520	340
4	60	6	220	370
5	50	3,6	1210	360
6	50	6,4	730	340
7	36	5	1620	370
8	64	5	100	410
9	50	5	1890	480
10	50	5	1890	470
11	50	5	1890	470

O melhor rendimento na condição ótima de hidrólise (pH 5,0 e 50 °C) foi de 480 mg/L para xilana de milho e 1890 mg/L para soja, uma conversão de 7.3 % e 24,8 %, respectivamente. A biomassa de soja apresentou maior rendimento em XOS devido à menor quantidade de lignina, a qual prejudica a atividade enzimática da endoxilânase do coquetel. Maiores rendimentos provavelmente não são possíveis devido também à presença da arabinose das cadeias laterais das xilanas, o que requereria uma suplementação de uma arabinofuranosidase ao coquetel, para sua melhor despolimerização. Nas Figuras 1 e 2 são apresentadas as curvas resposta dos modelos gerados, válidos sob as condições de hidrólise pH 5,0 e 50 °C, com a mesma concentração de enzima.

**Figura 1** – Superfície resposta para produção de XOS após 48h de hidrólise enzimática de xilana de casca de Milho.



**Figura 2** – Superfície resposta para produção de XOS após 48h de hidrólise enzimática de xilana de casca de Soja.



## Atividade antioxidante e Fenóis totais

**Tabela 3** – Atividade antioxidante e fenóis totais de XOS obtido por hidrólise de xilana de soja e milho em comparação com XOS comercial, apresentados por  $\mu\text{M}$  trolox e  $\mu\text{g}$  ácido gálico equivalente (eq) por grama de XOS, respectivamente.

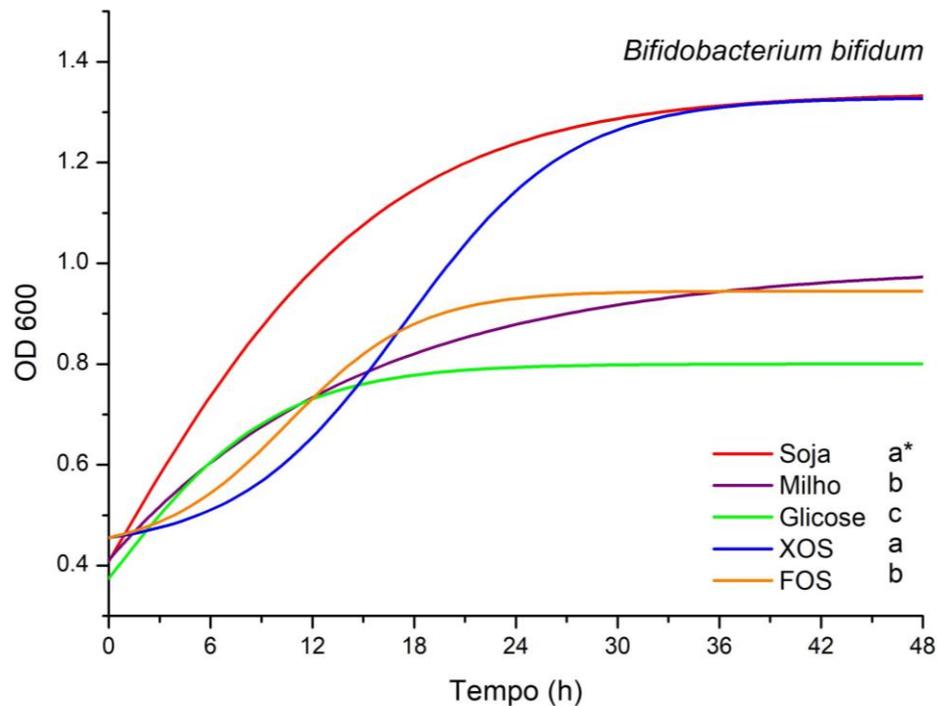
	IC 50	CAT ( $\mu\text{M}$ Trolox eq/g XOS)	Fenóis totais ( $\mu\text{g}$ ác. gálico eq/g XOS)
<b>XOS Soja</b>	0.188 mg/mL	1859.60	26.20
<b>XOS Milho</b>	0.094 mg/mL	3714.54	87.60
<b>XOS comercial</b>	1 mg/mL	530.42	0

Como apresentado na Tabela 3, embora o milho tenha rendido menor concentração de XOS, a atividade antioxidante e fenóis totais por grama de XOS foi superior à da soja. Essa capacidade se deve ao teor de ácido ferúlico e cumarínico encontrado nessa biomassa além do próprio potencial dos XOS.

A grande concentração de ácido ferúlico e cumarínico é outro fator que afeta a ação de endoxilanase e reduz a eficiência de conversão, carecendo a ação de esterases para a remoção destas ramificações. Ambas biomassas apresentaram um valor de IC 50 significativamente menor e CAT maior ao do XOS comercial, o que indica uma notável e interessante capacidade sequestrante (antioxidante) superior.

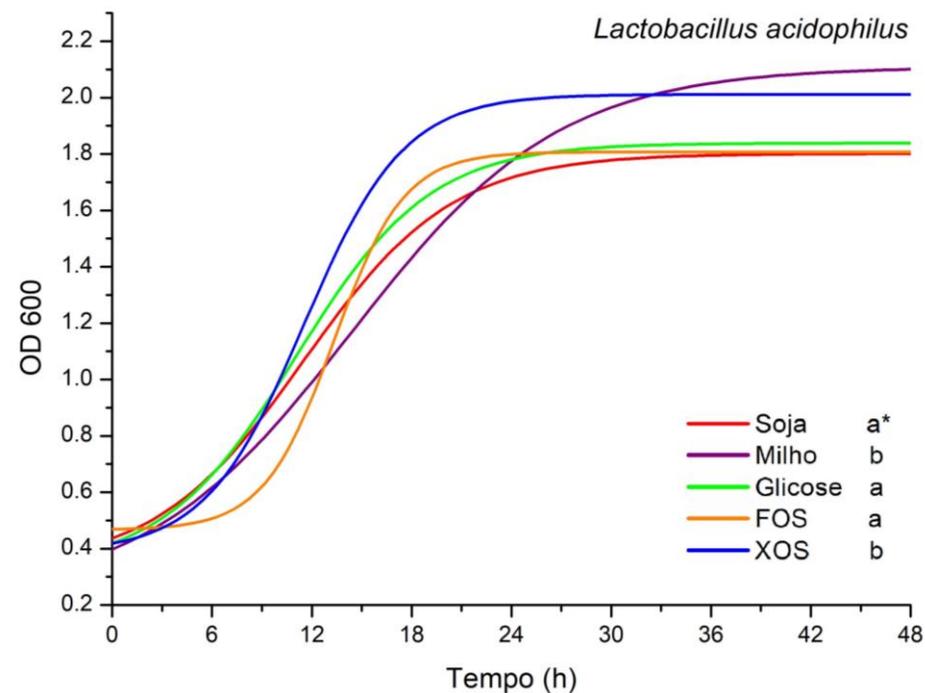
## Atividade Prebiótica

**Figura 3** – Curva de crescimento microbiológico de *Bifidobacterium bifidum*.



\*Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

**Figura 4** – Curva de crescimento microbiológico de *Lactobacillus acidophilus*.



\*Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

As Figuras 3 e 4 apresentam o crescimento microbiológico e seu enriquecimento com o XOS produzido de soja e milho em comparação com XOS comercial, FOS e glicose. É possível observar, que não houve diferenças entre o crescimento do XOS produzido em comparação ao XOS comercial. Mesmo assim, os resultados obtidos são muito desejáveis com um notável efeito prebiótico, tendo vista principalmente que o XOS produzidos não passaram por nenhum processo de purificação. Foram observadas diferenças entre os crescimentos nos meios enriquecidos com soja e milho nas diferentes bactérias, onde a soja favoreceu a *B. bifidum*, e o milho, o *L. acidophilus*. Uma hipótese levantada é a de que, por *B. bifidum* ser um organismo anaeróbico, a alta atividade antioxidante do milho serviu como um fator negativo de crescimento da bactéria. Por outro lado, no caso do *L. acidophilus*, um organismo aeróbico facultativo, o milho foi fator positivo no crescimento. Além disso, é reportado na literatura a capacidade superior de *L. acidophilus* em produzir esterases e metabolizar feruloil oligossacarídeos (SZWAJGIER, 2010).

# CONCLUSÕES

As biomassas escolhidas apresentaram um teor adequado de xilana e foram extraídas com eficiência segundo a metodologia escolhida, empregando baixa concentração de álcali, tornando o processo de extração mais barato e ecológico. Também foi possível encontrar a região ótima de atividade do coquetel enzimático comercial de baixo custo contendo endoxilanase, visando a otimização da produção de XOS. As eficiências de conversão podem ainda ser melhoradas com a adição de enzimas sinérgicas à endoxilanase, como arabinofuranosidases e esterases.

Os resíduos agroindustriais estudados permitiram uma produção sustentável de XOS, que além de uma notável capacidade prebiótica, apresentaram também elevado teor de compostos fenólicos com grande potencial antioxidante, o que agrega ainda mais valor ao produto final visando o desenvolvimento de alimentos funcionais e sustentáveis.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKPINAR, O. et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, p. 119–125, 2010.
- ÁVILA, Patrícia F.; MARTINS, Manoela; GOLDBECK, Rosana. Enzymatic production of xylooligosaccharides from alkali-solubilized arabinoxylan from sugarcane straw and coffee husk. *BioEnergy Research*, v. 14, n. 3, p. 739-751, 2021.
- BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of biotechnology*, v. 23, n. 3, p. 257–270, 1992.
- FIGUEIREDO, F. C. et al. Evaluation of xylooligosaccharides and fructooligosaccharides on digestive enzymes hydrolysis and as a nutrient for different probiotics and *Salmonella typhimurium*. *Food Science and Technology*, v. 118, 2020.
- GOLDBECK, R. et al. Development of hemicellulolytic enzyme mixtures for plant biomass deconstruction on target biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 20, p. 8513– 8525, 2014.
- GOLDBECK, R.; et al. Effect of hemicellulolytic enzymes to improve sugarcane bagassesaccharification and xylooligosaccharides production. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, v. 131, p. 36-46, 2016.
- HONG, C. et al. Xylooligosaccharides as prebiotics from biomass autohydrolyzate. *LWT - Food Science and Technology*, n. 111, p. 703-710, 2019.
- MARTINS, M. et al. Synergic recombinant enzyme association to optimize xylo-oligosaccharides production from agricultural waste. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 28, p. 101747, 2020.
- SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, v. 1617, n. 1, p. 1-16, 2008.
- SZWAJGIER, Dominik; JAKUBCZYK, Anna. Biotransformation of ferulic acid by *Lactobacillus acidophilus* KI and selected *Bifidobacterium* strains. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, v. 9, n. 1, p. 45-59, 2010.