

AValiação DE Diferentes Estratégias DE Síntese Enzimática DE ISOMALTO-OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS

M. C. RABELO¹, A. R. A. SILVA², S. O. SANCHO², S. RODRIGUES², D. C. S. AZEVEDO¹

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos

² Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia de Alimentos

E-mail para contato: tianerabelo@yahoo.com.br

RESUMO – Os isomalto-oligossacarídeos (IMOs) promovem o crescimento de bactérias benéficas no intestino grosso, e por isso, são reconhecidos como prebióticos. Este trabalho teve como objetivo maximizar a produção de isomalto-oligossacarídeos de cadeia longa por meio de alimentação de maltose e sacarose em reator semi-contínuo. A síntese foi realizada durante 36 horas adicionando-se 1UI/mL da enzima dextrana-sacarase ao reator contendo sacarose e maltose (substrato). Na primeira estratégia, houve a alimentação a cada hora da mistura contendo sacarose e maltose (10g/L), seguida da adição de sacarose somente (10g/L) a partir da sétima hora. Na segunda estratégia, houve a alimentação alternada a cada hora da mistura contendo sacarose e maltose e sacarose somente (10g/L). A segunda estratégia de alimentação com duração de dezesseis horas foi a melhor condição de produção dos isomalto-oligossacarídeos. Foram produzidos isomalto-oligossacarídeos em maiores concentrações (87,19 g/L) e dextrana em menor concentração (25,38 g/L). Em ambas as estratégias, a concentração de isomalto-oligossacarídeos decresceu a partir de 16 horas de síntese, o que foi atribuído a uma inibição da atividade da enzima devido a um excesso de frutose no meio.

1. INTRODUÇÃO

Os isomalto-oligossacarídeos (IMOs) são oligossacarídeos pré-bióticos com várias funções fisiológicas, como a melhoria da microbiota intestinal, prevenção da cárie dentária, aumento da imunidade (Patel; Goyal, 2011). São compostos por uma unidade de maltose e até oito unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,6 que podem ser obtidos a partir de sacarose e maltose através da reação do aceptor utilizando a enzima dextrana-sacarase (Mussatto e Mancilha, 2007). Esta enzima é utilizada para a síntese de dextrana em meio contendo sacarose como substrato. Entretanto, quando além de sacarose, um aceptor (maltose, frutose, glicose, etc) é também utilizado como substrato, partes das unidades de glicose, provenientes da hidrólise da sacarose, são desviadas da cadeia de dextrana, sendo incorporadas neste segundo substrato, formando oligossacarídeos pré-bióticos. A panose é o produto primário do aceptor formado quando maltose é utilizada como aceptor. Quando há uma quantidade suficiente de panose, a mesma funciona como aceptor formando isomaltosil-1,6- α -O-D-maltose que atua como aceptor formando séries homólogas (oligossacarídeos

superiores) (Heincke *et al.*, 1999; Rabelo, *et al.*, 2006).

Os oligossacarídeos são de difícil síntese e na síntese tradicional (reator batelada) não há formação de oligossacarídeos de cadeia longa, sendo a obtenção destes produtos de interesse tecnológico e nutricional, uma vez que apresentam vantagens sobre os de cadeia curta, no que se refere ao seu efeito pré-biótico. Estudos anteriores (Rabelo, *et al.*, 2013) indicaram que a alimentação em pulsos dos substratos leva a graus de polimerização e concentrações crescentes de IMOs em até 12 horas de reação. Em virtude do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a síntese enzimática de IMOs pré-bióticos, por tempos prolongados de reação, a fim de analisar em pormenor o efeito de diferentes esquemas de alimentação de sacarose e maltose ao meio reacional em um reator semi-contínuo sobre o alongamento da cadeia oligossacarídica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação da enzima e determinação da atividade enzimática

O micro-organismo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F foi obtido junto ao banco de micro-organismos do Departamento de Agricultura dos EUA (Peoria, Illinois, NRRL Culture Collection). A enzima dextrana-sacarase foi obtida via processo fermentativo com o micro-organismo utilizando sacarose como fonte de carbono segundo Guimarães *et al.* (1999). O micro-organismo foi ativado em agitador orbital (27 °C) e a produção da enzima foi realizada em fermentador por processo de batelada alimentada (Rodrigues, *et al.*, 2005). A alimentação do fermentador foi constituída de solução concentrada de NaOH (120 g/L) contendo sacarose (300 g/L). A alimentação foi interrompida após 6 horas de fermentação, mas o processo foi mantido por mais 2 horas para que houvesse queda do pH para 5,2 e consumo de sacarose residual (Rabelo, *et al.*, 2006). Ao final da fermentação as células foram removidas por centrifugação a 11.806 x g (8000 rpm) por 10 minutos a 4°C em centrífuga Sigma, modelo 6-15, obtendo-se assim a enzima bruta.

O processo de purificação da enzima consistiu em adicionar lentamente ao caldo bruto (sem células) uma solução de polietilenoglicol (PEG 1500) a 50% (v/v). A mistura foi centrifugada nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi ressuspenso em tampão acetato de sódio 20mM com pH ajustado para 5,2, contendo 0,05 g/L de CaCl₂. A enzima foi estocada congelada a -20°C. A atividade enzimática foi determinada pela quantificação de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), sendo expressa em Unidade Internacional por mililitro (UI/mL) a 30°C e pH 5,2, valores nos quais a enzima é estável e apresenta atividade máxima.

2.2 Síntese enzimática dos isomalto-oligossacarídeos (IMOs) pré-bióticos de cadeia longa

Foi avaliado o efeito da alimentação, por pulso, de sacarose e maltose ao meio reacional, sobre o alongamento da cadeia oligossacarídica através de duas diferentes estratégias de alimentação, sendo o Ensaio 1 constituído da alimentação da mistura contendo sacarose e maltose, seguida da adição de sacarose somente a partir da sétima hora. O ensaio 2 foi constituído da alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose e da sacarose somente, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Estratégias de alimentação de sacarose e maltose ao meio reacional para a síntese de IMOs de cadeia longa

Ensaio	Alimentação	Intervalo de tempo de alimentação	Duração	Tempo total
1	Sacarose (10 g/L) + maltose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	36
	Sacarose (10 g/L)	A cada 1 hora	30 horas	
2	Sacarose (10 g/L) + maltose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	36
	Sacarose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	
	Sacarose (10 g/L) + maltose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	
	Sacarose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	
	Sacarose (10 g/L) + maltose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	
	Sacarose (10 g/L)	A cada 1 hora	6 horas	

Os ensaios foram realizados nas condições ótimas de atuação da enzima dextrana-sacarase: temperatura de 30 °C e pH 5,2. A síntese enzimática dos IMOs foi conduzida em reator de vidro encamisado (capacidade de 250 mL) sob agitação. Inicialmente foi adicionado o substrato constituído de uma solução tampão (acetato de sódio 20 mM contendo 0,05 g/L de CaCl₂, pH 5,2) contendo sacarose (40 g/L) e maltose (45 g/L). Em seguida foi adicionado 1 UI/mL da enzima dextrana-sacarase. Após a primeira hora de síntese, iniciou-se a alimentação do meio reacional pela adição de 2 mL do(s) substrato(s). Antes de cada alimentação foram retirados 2 mL de amostra para as análises posteriores, resultando num volume constante de 100 mL. A cada amostra retirada (2 mL) foram adicionados 3 volumes de etanol 96% (v/v) para interrupção da reação e precipitação da dextrana, que foi determinada segundo o método fenol ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) para a determinação de carboidratos totais. O sobrenadante contendo os IMOs foi removido para as análises por Cromatografia de Camada Delgada (para qualificar o grau de polimerização) segundo procedimento descrito por Rodrigues *et al.* (2005) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Cromatógrafo Líquido Varian Pro Star equipado com duas bombas (modelo 210), detector de índice de refração (modelo 350) e forno (Eldex CH modelo 150). Os IMOs foram separados em uma coluna Rezex RSO-Oligosaccharide (200 x 10mm) à 85°C. A fase móvel foi constituída de água deionizada (0,3 ml/min). A temperatura do detector foi 35°C. Foram utilizadas soluções padrões de IMOs (Sigma-Aldrich) com grau de polimerização (GP) de três a sete.

Para avaliar o efeito do acúmulo de frutose ao longo da síntese dos IMOs, foi realizada a síntese dos IMOs (30°C e pH 5,2) durante 36h em reator batelada contendo diferentes concentrações iniciais de frutose. As sínteses foram realizadas adicionando-se 1UI/mL da enzima dextrana-sacarase ao meio reacional contendo como substrato os açúcares sacarose (40 g/L) e maltose (45 g/L). Na primeira síntese, foram adicionados 40g/L de frutose. Na segunda síntese, foram adicionados 80g/L de frutose.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os resultados de cromatografia de camada delgada dos isomaltoligossacarídeos (IMOs) obtidos no Ensaio 1, onde houve a alimentação da mistura contendo sacarose e maltose nas seis primeiras horas, seguida da adição de sacarose somente, durante as 30 horas seguintes (a) e no Ensaio 2 onde houve a alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose e sacarose somente com duração total de 36 horas (b).

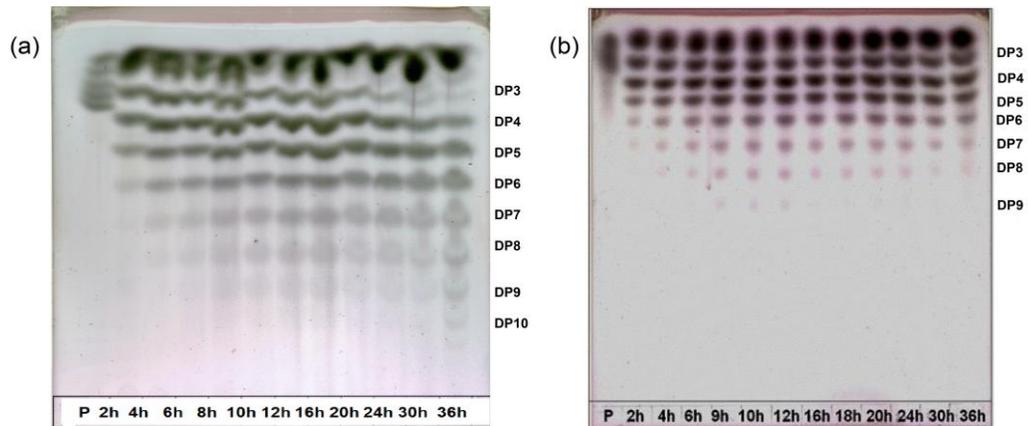


Figura 1 - Cromatografia em camada delgada dos IMOs formados no ensaio 1(a) e no ensaio 2 (b).

Conforme apresentado na Figura 1a, a alimentação da mistura contendo sacarose e maltose, seguida da adição de sacarose somente, promoveu o alongamento da cadeia dos IMOs ao longo do tempo visto que no início da síntese foram formados somente IMOs com grau de polimerização (GP) de três a seis e ao final da síntese (36 horas), foram formados IMOs com grau de polimerização de três a dez, obtendo-se assim uma maior variedade de IMOs pré-bióticos. A Figura 2b mostra que a estratégia de alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose e sacarose somente (Ensaio 2) promoveu o alongamento da cadeia dos IMOs ao longo do tempo, tendo sido formados IMOs com grau de polimerização (GP) de três a nove. No entanto, verifica-se que a intensidade das manchas é maior em tempos intermediários de reação (entre 9 e 12 horas), particularmente dos IMOs de maior grau de polimerização.

Os IMOs produzidos, a frutose liberada, sacarose, glicose e maltose não consumidas durante a reação a partir da estratégia de alimentação da mistura sacarose e maltose, seguida da alimentação de sacarose (Ensaio 1) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os resultados são apresentados na Figura 2.

A Figura 2a mostra que a adição de sacarose e maltose, seguida da alimentação de somente sacarose (Ensaio 1) resultou na formação de IMOs com grau de polimerização (GP) variando de três a sete em concentração suficiente para detecção e quantificação. Observa-se que a partir de 4 horas de síntese houve o decréscimo da concentração da panose (GP3) e um aumento da concentração dos IMOs GP4 a GP7. A partir de 16 horas, também os IMOs com grau de polimerização 4 e 5 tiveram sua concentração reduzida. Este comportamento é justificado pelo fato de que o alongamento da cadeia depender da disponibilidade de precursores de cadeia menor. Como a maltose deixou de ser alimentada após seis horas de síntese, sua concentração cai drasticamente (ver fig. 2b) e não há possibilidade de formação de novas unidades de panose. Apenas observa-se a adição de unidades de glicose, aumentando o grau de polimerização dos IMOs, além da polimerização em dextrana.

Os IMOs com graus de polimerização oito a dez, identificados por meio da cromatografia de camada delgada, não foram detectados nas análises de HPLC, pois se apresentavam em concentração inferior ao limite de detecção do equipamento (0,2 g/L). Durante a síntese dos IMOs verifica-se o

aumento significativo da concentração de sacarose a partir de 12 horas e de frutose (que é produto da síntese proveniente da quebra da sacarose e não é utilizada na síntese dos IMOs).

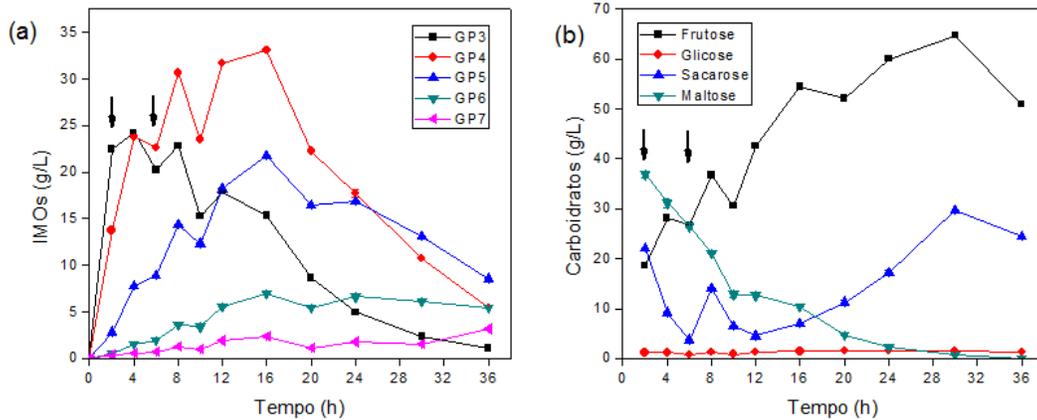


Figura 2 - IMOs (GP3 a GP7) (a) e monossacarídeos e dissacarídeo (b) resultantes da síntese com adição de uma mistura contendo sacarose e maltose (durante 6 horas), seguida da adição de sacarose somente (Ensaio 1) com duração de 36 horas de síntese. As setas indicam os tempos em que foram adicionados a mistura sacarose e maltose e sacarose somente.

Os IMOs formados, a frutose liberada, sacarose, glicose e maltose não consumidas durante a reação a partir da estratégia de alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose (intervalo de 6 horas) e sacarose somente (intervalo de 6 horas) com duração total de 36 horas (Ensaio 2) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os resultados são apresentados na Figura 3.

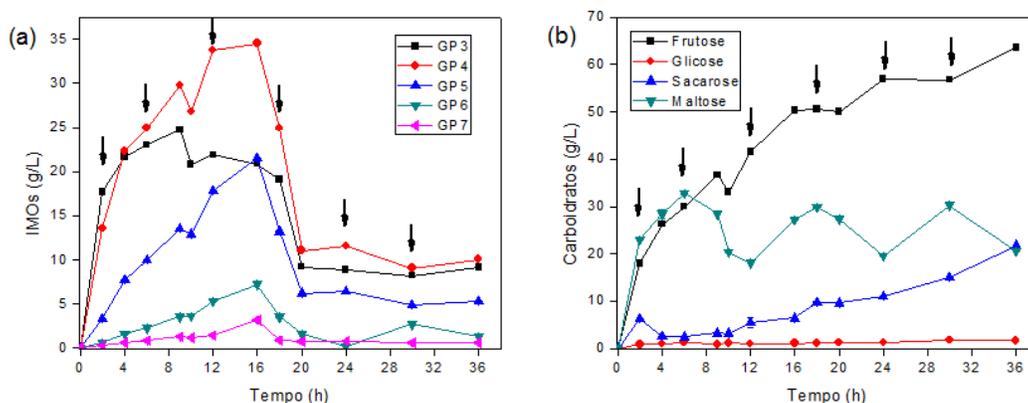


Figura 3 - IMOs (GP3 a GP7) (a) e monossacarídeos e dissacarídeo (b) resultantes da síntese com adição alternada da mistura contendo sacarose e maltose (intervalo de 6 horas) e sacarose somente (intervalo de 6 horas) com duração total de 36 horas (Ensaio 2). As setas indicam os tempos em que foram adicionados a mistura sacarose e maltose e sacarose somente.

De acordo com a Figura 3a, observa-se que a partir de oito horas ocorre a diminuição da concentração da panose (GP3), quando ainda crescem as concentrações de maltotetraose (GP4), maltopentaose (GP5), maltohexaose (GP6) e maltoheptaose (GP7). No período de dezesseis horas de síntese, foi obtida a maior quantidade de IMOs e a partir deste período houve uma diminuição da concentração dos mesmos. A isomaltotriose (GP4) foi o isomalto-oligossacarídeo que apresentou o maior nível de concentração (34,52 g/L). Semelhante ao Ensaio 1, houve aumento da concentração de sacarose e de frutose e consumo de glicose (Figura 3b). No entanto, a concentração de maltose tem um comportamento oscilatório, condizente com sua alimentação periódica e consumo para a formação de IMOs. A partir das 16 horas, o padrão de oscilação parece ter uma frequência e amplitude constantes, consistente com a alimentação em pulsos alternados (com e sem maltose).

A Figura 4 apresenta os resultados de IMOs totais e dextrana obtidos no Ensaio 1 onde houve a alimentação da mistura contendo sacarose e maltose nas seis primeiras horas, seguida da adição de sacarose somente, durante as 30 horas seguintes (a) e no Ensaio 2 onde houve a alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose e sacarose somente com duração total de 36 horas (b).

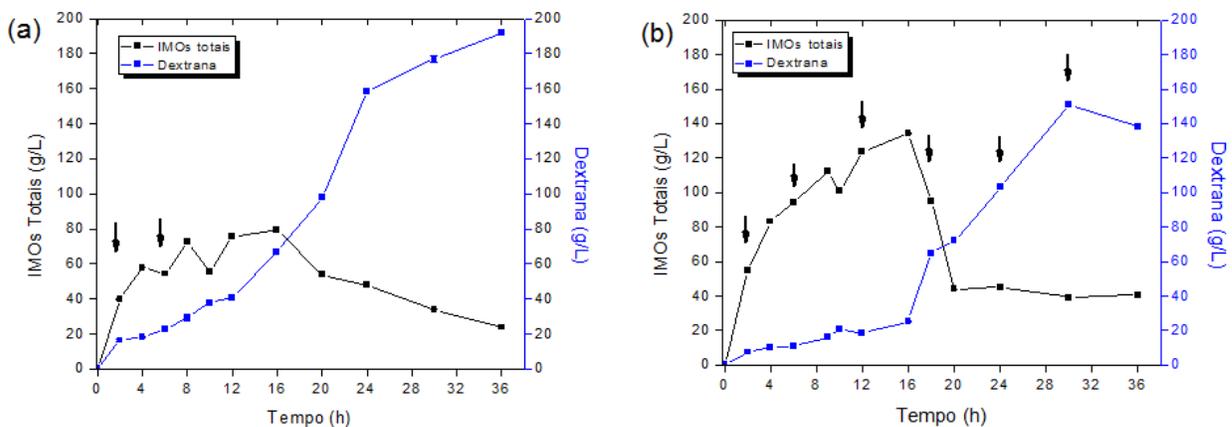


Figura 4 - IMOs totais e dextrana formados no ensaio 1(a) e no ensaio 2 (b).

De acordo com a Figura 4a, no período de 16 horas de síntese houve um aumento da concentração de IMOs (79,56 g/L) e de dextrana (66,91 g/L), onde a quantidade de dextrana formada foi inferior à de IMOs formados. Entretanto, após este período, houve um decréscimo na concentração dos IMOs e um aumento da formação de dextrana. No início da síntese (Ensaio 1), sacarose e maltose (acceptor) foi adicionada ao meio, o que resultou na transferência das unidades glicosídicas, provenientes da quebra da sacarose, para a extremidade do acceptor formando os IMOs, diminuindo assim a formação de dextrana. Após as 16 horas de síntese, houve a alimentação somente de sacarose e a maltose presente na reação havia sido consumida. Portanto, as unidades de glicose deixaram de ser desviadas para serem incorporadas na maltose e passaram a ser utilizadas para a formação de dextrana. A Figura 4b mostra que entre 16 e 20 h, todos os IMOs detectados por HPLC tiveram sua concentração bruscamente reduzida e por outro lado, observa-se uma acumulação bem mais lenta de dextrana, particularmente até as 16 horas indicando que este é o melhor tempo de síntese para produção dos IMOs. No caso do ensaio 1, a ausência de maltose no meio favorece uma acumulação expressiva de dextrana, de maneira bem mais intensa que para o ensaio 2.

Nos dois ensaios, podemos observar uma elevada concentração de frutose, superando 50 g/L após as 16 horas. Uma hipótese para justificar o decréscimo da concentração dos IMOs é que o acúmulo de frutose no reator pode afetar a formação dos IMOs devido a alteração da rota enzimática segundo mecanismo proposto por Heincke et al. (1999). Diante disso, foi realizada a síntese dos IMOs em reator batelada contendo diferentes concentrações de frutose e os resultados são apresentados na Figura 5.

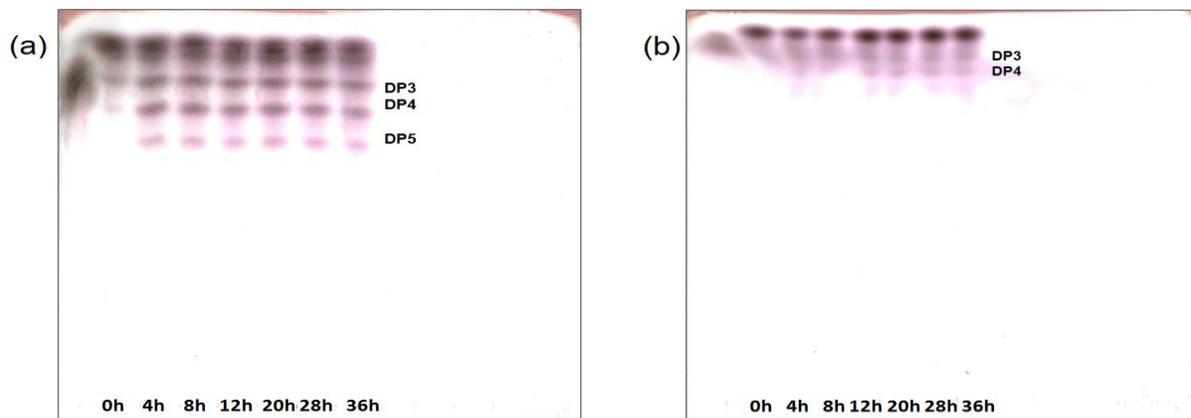


Figura 5 - Cromatografia em camada delgada dos IMOs formados na síntese realizada com 40 g/l de frutose (a) e 80 g/L de frutose (b).

Conforme apresentado na Figura 5, podemos observar que na síntese realizada com uma menor concentração de frutose (40 g/L), foi obtida uma maior variedade (DP3 a DP5) e concentrações mais elevadas dos IMOs (Figura 5a), visto que na síntese realizada com 80 g/L de frutose (Figura 5b) foram obtidas concentrações reduzidas de IMOs (verificadas pela intensidade das manchas) com grau de polimerização três e quatro. Esses resultados sugerem que a presença de elevadas concentrações de frutose no reator podem inibir a síntese dos IMOs.

A concentração de IMOs totais obtidos foram superiores ao obtido por Rudeekulthamrong *et al.* (2013), que estudaram a produção de isomalto-oligossacarídeos de cadeia longa utilizando amilomaltase e transglicosidade. Foram obtidos 9,9 g/L de IMOs com grau de polimerização de dois a sete. Os resultados obtidos também foram superiores aos obtidos por Honorato *et al.* (2007), que utilizaram suco de caju clarificado como fonte de aceptores (glicose e frutose) para a síntese de oligossacarídeos pré-bióticos. A maior concentração de oligossacarídeos reportada neste trabalho foi de 9,30 g/L. Estes resultados confirmam que a alimentação de substratos, durante a reação, favorece a formação de oligossacarídeos com maior grau de polimerização e em maior concentração. No entanto, tempos longos de reação podem levar a um acúmulo de dextrana, provavelmente devido ao excesso de frutose levar à inibição da síntese de IMOs.

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste estudo observamos que a melhor condição para a produção de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos de cadeia longa foi a estratégia de alimentação alternada da mistura contendo sacarose e maltose, seguida da adição de sacarose. A maior

seletividade IMOs/dextrana foi obtida em dezesseis horas de síntese, provavelmente devido ao acúmulo de frutose afetar a atividade da enzima para a síntese de IMOs.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pelo apoio financeiro, a ARS Culture Collection pela doação do micro-organismo, ao GPSA e LABIOTEC pelo apoio na realização deste trabalho.

7. REFERÊNCIAS

- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, P. A.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350-356, 1956.
- GUIMARÃES, D. R. B.; COSTA, F. A. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hidrolisys by surface response analysis. *Braz. J. Chem. Eng.*, 16, 129-139, 1999.
- HEINCKE, K.; DEMUTH, B.; JÖRDENIN, H. J.; BUCHHOLZ, K. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 24, p. 523-534, 1999.
- HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Fermentation of cashew apple juice to produce high added value products. *World. J. Microb. Biot.*, v. 23, p. 1409-1415, 2007.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MUSSATTO, S. I.; MANCILHA, I. M. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.*, v. 68, p. 587-597, 2007.
- PATEL, S.; GOYAL, A. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World. J. Microb. Biot.*, v. 27, p. 1119-1128, 2011.
- RABELO, M. C.; FONTES, C. P. M. L.; RODRIGUES, S.; AZEVEDO, D. C. S. . Estudo do alongamento da cadeia de isomalto-oligossacarídeos pré-bióticos. In: XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2013, Foz do Iguaçu - PR. Anais do SINAFERM 2013, 2013. v. 1. p. 1-4.
- RABELO, M. C.; HONORATO, T. L.; GONÇALVES, L. R. B.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Enzymatic synthesis of prebiotic oligosaccharides. *Appl. Biochem. Biotech.*, v. 133, p. 31-40, 2006.
- RODRIGUES, S.; LONA, L. M. F.; FRANCO, T. T. The effect of maltose on dextran yield and molecular weight distribution. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, v.28,p. 9-14, 2005.
- RUDEEKULTHAMRONG, P.; SAWASDEE, K; KAULPIBOON, J. Production of long-chain Isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amylomaltase and transglucosidase enzymes. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, v. 18, p. 778-786, 2013.