



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Joana Filipa Martinho
Lopes**

**Produção de mano-oligossacarídeos através da
 β -mananase imobilizada para formulação de
ingredientes alimentares**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Joana Filipa Martinho
Lopes**

**Produção de mano-oligossacarídeos através da
 β -mananase imobilizada para formulação de
ingredientes alimentares**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Joana Sá Ramalho Simões, Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família.

O júri

Presidente

Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade
de Aveiro

Arguente

Professor Doutor Fernando Hermínio Ferreira Milheiro Nunes
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade
de Trás-os-Montes e Alto Douro

Orientador

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva
Professor associado com agregação do Departamento de
Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Joana Simões por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade, motivação e paciência ao longo deste ano.

Agradeço ao Doutor Manuel Vilanova do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Faculdade do Porto pela disponibilidade do laboratório de Imunologia, em particular à Doutora Alexandra Correia pela orientação no estudo da atividade imunoestimuladora.

Agradeço à Doutora Manuela Pintado e à Doutora Ana Gomes da Universidade Católica do Porto pela disponibilidade na realização dos ensaios da atividade prebiótica

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório da Unidade de Investigação em Química Orgânica, Produtos Naturais e Agro-Alimentares (QOPNA) pelo acolhimento, boa disposição e por toda a ajuda, em especial à Susana e à Ana por todo o companheirismo.

Agradeço ao Hugo e a todos os meus amigos em especial à Susana, à Joana, à Sofia, à Rita e à Catarina por me ajudarem sempre, me motivarem e animarem ao longo do percurso.

Agradeço, de uma forma muito especial, à minha família, ao meu pai e à minha irmã, por me ajudarem sempre e estarem sempre presentes.

Palavras-chave

Galactomananas; (β 1 \rightarrow 4)-mananase; Imobilização; Quitina; Genipina; Mano-oligossacarídeos

Resumo

Mano-oligossacarídeos (MOS) são hidratos de carbono constituídos por 2 a 10 resíduos de manose, que podem ser obtidos a partir de galactomananas (GM). As GM são polissacarídeos compostos por resíduos de D-manopiranoose em ligações (β 1 \rightarrow 4), que podem estar substituídos em O-6 por resíduos únicos de α -D-galactopiranoose. As GM com baixo grau de substituição tendem a ser insolúveis em água e com elevado grau de substituição, se tiverem um grau de polimerização elevado, tendem a formar soluções de alta viscosidade. A hidrólise das GM pela β -mananase permite a produção de MOS, sendo a reutilização da enzima possível se esta estiver imobilizada.

Neste trabalho foram utilizadas GM obtidas a partir do resíduo de café (SCG) e da goma de alfarroba. Para solubilizar as GM do SCG foram testadas a hidrólise ácida parcial e a torra, tendo sido obtidas, por ambas as metodologias, GM solúveis. Estas GM solúveis foram caracterizadas por análise de açúcares neutros, análise de ligações glicosídicas e cromatografia de exclusão molecular. Foi também analisada uma amostra de GM solúvel de SCG, obtida por extração assistida por micro-ondas.

A β -mananase, de origem comercial foi imobilizada usando a quitina, obtida previamente a partir das cascas de camarão, como suporte. Usou-se como reagente bi-funcional a genipina. A percentagem de imobilização foi de 36%. A atividade da enzima foi avaliada, utilizando como substrato as GM do SCG e monitorizada pela formação de manbiose por cromatografia em fase gasosa acoplada a detecção por ionização de chama (GC-FID). A formação de trissacarídeos (Man_3 e Gal-Man_2) e outros MOS também foi avaliada por GC-FID e por cromatografia de exclusão molecular.

Os parâmetros cinéticos da β -mananase livre e imobilizada foram determinados por hidrólise das GM de SCG e formação de manbiose. Estes foram calculados a partir da equação de Lineweaver-Burk. A enzima livre apresentou uma $V_{\text{máx}}$ de 10,5 mmol/min e um K_m de 0,047 mg/mL. No caso da enzima imobilizada a $V_{\text{máx}}$ (6,4 mmol/min) foi ligeiramente inferior à da enzima livre, enquanto que o K_m (1,57 mg/mL) foi 30 vezes superior.

A β -mananase imobilizada foi utilizada para a produção de MOS a partir de GM de goma de alfarroba (LBG), tendo-se verificado a formação de trissacarídeos e tetrassacarídeos, para além de MOS de maior tamanho, não tendo, no entanto, sido produzidos dissacarídeos.

Os MOS produzidos a partir das GM do SCG e da LBG não apresentaram citotoxicidade com células do baço de ratinho. No entanto, não foi observada atividade imunoestimuladora. Foi também avaliada a atividade prebiótica para a estirpe *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* não se tendo verificado atividade prebiótica.

Keywords

Galactomannan; (β 1 \rightarrow 4)-mannanase; Immobilization; Chitin; Genipin; Manno-oligosaccharides

Abstract

Mano-oligosaccharides (MOS) are carbohydrates consisting of 2 to 10 mannose residues that can be obtained from galactomannans (GM). GM are polysaccharides composed by (β 1 \rightarrow 4) linked D-mannopyranose residues that can be substituted at O-6 with single residues of α -D-galactopyranose. GM with low degree of substitution tend to be insoluble in water whereas GM with high degree of substitution, and high degree of polymerization, tend to form high viscosity solutions. Hydrolysis of GM with β -mannanase allows the production of MOS, and enzyme immobilization allows its reuse.

In this study, GM obtained from spent coffee grounds (SCG) and also from locust bean gum (LBG) were used. To render them soluble in water, a pretreatment of GM of the SCG by partial acid hydrolysis and also by roasting was tested. The efficiency of pretreatment was evaluated by neutral sugar analysis, analysis of glycosidic bonds and molecular exclusion chromatography. The sample of SCG previously obtained by microwave assisted extraction was also analyzed.

The β -mannanase from commercial sources was immobilized on chitin, as support, previously obtained from shrimp shells. Genipin was used as bifunctional reagent. The percentage of enzyme immobilization was 36%. The enzyme activity was measured by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID) through the formation of mannobiose from galactomannans of the SCG. The formation of trisaccharides (Man₃ and Gal-Man₂) and other MOS was also evaluated by GC-FID and size exclusion chromatography.

The kinetic parameters of both free and immobilized β -mannanase were determined by hydrolysis of GM of the SCG and mannobiose formation, calculated from Lineweaver-Burk equation. The free enzyme showed a V_{max} of 10.5 mmol/min and K_m of 0.047 mg/mL. In case of the immobilized enzyme the V_{max} (6.4 mmol/min) was slightly lower than the free enzyme, while the K_m (1.57 mg/mL) was 30 times higher.

The activity of immobilized β -mannanase was tested in GM of the LBG, allowing to obtain tetrasaccharides and trisaccharides, as well as other major MOS. However, disaccharides have not been produced.

The MOS obtained by hydrolyses of GM of the SCG and LBG through β -mannanase immobilization did not show cytotoxicity against mouse spleen cells. However, no immunostimulatory activity was observed. Prebiotic activity was also evaluated for the strain *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* prebiotic activity was not verified.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS.....	1
1.1. Oligossacarídeos	3
1.2. Galactomananas	4
1.2.1. Café	5
1.2.2. Goma de alfarroba	7
1.3. Hidrólise enzimática	9
1.4. Imobilização de enzimas.....	10
1.4.1. Imobilização de enzimas: Ligação cruzada quitina-genipina-enzima.....	11
1.4.2. Imobilização de enzimas que hidrolisam polissacarídeos.....	14
1.4.3. Cinética enzimática	15
1.5. Atividades biológicas.....	15
1.5.1. Atividade imunoestimuladora	15
1.5.2. Atividade prebiótica	16
1.6. Objetivos do trabalho.....	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Origem e caracterização das amostras.....	21
2.1.1. Precipitação em etanol das galactomananas de resíduo de café obtida por extração assistida por micro-ondas	21
2.1.2. Solubilização das galactomananas do resíduo de café	22
2.1.2.1. Hidrólise ácida parcial das galactomananas do resíduo de café	22
2.1.2.2. Torra das galactomananas do resíduo de café.....	22
2.1.3. Análise de açúcares neutros	23
2.1.4. Análise de ligações glicosídicas.....	24
2.1.5. Cromatografia de exclusão molecular.....	26
2.2. Imobilização da <i>endo</i> -(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase	27
2.2.1. Quantificação de enzima imobilizada pelo método do ácido bicinconínico.....	28

2.2.2.	Hidrólise das galactomananas solúveis do resíduo de café.....	29
2.2.3.	Quantificação de dissacarídeos formados	29
2.2.4.	Ensaio de cinética enzimática.....	30
2.2.5.	Cromatografia de exclusão molecular.....	30
2.2.6.	Avaliação da atividade da β -mananase imobilizada em galactomananas da goma de alfarroba	31
2.3.	Ensaio biológico	31
2.3.1.	Ensaio de imunoestimulação	31
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
3.1.	Preparação das galactomananas.....	37
3.1.1.	Caracterização da amostra de galactomananas do resíduo de café obtida por extração assistida por micro-ondas	37
3.1.1.1.	Análise de ligações glicosídicas	37
3.1.1.2.	Análise através de cromatografia de exclusão molecular (Biogel-P2)	39
3.1.1.3.	Precipitação em etanol da amostra de SCG _{MW} e análise por cromatografia de exclusão molecular	40
3.1.2.	Solubilização das galactomananas	41
3.1.2.1.	Hidrólise ácida parcial	41
3.1.2.2.	Torra das galactomananas do resíduo de café.....	43
3.2.	β -mananase	45
3.2.1.	Imobilização da β -mananase	45
3.2.1.1.	Quantificação da enzima imobilizada pelo método do ácido bicinconínico..	46
3.2.1.2.	Quantificação de dissacarídeos formados.....	46
3.2.2.	Análise dos MOS formados	47
3.2.3.	Cinética enzimática	52
3.2.4.	Avaliação da atividade da β -mananase imobilizada através das galactomananas da goma de alfarroba.....	54
3.2.4.1.	Caracterização da amostra de galactomananas de goma de alfarroba	54
3.2.4.2.	Hidrólise das galactomananas da goma de alfarroba.....	55

3.3. Atividade biológica.....	56
3.3.1. Ensaios de imunoestimulação	56
3.3.2. Ensaios prebióticos.....	58
4. CONCLUSÕES	61
5. PERSPETIVAS DE FUTUROS TRABALHOS	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Estrutura das galactomananas (Adaptado Ref. (11)).....	4
Figura 1.2 – Esquema das galactomananas do café (Adaptado Ref. (11)).....	5
Figura 1.3 - Grãos de café: a) café verde e b) café torrado.	6
Figura 1.4 – Goma de alfarroba: a) vagens; b) sementes e c) pó (29).....	8
Figura 1.5 – Hidrólise enzimática das galactomananas pela β -mananase (Adaptado Ref. (35))	9
Figura 1.6 – Estrutura da quitina e da quitosana (Adaptado Ref. (47)).....	12
Figura 1.7 – Estrutura da genipina (Adaptado Ref. (58)).....	13
Figura 1.8 – Ligação cruzada quitina-genipina-enzima (Adaptado Ref. (58)).....	14
Figura 2.1 – Esquema de imobilização da β -mananase.....	27
Figura 3.1 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de SCG _{MW} . V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i - volume de inclusão.....	39
Figura 3.2 – Cromatografia de exclusão molecular do precipitado e do sobrenadante obtidos depois da precipitação em etanol da amostra SCG _{MW} . V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i - volume de inclusão.....	41
Figura 3.3 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de SCG solúvel hidrolisadas durante 6 h pela β -mananase livre. V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i - volume de inclusão.....	48
Figura 3.4 - Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de SCG solúvel hidrolisadas durante 24 h pela β -mananase imobilizada. V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i - volume de inclusão.....	49
Figura 3.5 – Cromatogramas de GC-FID de padrões de mano-oligossacarídeos: a) manobiose, b) galactosil-manose, c) manotriose, d) galactosil-manobiose e e) galactosil-manotriose	50
Figura 3.6 – Cromatograma de GC-FID da formação de mano-oligossacarídeos pela β -mananase livre	51

Figura 3.7 – Cromatograma de GC-FID da formação de mano-oligossacarídeos pela β -mananase imobilizada.....	51
Figura 3.8 – Cinética da β -mananase livre: a) gráfico de Michaelis-Menten e b) gráfico de Lineawer-Burk e cinética da β -mananase imobilizada: c) gráfico de Michaelis-Menten e d) gráfico de Lineawer-Burk.....	53
Figura 3.9 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de LBG hidrolisadas durante 90 min pela β -mananase livre. V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, tri-sacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i - volume de inclusão.....	55
Figura 3.10 – Exemplo de citogramas de fluxo de ativação de Células B (CD19): a) controlo negativo, b) controlo positivo, c) amostra com polimixina e d) amostra sem polimixina ..	57
Figura 3.11 – Efeito estimulatório, expresso em % de células B ativadas, nas amostras de GM_1, MOS_1, MOS_2 e MOS_3, em diferentes concentrações (25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$), com e sem polimixina.....	58
Figura 3.12 – Efeito prebiótico ao longo do tempo, da amostra de MOS da LBG, controlos positivos e controlo negativo.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Análise das ligações glicosídicas das amostras ricas em galactomananas provenientes do resíduo de café e da goma de alfarroba.	38
Tabela 3.2 – Condições das hidrólises ácidas parciais (concentração de ácido, temperatura e tempo) e percentagem de amostra solúvel.....	42
Tabela 3.3 – Composição em açúcares das amostras de galactomananas de SCG _{inicial} , SCG solúvel (SOL_HA1) e insolúvel (INSOL_HA1) após hidrólise ácida parcial HA_1 e amostra de galactomananas de LBG	43
Tabela 3.4 – Concentração de proteína nas águas de lavagem e inicial, calculada a partir da curva de calibração dos padrões de BSA e percentagem de manobiose formada por hidrólise com cada amostra	46
Tabela 3.5 – Valores da cinética da β -mananase livre e imobilizada.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

% mol – Percentagem molar

Ara – Arabinose

BCA – Ácido bicinconínico

BSA – Albumina de soro bovino

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNS – 3,5-Dinitrossalicilato

DP – Grau de polimerização

ELSD – “Evaporative light scattering detection”

Et75 – Fração do precipitado da precipitação em etanol 75%

EtSN – Fração do sobrenadante da precipitação em etanol 75%

FACS – Solução balanceada de sais suplementada com 10 mmol/L de azida de sódio em 1% de BSA

FBS – Soro bovino fetal

FOS – Oligossacarídeos de frutose ou fruto-oligossacarídeos

Gal – Galactose

Gal-Man – Galactosil-manose

Gal-Man₂ – Galactosil-manobiose

Gal-Man₃ – Galactosil-manotriose

Gen – Genipina

GC-FID – Cromatografia em fase gasosa acoplada a detetor de ionização de chama

GC-qMS – Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa com quadrupolo

Glc – Glucose

GlcN – Glucosamina

GM – Galactomanana

GOS – Oligossacarídeos de galactose ou galacto-oligossacarídeos

HA – Hidrólise ácida parcial

HEPES – Ácido etanosulfónico 2-[4-(2-hidroxietilo)-1-piperazinilo]

K_m – Constante de Michaelis-Menten

LBG – Locust bean gum

LBG_{Et50} – Goma de alfarroba purificada por precipitação em etanol 50%

LPS – Lipopolissacarídeo

Man – Manose

Man₂ – Manobiose

Man₃ – Manotriose

min – Minutos

MOS – Oligossacarídeos de manose ou mano-oligossacarídeos

MRS – Man-Rogosa-Sharpe

NDO – Oligossacarídeos não digeríveis

PMAA – Acetatos de alditol parcialmente metilados

Qui – Quitina

rpm – Rotações por minuto

RPMI – Meio “Roswell Park Memorial Institute”

SCG – Spent Coffee Grounds

SCG_{MW} – Resíduo de café obtido por extração assistida por microondas

TFA – Ácido trifluoroacético

XOS – Oligossacarídeos de xilose ou xilo-oligossacarídeos

1. CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

1.1. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são hidratos de carbono de baixo peso molecular, que contêm um grau de polimerização (DP) entre 2 e 10 unidades de monossacarídeos, tendo um tamanho intermédio entre os monossacarídeos e os polissacarídeos (1,2). Com base nas suas propriedades nutricionais, os oligossacarídeos podem ser divididos em oligossacarídeos digeríveis e não digeríveis (2). Os oligossacarídeos em ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$) não são digeridos ao longo do trato gastrointestinal mas são digeridos pelas bactérias do colon, e por isso são conhecidos por promover o crescimento destas bactérias benéficas, principalmente bifidobactérias, sendo então reconhecidos como prebióticos (1).

As principais categorias de oligossacarídeos não digeríveis (NDO) incluem oligossacarídeos de frutose (FOS), que são obtidos a partir da inulina, oligossacarídeos de galactose (GOS), obtidos da lactose, oligossacarídeos de xilose (XOS), obtidos a partir de xilanas e ainda oligossacarídeos de manose (MOS), formados a partir de mananas (2). Os GOS, FOS e XOS têm muitas aplicações descritas na literatura, e devido aos múltiplos efeitos benéficos para a saúde os NDOs, têm sido amplamente utilizados como ingredientes alimentares em diferentes produtos. Os GOS são muito utilizados nas fórmulas de leite infantil (2,3). Para além dos GOS, diferentes NDOs, de diferentes fontes, têm sido incorporados numa grande variedade de outros alimentos, como, bebidas (refrigerantes, bebidas de fruta, bebidas alcoólicas), produtos lácteos (leites fermentados, leites aromatizados, iogurtes), produtos de confeitaria (bolachas, biscoitos, doces) (2,3), cereais matinais e alimentos para idosos e diabéticos (2). No caso dos MOS, estes são uma fonte pouco explorada e por isso é pertinente desenvolver utilizações para este tipo de oligossacarídeos.

Os MOS são bons substratos para as bactérias do tipo *Bifidobacterium* spp. e *Bacteroides* spp. (4). Uma alimentação que inclua grandes quantidades de MOS pode ser boa para evitar distúrbios intestinais, como doença inflamatória, evitando também a colonização de patogénicos digestivos (4).

Os MOS têm sido utilizados em alimentação animal. A utilização de MOS em rações para aves acelera a maturação da microflora intestinal promovendo o crescimento de certas espécies de *Lactobacillus* (5). Os MOS melhoram também a homogeneidade da

microflora intestinal e permitem a seleção diferencial de certas bactérias benéficas específicas (5).

Os MOS são utilizados como aditivos alimentares para humanos e animais. MOS preparados por hidrólise de mananas dos grãos de café e/ou do resíduo de café são utilizados como aditivos alimentares e alimentos para animais, para estimular o crescimento de microrganismos intestinais úteis (6). Para além disso, os MOS são usados em alimentos para animais para melhorar a produtividade e a qualidade dos ovos produzidos (7). Os MOS são ainda descritos como prebióticos (8).

Assim, existem muitos recursos naturais ricos em galactomananas que podem ser aproveitados para a produção de MOS, podendo estes ser utilizados como ingredientes e aditivos alimentares para pessoas e animais.

1.2. Galactomananas

As galactomananas são compostas por resíduos de D-manopirranose em ligações ($\beta 1 \rightarrow 4$) na cadeia principal, substituído em O-6 por resíduos únicos de α -D-galactopirranose (Figura 1.1) (9,10).

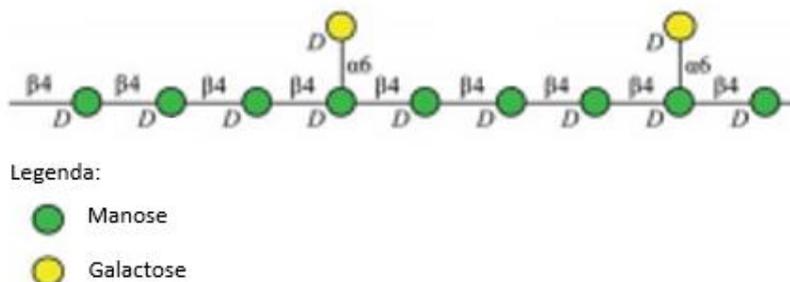


Figura 1.1 – Estrutura das galactomananas (Adaptado Ref. (11))

Existem muitas fontes ricas em galactomananas que podem ser utilizadas para a produção de mano-oligossacarídeos, tais como o café e a goma de alfarroba. Estes mano-oligossacarídeos podem ser produzidos por hidrólise enzimática e podem ter diferentes propriedades biológicas.

1.2.1. Café

As galactomananas são o polissacarídeo maioritário das infusões de café torrado (12,13). Para além das características habituais das galactomananas, no café estas possuem ainda, resíduos de α -L-arabinose terminais ligados ao O-6 dos resíduos de manose da cadeia principal, em ligações (α 1 \rightarrow 6), tal como os resíduos de galactose (Figura 1.2) (9). Estas galactomananas são polissacarídeos acetilados, com os grupos acetilo em O-2 e/ou O-3 dos resíduos de manose (14). Os resíduos podem estar acetilados individualmente, duplamente acetilados e acetilados consecutivamente (9). As galactomananas do café contêm também resíduos únicos glucose em ligação (β 1 \rightarrow 4) intercalados na cadeia principal (14).

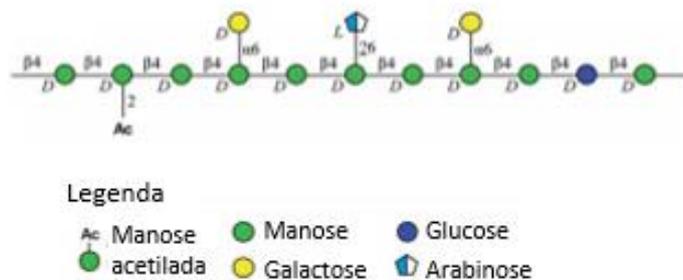


Figura 1.2 – Esquema das galactomananas do café (Adaptado Ref. (11))

O café é uma das bebidas mais apreciadas no mundo (15,16), sendo o seu consumo de cerca de 6 milhões de toneladas por ano (17). A bebida de café é obtida por extração com água quente do grão de café torrado e moído. O café que é atualmente comercializado pertence na sua grande maioria a duas espécies: *Coffea arabica* e a *Coffea canefora*, da variedade *robusta*, que são conhecidos como café Arábica e café Robusta, respetivamente (18). O facto do consumo de café ser tão elevado também significa que a quantidade de resíduo de café (SCG) produzida também é muito elevada, e por isso a valorização deste subproduto é um assunto de relevância (13), uma vez que, durante a preparação de infusões de café ou de café expresso, os resíduos não têm qualquer reaproveitamento.

As galactomananas encontram-se nos grãos de café, que são as sementes da planta do café, o cafezeiro, e são na sua grande maioria constituídos por polissacarídeos, correspondendo estes a metade do peso seco do grão de café nativo (19). Os principais

polissacarídeos presentes nos grãos de café verde são as galactomananas, as arabinogalactanas e a celulose (19). Relativamente ao café torrado, a quantidade de polissacarídeos depende do grau de torra e da origem do café (19). A quantidade de polissacarídeos do grão de café torrado que passa para a bebida durante a produção de infusão de café ou café expresso é apenas cerca de 20%, o que sugere que 80% dos polissacarídeos permanecem no SCG (13).

Apesar do SCG ser uma potencial fonte de galactomananas, o seu uso é dificultado pelo facto das galactomananas serem muito insolúveis. A hidrólise ácida parcial mostra ser uma forma de aumentar a solubilidade das galactomananas do SCG (20,21), mantendo intactas as características estruturais das galactomananas, originando polissacarídeos de menor tamanho, logo mais solúveis. Para além da hidrólise ácida parcial, também a torra das galactomananas aumenta a solubilidade destas em água (22). A torra do café consiste em submeter os grãos de café verde a uma temperatura elevada, geralmente entre os 150°C e os 225°C (sem ultrapassar os 250°C), durante 10 a 20 minutos (Figura 1.3) (18).

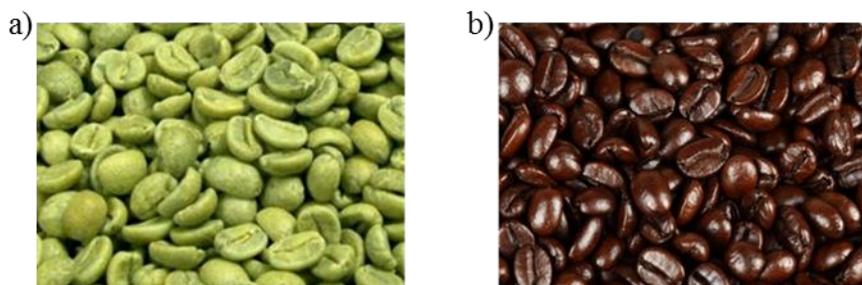


Figura 1.3 - Grãos de café: a) café verde e b) café torrado.

A torra provoca alterações nos grãos de café, ou seja, promove um aumento do volume do grão e o aparecimento de microporos na parede celular, que leva a uma alteração na quantidade e na estrutura dos polissacarídeos (23). Assim, a torra promove uma maior acessibilidade da água ao interior do grão, levando ao aumento da solubilidade em água quente dos polissacarídeos extratáveis, nomeadamente das galactomananas (23). O aumento da solubilidade das galactomananas ocorre devido ao decréscimo do grau de ramificação e do grau de polimerização destes polissacarídeos (12,24). No processo de torra as galactomananas podem sofrer despolimerização, desramificação, caramelização, isomerização, oxidação, reações de Maillard e formação de melanoidinas (25). As galactomananas são termicamente transformadas em

melanoidinas compostas por material heterogêneo de elevado peso molecular, de cor castanha e que contêm azoto (26).

A torra do café provoca alterações na estrutura das galactomananas. O grau de polimerização (DP) das galactomananas do café torrado é de 17-26, enquanto que o DP das galactomananas do café verde é de 29-31 (9). Para além desta despolimerização provocada pela torra, a quantidade relativa de ligações (1→4,6) dos resíduos de manose são também inferiores às encontradas para o café verde, mostrando que galactomananas menos ramificadas também foram obtidas do processo de torrefação (9). Apesar das alterações que ocorrem durante a torra, estas não modificam as ligações (β 1→4), havendo por isso ligações suscetíveis à hidrólise enzimática pela β -mananase.

Para além da hidrólise ácida parcial e da torra para aumentar a solubilidade das galactomananas do SCG, também a extração assistida por micro-ondas parece aumentar a solubilidade destas (27,28). Com a extração assistida por micro-ondas obtém-se entre 23% e 29% de material solúvel em água (27,28).

1.2.2. Goma de alfarroba

A goma de alfarroba, para além do café, é outra fonte rica em galactomananas. A goma de alfarroba (LBG) é usada como aditivo alimentar (E410) e é um pó branco amarelado obtido por moagem do endosperma da semente da alfarrobeira (*Ceratonia siliqua* L.), (Figura 1.4) encontrada em muitas zonas do Mediterrâneo (29). A semente da alfarroba é composta pela casca (30-33%), pelo endosperma (46%) e pelo germe (23-25%). A primeira etapa para extração do polissacarídeo envolve a remoção da casca da semente, por tratamento termo-mecânico ou por tratamento químico. Depois o germe é separado do endosperma, moído, peneirado, classificado e comercializado como LBG (30).



Figura 1.4 – Goma de alfarroba: a) vagens; b) sementes e c) pó (29)

As galactomananas da LBG já há muito tempo que são usadas na indústria de papel, têxtil, farmacêutica, de cosméticos e alimentar. A característica importante deste polissacarídeo que o torna industrialmente útil é a sua capacidade para formar uma solução aquosa viscosa a concentrações relativamente baixas, sendo usado para estabilizar emulsões e para substituir a gordura em muitos produtos alimentares (31). Para além disso, esta goma é apenas ligeiramente afetada pelo pH, por iões adicionados e pelo processamento térmico (31).

As galactomananas da LBG são idênticas às galactomananas do SCG. Também contêm α -L-arabinose ligada à manose em O-6 assim como, resíduos únicos de glucose em ligação (β 1 \rightarrow 4) intercalados na cadeia principal (29). Os grupos acetilo presentes nas cadeias de manose (29) são semelhantes ao que se verifica nas galactomananas do café, embora com um grau de acetilação inferior. A constituição das galactomananas da LBG é de cerca de 73-77% de manose, 22-23% de galactose, 1-3% de glucose e 2% de arabinose (29). As galactomananas da LBG diferem na relação Man/Gal dependendo para além da origem, da variedade e idade da planta, das condições de crescimento e do método de extração dos polissacarídeos (32). De entre as principais galactomananas comerciais disponíveis, a LBG é das que apresenta maior conteúdo em galactose, sendo em média a sua relação Man/Gal de 3,5 (29).

1.3. Hidrólise enzimática

As galactomananas podem ser hidrolisadas utilizando uma enzima específica para galactomananas, a *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase (EC 3.2.1.78), que degrada especificamente ligações (β 1 \rightarrow 4) da cadeia principal (33).

A (β 1 \rightarrow 4)-D-mananase uma enzima do tipo *endo*, é responsável por clivar ligações (β 1 \rightarrow 4) da cadeia principal, produzindo aleatoriamente pequenos mano-oligossacarídeos e novos terminais na cadeia (Figura 1.5) (34,35). A degradação das galactomananas pela β -mananase é fortemente influenciada pelo padrão de substituição da cadeia principal de manose, uma vez que esta tem atividade em regiões não substituídas por galactose ou arabinose e em resíduos não acetilados, resultando na produção de mano-oligossacarídeos (36). A β -mananase atua preferencialmente em regiões com baixa substituição e as frações de MOS libertadas consistem principalmente em resíduos de manose não substituídos (36).

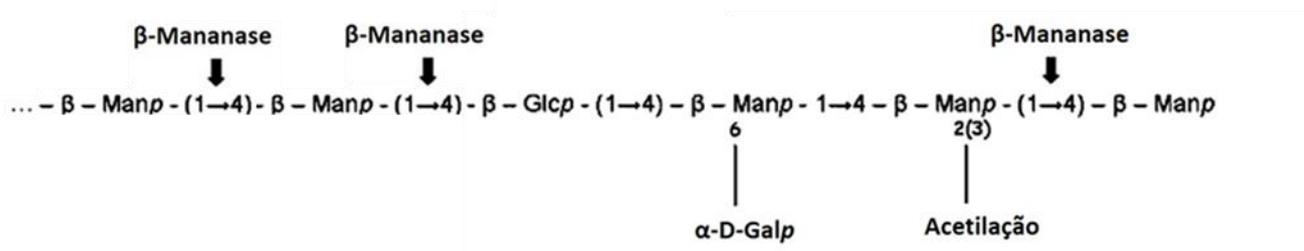


Figura 1.5 – Hidrólise enzimática das galactomananas pela β -mananase (Adaptado Ref. (35))

As galactomananas para além de serem hidrolisadas pela β -mananase podem ainda ser hidrolisadas por outras enzimas, que atuam cooperativamente na sua degradação (34). As enzimas que podem ainda hidrolisar as galactomananas são: a β -manosidase (EC 3.2.1.25) e a β -glucosidase (EC 3.2.1.21) que vão degradar ligações ao longo da cadeia principal das galactomananas (33,35). Para além destas, outras enzimas adicionais, como a acetil-manana-esterase e α -galactosidase (EC 3.2.1.22) são necessárias para remover substituintes da cadeia lateral, que podem estar ligados em vários pontos da cadeia principal (35).

As enzimas que degradam as galactomananas podem ser produzidas por diferentes fontes, tais como plantas, animais e microrganismos. As enzimas de origem microbiana

são as mais utilizadas para aplicação industrial devido à fácil e económica produção e às suas propriedades, como a atividade numa vasta gama de pH e temperatura (37).

As enzimas, em particular a β -mananase, têm sido utilizadas para hidrolisar galactomananas de diferentes origens, tais como as galactomananas do café (14,25,38) da goma de alfarroba (29), do *Aloe vera* (39) e de *Gleditsia triacanthos*, *Caesalpinia pulcherrima* e *Adenanthera pavonina* (40). A hidrólise das galactomananas do café torrado com a *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase, para além da diminuição do peso molecular destes polissacarídeos (25), provoca também um aumento de açúcares redutores (41), assim como uma diminuição da viscosidade (41). A hidrólise do SCG com a β -mananase provoca também um aumento na solubilidade do extrato (42). Numa fase inicial da hidrólise das mananas do café foi detetado predominantemente manotriose e manotetraose, enquanto que na fase final da hidrólise os principais produtos foram a manotriose e a manobiose (41). A enzima β -mananase foi utilizada para hidrolisar as galactomananas de *Gleditsia sinensis* (43), um polissacarídeo semelhante à LBG quer a nível estrutural quer a nível funcional, tendo a hidrólise resultado numa série de oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização (DP) (43), provavelmente devido a ser uma galactomanana com maior grau de substituição.

1.4. Imobilização de enzimas

As enzimas têm sido consideradas como uma boa aplicação na indústria química devido à sua elevada atividade, alta seletividade e especificidade (44). No entanto, a aplicação da enzima livre é muitas vezes prejudicada por fatores vários como a falta de estabilidade a longo prazo, dificuldades na sua recuperação e reutilização (45), assim como sensibilidade à desnaturação e devido aos seus elevados custos (46). Existem inúmeras técnicas que têm sido desenvolvidas por forma a melhorar as características enzimáticas, sendo uma delas a imobilização de enzimas que, permite melhorar várias propriedades, como por exemplo, a estabilidade, a atividade, a especificidade, a seletividade, a redução da inibição e a redução dos custos, sendo muito importante a sua reutilização (47). A imobilização consiste na fixação a um suporte e pode ser por diferentes formas: fixação física, onde existe interação fraca entre o suporte e a enzima,

ou fixação química onde são formadas ligações covalentes entre o suporte e a enzima (46). Neste trabalho, a β -mananase foi imobilizada para poder ser reutilizada e as galactomananas do café e da goma de alfarroba foram utilizadas como substrato. Existem diversos materiais de suporte que podem ser usados para fixar a enzima como por exemplo a quitina.

1.4.1. Imobilização de enzimas: Ligação cruzada quitina-genipina-enzima

Não existe um suporte universal para a imobilização de todas as enzimas e as suas aplicações, mas existem características que devem ser comuns a todos os materiais utilizados para imobilizar enzimas (45). Estas características são: elevada afinidade para proteínas, grupos funcionais livres para reação direta com as enzimas, estabilidade mecânica, rigidez e regenerabilidade (45).

Para aplicações alimentares é ainda importante que os materiais usados sejam biocompatíveis e não tóxicos. Dos muitos suportes, orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, usados e estudados para imobilizar enzimas, a quitina tem grande interesse pois possui uma grande parte das características acima descritas (45). A quitina é um polissacarídeo natural sendo um dos recursos biológicos renováveis mais abundantes no mundo. É encontrada no exoesqueleto de crustáceos, na cutícula dos insetos e nas paredes celulares dos fungos, conferindo-lhes resistência. A quitina é composta por unidades de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranosose (*N*-acetil-glucosamina, GlcNAc) em ligações (β 1 \rightarrow 4) (Figura 1.6) e é insolúvel na maioria dos solventes (46,48). A quitina, quando tratada por reagentes alcalinos (54), sofre *N*-desacetilação e dá origem à quitosana (Figura 1.6), que pode estar desacetilada num grau variável (46).

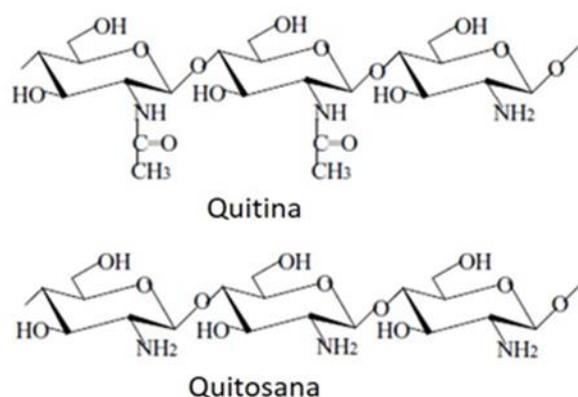


Figura 1.6 – Estrutura da quitina e da quitosana (Adaptado Ref. (47))

Geralmente, o produto da N-desacetilação da quitina só é considerado como sendo quitosana quando o grau de desacetilação é superior a 60% (49). O grau de desacetilação é o parâmetro que expressa o conteúdo de GlcN nas cadeias do polímero, e exerce influência sobre algumas propriedades como a solubilidade e a viscosidade, determinando a sua aplicação (50). A quitosana é solúvel na maioria dos solventes orgânicos, enquanto a quitina é insolúvel na sua grande maioria (51), o que é uma vantagem quando se pretende obter um sólido que não se difunda numa rede, por exemplo. Para além disso a quitina tem boa estabilidade promovida pela criação de uma rede de pontes de hidrogénio entre as cadeias (48). A vantagem da quitina e da quitosana em relação a outros polissacarídeos, como a celulose e o amido, é que a sua estrutura química permite modificações específicas, por possuir um grupo amina primária (49).

O glutaraldeído é o reagente bi-funcional mais utilizado na imobilização de enzimas. Este é um agente reticulante citotóxico e desta forma requer procedimentos cuidadosos na sua utilização na imobilização de enzimas, uma vez que é necessário eliminar todo o glutaraldeído que fica livre (8). O glutaraldeído é muito reativo formando ligações reversíveis, bases de Schiff, e desta forma a imobilização da enzima vai sendo perdida ao longo do tempo. Existe então a necessidade de, por exemplo, reduzi-lo com borohidreto de sódio para se eliminar esta possibilidade de formação de bases de Schiff (espécies reativas indesejáveis, por serem reversíveis) (52).

A genipina pode ser obtida a partir dos frutos de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides* Ellis (53). A *Genipa americana* é encontrada na América tropical e tem sido utilizada como diurético e como medicamento para problemas respiratórios (53). A

Gardenia jasminoides Ellis é cultivada no Extremo Oriente e tem sido usada em medicamentos anti-inflamatórios, diuréticos e com propriedades hemostáticas (53). O geniposídeo extraído dos frutos da *Gardenia jasminoides* Ellis é hidrolisado enzimaticamente num composto heterocíclico, a genipina (Figura 1.7), pela enzima β -glucosidase num processo microbiológico envolvendo *Penicillium nigricans* (53). A genipina pode ser usada como reagente bi-funcional que se vai ligar ao suporte e à enzima.

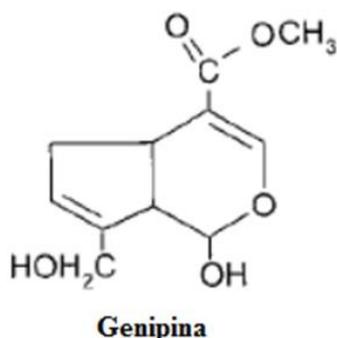


Figura 1.7 – Estrutura da genipina (Adaptado Ref. (58))

A genipina é um reagente bi-funcional alternativo e mais vantajoso em relação ao glutaraldeído (54). A genipina é cerca de 5000-10000 vezes menos tóxica que o glutaraldeído (52) e usada como reagente bi-funcional possui elevada seletividade, sendo capaz de reagir apenas com grupos amina primários (55). Assim, a genipina é mais estável, biocompatível e menos tóxica que o glutaraldeído, o que a torna mais vantajosa como suporte para a imobilização de enzimas (52).

Embora o mecanismo de formação da ligação entre a genipina e quitina não seja ainda totalmente conhecido, estudos demonstram que a genipina reage com materiais que contêm grupos amina primários, como por exemplo, a quitosana e alguns péptidos, de modo a formar redes reticuladas estáveis (56, 57). A quitina não é completamente acetilada e é nos locais não acetilados (aminas primárias) que ocorre a ligação com a genipina.

Existem várias possibilidades e formas de ocorrer a ligação entre a quitina, a genipina e a enzima a imobilizar. A formação da ligação cruzada quitina-genipina-enzima pode dar-se por um ataque nucleofílico dos grupos amina da quitina ao C-3 da genipina, havendo abertura do anel e posterior formação de um grupo amina secundário (52). Posteriormente, o grupo amina da lisina da enzima faz um ataque nucleofílico ao grupo

éster da genipina havendo formação de uma amida e libertação de metanol, formando-se assim a ligação cruzada quitina-genipina-enzima. Na Figura 1.8 encontra-se representada uma possível estrutura para a ligação entre a quitina e a genipina que pode justificar o cross-linking da quitina com a genipina (58).

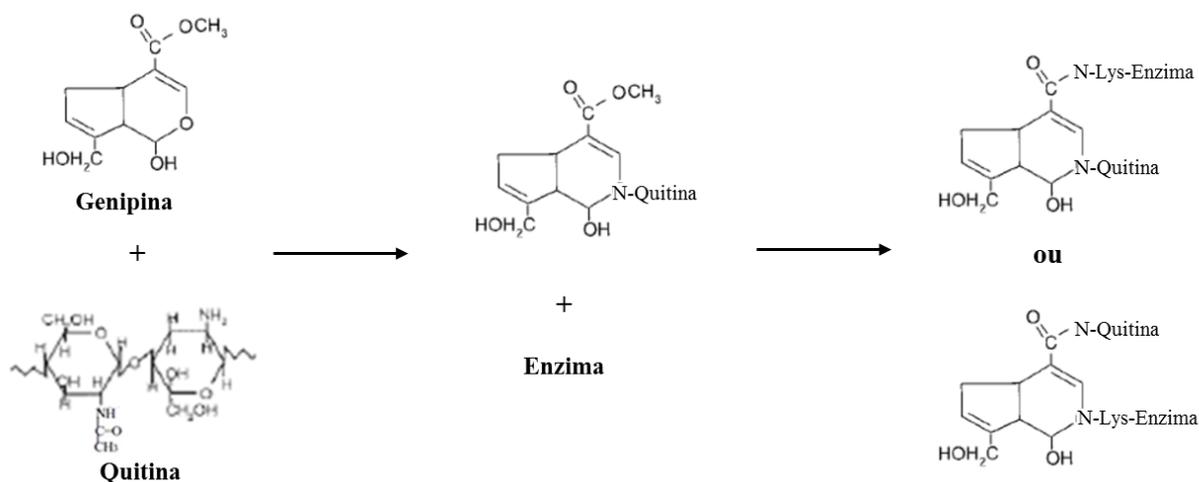


Figura 1.8 – Ligação cruzada quitina-genipina-enzima (Adaptado Ref. (58))

1.4.2. Imobilização de enzimas que hidrolisam polissacarídeos

Existem diversos trabalhos tendo como objetivo a imobilização de enzimas para atuarem em diferentes polissacarídeos, como por exemplo a imobilização de xilanase para a produção de XOS a partir de xilanas de bétula e o de trigo (59). A enzima β -galactosidase foi imobilizada para produção de GOS a partir da lactose (60). Também a β -mananase foi objeto de imobilização usando quitina como suporte e o glutaraldeído como reagente bi-funcional (8). A hidrólise de galactomananas de LBG com este sistema originou principalmente manotriose e manotetraose, com um rendimento de imobilização de cerca de 95%, sendo a estabilidade da enzima ao armazenamento mantido ao longo de 120 dias (8). Como se formam bases de Schiff, a imobilização com o glutaraldeído é reversível, sendo a enzima libertada para o meio e consequente perda da enzima. Esta situação poderia ser vantajosa no caso de se pretender um sistema do tipo “drug delivery”, onde se pretende ir libertando, neste caso enzima, ao longo do

tempo, mas a libertação de glutaraldeído não seria nunca vantajosa. Estes problemas de citotoxicidade podem ser ultrapassados pela utilização de genipina como agente reticulante.

1.4.3. Cinética enzimática

A cinética enzimática estuda a velocidade das reações catalisadas por enzimas. A cinética pode ser avaliada através da medição da quantidade de produto formado ou de substrato transformado variando a concentração de substrato. Se a enzima obedecer à cinética de Michaelis-Menten, podem ser calculados os parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (43). K_m é a constante de Michaelis-Menten e é igual à concentração de substrato quando a velocidade é metade da velocidade máxima. $V_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima da reação. Estes parâmetros são geralmente determinados através de representações gráficas de Lineweaver-Burk, obtidas a partir da equação de Michaelis-Menten (43). Quanto menor o valor de K_m , maior vai ser a afinidade da enzima para o substrato, ou seja, o substrato é mais suscetível à ação da enzima (43). A grande maioria das enzimas imobilizadas tem um K_m maior em relação à enzima livre (59), uma vez que a imobilização diminui a afinidade que a enzima tem para com o substrato, pois existe um grande impedimento estérico entre o substrato e a matriz, onde se encontram imobilizadas as enzimas.

1.5. Atividades biológicas

1.5.1. Atividade imunoestimuladora

Uma grande quantidade de polissacarídeos tem demonstrado ter atividade imunoestimuladora, sendo as mananas acetiladas do *Aloe vera* um exemplo deste tipo de polissacarídeos. Esta atividade imunoestimuladora pode estar relacionada com a distribuição dos grupos acetilo ao longo da cadeia (61). Para além das mananas de *Aloe vera* também as mananas do café mostraram ter efeito imunoestimulador induzindo a expressão *in vitro* de linfócitos B e T (13). O efeito imunoestimulador foi também

estudado para XOS presentes na casca da amêndoa, e foi mostrado que estes contêm efeitos de imunoestimulação (62). Como este efeito bioativo está presente nas mananas do café e em outros oligossacarídeos (XOS) é possível que esteja também presente em fragmentos menores das galactomananas, como é o caso dos MOS.

Os linfócitos são as principais células do sistema linfático e, em conjunto com os macrófagos e os neutrófilos, constituem os glóbulos brancos. Os linfócitos são produzidos e sofrem maturação em órgãos específicos, denominados órgãos linfóides que são a medula óssea e o timo (63). Existem duas classes de linfócitos específicos com recetores para antígenos, as células B e as células T, que funcionam como mediadores da imunidade humoral e imunidade mediada por células, respetivamente (63). Os linfócitos B segregam anticorpos que têm a capacidade de reconhecer especificamente qualquer tipo de molécula (63).

1.5.2. Atividade prebiótica

Os prebióticos são definidos como um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias do cólon, sendo as bifidobactérias e os lactobacilos os alvos (64).

Existem prebióticos com eficácia comprovada como é o caso dos FOS, inulina, lactulose e GOS. A capacidade destes oligossacarídeos para alterar a flora intestinal para uma composição mais vantajosa tem sido demonstrada (64). Para além destes prebióticos existem outros potenciais prebióticos em estudo, como é o caso dos MOS.

Os MOS obtidos a partir do SCG são resistentes às enzimas digestivas salivares α -amilase, ao suco gástrico, enzimas pancreáticas e da mucosa intestinal (65). Para além disso, os MOS podem ser fermentados por bactérias fecais humanas obtendo-se essencialmente ácidos gordos de cadeia curta, como o ácido acético, propiónico e n-butírico (65). Os ácidos gordos de cadeia curta melhoram o ambiente intestinal e para além disso são absorvidos e utilizados como fonte de energia para o hospedeiro (65).

A adição de MOS do SCG à dieta de ratos aumentou a concentração de bifidobactérias e ácidos gordos de cadeia curta (66). Isto mostra que os MOS promovem o crescimento das bifidobactérias e o aumento da produção de ácidos gordos de cadeia curta nos ratos (66). No caso dos humanos, a suplementação da dieta com MOS provocou

também um aumento do teor de bifidobactérias (*Bifidobacterium*) (67). Assim os MOS podem ser uma importante fonte de prebióticos a introduzir na alimentação humana.

1.6. Objetivos do trabalho

Neste trabalho pretende-se produzir mano-oligossacarídeos (MOS) através da hidrólise enzimática de amostras de galactomananas (GM) provenientes do resíduo de café (SCG) e da goma de alfarroba (LBG). Os MOS serão produzidos através da enzima *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase imobilizada, usando a quitina como suporte de imobilização e a genipina como regente bi-funcional, que liga a enzima ao suporte. Os MOS produzidos serão caracterizados estruturalmente e as propriedades físico-químicas assim como as propriedades biológicas (como a atividade imunoestimuladora e a atividade prebiótica) serão testadas, por forma a avaliar as suas aplicabilidades enquanto ingredientes alimentares.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem e caracterização das amostras

Neste trabalho foi utilizada uma fração de galactomananas (GM), obtidas por extração assistida por micro-ondas (SCG_{MW}) a partir do resíduo de café (SCG). Este resíduo foi previamente seco a 105°C durante 8 h e re-suspenso em água numa proporção de 1g em 10 mL de água num volume total de 70 mL (28). Esta fração foi resultante da quarta extração ao resíduo de café, a 200°C durante 2 minutos. O material foi centrifugado a 15 000 rpm durante 20 min a 4°C e a solução foi filtrada usando filtro de fibra de vidro MN GF-3, congelado e liofilizado.

Foi também usada uma amostra de galactomananas extraídas do SCG ($SCG_{inicial}$) com NaOH 4M, neutralizadas, dialisadas e liofilizadas, e por fim torradas a 200°C durante 1 h (22). Esta amostra era composta por manose (89%), galactose (7%), arabinose (2%) e glucose (2%), num conteúdo total de açúcares de 80%.

Para além das amostras de SCG, foi também utilizada uma amostra de goma de alfarroba (LBG from *Ceratonia siliqua*, Sigma G0753) que foi previamente purificada por precipitação em etanol 50% (LBG_{E50}) (29). A amostra é composta por manose (74%), galactose (24%), glucose (1%) e arabinose (1%), num conteúdo total de açúcares de 86%.

2.1.1. Precipitação em etanol das galactomananas de resíduo de café obtida por extração assistida por micro-ondas

A amostra de galactomananas de SCG obtidas por extração assistida por micro-ondas, sendo completamente solúvel em água, foi submetida a uma precipitação em etanol (21) para separar os compostos de maior peso molecular, tendencialmente mais insolúveis em soluções de etanol/água, dos de menor peso e poder utilizar os de maior peso molecular nos ensaios enzimáticos.

A amostra (1,0 g) foi dissolvida em 100 mL de água, com agitação, durante 1 h. Posteriormente foi adicionado etanol absoluto (75% de etanol). A mistura foi colocada a 4°C, com agitação, durante 2 h, para que houvesse formação de mais precipitado. Este

precipitado foi recolhido por centrifugação a 24 000 rpm, a 4°C, durante 30 min. O precipitado recolhido foi suspenso em água, concentrado por evaporação a pressão reduzida a 30°C, para evaporar o etanol, e foi por fim liofilizado.

2.1.2. Solubilização das galactomananas do resíduo de café

2.1.2.1. Hidrólise ácida parcial das galactomananas do resíduo de café

Como as galactomananas do SCG_{inicial} obtidas com NaOH 4M eram insolúveis em água foi feita uma hidrólise ácida parcial de acordo com Nunes *et al.*, com o objetivo de as tornar solúveis em água (21). Para tal, hidrolisaram-se 350 mg da galactomananas com 70 mL de TFA 50 mM, a 70°C, com agitação, durante 30 minutos. Posteriormente fez-se uma centrifugação a 4000 rpm, durante 20 min, de modo a separar o resíduo do sobrenadante. O sobrenadante obtido foi recolhido, e o ácido foi evaporado sob pressão reduzida a 40°C, sendo depois congelado e liofilizado para avaliar a percentagem de solubilização. Outras condições de hidrólise foram testadas alterando a concentração de TFA, o tempo de hidrólise ou/e a temperatura: TFA 250 mM, a 70°C durante 30 minutos, TFA 250 mM, a 100°C durante 60 minutos e ainda TFA 2 M, a 120°C durante 10 minutos.

2.1.2.2. Torra das galactomananas do resíduo de café

Para tentar solubilizar as galactomananas do SCG_{inicial}, a amostra foi submetida a uma torra a 200°C durante 2h (68). Após o processo de torra o material foi suspenso em água à temperatura ambiente e deixado em agitação durante 1h. O sobrenadante foi separado do resíduo insolúvel por filtração usando filtro de fibra de vidro, MN GF-3, e foi adicionada água a 90°C ao resíduo insolúvel e deixou-se agitar durante 1h. O resíduo insolúvel e o sobrenadante foram separados por filtração e os sobrenadantes obtidos foram concentrados por evaporação a pressão reduzida, a 30°C, sendo depois liofilizados.

2.1.3. Análise de açúcares neutros

A quantificação de açúcares neutros presentes nos polissacarídeos foi feita em dois passos, segundo Coimbra *et al.* (69). Num primeiro passo, procedeu-se à hidrólise ácida dos açúcares promovendo a sua despolimerização seguindo-se um segundo passo, a redução e acetilação, onde ocorre a conversão dos monossacarídeos em acetatos de alditol (compostos voláteis) para que sejam analisados por GC-FID.

A hidrólise dos polissacarídeos realizou-se em tubos de cultura com 1-2 mg de amostra. À amostra foram adicionados 200 μL de H_2SO_4 72% (m/m) deixando-se reagir durante 3 h à temperatura ambiente, com agitação esporádica para homogeneização da amostra. De seguida adicionou-se 1 mL de água destilada, perfazendo a concentração do ácido a 2 M, e deixou-se incubar a 120°C num bloco de aquecimento durante 1 h.

Após a hidrólise arrefeceu-se a amostra num banho de gelo e adicionaram-se 200 μL da solução de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL). Em seguida transferiu-se 1 mL de hidrolisado para novos tubos de cultura e neutralizou-se o ácido com 200 μL de NH_3 a 25 %. Para redução dos açúcares a acetatos de alditol adicionaram-se 100 μL de solução de NaBH_4 15% (m/v) em NH_3 3 M (preparada na hora). A solução foi agitada e incubada num bloco de aquecimento a 30°C durante 1 h.

Posteriormente, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e o excesso de NaBH_4 foi eliminado por 2 adições sucessivas de 50 μL de ácido acético glacial. De seguida transferiram-se para tubos de Sovirel 300 μL de solução contendo os açúcares reduzidos, e colocaram-se os tubos num banho de gelo. A cada tubo adicionaram-se 450 μL de 1-metilimidazol (catalisador) e 3 mL de anidrido acético (reagente acetilante), agitando-se muito bem e deixando-se reagir num bloco de aquecimento a 30°C durante 30 min.

Num banho de gelo, foram adicionados 3,0 mL de água destilada, para decompor o excesso de anidrido acético, e 2,5 mL de diclorometano para promover a extração dos acetatos de alditol. Após agitação manual vigorosa, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 30 segundos, para a separação das duas fases, e a fase aquosa (superior) foi removida por sucção. À fase orgânica adicionaram-se, novamente, 3,0 mL de água destilada e 2,5 mL de diclorometano, sendo depois centrifugada e removida a fase aquosa como descrito anteriormente. A fase orgânica foi lavada 2 vezes com 3 mL de água destilada, intercaladas por agitação vigorosa, centrifugação e aspiração de fase aquosa.

Na última aspiração a fase aquosa foi completa e cuidadosamente removida, e a fase orgânica contendo os acetatos de alditol foi transferida para tubos de *speedvac*. As amostras foram concentradas até à secura num concentrador de amostras (speed vacuum) e lavadas 2 vezes com 1 mL de acetona anidra e concentradas novamente.

Os acetatos de alditol foram dissolvidos no volume adequado de acetona anidra (50 μ L) e 2 μ L foram injetados num cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400) e analisados por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama, GC-FID, usando uma coluna capilar DB-225 de 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 μ m de espessura. A temperatura do injetor foi de 220°C e a do detetor 230°C, e utilizou-se o hidrogénio como gás de arraste. Utilizou-se o programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 200°C mantendo-se durante 1 min, rampa de 40°C/min até 220°C, mantendo-se a 220°C durante 7 min, rampa de 20°C/min até 230°C, e mantendo-se a 230°C durante 1 min.

2.1.4. Análise de ligações glicosídicas

As ligações glicosídicas estabelecidas entre os monossacarídeos constituintes das amostras foram analisadas pelo método proposto por Ciucanu e Kerek (70). Este método propõe a metilação dos grupos hidroxilo livres, seguindo-se a hidrólise dos polissacarídeos, a redução dos monossacarídeos aos respetivos alditóis e a acetilação dos grupos hidroxilo livres (que estabeleciam no polissacarídeo ligações glicosídicas ou que estavam envolvidos na formação do anel do açúcar) obtendo-se acetatos de alditol parcialmente metilados (PMAA). Os PMAA foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa com quadrupolo como analisador (GC-qMS).

As amostras foram previamente pesadas, 1-2 mg, para tubos de *speedvac* com septo na tampa e secas em estufa de vazio na presença de P₂O₅. Posteriormente, as amostras foram deixadas em agitação durante a noite em 1 mL de DMSO, à temperatura ambiente. Às amostras completamente dissolvidas foram adicionados 40 mg de NaOH, em pó, triturado sob atmosfera de árgon imediatamente antes de utilizar, e deixou-se reagir durante 30 min com agitação à temperatura ambiente. De seguida foram adicionados

com uma seringa 80 µL de iodeto de metilo (agente metilante) que reagiu por 20 min sob agitação vigorosa à temperatura ambiente. Repetiu-se a adição de iodeto de metilo. Aos éteres metílicos obtidos foram adicionados 2 mL de água, sendo depois neutralizado com uma solução de HCl 1 M. Seguidamente, adicionou-se 3,0 mL de diclorometano e, após agitação manual vigorosa, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 30 segundos, para a separação das duas fases, e a fase aquosa superior foi removida por sucção. À fase orgânica adicionaram-se 3,0 mL de água sendo depois centrifugada e removida a fase aquosa como descrito anteriormente. A lavagem com água destilada foi repetida até o diclorometano estar completamente límpido, sendo este depois evaporado na *speedvac*. Posteriormente, para completa metilação, dissolveram-se novamente as amostras em 1 mL de DMSO com agitação, durante o tempo necessário para a dissolução completa da amostra. Todos os passos de metilação até à evaporação do diclorometano na *speedvac* foram repetidos.

Após remetilação, os ésteres metílicos foram hidrolisados com 500 µL de TFA 2 M durante 1 h num bloco de aquecimento a 121°C, com agitação ocasional. Depois de hidrolisadas as amostras, o ácido foi evaporado num concentrador de amostras (*speed vacuum*). Para redução das amostras hidrolisadas foram adicionados 20 mg de NaBD₄ e 300 µL de NH₃ 2 M, agitaram-se os tubos e deixou-se reagir a 30°C durante 1 h. O excesso de NaBD₄ foi neutralizado com duas adições sucessivas de 50 µL de ácido acético glacial. A reação de redução, acetilação e a extração líquido-líquido foi realizada de igual forma à análise de açúcares (ponto 2.1.3.).

Os PMAA foram dissolvidos no volume adequado de acetona anidra (cerca de 100 µL) e analisados por GC-qMS. Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu GC-MS-QP 2010 Plus com uma coluna capilar apolar DB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro, e 0,15 µm de espessura). O volume de injeção foi de 0,2 µL, a temperatura do injetor de 220°C em modo “*split*”, a temperatura do detetor 300°C e utilizou-se hélio como gás de arraste. Utilizou-se um programa de temperaturas com as seguintes condições: 39,73 min de tempo total, temperatura inicial de 80°C, rampa de 7,5°C/min até 140°C, manteve-se a 140°C durante 5 min, rampa de 0,2°C/min até 143,20°C, rampa de 12°C/min até 200°C, rampa de 50°C/min até 250°C e manteve-se a 250°C durante 5 min.

2.1.5. Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular em Biogel-P2 foi utilizada para fracionar e caracterizar as amostras de galactomananas de SCG obtidas por extração assistida por micro-ondas (SCG_{MW}), assim como a amostra de SCG inicial ($SCG_{inicial}$) e a amostra de SCG solúvel após torra ($SCG_{solúvel}$).

A cromatografia foi realizada numa coluna XK 16/100 (Pharmacia) com diâmetro de 1,6 cm e altura de fase estacionária de 56 cm. A coluna foi empacotada de acordo com as instruções do fabricante. O eluente utilizado foi água e o fluxo do eluente através da coluna foi de 0,30 mL/min recorrendo a uma bomba peristáltica. De seguida foi feita a calibração da coluna com vista a determinar o seu volume de exclusão e inclusão e o volume de saída de diferentes oligossacarídeos (DP2, DP3 e DP4). A coluna foi calibrada para monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos e tetrassacarídeos e volume de exclusão molecular pela utilização de glucose, trealose, rafinose e estaquiiose e dextrana azul, respetivamente. A dextrana azul permite aferir o volume de exclusão uma vez que se trata de um polímero de elevado peso molecular, 2000 kDa, sendo possível acompanhar o seu deslocamento ao longo da coluna devido à sua coloração azul. A glucose indicou o volume de inclusão da coluna.

Com o objetivo de separar os polissacarídeos de diferentes pesos moleculares presentes na amostra, esta foi dissolvida num volume máximo de 1,5 mL e aplicada no topo da coluna através de uma bomba peristáltica. Foram recolhidas frações de 1,5 mL e a deteção dos oligossacarídeos foi realizada usando um detetor ELSD (“evaporative light scattering detection”). A deteção por ELSD nas várias frações de recolha foi possível mediante a introdução de 70 μ L de volume de recolha com um fluxo de 4 mL/min para o interior do detetor a uma temperatura de 57°C e pressão a 1,9 bar, por meio de uma bomba peristáltica.

2.2. Imobilização da *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase

Para a imobilização da *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.78, Megazyme) preparou-se uma solução tampão de acetato de sódio 100 mM e pH 5,5. Preparou-se também uma solução de genipina em 10% de etanol (v/v), usando 750 mg de genipina num volume de 100 mL de etanol. Para a montagem do sistema de imobilização começou por se colocar 93 mL da solução de genipina (Gen), preparada anteriormente, num copo, em agitação magnética ao qual se adicionou 0,5 g de quitina (Qui), previamente obtida a partir de cascas de camarão. Esta mistura foi transferida para o sistema de imobilização (Figura 2.1) e foi lavada três vezes com 60 mL de água destilada.

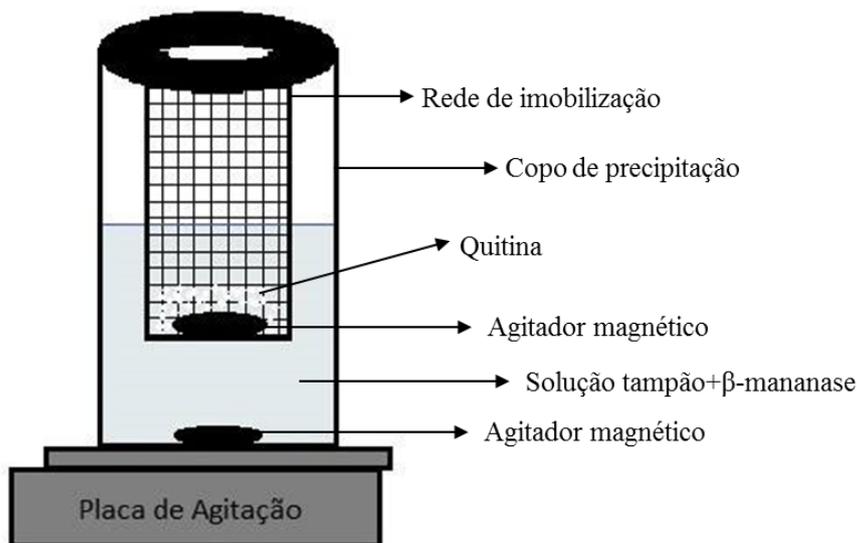


Figura 2.1 – Esquema de imobilização da β -mananase

Num copo colocaram-se 60 mL da solução tampão de acetato de sódio pH 5,5, preparada anteriormente e adicionou-se a enzima β -mananase (100 U) e a mistura Gen+Qui e deixou-se em agitação *overnight*. Em cada passo foi recolhida uma alíquota da solução (500 μ L).

A solução foi depois transferida para o sistema de imobilização e foi lavada quatro vezes com 60 mL de solução tampão, recolhendo-se o tampão de cada uma das lavagens, obtendo-se assim as soluções “lavagem 0”, “1^alavagem”, “2^alavagem”, “3^alavagem” e “4^alavagem”. A enzima imobilizada foi armazenada em tampão, na câmara fria (4°C).

2.2.1. Quantificação de enzima imobilizada pelo método do ácido bicinconínico

A determinação da percentagem da enzima imobilizada foi feita pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Este método baseia-se na reação de biureto em que ocorre a redução de Cu^{2+} a Cu^+ pelas proteínas, em meio alcalino, sendo que a redução é proporcional à quantidade de proteína presente na amostra. O produto da reação é um complexo de cor púrpura e é formado pela ligação de duas moléculas de BCA com o íon Cu^+ . Este complexo é solúvel em água e absorve a 562 nm.

A proteína total foi determinada recorrendo a este método a partir de uma reta de calibração construída com o padrão de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações entre 0,05 e 0,2 mg/mL. Foi utilizado o protocolo para volumes reduzidos tendo-se realizado a experiência e a leitura das absorvâncias diretamente numa placa com 96 poços. Primeiramente preparou-se a solução de trabalho em que se mistura 50 partes do reagente A (constituído por uma solução de ácido bicinconínico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em NaOH 0,1 M com pH final de 11,25) com 1 parte do reagente B (uma solução de sulfato de cobre penta-hidratado 4% (m/v)). Em cada poço da placa foram colocados 25 μL de solução padrão ou amostra e 200 μL de solução de trabalho. A placa foi colocada a incubar a 37 °C durante 30 minutos e após atingir a temperatura ambiente foi lida a absorvância a 562 nm. Todas as determinações foram feitas em triplicado. A avaliação da percentagem de enzima imobilizada foi calculada da seguinte forma (71):

$$\% \text{ mananase imobilizada} = \frac{(\text{Proteína inicial} - \text{Proteína nas águas de lavagem})}{\text{Proteína inicial}} \times 100\%$$

A proteína inicial corresponde à enzima total que foi colocada na imobilização e a proteína nas águas de lavagem corresponde à proteína presente em cada água de lavagem da enzima imobilizada (“lavagem 0”, “1ªlavagem”, “2ªlavagem”, “3ªlavagem” e “4ªlavagem”).

2.2.2. Hidrólise das galactomananas solúveis do resíduo de café

Para se verificar a eficiência da imobilização, a galactomanana (GM) do SCG_{solúvel} foi hidrolisada pela enzima imobilizada, pelas soluções “lavagem zero”, “1^alavagem”, “2^alavagem”, “3^alavagem” e “4^alavagem”, durante 12 h, 6 h e 3 h, em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, a 37°C. Para este ensaio usou-se sempre a mesma concentração de GM (1 mg/mL), para cada uma das lavagens. Por fim os dissacarídeos formados foram quantificados tal como descrito em 2.2.3.

2.2.3. Quantificação de dissacarídeos formados

Para a quantificação dos dissacarídeos, a diferentes tubos de cultura, foram adicionados 2 mL de cada uma das amostras e logo em seguida adicionaram-se 200 µL de padrão interno (2-desoxiglucose, 1 mg/mL) e neutralizou-se com 200 µL de NH₃ a 25%. Para redução dos açúcares a acetatos de alditol adicionou-se 100 µL de solução de NaBH₄ 15% (m/v) em NH₃ 3 M (preparada na hora). A solução foi agitada e incubada num bloco de aquecimento a 30°C durante 1 h.

Posteriormente, arrefeceram-se os tubos num banho de gelo e o excesso de NaBH₄ foi eliminado por 2 adições sucessivas de 50 µL de ácido acético glacial. A reação de redução, acetilação e a extração líquido-líquido foi realizada de igual forma à análise de açúcares (ponto 2.1.3.).

No final da redução e acetilação dos acetatos de alditol, estes foram dissolvidos no volume adequado de acetona anidra (50 µL) e 2 µL foram injetados num cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400) e analisados por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama, GC-FID, usando uma coluna capilar DB-1 de 30 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura. A temperatura do injetor foi de 300°C e a do detetor 350°C, e utilizou-se o hidrogénio como gás de arraste. Utilizou-se o programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 100°C e rampa de 20°C/min até 350°C. O tempo total da análise foram 12,50 min. Para além da

formação de dissacarídeos foi também avaliada a formação de outros oligossacarídeos. Para isso utilizou-se uma coluna capilar de 5% fenilsilicone com 25 m comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,05 µm de espessura. Injetaram-se 2 µL de cada amostra num cromatógrafo (Perkin Elmer – Clarus 400) e analisou-se por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização em chama, GC-FID, usando uma coluna capilar. A temperatura do injetor foi de 300°C e a do detetor 400°C, e utilizou-se o hidrogénio como gás de arraste. Utilizou-se o programa de temperaturas com as seguintes condições: início a 100°C, rampa de 10°C/min até 260°C, em seguida rampa de 2°C/min até aos 300°C e por fim rampa de 15°C/min até aos 400°C. O tempo total desta análise foram 43,67 min.

2.2.4. Ensaios de cinética enzimática

Para caracterizar a cinética da enzima imobilizada e se poder comparar com a enzima livre, foi avaliada a cinética quer da enzima livre, quer da enzima imobilizada. Para isso testaram-se diferentes concentrações de galactomananas (GM) de SCG solúvel após a torra para a enzima livre e para a imobilizada, em dois tempos diferentes (6h e 3h). Para a enzima livre usaram-se as concentrações de GM de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/mL e a cada concentração adicionou-se 1 U de enzima. Para a enzima imobilizada usaram-se as concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mg/mL. As GM foram hidrolisadas numa solução de tampão acetato de sódio 100 mM e pH 5,5, pela *endo*-β-(1→4)-D-mananase de *Aspergillus niger* (EC 3.2.1.78, Megazyme). A amostra, em diferentes concentrações, foi então colocada a 37°C e a formação de dissacarídeos foi avaliada de acordo com o descrito no ponto 2.2.3.

2.2.5. Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular em Biogel P2 foi utilizada para separar os diferentes mono-oligossacarídeos obtidos nas hidrólises enzimáticas e para verificar a sua eficiência. Esta separação foi realizada de acordo com o descrito no ponto 2.1.5.

2.2.6. Avaliação da atividade da β -mananase imobilizada em galactomananas da goma de alfarroba

A atividade da β -mananase imobilizada foi verificada recorrendo a uma amostra de GM provenientes da goma de alfarroba e procedeu-se tal como para as amostras de SCG, como descrito anteriormente (ponto 2.2.2.), mas utilizando apenas a enzima imobilizada para a hidrólise da LBG. Depois a hidrólise da LBG foi caracterizada passando a amostra na coluna P2 tal como descrito no ponto 2.1.5.

2.3. Ensaio biológicos

2.3.1. Ensaio de imunoestimulação

De modo a investigar o potencial efeito imunoestimulador da amostra de SCG solúvel, das frações de DP6 a DP10 de SCG, separadas na coluna de cromatografia de exclusão molecular (produzidas por hidrólise com a enzima imobilizada, e com a enzima livre) e das frações de DP6 a DP10 da LBG (produzidas por hidrólise com a enzima imobilizada), foram realizados no ICBAS – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto, ensaios para avaliar a capacidade das amostras em estimular linfócitos para uma resposta imunitária. Foram realizadas 2 réplicas por ensaio realizado.

Inicialmente foi necessário fazer a recolha das células do baço de um ratinho. O ratinho é sacrificado de uma forma rápida e indolor através de um deslocamento da cervical. Após a sua desinfeção com etanol 70%, em câmara de fluxo laminar, é feita uma incisão na zona abdominal e a pele é afastada de forma a expor o peritoneu parietal. Uma nova incisão é feita do lado esquerdo do abdómen tornando o baço acessível. Com o auxílio de uma pinça e uma tesoura o baço é removido gentilmente com o mínimo possível de tecido adiposo e colocado numa solução de RPMI numa caixa de Petri. Com o auxílio de uma pinça e um filtro, os esplenócitos foram libertados para o meio. As células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos e ressuspendidas em RPMI

de forma a ter-se cerca de 6×10^6 células/mL. O RPMI é um meio de suspensão celular que contém antibiótico e nutrientes de forma a manter a integridade celular. Para a preparação do RPMI completo foram necessários 50 mL de RPMI-1640 ao qual foram adicionados 500 μ L de tampão HEPES pH 7,5, 500 μ L de uma solução contendo penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 50 mg/mL, 5 mL de soro bovino fetal (FBS), 25 μ L de 2-mercaptoetanol e 1 mL de L-Glutamina.

Numa placa de cultura de 96 poços foram colocados 100 μ L de suspensão celular. As células plaqueadas foram estimuladas com RPMI (controlo negativo), LPS (controlo positivo), Concanavalina A (controlo positivo) e com as amostras a testar em diferentes concentrações (25, 50 e 75 μ g/mL), dissolvidas em RPMI. As células foram incubadas durante 6 h numa estufa a 37°C numa atmosfera húmida a 95% e com 5% de CO₂.

Depois do período de incubação das células com as amostras, estas foram centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos tendo sido descartado o sobrenadante. De seguida foi feita a marcação com os anticorpos monoclonais, tendo-se usado o anti-CD69-PE-Cy7 para marcar células ativadas (um marcador precoce de ativação), o anti-CD3-PE como marcador de linfócitos T, o anti-CD19-FITC como marcador de linfócitos B e o iodeto de propídio como marcador de viabilidade das células (para retirar as células mortas). Num eppendorf foi feita uma mistura dos anticorpos usados na marcação, diluídos na proporção de 1:100 com tampão FACS, uma solução salina com 10 mmol/L de azida de sódio e 1 % de BSA. Após a adição de 25 μ L da mistura de anticorpos, as células permaneceram em incubação durante 30 minutos no escuro a 4°C. Centrifugou-se a 1500rpm durante 5 minutos e ressuspenderam-se as células em tampão FACS e por fim, as células foram analisadas por citometria de fluxo.

O citómetro de fluxo é um aparelho de análise multiparamétrica de partículas (uma a uma) em suspensão. Neste aparelho faz-se passar, por um feixe de luz (laser), partículas em suspensão, de uma forma alinhada. A interação destas com o feixe gera sinais, que podem ser gerados pela dispersão do feixe de luz ou pela luz emitida por fluorocromos após excitação pelo feixe de luz, sinais estes que são captados por detetores apropriados e a informação produzida. Assim, por este processo, é possível selecionar populações linfocitárias e verificar se cada linfócito está ou não ativado, através de anticorpos específicos utilizados, acoplado a um corante fluorescente que são depois detetados por foto-sensores, que recebem o comprimento de onda selecionado.

2.3.2. Ensaio prebióticos

De modo a investigar o potencial efeito prebiótico das frações de DP6 a DP10 da LBG produzidas por hidrólise com a enzima imobilizada, foram realizados na Universidade Católica do Porto, ensaios para avaliar a capacidade das amostras em estimularem bactérias.

No estudo da atividade prebiótica foi utilizada a *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* LAFTI® L26, que foi obtida a partir de DSM Food Specialties (Moorebank, Austrália).

A cultura de *Lactobacillus* foi mantida a -80°C numa solução de glicerol 30% (v/v). Para o ensaio de atividade prebiótica, a cultura congelada foi re-ativada numa solução de Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Biokar Diagnostics, França), seguida por incubação a 37°C, durante a noite. A pré-cultura também foi preparada de acordo com as condições acima mencionadas.

Para avaliar o potencial prebiótico, a fim de permitir a substituição das fontes de carbono, a solução de MRS sem fonte de carbono foi preparada, por mistura dos diferentes constituintes do meio: 10 g/L de triptona (Sigma-Aldrich, EUA), 8 g/L de extrato de carne (Merck, Alemanha), 4 g/L de extrato de levedura (Biokar Diagnostics), 2 g/L de hidrogeno-fosfato de di-potássio (Merck), 1 g/L de tween 80 (Merck), 5 g/L de acetato de sódio (Merck), 2 g/L de citrato tribásico de amónia (Sigma-Aldrich), 0,2 g/L de sulfato de magnésio (Merck), 0,04 g/L de sulfato de manganês (Sigma-Aldrich). Este meio foi apenas preparado com 73,3% de água desionizada, de modo que a solução com a fonte de carbono desejada pudesse ser preparada separadamente e depois adicionada ao meio, para perfazer o volume final, com a concentração da fonte de carbono desejada.

O meio resultante foi então submetido ao autoclave a 121°C, durante 15 minutos. Separadamente, as soluções de glucose (Sigma-Aldrich, França) com 7,5% (m/v), oligossacarídeos de frutose comercial (FOS; P95 RAFTILOSE® de ORAFTI, Bélgica) e do prebiótico a ser testado, foram preparados e filtro-esterilizados. Estas soluções foram, em seguida, adicionadas, separadamente, ao MRS sem fonte de carbono numa razão 2,7:7,3 (v/v) para perfazer o volume final. Para o controlo negativo, em vez das soluções anteriormente mencionadas, apenas a água desionizada (também filtro-esterilizada) foi adicionada.

O ensaio foi realizado por adição de 2% (v/v) de uma cultura de uma noite de uma estirpe probiótica separada, previamente esterilizada, a eppendorfs contendo MRS com as diferentes fontes de carbono. Estes meios foram, então, transferidos, em triplicado para uma microplaca de 96 poços. A microplaca foi depois incubada a 37°C durante 48 h, e a absorvância a 660 nm foi monitorizada num leitor de microplacas Fluostar Optima (BMG LABTECH, Alemanha).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Preparação das galactomananas

Com o objetivo de preparar amostras de galactomananas do resíduo de café que pudessem ser utilizadas como substrato da β -mananase imobilizada, foram testados o tratamento por micro-ondas, a hidrólise ácida parcial e a torra, como forma de as tornar solúveis em água. As frações obtidas foram analisadas por análise de açúcares neutros, análise de ligações glicosídicas e cromatografia de exclusão molecular.

3.1.1. Caracterização da amostra de galactomananas do resíduo de café obtida por extração assistida por micro-ondas

3.1.1.1. Análise de ligações glicosídicas

Para caracterizar a amostra de galactomananas de SCG obtidas por extração assistida por micro-ondas (SCG_{MW}) e verificar o tipo de ligações glicosídicas existentes na amostra foi realizada uma análise de metilação permitindo traçar o perfil da amostra. As ligações glicosídicas da amostra SCG_{MW} estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Análise das ligações glicosídicas das amostras ricas em galactomananas provenientes do resíduo de café e da goma de alfarroba.

Ligação glicosídica	Fração (% mol)				
	SCG _{inicial}	SCG _{sol}	SCG _{insol}	SCG _{MW}	LBG _{Et50}
T-Ara	0,8	1,0	1,6	0,1	0,1
5-Ara	-	0,2	0,3	0,6	-
Total	0,8	1,3	1,9	0,6	0,1
T-Man	4,7	12,3	7,4	21,8	0,9
4-Man	78,3	68,9	70,9	50,5	50,0
6-Man	0,2	1,1	0,8	0,7	-
2,3-Man	-	-	-	0,2	-
2,4-Man	1,5	1,3	1,7	0,6	-
3,4-Man	0,5	0,8	0,4	0,3	-
4,6-Man	3,8	5,8	5,5	2,4	25,6
Total	89,0	90,1	86,6	76,5	76,4
T-Gal	2,1	2,9	2,7	8,1	19,9
3-Gal	3,7	2,2	2,9	7,4	-
6-Gal	0,6	0,9	0,6	2,5	-
3,6-Gal	1,4	1,1	1,7	3,1	-
Total	7,8	7,0	7,8	21,1	19,9
T-Glcp	0,1	0,4	0,2	0,2	0,2
4-Glcp	3,4	1,6	4,4	1,5	0,9
4,6-Glcp	-	-	-	-	0,3
Total	3,5	2,0	4,6	1,7	1,4
Man Total/(4,6)-Man	23,4 (4,3)	15,6 (6,4)	15,7 (6,4)	32,4 (3,1)	3,0 (33,5)
Man Total/T-Man	18,8	7,3	11,8	3,5	89,9

*Entre parênteses encontra-se a percentagem de ramificação

Pela análise de ligações glicosídicas da amostra de SCG obtida por extração assistida por micro-ondas verifica-se que a (1→4)-Man (50,5%) e a T-Man (21,8%) são os resíduos mais abundantes presentes nesta amostra. A quantidade de T-Gal (8,1%) existente é também elevada. O grau de ramificação de amostra, estimado pela razão (1→4,6)-Man/Man Totalx100%, é de 3,1% o que mostra que a amostra é pouco ramificada, quando comparada com as restantes amostras de SCG analisadas (4,3% e 6,4%). Esta amostra, SCG_{MW}, provavelmente sofreu desramificação devido ao tratamento térmico assistido por micro-ondas. Para além disso a razão Man Total/T-Man

dá uma estimativa do grau de polimerização (3,5), mostrando que em média a amostra é constituída por fragmentos relativamente pequenos quando comparada com a amostra de SCG_{inicial}, SCG_{solúvel} e SCG_{insolúvel} (18,8%, 7,3% e 11,8%, respetivamente). Este resultados mostram que a extração assistida por micro-ondas induz a quebra das ligações do polissacarídeo (28).

3.1.1.2. Análise através de cromatografia de exclusão molecular (Biogel-P2)

A amostra de SCG_{MW} foi caracterizada por fracionamento por cromatografia de exclusão molecular. A Figura 3.1 representa o cromatograma obtido após separação em Biogel-P2 da amostra de galactomananas de SCG_{MW}.

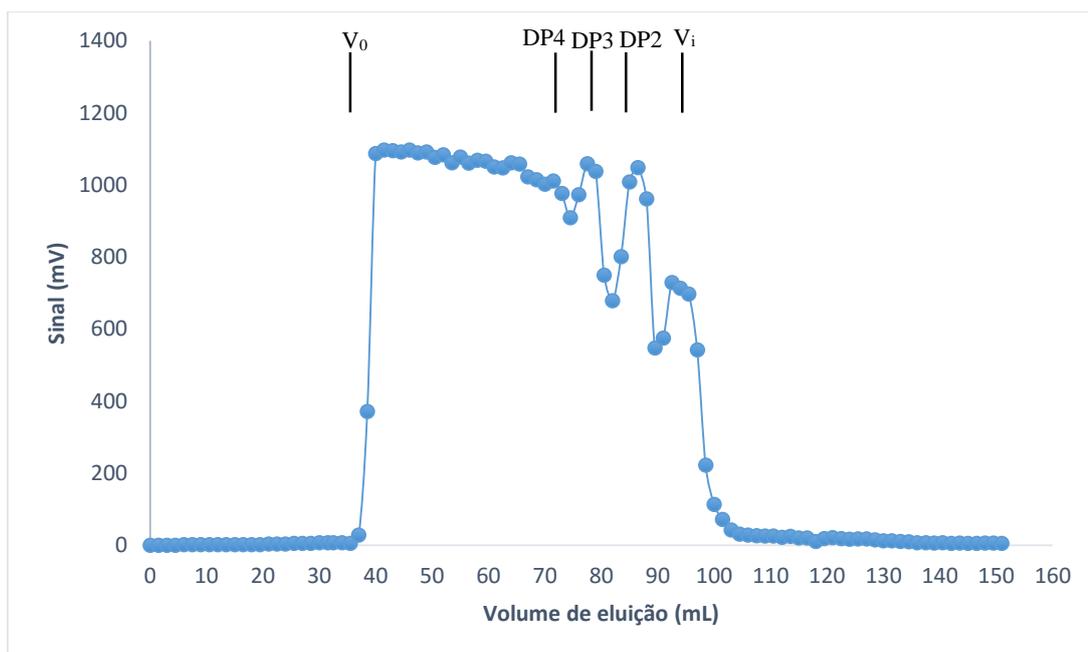


Figura 3.1 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de SCG_{MW}. V₀- volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i- volume de inclusão.

Pela análise do cromatograma verifica-se que para além de frações de maior tamanho, a amostra de micro-ondas continha também frações de tetrassacarídeos, trissacarídeos, dissacarídeos e até monossacarídeos. Estes resultados comprovam que esta amostra sofreu desramificação com o tratamento térmico assistido por micro-ondas.

Como estes compostos (os mais pequenos) serão produzidos pela enzima, esta amostra não permitiria avaliar a atividade da enzima imobilizada, não podendo então ser utilizada para testar a eficácia da imobilização da enzima e nos ensaios enzimáticos.

3.1.1.3. Precipitação em etanol da amostra de SCG_{MW} e análise por cromatografia de exclusão molecular

Para separar a fração de baixo peso molecular da de alto peso molecular, a amostra SCG_{MW} foi submetida a precipitação em etanol para precipitar os fragmentos de maior tamanho, deixando assim os fragmentos mais pequenos em solução, sendo possível retirar estes últimos e utilizar os de maior tamanho. Desta forma poderíamos obter uma amostra que pudesse ser usada para testar a imobilização da enzima. Realizou-se então uma precipitação em etanol de acordo com o descrito no ponto 2.1.1

O rendimento da fração que precipitou na solução de 75% de etanol (Et75) foi de 14%, enquanto na fração sobrenadante (EtSN) permaneceu 69% do material. A quantidade de amostra na fração Et75, que contém o polissacarídeo de interesse, é muito menor do que a quantidade de polissacarídeos na fração EtSN. Na fração Et75, como se vê pela análise por cromatografia de exclusão molecular em Biogel-P2 (Figura 3.2), existem DPs de tamanho superior a DP4. Assim esta separação permite que a amostra Et75 tenha ainda alguns DPs que são MOS, e como o objetivo com a enzima imobilizada é produzir MOS, esta amostra não foi utilizada para os ensaios enzimáticos nem para testar a imobilização da enzima.

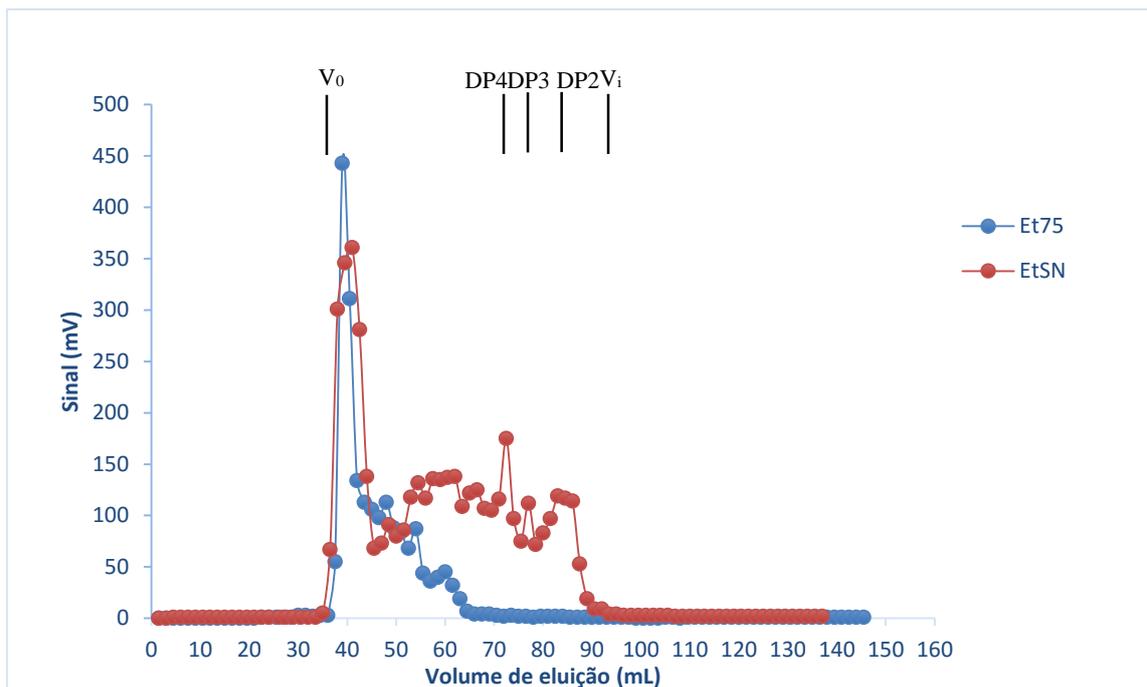


Figura 3.2 – Cromatografia de exclusão molecular do precipitado e do sobrenadante obtidos depois da precipitação em etanol da amostra SCG_{MW}. V₀- volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i- volume de inclusão.

3.1.2. Solubilização das galactomananas

Para que a atividade da enzima imobilizada seja avaliada é necessário que as amostras sejam solúveis em água para poderem estar em contacto com a enzima imobilizada. A amostra de GM do SCG inicial (SCG_{inicial}) sofreu dois processos distintos, uma hidrólise ácida parcial e outro recorrendo a temperaturas elevadas (torra, 2h a 200°C), com o intuito de a tornar solúvel.

3.1.2.1. Hidrólise ácida parcial

Para as galactomananas do SCG_{inicial} serem solúveis em água foi testada uma hidrólise usando ácido trifluoroacético (TFA) e temperatura. Foi feita uma primeira hidrólise ácida parcial (HA₁), com 50 mM de TFA, a 70°C durante 30 minutos onde se obteve uma percentagem de amostra solúvel de 8,9%. Uma vez que com estas primeiras

condições de hidrólise ácida parcial a quantidade de galactomananas que solubilizou foi muito baixa, foi necessário testar diferentes condições. Com as segundas condições testadas de hidrólise (HA_2), onde se aumentou a concentração de TFA para 250 mM, a percentagem de solubilização das galactomananas aumentou ligeiramente para 15,4%. Ainda assim, a percentagem de solubilização continuava baixa e fizeram-se novas condições de hidrólise aumentando a temperatura para 100°C e o tempo para 60 min (HA_3) e aumentando a concentração do ácido (2000 mM), a temperatura (120°C) e diminuindo o tempo para 10 min (HA_4). Para as amostras HA_3 e HA_4, apesar de se testarem condições de hidrólise mais drásticas, a percentagem de solubilização das galactomananas diminuiu (13% e 9,6%, respetivamente). Estes resultados encontram-se na Tabela 3.2. De acordo com estes resultados pode supor-se que a hidrólise ácida parcial com maior concentração de ácido, maior temperatura e/ou durante mais tempo (HA_3 e HA_4) pode estar a hidrolisar as ramificações e não as ligações da cadeia principal, uma vez que se sabe que a desramificação diminui a solubilidade dos polissacarídeos (12,24).

Tabela 3.2 – Condições das hidrólises ácidas parciais (concentração de ácido, temperatura e tempo) e percentagem de amostra solúvel.

Amostra	Condições de hidrólise			% amostra solúvel
	[TFA] (mM)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	
HA_1	50	70	30	8,9
HA_2	250	70	30	15,4
HA_3	250	100	60	13,0
HA_4	2000	120	10	9,6

Embora se tenham testado diferentes condições para a hidrólise ácida parcial, com todas as condições obteve-se uma percentagem de solubilização das galactomananas baixa. Para verificar a constituição em açúcares na amostra fez-se uma análise de açúcares neutros e os valores obtidos encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composição em açúcares das amostras de galactomananas de SCG_{inicial}, SCG solúvel (SOL_HA1) e insolúvel (INSOL_HA1) após hidrólise ácida parcial HA_1 e amostra de galactomananas de LBG

Amostra	Composição em açúcares (% mol)				% Açúcares totais
	Ara	Man	Gal	Glc	
SCG _{inicial}	2	85	8	4	96
SOL_HA1	6	68	25	2	100
INSOL_HA1	1	90	1	7	100
LBG	4	66	26	3	100

Pela análise de açúcares verificou-se que todas as amostras analisadas eram constituídas por manose, galactose, arabinose e glucose, sendo a manose o açúcar existente em maior quantidade. A análise de açúcares da amostra de SCG_{inicial} (85% de manose, 8% de galactose, 2% de arabinose e 4% de glucose), quando comparada com a análise feita à mesma amostra por Simões *et al.* (89% de manose, 7% de galactose, 2% de arabinose e 2% de glucose), apresenta valores semelhantes de composição de açúcar (22).

Comparando a amostra de SCG_{inicial} (85% de manose e 8% de galactose) com a amostra SCG solúvel após a hidrólise (SOL_HA1), observou-se uma diminuição da manose e um aumento de galactose na (68% de manose e 25% de galactose). Isto significa que as GM que ficam solúveis são as mais ramificadas e na fração insolúvel ficam as menos ramificadas (90% Man e 1% Gal). Para além disso a amostra insolúvel após a hidrólise ácida (INSOL_HA1) tinha um conteúdo em galactose inferior à amostra SCG_{inicial} (1% e 8%, respetivamente). Estes resultados sugerem que durante a hidrólise ácida parcial ocorreu desramificação das galactomananas da amostra SCG_{inicial}, tendo assim aumentado o conteúdo de galactose na amostra SOL_HA1.

Como a quantidade de galactomananas que foi possível solubilizar foi muito baixa para o objetivo pretendido, esta metodologia não foi seguida.

3.1.2.2. Torra das galactomananas do resíduo de café

Como a hidrólise ácida parcial não permitiu obter galactomananas solúveis em quantidade suficiente para os ensaios enzimáticos pretendidos, testou-se então um

procedimento de torra (68), tendo-se seguido as condições descritas no ponto 2.1.2.2. Depois da amostra torrada ser solubilizada e liofilizada, foi calculada a percentagem de amostra que ficou solúvel, tendo-se obtido 13% de galactomananas solúveis em água. Fez-se uma análise às ligações glicosídicas (Tabela 3.1) das amostras de SCG_{inicial}, SCG_{solúvel} e SCG_{insolúvel} obtidas após a torra.

A predominância de ligações (1→4)-Man (78,3%), (1→4,6)-Man (3,8%) e manose terminal (4,7%), assim como galactose terminal (2,1), confirma que a amostra são galactomananas (22). A relação (1→4,6)Man/Man Totalx100% indica o grau de ramificação da amostra e no caso da amostra de SCG_{inicial} tem uma ramificação de 4%. No caso da proporção Man Total/T-Man indica o grau de polimerização das galactomananas e apresenta um valor de 18,8%, sendo semelhante ao já descrito na literatura (23%) (38). A amostra apresenta arabinogalactanas, que se observam pela presença dos seus resíduos característicos, (1→3)-Gal (3,7%) e (1→3,6)-Gal (1,4%) (38). A presença das arabinogalactanas pode ser justificada pelas reações de transglicosilação que ocorrem nestes compostos e que impedem que as galactomananas sejam completamente separadas das arabinogalactanas presentes no café (72,73), ou o próprio processo de fracionamento e purificação das GM não ser cem por cento eficaz. A amostra apresenta ainda resíduos de galactose e arabinose terminais, assim como (1→4)-Glc, características estruturais das galactomananas do café (14).

No que diz respeito à mostra de SCG solúvel e insolúvel, após a torra a 200°C, verifica-se que as ligações (1→4)-Man (68,9% e 70,9%, respetivamente), são as que existem em maior quantidade, tal como na amostra SCG_{inicial}, a presença de ligações (1→4,6)-Man (5,8% e 5,5%, respetivamente) e manose terminal (12,3% e 7,4%, respetivamente), assim como galactose terminal (2,9% e 2,7%, respetivamente) também se observam. Depois da torra, o SCG_{solúvel} e o SCG_{insolúvel} apresentam também arabinogalactanas, observadas pela presença de ligações (1→3)-Gal (2,2% e 2,9%, respetivamente) e (1→3,6)-Gal (1,1% e 1,7%, respetivamente), assim como pelos resíduos de (1→5)-Ara (0,2% e 0,3%, respetivamente). O grau de polimerização das amostras de SCG_{solúvel} e de SCG_{insolúvel} foram de 7,3% e 11,8% respetivamente, sendo inferior ao grau de polimerização da amostra de SCG_{inicial}. Estes valores mostram que a torra promove quebras na cadeia das galactomananas (despolimerização), ficando estas mais curtas e quanto mais curtas forem as cadeias mais solúveis vão ser as GM (22).

Observou-se também que com a torra houve um aumento da T-Man, enquanto que a (1→4)-Man diminuiu. Como a manose terminal dá uma indicação do tamanho do polímero, pode inferir-se que o grau de polimerização do polissacarídeo diminuiu com a torra (68). A abundância relativa dos resíduos de (1→4,6) -Man é geralmente utilizada para inferir o grau de ramificação das galactomananas (razão (1→4,6)-Man/Man Totalx100%). A ligação (1→4,6)-Man aumentou na amostra SCG_{solúvel} e na SCG_{insolúvel} relativamente ao SCG_{inicial} (5,8%, 5,5% e 3,8%, respetivamente). Como a torra promove a desramificação das galactomananas (12,24) é possível que a despolimerização permita a formação de terminais redutores nas unidades de açúcares, e que as condições de torra promovam a formação de 1,6-anidromanose (reações de transglicosilação) (68), aparecendo na análise por metilação como ramificações. Isto acontece porque com a formação de 1,6-anidromanose o C-6 vai estar bloqueado com o anidro e o C-4 encontra-se a estabelecer ligação nas cadeias de GM e ao metilar-se a amostra, nem o C-4 nem o C-6 vão ser metilados e assim aparecem mais ligações (1→4,6)-Man do que as que existem porque o C-6 está bloqueado com o anidro.

A T-Gal é menor na amostra de SCG_{inicial} comparando com a amostra de SCG_{solúvel} e de SCG_{insolúvel}. A (1→4)-Glc aumenta com a torra pois podem ocorrer reações de epimerização térmica durante o processamento, promovendo a conversão de manose em glucose, por ser uma estrutura mais estável, uma vez que apresenta todos os grupos hidroxilo (OH) em posições equatoriais na sua forma de cadeira (68,72,73).

Embora a percentagem de solubilização das galactomananas por torra (13%) não tivesse sido total, a quantidade de amostra obtida permitiu que fosse utilizada nos ensaios com a β-mananase livre e imobilizada.

3.2. β-mananase

3.2.1. Imobilização da β-mananase

A enzima β-mananase foi imobilizada usando como tipo de imobilização a ligação cruzada. Este tipo de imobilização foi feita para se poderem produzir mano-

oligossacarídeos (MOS) e para testar a hipótese de ter a enzima imobilizada em quitina, reticulada com a genipina.

3.2.1.1. Quantificação da enzima imobilizada pelo método do ácido bicinconínico

De acordo com a fórmula descrita na secção de Materiais e Métodos, no ponto 2.2.1., e recorrendo aos valores presentes na Tabela 3.4 a percentagem de enzima imobilizada foi determinada com recurso ao método colorimétrico do BCA.

Tabela 3.4 – Concentração de proteína nas águas de lavagem e inicial, calculada a partir da curva de calibração dos padrões de BSA e percentagem de manobiose formada por hidrólise com cada amostra

Amostras	Massa de proteína (mg)	% Man ₂
Enzima imobilizada	-	3,7
Lavagem zero	0,78	9,3
1ª Lavagem	0,15	5,3
2ª Lavagem	0,15	4,5
3ª Lavagem	0,29	3
4ª Lavagem	0,47	3,7
Proteína total nas lavagens	1,85	-
Proteína inicial usada	2,89	-

A massa de proteína (enzima) foi calculada a partir da curva de calibração dos padrões de albumina de soro de bovino (BSA) usando o método colorimétrico do BCA. Através da soma das massas de proteína nas águas de lavagens (1,85 mg) e de proteína inicial (2,89 mg), calculou-se a percentagem de imobilização e obteve-se assim uma percentagem de imobilização de 36%.

3.2.1.2. Quantificação de dissacarídeos formados

Para além de se quantificar a imobilização da enzima pelo método do BCA, em paralelo fez-se a quantificação de dissacarídeos formados após a hidrólise das

galactomananas do SCG solúvel para confirmar a imobilização da enzima. Escolheu-se o método dos dissacarídeos para verificar a imobilização da β -mananase pois apesar de se formarem outros mano-oligossacarídeos para além dos dissacarídeos, que apenas se começam a formar depois, este método é mais sensível do que outros métodos como por exemplo, o método do 3,5-Dinitrossalicilato (DNS). No método de DNS vêm-se todos os terminais redutores, não só os dissacarídeos, mas este requer uma maior concentração quer de substrato quer de enzima para que se consigam quantificar os açúcares. Os resultados obtidos com o método de dissacarídeos encontram-se na Tabela 3.4. Os valores presentes na tabela estão concordantes com os obtidos pelo método do BCA, sendo a quantidade de Man_2 maior na “Lavagem zero” (9,3%) e diminuindo ao longo das lavagens até à “3ª Lavagem” (5,3%, 4,5% e 3,0%, respetivamente). Na “4ª Lavagem” a quantidade de Man_2 aumenta ligeiramente comparando com a “3ª Lavagem” (3,7% e 3,0%, respetivamente).

3.2.2. Análise dos MOS formados

Foi avaliada a produção de MOS pela enzima *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase, na forma livre e imobilizada, através da hidrólise das galactomananas do SCG solúvel. A amostra, depois de hidrolisada, foi fracionada por cromatografia de exclusão molecular. Esta análise foi complementada pela análise das amostras obtidas depois da hidrólise, por GC-FID, numa coluna que permitiu verificar a formação de MOS por comparação com açúcares padrões.

Por forma a verificar que tipo de mano-oligossacarídeos se formavam na hidrólise com a enzima β -mananase livre, a amostra de $\text{SCG}_{\text{solúvel}}$ foi colocada em solução com a β -mananase livre durante 6 h. Depois da hidrólise a amostra foi fracionada por cromatografia de exclusão molecular em Biogel-P2, com um limite de separação da resina de 100-1800 Da, obtendo-se o cromatograma da Figura 3.3.

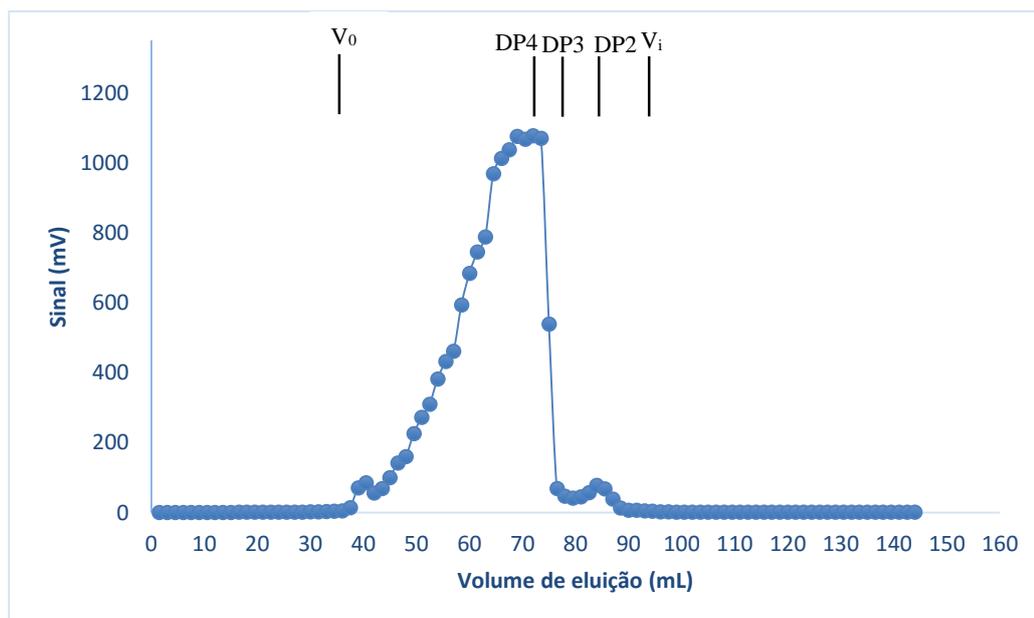


Figura 3.3 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de SCG solúvel hidrolisadas durante 6 h pela β -mananase livre. V₀- volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respectivamente; V_i- volume de inclusão.

Pela análise do cromatograma da Figura 3.3 verifica-se que em 6 h a enzima β -mananase livre produziu essencialmente tetrassacarídeos e outros MOS de maior peso molecular. Mas além de DP4 e DPs maiores produziu também uma pequena quantidade de dissacarídeos (DP2). Não se verificou pela análise que a enzima produzisse monossacarídeos.

Para verificar também que tipo de mano-oligossacarídeos se formavam na hidrólise com a β -mananase imobilizada, a amostra de SCG_{solúvel} foi colocada em solução com a β -mananase imobilizada, durante 24 h. Depois da hidrólise a amostra, tal como a produzida pela β -mananase livre, foi também fracionada por cromatografia de exclusão molecular em Biogel-P2, obtendo-se o cromatograma da Figura 3.4.

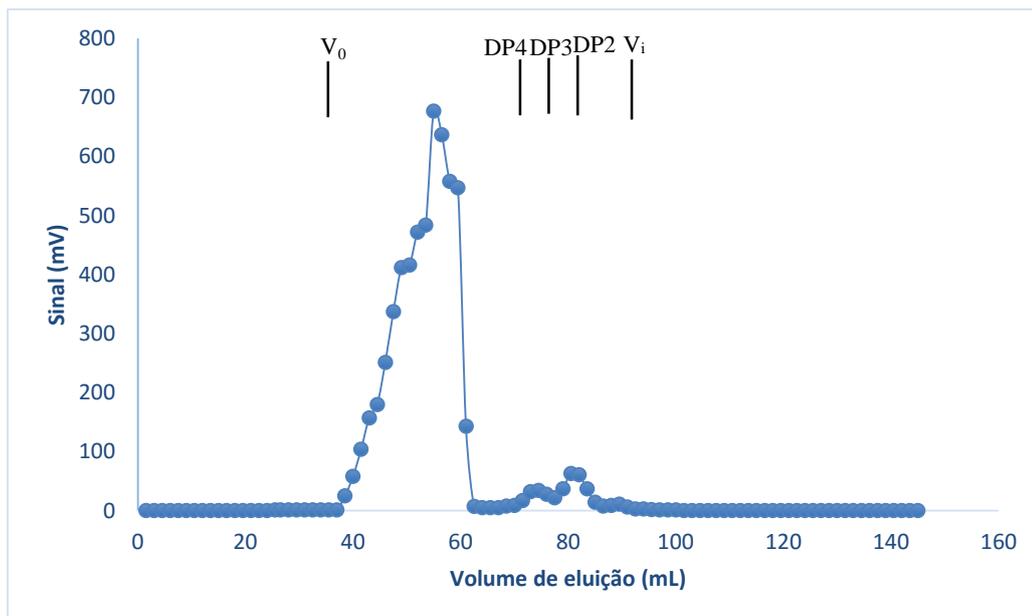


Figura 3.4 - Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de SCG solúvel hidrolisadas durante 24 h pela β -mananase imobilizada. V_0 - volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, trissacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respectivamente; V_i - volume de inclusão.

De acordo com o cromatograma da Figura 3.4 verifica-se que ao fim de 24 h a β -mananase imobilizada produziu essencialmente MOS de peso molecular maior que o DP4 e produziu também uma pequena quantidade de tetrassacarídeos e dissacarídeos, não se verificando, tal como para a β -mananase livre, a produção de monossacarídeos.

A informação obtida nos cromatogramas acima foi confirmada através da análise por GC-FID, da amostra por comparação com padrões de mano-oligosacarídeos. Os cromatogramas dos padrões de MOS encontram-se representados na Figura 3.5, onde se pode ver o cromatograma dos dissacarídeos Man₂ e Gal-Man, dos trissacarídeos Man₃ e Gal-Man₂ e do tetrassacarídeo Gal-Man₃.

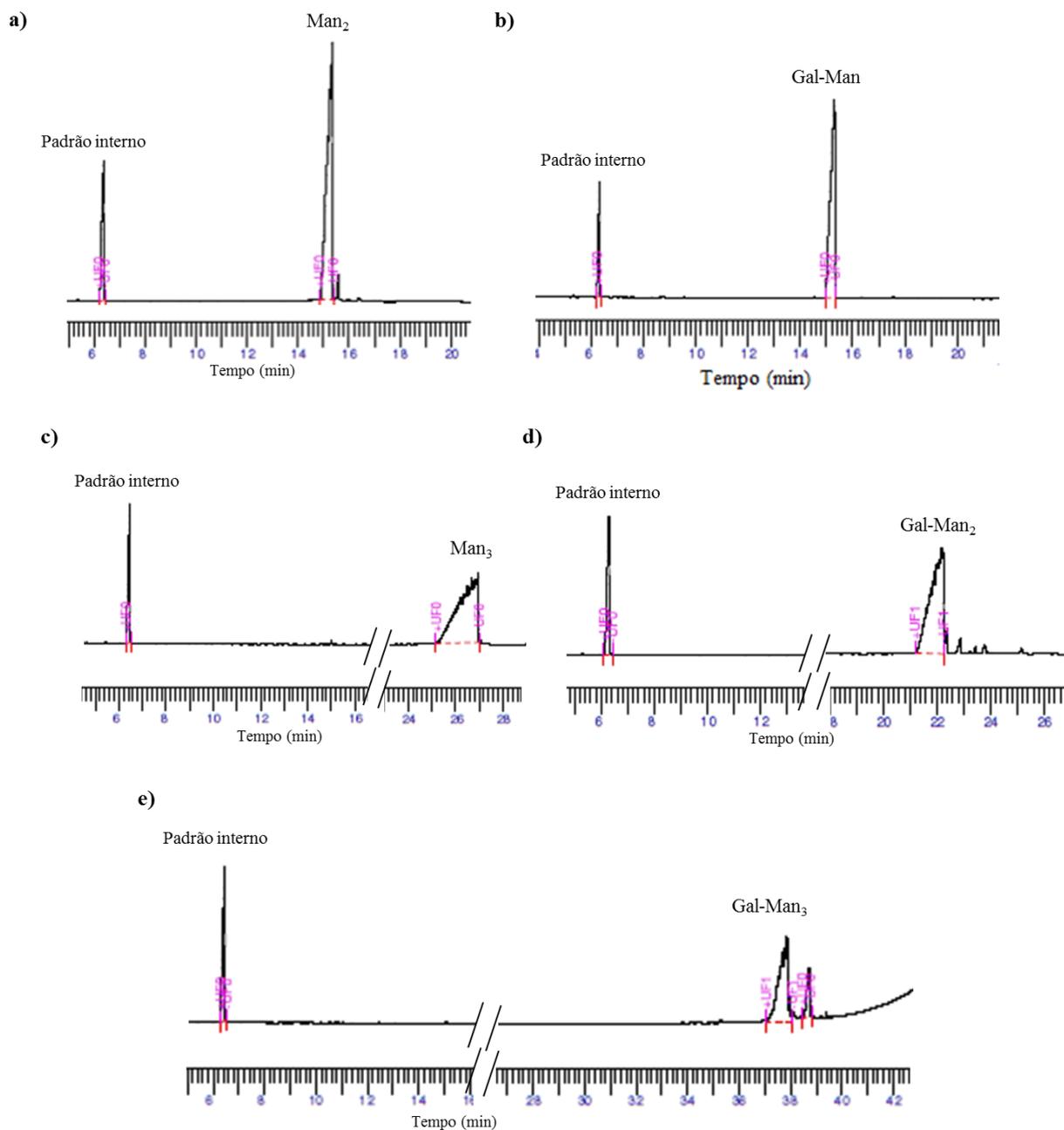


Figura 3.5 – Cromatogramas de GC-FID de padrões de mano-oligosacarídeos: a) manobiose, b) galactosil-manose, c) manotriose, d) galactosil-manobiose e e) galactosil-manotriose

O cromatograma da hidrólise das galactomananas pela β -mananase livre encontra-se representado na Figura 3.6, onde se verifica que a enzima na forma livre produziu o dissacarídeo manobiose (Man₂) e produziu ainda o trissacarídeo manotriose (Man₃). Para além do trissacarídeo Man₃, a enzima livre produziu ainda o trissacarídeo Gal-Man₂

(galactosil-manobiose), embora esteja numa quantidade muito pequena. No entanto, na análise por GC-FID não se identifica o DP4 que se observa na análise por exclusão molecular, ou seja, a fração que se vê por exclusão molecular e que poderia corresponder ao DP4, poderá não ser DP4, mas sim uma gama de DPs ligeiramente superior, que não se observam na análise por GC-FID.

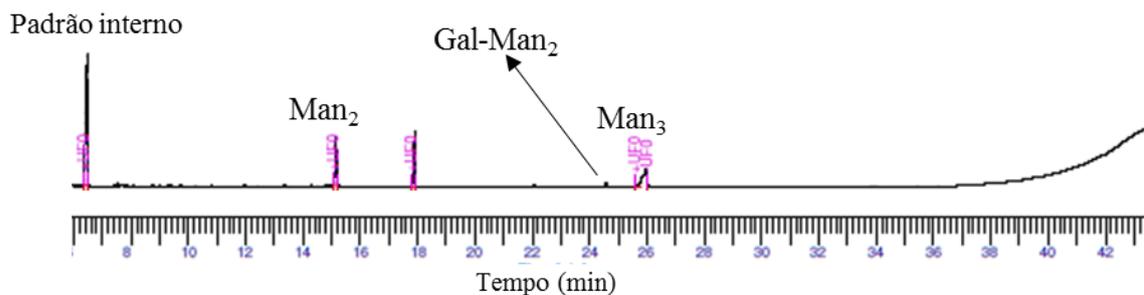


Figura 3.6 – Cromatograma de GC-FID da formação de mano-oligosacarídeos pela β -mananase livre

No caso da β -mananase imobilizada foi também avaliada a produção de MOS, tal como para a enzima livre, por GC-FID. Um dos cromatogramas obtidos encontra-se na Figura 3.7.

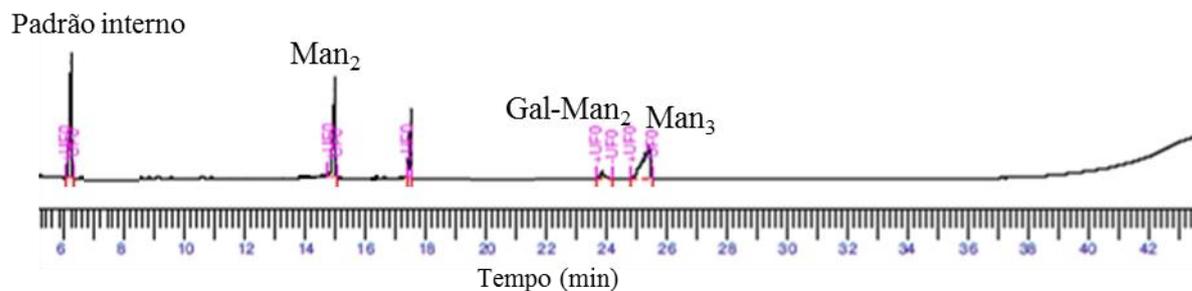


Figura 3.7 – Cromatograma de GC-FID da formação de mano-oligosacarídeos pela β -mananase imobilizada

Pela análise dos cromatogramas verifica-se que tal como a enzima livre, a enzima imobilizada, forma outros MOS para além de dissacarídeos. Observa-se que pela β -mananase imobilizada formam-se também diferentes tipos de MOS: o dissacarídeo manobiose (Man_2) e os trissacarídeos manotriose (Man_3) e galactosil-manobiose (Gal-Man_2), tal como na enzima livre.

Através da hidrólise da amostra de galactomananas, quer pela enzima livre quer pela enzima imobilizada, verifica-se que se formam poucos dissacarídeos. Isto pode dever-se às galactomananas apresentarem resíduos modificados pela torra e por isso não serem clivados pela β -mananase. A manose pode não ser contígua, podendo ter havido reações de transglicosilação (72,73). Em todo o caso, a baixa quantidade de Man₂ formada permite seguir a atividade da enzima.

3.2.3. Cinética enzimática

A determinação dos parâmetros cinéticos foi feita de acordo com o descrito na secção de Materiais e Métodos, no ponto 2.2.4. Através da quantificação do dissacarídeo Man₂ foi possível determinar a velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaelis-Menten (K_m). Estes parâmetros foram calculados de acordo com a equação de Lineweaver-Burk. Para a enzima livre foram avaliadas cinco concentrações de substrato diferentes, mas ao fazer os gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk os dois pontos com concentrações mais elevadas foram retirados pois, no gráfico de Lineweaver-Burk estes pontos tinham velocidades muito próximas e a reta fugia da linearidade verificada para as outras concentrações. No caso da β -mananase imobilizada o ponto de menor concentração também foi retirado uma vez que afastava também a reta da linearidade observada para as restantes concentrações. Os gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk obtidos encontram-se representados na Figura 3.8.

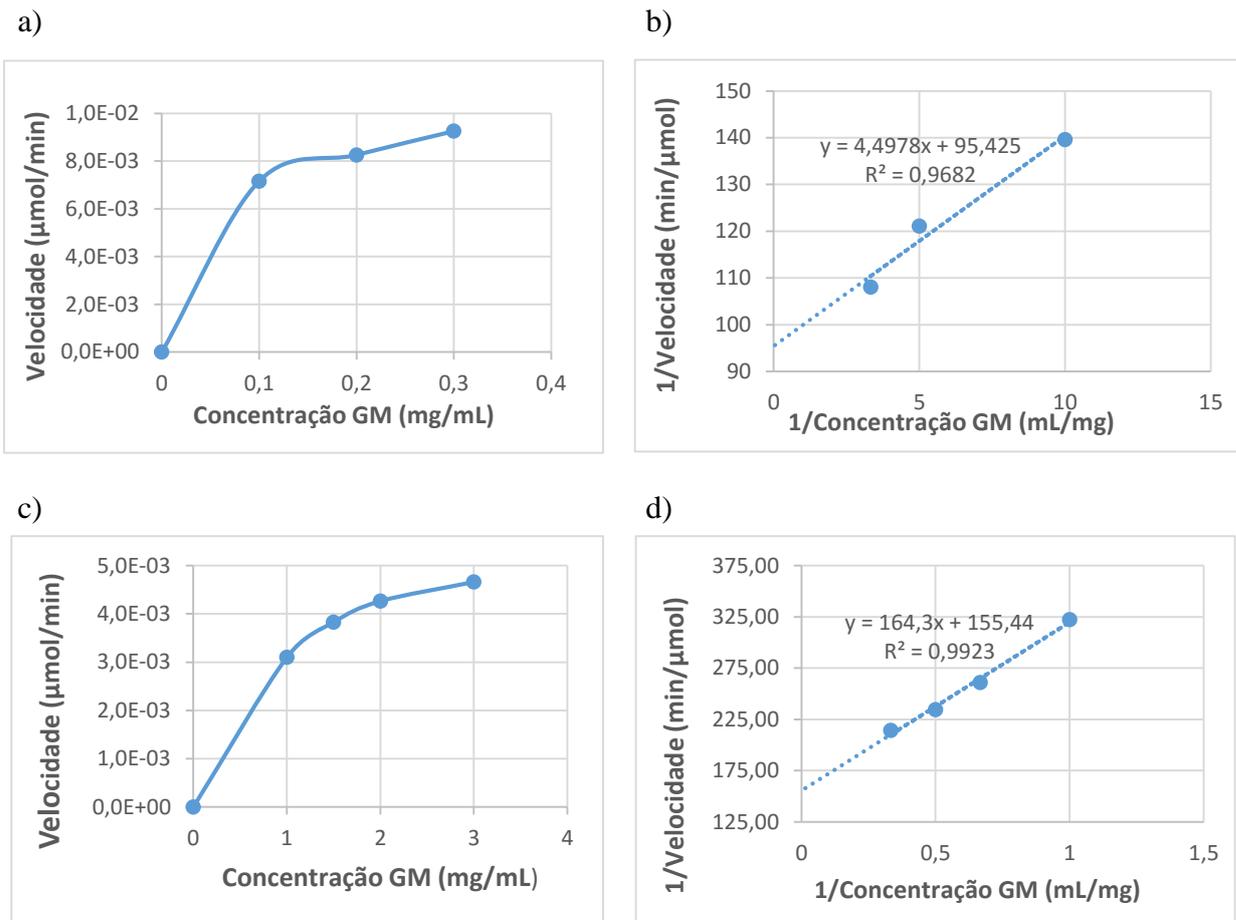


Figura 3.8 – Cinética da β -mananase livre: a) gráfico de Michaelis-Menten e b) gráfico de Lineawer-Burk e cinética da β -mananase imobilizada: c) gráfico de Michaelis-Menten e d) gráfico de Lineawer-Burk.

De acordo com cada equação da reta foi calculada a $V_{m\acute{a}x}$ e a K_m para a enzima livre e para a enzima imobilizada. Os valores obtidos para a β -mananase livre foi de 1,89E3 mg/min (10,5 mmol/min) para a $V_{m\acute{a}x}$ e 0,047 mg/mL para o K_m . Para a β -mananase imobilizada obteve-se uma $V_{m\acute{a}x}$ de 1,15E3 mg/min (6,4 mmol/min) e uma K_m de 1,57 mg/mL (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 – Valores da cinética da β -mananase livre e imobilizada.

Amostra	K_m (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/min)	$V_{m\acute{a}x}$ (mg/min)
Enzima livre	0,047	10,5	1,89E+03
Enzima imobilizada	1,57	6,4	1,15E+03

Os valores obtidos para a enzima imobilizada, quando comparados com a enzima na forma livre mostram que a enzima imobilizada tem um K_m 30 vezes maior que a enzima livre, uma vez que a imobilização diminui a afinidade que esta tem para com o substrato.

Isto deve-se ao facto de existir um grande impedimento estérico entre o substrato e a matriz, onde se encontra imobilizada a enzima. Quanto à V_{\max} esta foi apenas ligeiramente superior à verificada para a enzima livre (1,89E3 mg/min) do que na enzima imobilizada (1,15E3 mg/min). Esta redução da V_{\max} , ou seja, da afinidade da enzima imobilizada para o substrato pode ser causada por interações repulsivas causadas pelo suporte, mudanças na estrutura da enzima durante o processo de ligação ao suporte ou baixa acessibilidade do substrato ao local ativo da enzima (59). Os valores de V_{\max} e K_m para a enzima livre e para a enzima imobilizada foram obtidos utilizando diferentes concentrações de substrato e diferentes tempos de hidrólise. Para a enzima livre foram usadas menores concentrações de substrato e foi usado um tempo de hidrólise menor, uma vez que seria de esperar que saturasse mais facilmente. Enquanto que para a enzima imobilizada se usou maior concentração de substrato e maior tempo de hidrólise.

3.2.4. Avaliação da atividade da β -mananase imobilizada através das galactomananas da goma de alfarroba

Por forma a avaliar e validar a imobilização da enzima β -mananase utilizou-se uma amostra de GM provenientes de uma fonte diferente das anteriormente usadas (GM do SCG), tendo-se utilizado para uma amostra de LBG.

3.2.4.1. Caracterização da amostra de galactomananas de goma de alfarroba

A amostra de galactomananas de goma de alfarroba (LBG) comercial foi caracterizada por análise de açúcares encontrando-se estes resultados na Tabela 3.3. A manose é o resíduo principal (66%), seguido da galactose (26%), glucose (3%) e arabinose (4%). Estes resultados são semelhantes aos anteriormente determinados para a LBG por Simões *et al.* (29).

Foram analisadas as ligações glicosídicas da galactomanana da LBG que tinha sido anteriormente purificada com etanol 50% (LBG_{Et50}). Estes resultados encontram-se na Tabela 3.1. Pela análise da amostra de LBG purificada verificou-se que esta tinha 50%

de resíduos de manose em ligação (1→4), 25,6% em ligação (1→4,6) e 0,9% de resíduos de manose em ligação terminal. A galactose em ligação terminal era 19,9%. A glucose (1,4%) presente na amostra poderá ser de alguma glucana que nela possa existir. A razão $\text{Man total}/(1\rightarrow4,6)\text{-Man}$ é de 3, o que mostra que em média a cada 3 resíduos de manose, um é ramificada. A razão $\text{Man Total}/\text{T-Man}$ permite estimar o grau de polimerização das galactomananas, sendo 89,9. Tal como na análise de açúcares, também na análise de metilação se obtêm valores semelhantes para a LBG anteriormente testada (29).

3.2.4.2. Hidrólise das galactomananas da goma de alfarroba

Por forma a avaliar a formação de MOS pela β -mananase imobilizada, em GM diferentes das GM do SCG, a amostra de GM da LBG foi hidrolisada e depois disso foi fracionada por cromatografia de exclusão molecular. A amostra de LBG foi hidrolisada durante 90 min com a enzima β -mananase imobilizada e foi depois fracionada por cromatografia de exclusão molecular em Biogel-P2, com um limite de separação da resina de 100-1800 Da, podendo ver se o cromatograma na Figura 3.9.

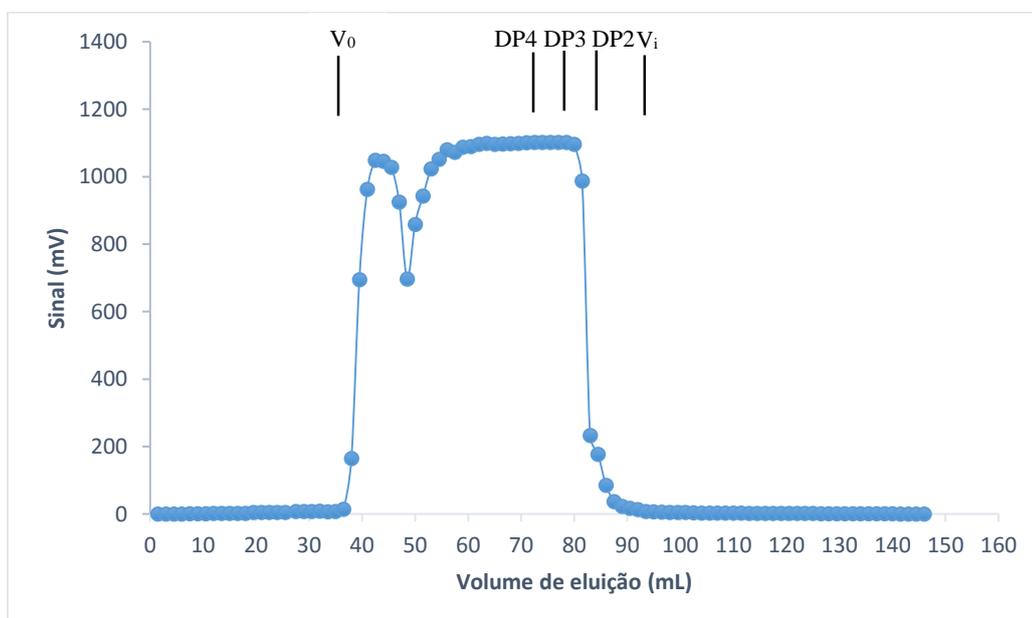


Figura 3.9 – Cromatografia de exclusão molecular da amostra de galactomananas de LBG hidrolisadas durante 90 min pela β -mananase livre. V₀- volume morto; DP2, DP3 e DP4- volume de eluição de um dissacarídeo, tri-sacarídeo e tetrassacarídeo padrão, respetivamente; V_i- volume de inclusão.

Pela análise do cromatograma da Figura 3.9 verificou-se que enzima imobilizada em 90 min produziu MOS de DP superior a DP4, produzindo também DP4 e DP3. Ao contrário do que acontece para a amostra de SCG a enzima não produz DP2 a partir das GM da LBG. Isto pode dever-se ao facto das galactomananas da LBG serem muito mais ramificadas do que as do SCG, e a enzima não consegue atuar uma vez que os resíduos de manose não estão disponíveis.

3.3. Atividade biológica

3.3.1. Ensaio de imunoestimulação

De modo a avaliar o efeito imunoestimulador presente nos MOS as amostras de galactomananas do SCG inicial (GM_1), as frações de DP6 a DP10 de SCG produzidos pela enzima imobilizada (MOS_1) e pela enzima livre (MOS_2) e as frações de DP6 a DP10 da LBG produzidos pela enzima imobilizada (MOS_3) foram testados.

É importante garantir que as amostras não têm lipopolissacarídeos (LPS) para garantir que a atividade imunoestimuladora é apenas devida às amostras e não é influenciada pela presença de LPS. Para isso foi adicionada polimixina ao meio de cultura para que se ligasse ao LPS. Foi também realizada uma réplica sem polimixina para cada amostra, para garantir que no caso de não haver atividade isto não é devido à presença da polimixina. A avaliação da atividade imunomoduladora foi realizada utilizando como técnica a citometria de fluxo.

Na Figura 3.10 estão representados citogramas de fluxo que mostram a ativação das células B (CD19) no controlo negativo (RPMI), no controlo positivo (LPS), e numa das amostras, com polimixina e sem polimixina. Na Figura 3.10, o quadrante 2 (Q2) indica a percentagem de ativação das células B. Como seria de esperar, no caso do controlo negativo praticamente não houve ativação das células B (5,03%), ao contrário do que acontece com o controlo positivo onde a ativação de células B foi de 49,9%. No caso da amostra com polimixina verifica-se que em relação aos controlos praticamente não houve ativação de células B (8,78%), e o mesmo se observa para a amostra sem polimixina (8,87%)

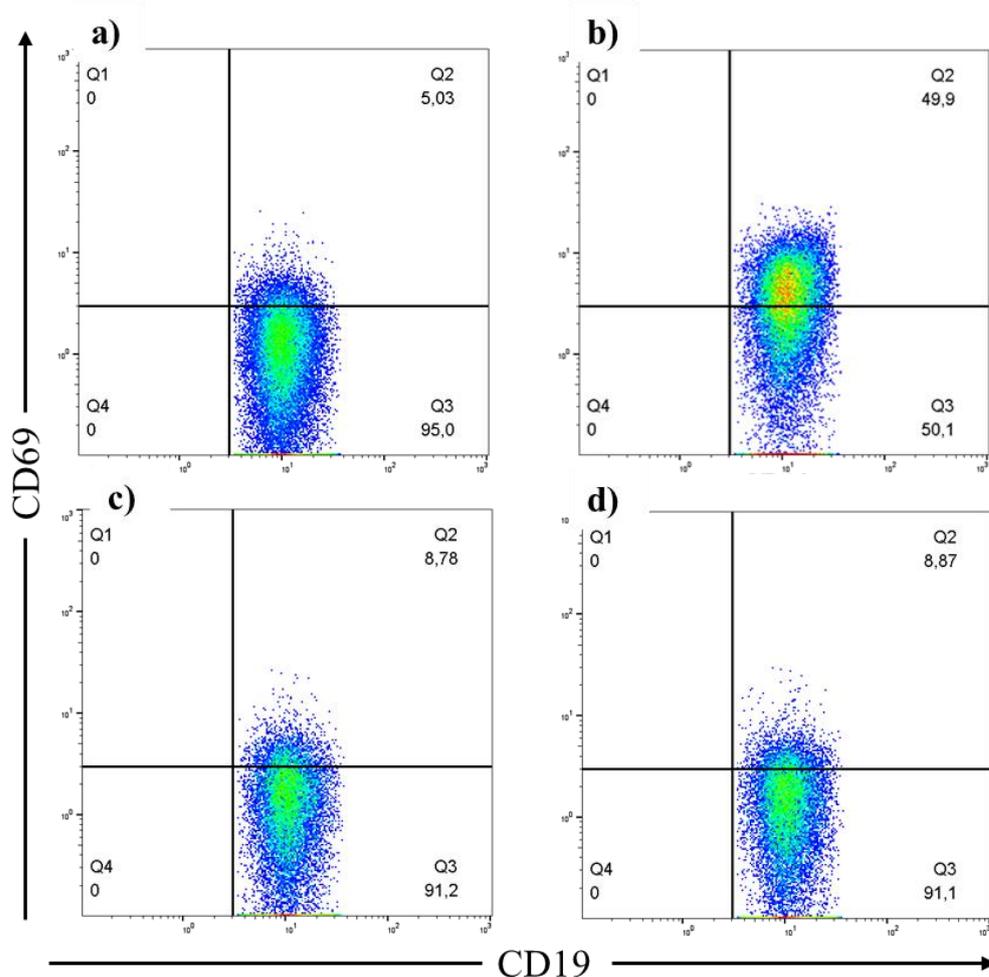


Figura 3.10 – Exemplo de citogramas de fluxo de ativação de Células B (CD19): a) controle negativo, b) controle positivo, c) amostra com polimixina e d) amostra sem polimixina

Os resultados do efeito imunoestimulador avaliado nas amostras encontram-se na Figura 3.11. Para cada amostra foi avaliada a ativação celular em três concentrações diferentes (25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$). Como se pode ver na Figura 3.11 as amostras testadas não apresentam ativação de células B. Quando comparadas com o controle negativo (RPMI), a ativação das células B é praticamente a mesma. Para as réplicas testadas com polimixina e sem polimixina o valor de ativação é o mesmo, logo a falta de atividade não é provocada pela presença de polimixina.

Ensaio realizados com galactomananas do café mostraram ter efeito imunoestimulador (13). Neste trabalho, as mananas usadas eram muito acetiladas e isso pode ser um motivo para as GM analisadas e os MOS não terem atividade imunoestimuladora.

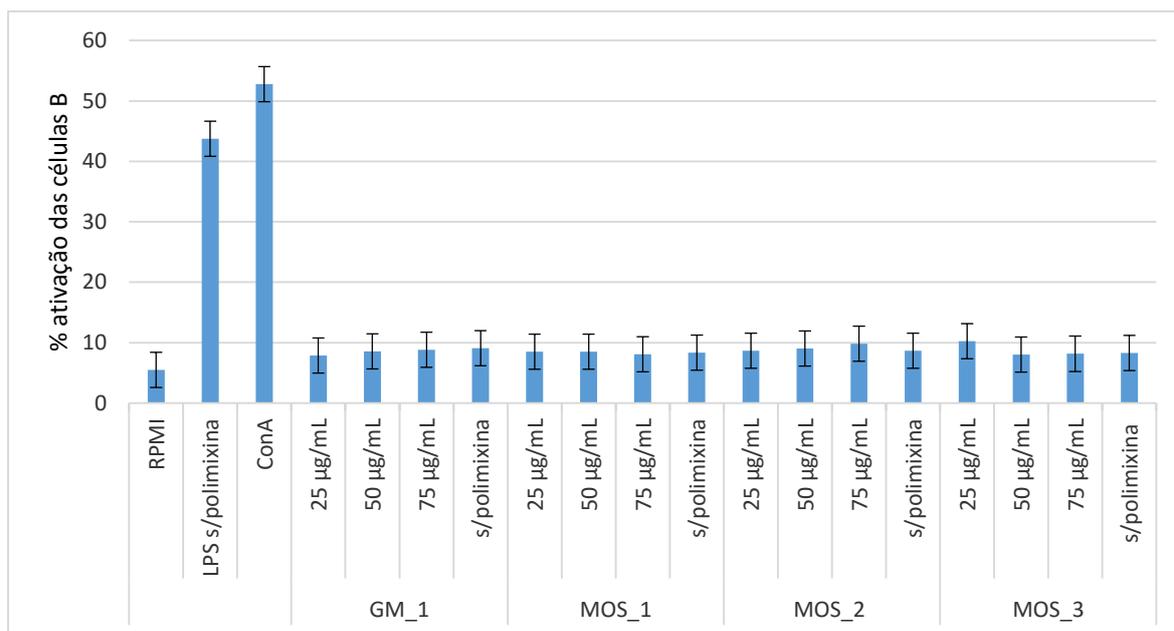


Figura 3.11 – Efeito estimulatório, expresso em % de células B ativadas, nas amostras de GM_1, MOS_1, MOS_2 e MOS_3, em diferentes concentrações (25, 50 e 75 µg/mL), com e sem polimixina

Foi também avaliada a citotoxicidade das amostras. A percentagem de viabilidade celular nos controlos positivos e negativos foi em média 78% e no caso das amostras foi em média 77%, o que indica que as amostras não são citotóxicas.

A avaliação de ativação de linfócitos foi feita também para as células T e também neste caso não se verificou ativação de células T por parte das amostras em comparação com os controlos positivos e negativo.

As amostras analisadas não demonstraram ter atividade imunoestimuladora. Isto pode ser justificado por serem oligossacarídeos, de tamanho relativamente pequeno, e podem não ter o peso molecular adequado (entre 1 e 5 kDa) necessário para terem esta atividade biológica (74). Por outro lado, o facto de as amostras serem pouco acetiladas pode também resultar na não ativação dos linfócitos (13,38).

3.3.2. Ensaio prebióticos

De modo a avaliar o efeito prebiótico presente nos MOS produzidos pela enzima imobilizada a partir das galactomananas da goma de alfarroba (DP6 a DP10), estas

frações foram testadas com a estirpe de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* de acordo com o descrito no ponto 2.3.2

Na Figura 3.12 está representado o gráfico que mostra o efeito dos MOS da LBG na bactéria testada. Nesta figura encontra-se ainda os controles positivos (glucose e FOS) e o controlo negativo (meio).

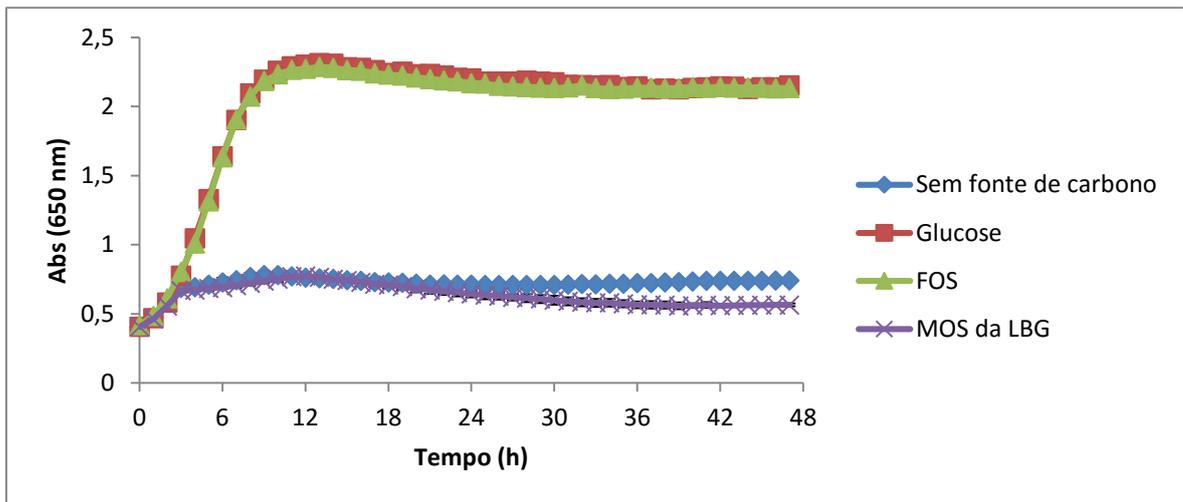


Figura 3.12 – Efeito prebiótico ao longo do tempo, da amostra de MOS da LBG, controles positivos e controlo negativo

Pela análise da Figura 3.12 verifica-se que a glucose e os FOS têm uma elevada absorvância a 650 nm ao longo do tempo, o que mostra que os controles positivos, tal como seria de esperar, têm uma atividade promotora do crescimento da estirpe probiótica de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* testada. No controlo negativo não se verifica praticamente crescimento da estirpe probiótica testada. No caso da amostra de MOS de LBG testada, quando comparada com os controlos, verifica-se que esta não apresenta atividade promotora do crescimento probiótico da estirpe analisada. Assim, verifica-se que esta amostra não apresenta atividade prebiótica para a estirpe de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*.

4. CONCLUSÕES

Na primeira parte deste trabalho tentou-se solubilizar a amostra de galactomananas do resíduo de café (SCG). Uma das tentativas foi por hidrólise ácida parcial, no entanto, desta forma não se conseguiram solubilizar as galactomananas, mas foi possível encontrar uma forma de as despolimerizar. A outra tentativa de solubilização das GM foi através da torra (200°C, 2h), onde foi possível obter uma amostra solúvel a partir da amostra inicial insolúvel.

O SCG torrado parece formar fragmentos de polissacarídeos que podem ser diretamente utilizados pela β -mananase imobilizada, uma vez que são solúveis e conseguem penetrar na rede de imobilização podendo assim, formar MOS.

A enzima *endo*-(β 1 \rightarrow 4)-D-mananase foi imobilizada utilizando a quitina como suporte e a genipina como reagente funcional, que serviu de ligação entre o suporte e a enzima. Desta forma obteve-se uma percentagem de imobilização da β -mananase de 36%. Para além disso foi possível avaliar o mecanismo de ação da enzima através da amostra de SCG, verificando-se que se formam dissacarídeos, a Man₂, e trissacarídeos, a Gal-Man₂ e a Man₃. Avaliaram-se ainda os parâmetros cinéticos onde se verificou que a enzima livre possuía um K_m 0,047 mg/mL de e uma V_{max} de 10,5 mmol/min. A enzima imobilizada mostrou ter um K_m 1,57 mg/mL de e uma V_{max} de 6,4 mmol/min.

A enzima β -mananase imobilizada mostrou que não forma dissacarídeos a partir da amostra de GM da LBG devido a esta ser muito ramificada.

Quanto às atividades biológicas, todas as amostras testadas mostraram não causar ativação de células B e de células T, logo não apresentaram atividade imunoestimuladora. Quanto à atividade prebiótica, para a amostra analisada, não foi verificada atividade promotora de crescimento da estirpe probiótica *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*.

5. PERSPETIVAS DE FUTUROS TRABALHOS

Num trabalho futuro seria interessante desenvolver uma metodologia onde se tentasse aumentar a solubilidade das galactomananas, assim como melhorar a percentagem de imobilização da β -mananase. Seria também interessante avaliar a estabilidade da enzima imobilizada com um maior número de utilizações. Após se verificar a atividade da enzima imobilizada através da formação do DP2 (manobiose) seria desafiante encontrar uma metodologia que permita ver a atividade não só pela formação de dissacarídeos, mas também pela formação de outros MOS.

Para além disso, este sistema de imobilização e produção de MOS poderia ser aplicado a um sistema real, como por exemplo, incorporar este tipo de oligossacarídeos como ingredientes alimentares, como aditivos e enriquecedores de alguns alimentos.

Na avaliação da capacidade prebiótica dos MOS produzidos, seria de interesse testar outras estirpes de *Lactobacillus* e outras bactérias, tal como a *Bifidobacterium*. Para além disso, seria também importante testar os MOS provenientes das galactomananas do resíduo de café.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mussatto S. I., Mancilha I. M., Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68, 587–597.
2. Patel S., Goyal A., Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27, 1119–1128.
3. Torres D. P. M., Gonçalves M. D. P. F., Teixeira J. A., Rodrigues L. R., Galacto-Oligosaccharides: Production, Properties, Applications, and Significance as Prebiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9, 438–454.
4. Qiang X., YongLie C., QianBing W., Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77, 435–441.
5. Chee S. H., Iji P. A., Choct M., Mikkelsen L. L., Kocher A., Characterisation and response of intestinal microflora and mucins to manno-oligosaccharide and antibiotic supplementation in broiler chickens. *British Poultry Science*, 2010, 51, 368–380.
6. Fujii S., Aoki T., Hoshino H., Nakamura Y., Hamaguchi K., Asano I., Imura N., Umemura M., Composition for food and feed additives, comprises manno-oligosaccharides of mannose, United States patent, JP2001149041-A JP3553866-B2, 2001.
7. Kenkyusho S., Hoshida S., Kenkyusho Y., Feed contg. manno-oligosaccharide(s) - used to improve quality of eggs, United States patent, JP7236429-A JP3054750-B2, 1995.
8. Blibech M., Chaari F., Bhiri F., Dammak I., Ghorbel R. E., Chaabouni S. E., Production of manno-oligosaccharides from locust bean gum using immobilized *Penicillium occitanis* mannanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 73, 111–115.
9. Moreira A. S. P., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Galactomannans in Coffee. In V. Preedy (Eds), *Coffee in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc. 2015, p. 173–182.
10. Lopes da Silva J. A., Gonçalves M. P., Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol. *Food Hydrocolloids*, 1990, 4, 277–287.
11. Moreira A. S. P., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 2012, 3, 903-915.
12. Nunes F. M., Coimbra M. A., Chemical characterization of the high-molecular-weight material extracted with hot water from green and roasted robusta coffees as affected by the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 7046–7052.
13. Simões J., Madureira P., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Vilanova M., Coimbra M. A., Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2009, 53, 1036–1043.
14. Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Arabinosyl and glucosyl residues as structural features of acetylated galactomannans from green and roasted coffee infusions. *Carbohydrate Research*, 2005, 340, 1689–1698.

15. Navarini L., Gilli R., Gombac V., Abatangelo A., Bosco M., Toffanin R., Polysaccharides from hot water extracts of roasted *Coffea arabica* beans: Isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 1999, 40, 71–81.
16. González A. G., Pablos F., Martín M. J., León-Camacho M., Valdenebro M. S., HPLC analysis of tocopherols and triglycerides in coffee and their use as authentication parameters. *Food Chemistry*, 2001, 73, 93–101.
17. Tokimoto T., Kawasaki N., Nakamura T., Akutagawa J., Tanada S., Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 281, 56–61.
18. Smith A. W., Chemistry. In: R. J. Clark, & R. Macrae (Eds.), *Coffee*, Elsevier Applied Science Publishers. 1985.
19. Fischer M., Reimann S., Trovato V., Redgwell R. J., Polysaccharides of green Arabica and Robusta coffee beans. *Carbohydrate Research*, 2001, 330, 93–101.
20. Pinto M., Coelho E., Nunes A., Brandão T., Coimbra M. A., Valuation of brewers spent yeast polysaccharides: a structural characterization approach. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 116, 215–222.
21. Nunes F. M., Reis A., Silva A. M. S., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry*, 2008, 69, 1573–1585.
22. Simões J., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 97, 81–89.
23. Schenker S., Handschin S., Frey B., Perren R., Escher F., Pore structure of coffee beans affected by roasting conditions. *Journal of Food Science*, 2000, 65, 452–457.
24. Nunes F. M., Reis A., Coimbra M. A., Chemical Characterization of Galactomannans and Arabinogalactans from Two Arabica Coffee Infusions As Affected by the Degree of Roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 1429–1434.
25. Nunes F. M., Reis A., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Characterization of galactomannan derivatives in roasted coffee beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 3428–3439.
26. Nunes F. M., Coimbra M. A., Melanoidins from coffee infusions. Fractionation, chemical characterization, and effect of the degree of roast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55, 3967–3977.
27. Passos C. P., Coimbra M. A., Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 2013; 94, 626–633.
28. Passos C. P., Moreira A. S. P., Domingues M. R. M., Evtuguin D. V., Coimbra M. A., Sequential microwave superheated water extraction of mannans from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 103, 333–338.

29. Simões J., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Demonstration of the presence of acetylation and arabinose branching as structural features of locust bean gum galactomannans. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86, 1476–1483.
30. Dakia P. A., Blecker C., Robert C., Wathelet B., Paquot M., Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22, 807–818.
31. Goycoolea F., Morris E., Gidley M., Short Communication: Viscosity of galactomannans at alkaline and neutral pH: evidence of “hyperentanglement” in solution. *Carbohydrate Polymers*, 1995, 27, 69–71.
32. Samil Kök M., A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties. *Carbohydrate Polymers*, 2007, 70, 68–76.
33. Daas P. J. H., Schols H. A., de Jongh H. H. J., On the galactosyl distribution of commercial galactomannans. *Carbohydrate Research*, 2000, 329, 609–619.
34. Malgas S., van Dyk J. S., Pletschke B. I., A review of the enzymatic hydrolysis of mannans and synergistic interactions between β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31, 1167–1175.
35. Moreira L. R. S., Filho E. X. F., An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79, 165–178.
36. Cheng Y., Brown K. M., Prud'homme R. K., Preparation and characterization of molecular weight fractions of guar galactomannans using acid and enzymatic hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2002, 31, 29–35.
37. Chauhan P. S., Puri N., Sharma P., Gupta N., Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93, 1817–1830.
38. Simões J., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Structural features of partially acetylated coffee galactomannans presenting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 79, 397–402.
39. Simões J., Nunes F. M., Domingues P., Coimbra M. A., Domingues M. R. M., Mass spectrometry characterization of an *Aloe vera* mannan presenting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 90, 229–236.
40. Cerqueira M. A., Souza B. W. S., Simões J., Teixeira J. A., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Vicente A. A., Structural and thermal characterization of galactomannans from non-conventional sources. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 83, 179–185.
41. Sachslehner A., Foidl G., Foidl N., Gübitz G., Haltrich D., Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 2000, 80, 127–134.

42. Jooste T., García-Aparicio M. P., Brienzo M., Van Zyl W. H., Görgens J. F., Enzymatic hydrolysis of spent coffee ground. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169, 2248–2262.
43. Jian H. L., Zhu L. W., Zhang W. M., Sun D. F., Jiang J. X., Enzymatic production and characterization of manno-oligosaccharides from *Gleditsia sinensis* galactomannan gum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 55, 282–288.
44. Rodrigues R. C., Berenguer-Murcia Á., Fernandez-Lafuente R., Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2011, 353, 2216–2238.
45. Xie T., Wang A., Huang L., Li H., Chen Z., Wang Q., Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *African Journal of Biotechnology*, 2009, 8, 4724–4733.
46. Krajewska B., Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35, 126–139.
47. Mateo C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M., Fernandez-Lafuente R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40, 1451–1463.
48. Younes I., Rinaudo M., Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 2015, 13, 1133–1174.
49. Shahidi F., Arachchi J. K. V., Jeon Y. J., Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10, 37–51.
50. Pujana M. A., Pérez-Álvarez L., Iturbe L. C. C., Katime I., Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 2013, 94, 836–842.
51. Pillai C. K. S., Paul W., Sharma C.P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 2009, 34, 641–678.
52. Muzzarelli R. A. A., Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrates Polymers*, 2009, 77, 1–9.
53. Butler M. F., Ng Y. F., Pudney P. D. A., Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2003, 41, 3941–3953.
54. Huang L. L., Sung H. W., Tsai C. C., Huang D. M., Biocompatibility study of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking reagent. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, 42, 568–576.
55. Chen H., Ouyang W., Lawuyi B., Martoni C., Prakash S., Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2005, 75, 917–927.

56. Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S., Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2000, 38, 2804–2814.
57. Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S., Release of indomethacin from a novel chitosan microsphere prepared by a naturally occurring crosslinker: Examination of crosslinking and polycation-anionic drug interaction. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2001, 81, 1700–1711.
58. Costa D. B., Estudo da utilização de filmes de quitosana como conservante de sumos. Universidade de Aveiro, 2015.
59. Liu M. Q., Dai X. J., Guan R. F., Xu X., Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase A on Fe₃O₄ coated chitosan magnetic nanoparticles for xylooligosaccharide preparation. *Catalysis Communications*, 2014, 55, 6–10.
60. Klein M. P., Hackenhaar C. R., Lorenzoni A. S. G., Rodrigues R. C., Costa T. M. H., Ninow J. L., Hertz P. F., Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and β-D-galactosidase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 137, 184–190.
61. Femenia A., García-Pascual P., Simal S., Roselló C., Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 2003, 51, 397–405.
62. Nabarlantz D., Montané D., Kardosová A., Bekesová S., Hříbalová V., Ebringerová A., Almond shell xylo-oligosaccharides exhibiting immunostimulatory activity. *Carbohydrate Research*, 2007, 342, 1122–1128.
63. Abbas A. K., Janeway C. A., Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*, 2000, 100, 129–138.
64. Tuohy K. M., Probert H. M., Smejkal C. W., Gibson G. R., Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 2003, 8, 692–700.
65. Asano I., Hamaguchi K., Fujii S., Iino H., In Vitro Digestibility and Fermentation of Mannooligosaccharides from Coffee Mannan. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9, 62–66.
66. Asano I., Ikeda Y., Fujii S., Iino H., Effects of Mannooligosaccharides from Coffee on Microbiota and Short Chain Fatty Acids in Rat Cecum. *Food Science and Technology Research*, 2004, 10, 273–277.
67. Asano I., Umemura M., Fujii S., Hoshino H., Iino H., Effects of Mannooligosaccharides from Coffee Mannan on Fecal Microflora and Defecation in Healthy Volunteers. *Food Science and Technology Research*, 2004, 10, 93–97.
68. Simões J., Maricato É., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Thermal stability of spent coffee ground polysaccharides: Galactomannans and arabinogalactans. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 101, 256–264.

69. Coimbra M. A., Delgadillo I., Waldron K. W., Selvendran R. R. Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp. In: H. Linskens, J. Jackson (Eds), *Plant Cell Wall Analysis*, Springer Berlin Heidelberg, 1996, p. 19-44.
70. Ciucanu I., Kerek F., A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 1984, 131, 209-217.
71. Sheldon R. A., Van Pelt S., Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42, 6223–6235.
72. Moreira A. S. P., Simões J., Pereira A. T., Passos C. P., Nunes F. M., Domingues M. R. M., Coimbra M. A., Transglycosylation reactions between galactomannans and arabinogalactans during dry thermal treatment. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 112, 48–55.
73. Moreira A. S. P., Coimbra M. A., Nunes F. M., Simões J., Domingues M. R. M., Evaluation of the effect of roasting on the structure of coffee galactomannans using model oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59, 10078–10087.
74. Passos C. P., Cepeda M. R., Ferreira S. S., Nunes F. M., Evtuguin D. V., Madureira P., Vilanova M., Coimbra M. A., Influence of molecular weight on *in vitro* immunostimulatory properties of instant coffee. *Food Chemistry*, 2014, 161, 60–66.