



29 E 30 DE AGOSTO 2019

ENBRAAF

**ENCONTRO BRASILEIRO DE
ALIMENTOS FUNCIONAIS**

Maringá - PR - Brasil



Alimentos Probióticos

fontes de origens e Biotecnologia em benefícios
da alimentação animal

Dr. Sandro Martins de Oliveira

Maringá, Agosto de 2019.

Índice

1. Resumo sobre Probióticos;

2. Biotecnología benéfica aos Probióticos;

3. Benefícios na alimentação animal.



29 E 30 DE AGOSTO 2019

ENBRA

**ENCONTRO BRASILEIRO DE
ALIMENTOS FUNCIONAIS**

Maringá - PR - Brasil



1. Resumo sobre Probióticos;

Os microorganismos e suas interações com o hospedeiro humano



Segunda metade do século 19.

Em 1885 Theodor Escherich descreveu a microbiota e em 1886 a colonização do trato gastrointestinal (GIT).

Albert Döderlein a sugerir a associação benéfica das bactérias vaginais pela produção de ácido láctico de açúcares. (1887)

Recentes pesquisas destacam a importância vital de uma população microbiana “saudável” no GIT .

Após mais de 100 anos, a associação benéfica de LAB foi confirmada e ampliada durante as últimas três décadas em correntes pesquisas.

Probióticos



Termo usado para denominar um grupo de alimentos pertencentes aos alimentos funcionais.

“Pró vida”

Antibiótico = contra vida

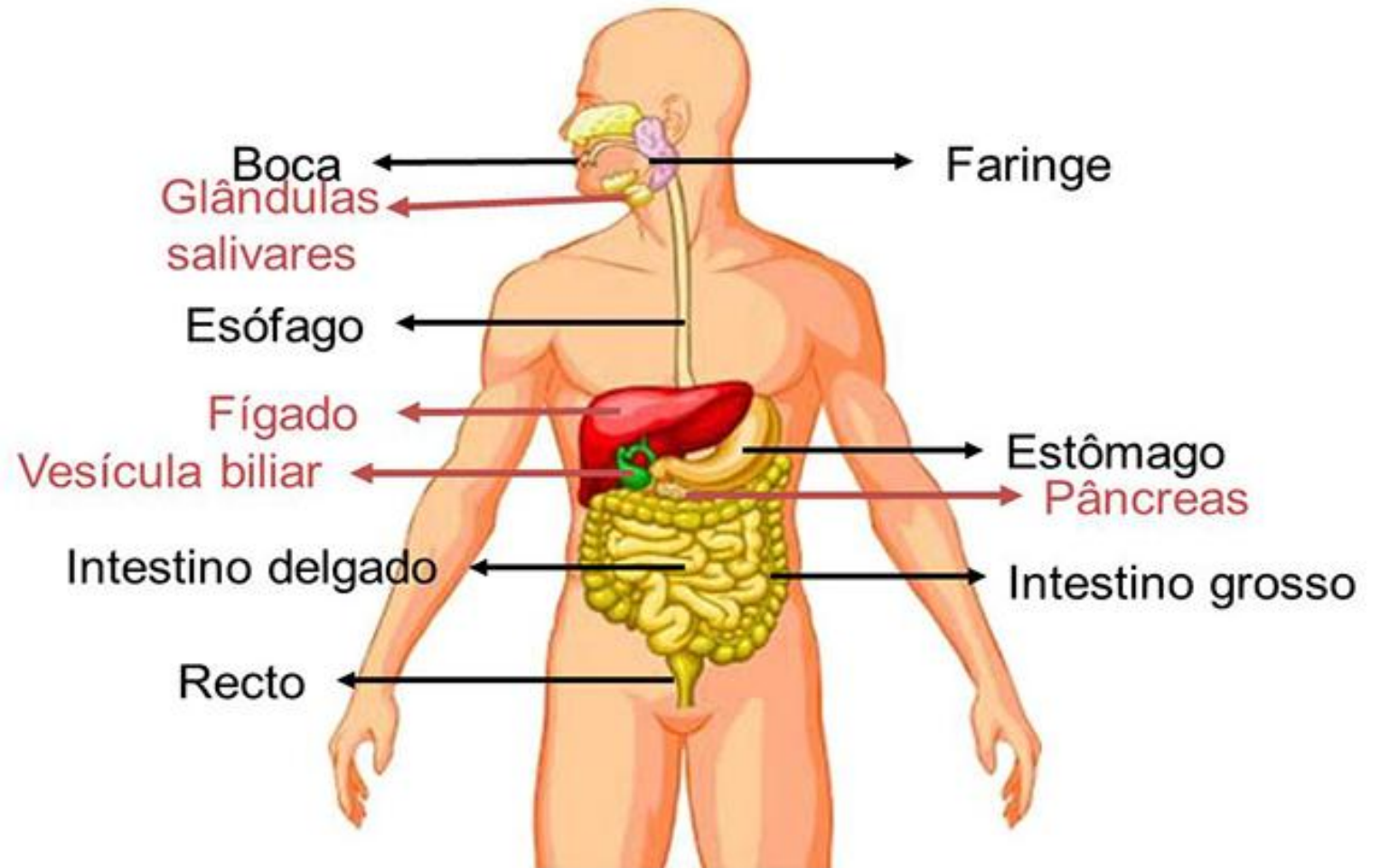
Suplemento alimentar microbiano vivo, que afeta de forma benéfica seu receptor, através da melhoria do balanço microbiano intestinal.

TABELA 1 – MICROORGANISMOS COM PROPRIEDADES PROBIÓTICAS			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. odolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyol</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa <i>nissie</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Adaptado de HOLZAPFEL et al. (2001).

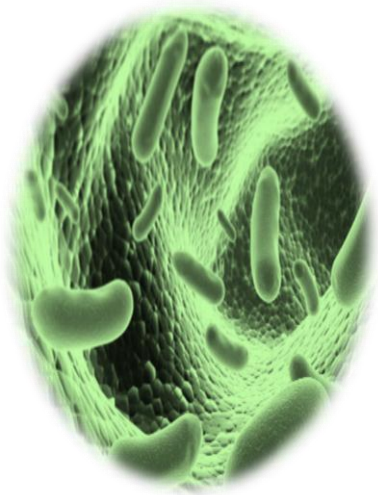
- Flora intestinal esteja equilibrada;
- Que a mucosa esteja íntegra;
- Microvilosidades perfeitas.

Sistema digestivo



Características dos Probióticos

- Serem habitantes normais do intestino;
- Reproduzirem-se rapidamente;
- Produzirem substâncias antimicrobianas;
- Resistirem ao tempo entre fabricação, comercialização e ingestão do produto devendo atingir o intestino ainda vivos.



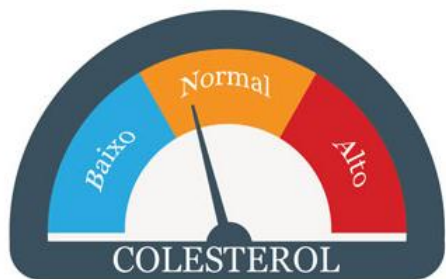
- Bifidobacterium
- Lactobacillus

A digestão
A absorção de minerais



Intestino delgado

Quais os benefícios dos probióticos?



Controle do colesterol



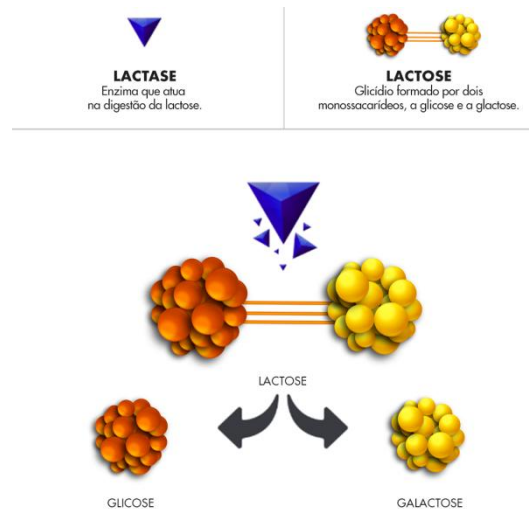
Diminuição da pressão arterial



Prevenção do câncer de cólon



Fortalece o sistema imunológico



Auxiliar no aumento de uma enzima que facilita a digestão da lactose



Beneficiar a memória de pessoas com Alzheimer

Probióticos



Produtos Lácteos

Alimentos Fortificados:

- Yakult
- Activia
- Actmel
- DanActive
- etc



Comprimidos, cápsulas e sachês que contêm bactérias em forma liofilizada

➤ **Alguns alimentos são ricos em Probióticos naturais:**

logurte natural, Kefir, Leite fermentado, Kombucha, Produtos orientais à base de soja (legumes e verduras, como Miso, Natto, Kimchi, que podem ser comprados em lojas especializadas), **entre outros.**

➤ **Probióticos na forma de suplementos em cápsulas, líquidos ou sachês:**

PB8, Simfort, Simcaps, Kefir Real, Floratil, etc.

Os mecanismos (efeitos fisiológicos) através dos quais os probióticos reduzem as bactérias patogênicas seriam:

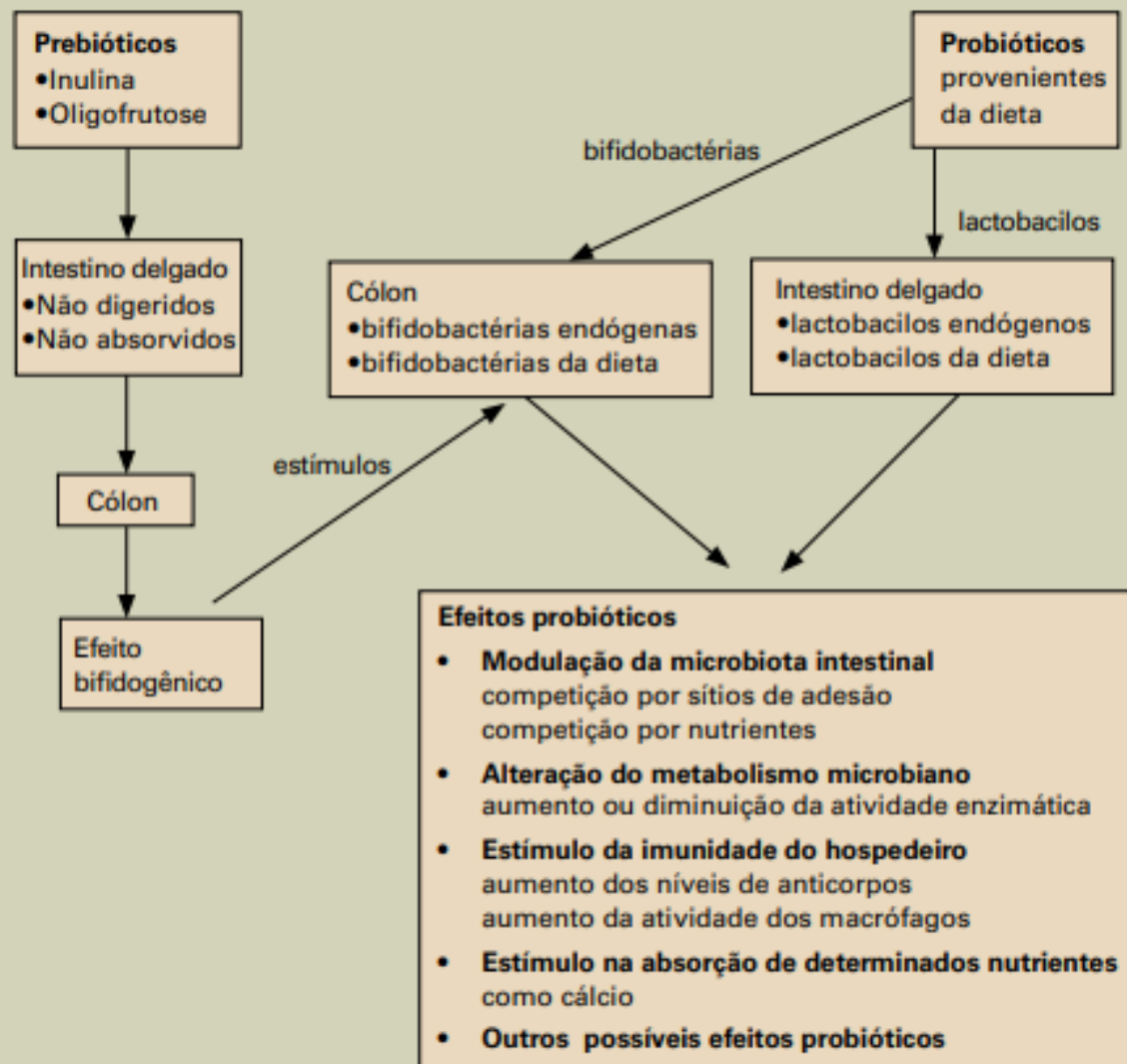
- **Produção de substâncias bactericidas** (inibindo as bactérias intestinais indesejáveis);
- **Disputa por nutrientes;**
- **Alteração do metabolismo microbiano;**
- **Adesão à mucosa e multiplicação** (capacidade de adesão nas vilosidades intestinais, competindo e inibindo a fixação de patogênicos – não ocorre com todos os probióticos, somente para o Lactobacilos Plantarum 299);
- **Ativação da imunidade humoral e celular** (os Lactobacilos acidófilo, bulgárico e casei parecem aumentar a atividade fagocitária, a síntese de imunoglobulinas (IgA) e ativação dos linfócitos T e B);
- **Aumento da digestibilidade da lactose** (os Lactobacilos produzem a enzima beta galactosidase que facilita a digestão da lactose).

Diferença entre Prebiótico e Probiótico

Enquanto os probióticos são bactérias saudáveis que povoam o intestino, os prebióticos são fibras que servem de alimentos para os probióticos e que favorecem a sua sobrevivência e proliferação no intestino.



FIGURA 1 - OS PREBIÓTICOS COMO FATORES BIFIDOGÊNICOS E OS MECANISMOS DE ATUAÇÃO DOS PROBIÓTICOS





29 E 30 DE AGOSTO 2019

ENBRA

**ENCONTRO BRASILEIRO DE
ALIMENTOS FUNCIONAIS**

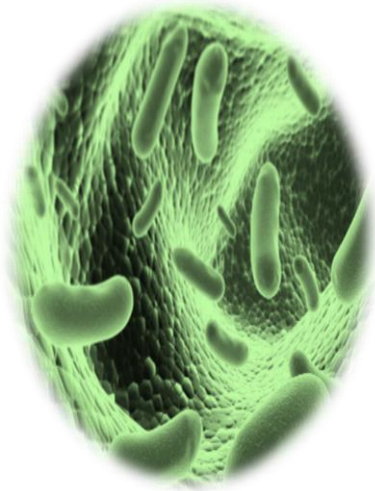
Maringá - PR - Brasil



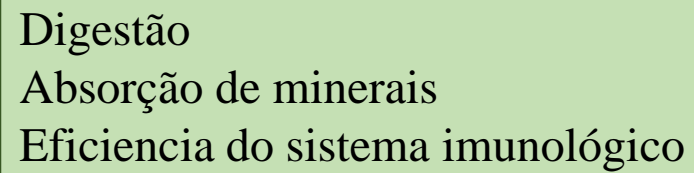
2. Biotecnologia benéfica aos Probióticos;



PREBIÓTICOS



- 
- Bifidobacterias
 - Bacterias do ácido láctico



Digestão
Absorção de minerais
Eficiência do sistema imunológico



Intestino delgado

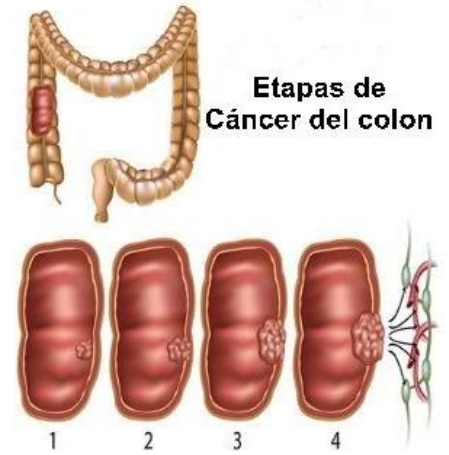
benefícios dos prebióticos?



Redução da inflamação intestinal.



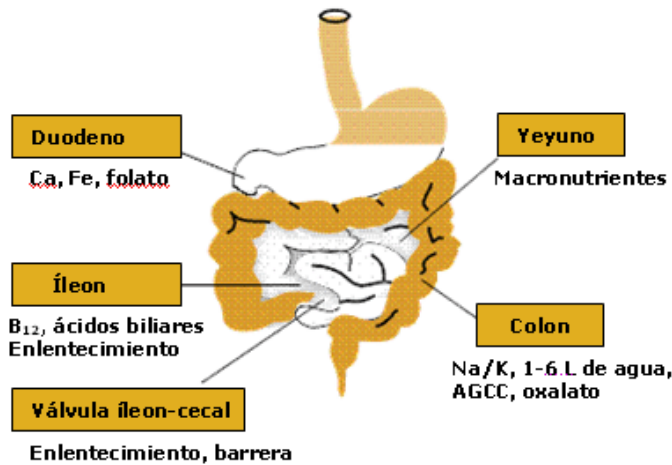
Redução de riscos de enfermidades cardiovasculares.



Ajuda na prevenção do câncer de colon



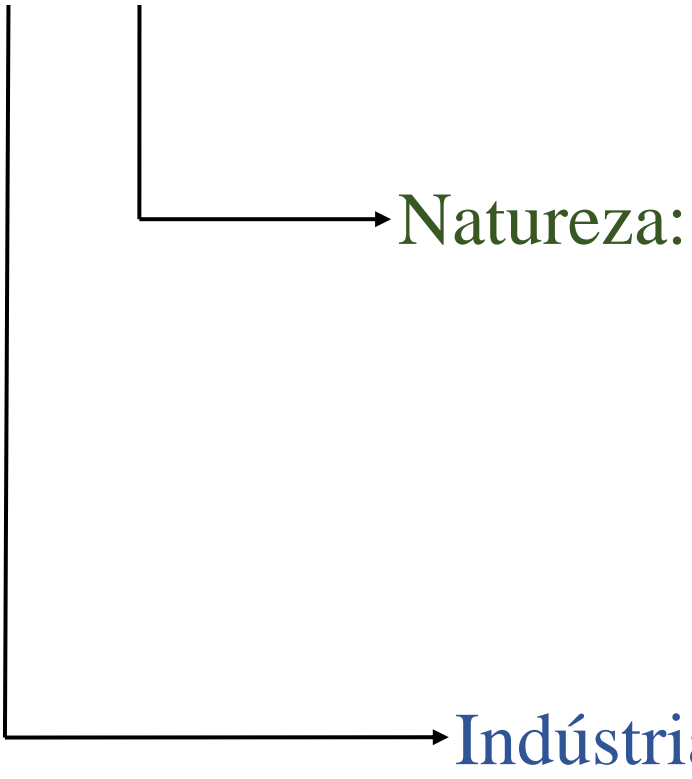
Evitar ou diminuir os episódios de diarreia.



Aumentar a absorção intestinal de certos minerais como: calcio, magnésio e ferro.



Disminuir a ansiedade e o estrés.



- Vegetais;
- Frutas;
- Bambú;
- Mel;
- Leite.

- Química;
 - Hidrólise.
- acida;
 - enzimática.



Hidrólise enzimática

Uso nas Industrias

- Síntese de biocombustíveis;
- síntese de fármacos;
- química de alimentos;
- biosensores;
- etc.

Hidrólise enzimática

Vantagens:

- Não é contaminante
- Ambientalmente correta
- Não exige neutralização durante a reação de produção de prebióticos

Desvantagens:

- Catalisa leres solúveis;
- Alto custo,
- Geralmente instáveis.
- A enzima pode ser inativada por processos térmicos ou mudanças de pH.

ESTABILIDADE E REUSO E

**REUSO
E
ESTABILIDADE**



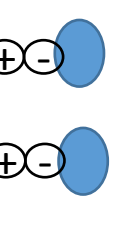
**Imobilização
de Enzimas**

Soportes sólidos:

Agarosa Beads (Agarosa)

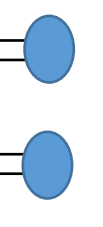
Imobilização
reversível

Interações iônicas

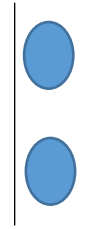
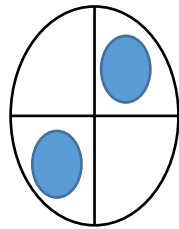


Imobilização
irreversível

União covalente

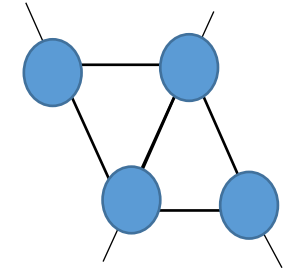


Confinamiento:



Gel ou polímero Fibra oca

Entrecruzamento:



Imobilização covalente

Unipuntual

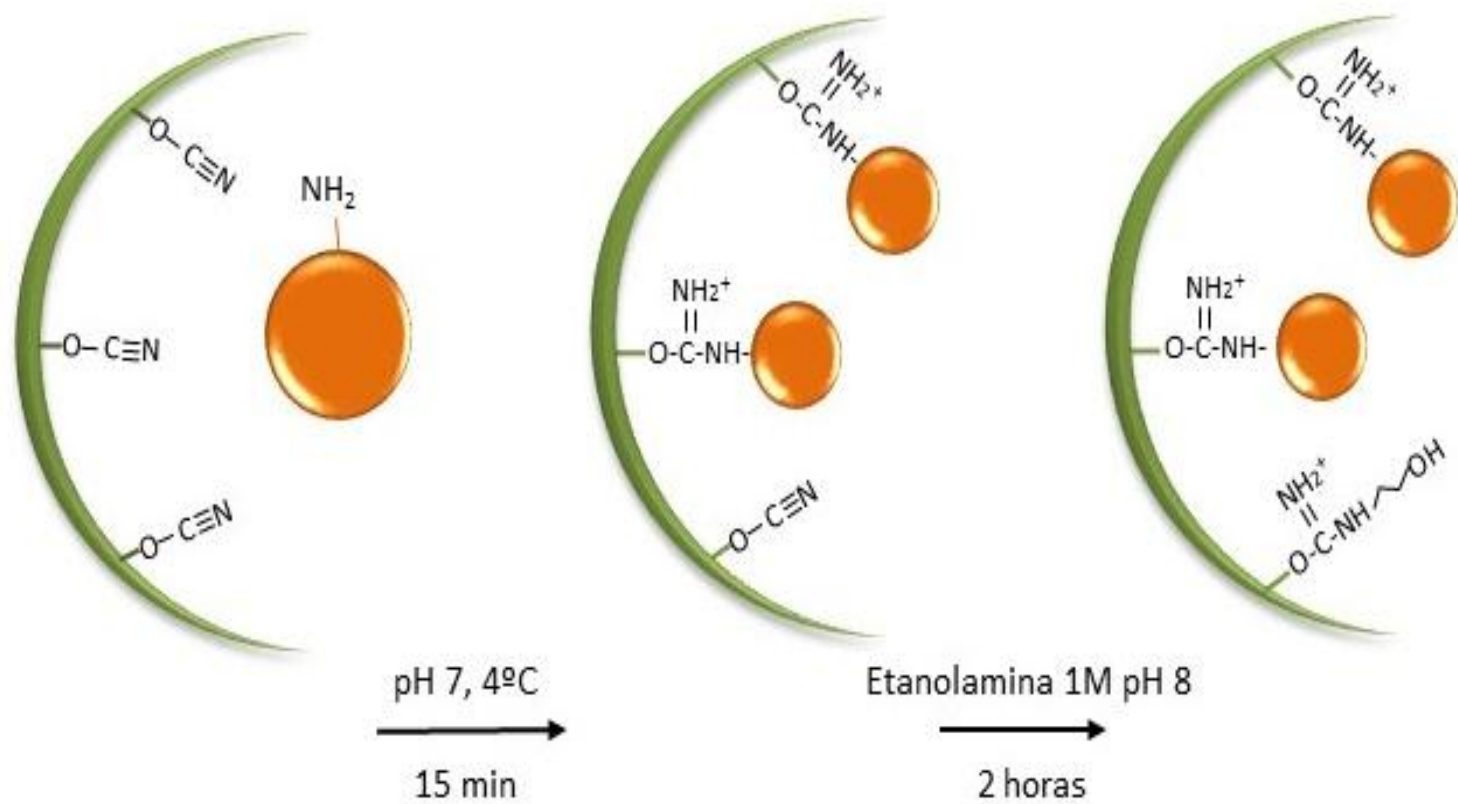


Figura 13 - Imobilização covalente unipuntual sobre suporte CNBr-agarosa. (figura adaptada (Moreno Pérez 2015)).

Imobilización covalente

Multipontual

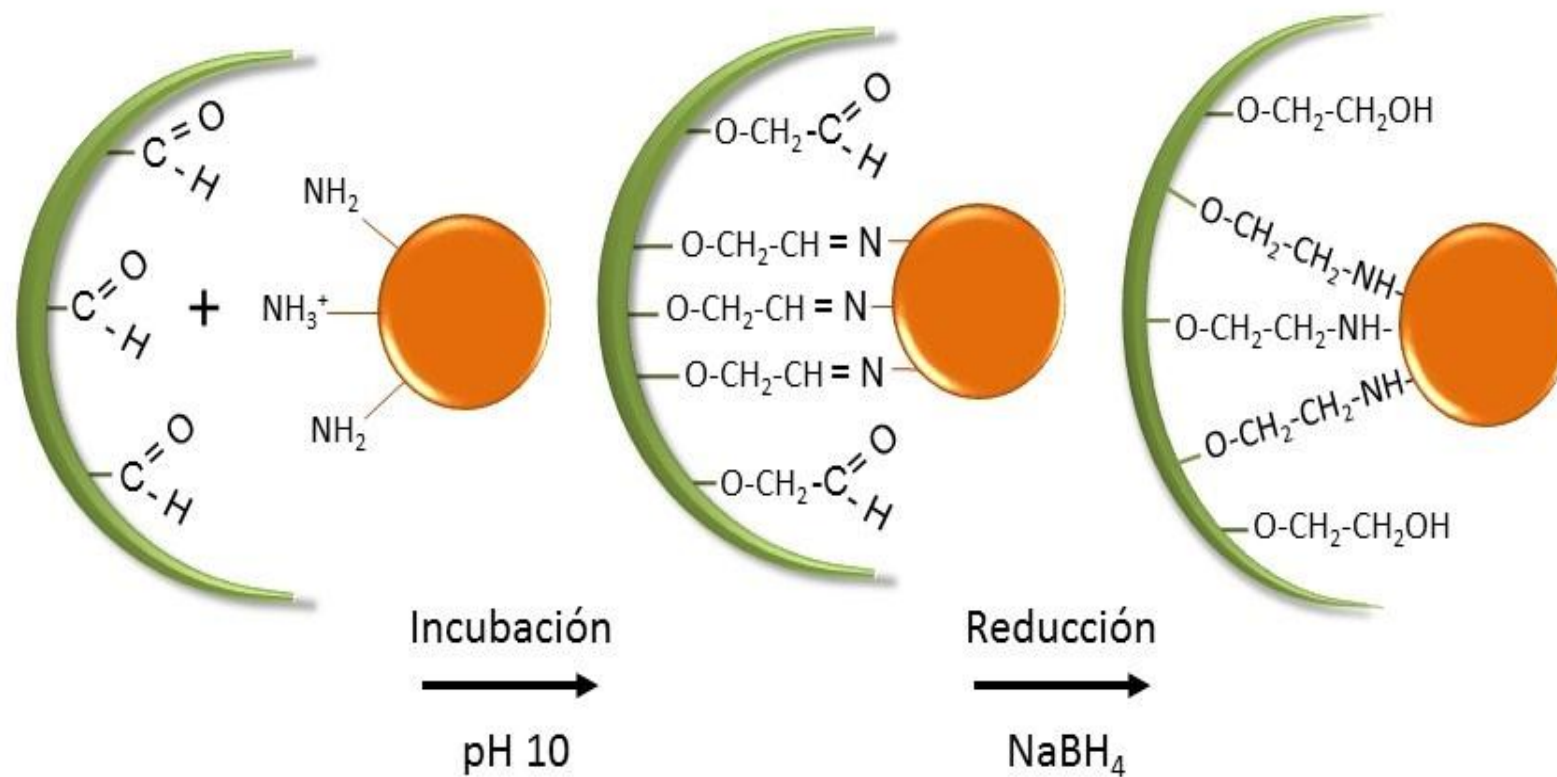
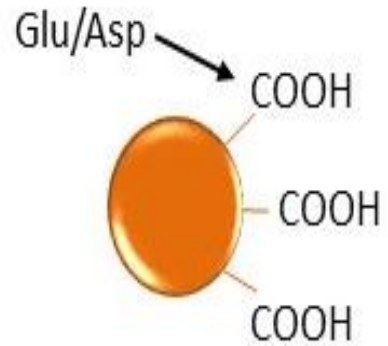


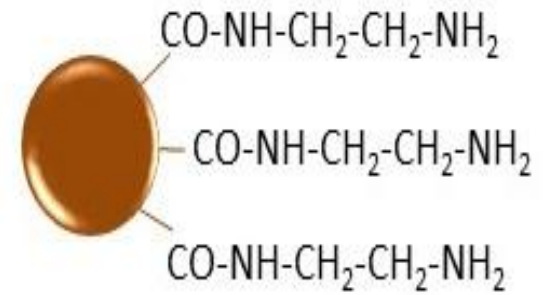
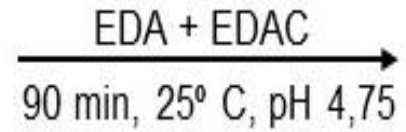
Figura 14 - Ilustração de uma enzima hipotética, imobilizada em glicil-agarosa. A redução com borohidruro de sodio faz irreversíveis as conexões imino formadas entre enzima e suporte (figura adaptada (Moreno Pérez 2015)).

**REUSO
E
STABILIDADE**

Modificações
pos-imobilização



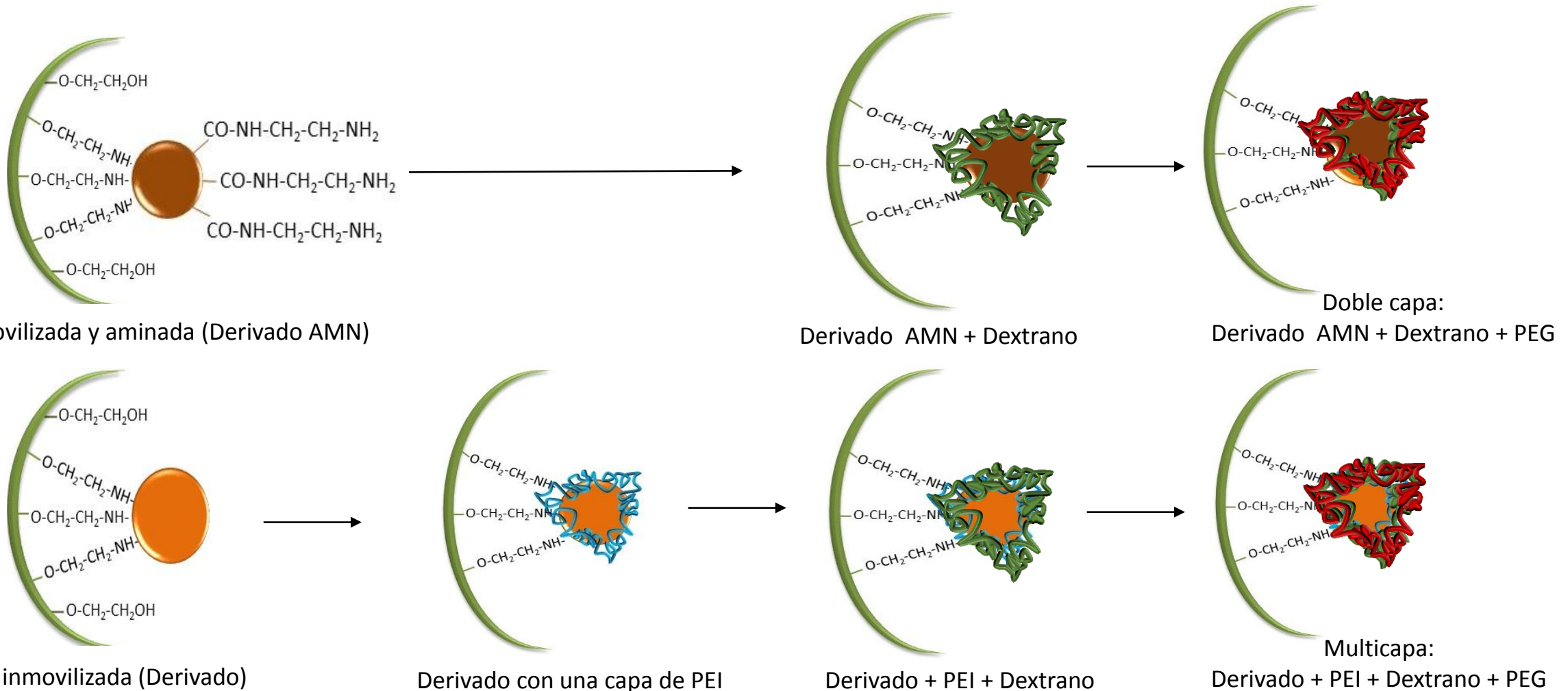
Enzima imobilizada



Enzima aminada

Capas de
Polímeros viscosos

Efeito da modificación físico-química, da enzima Bioxilanasa immobilizada, com polímeros viscosos.



- Efeito da capa de polímeros sobre o biocatalizador

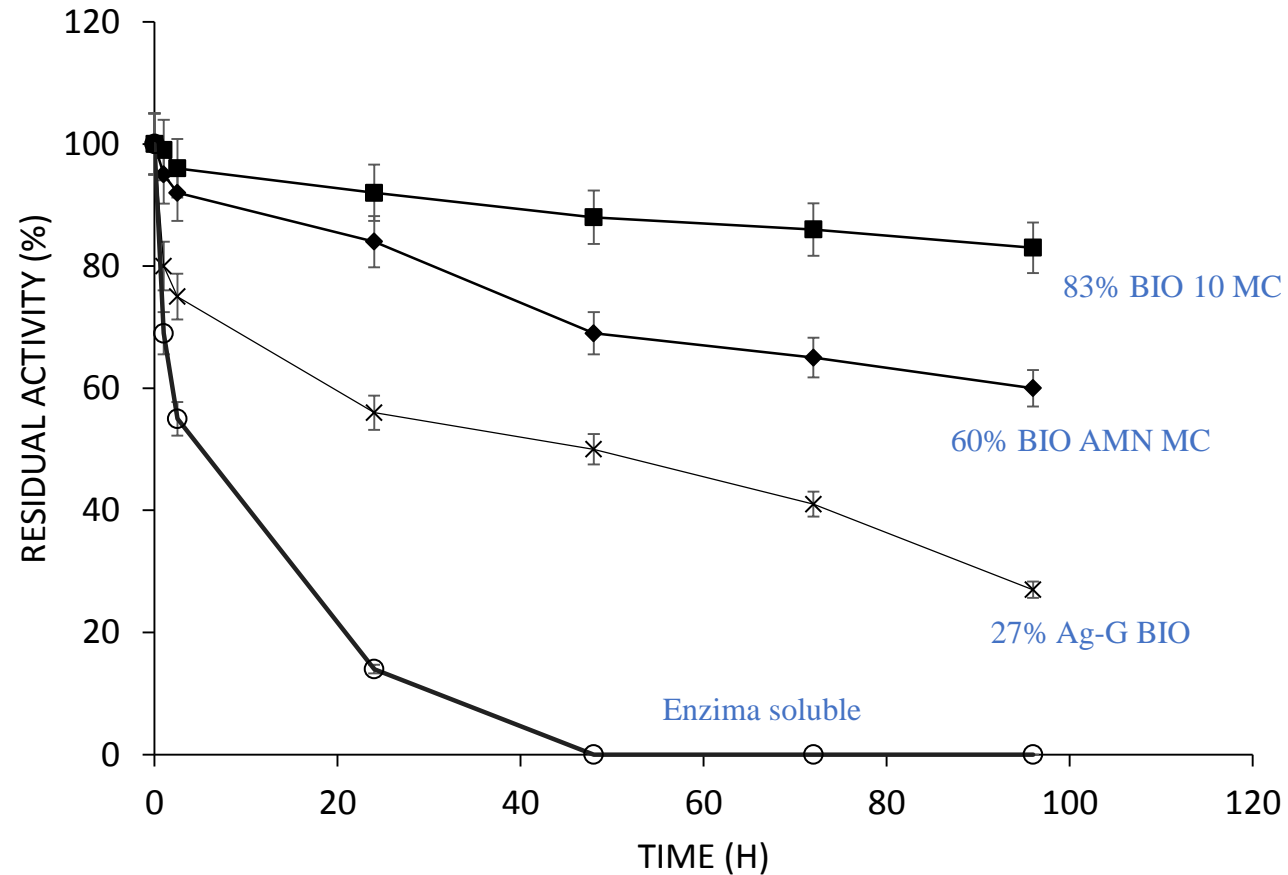


Figura 14 - Efecto de la multicapa sobre la estabilidad del derivado BIO AMN en comparación con el derivado BIO 10. Los derivados fueron 1:10 (p / v) suspendidos en tampón de fosfato de sodio 25 mM pH 7,0 y se incubaron a 60 °C. Símbolos: Bioxilanasa soluble (○) Ag-G BIO (×), BIO AMN MC (Δ) y BIO 10 MC (▲).

- Reação de hidrolise de xilano de faia para obtenção de prebióticos e reutilização de biocatalizadores; ciclo de reações.

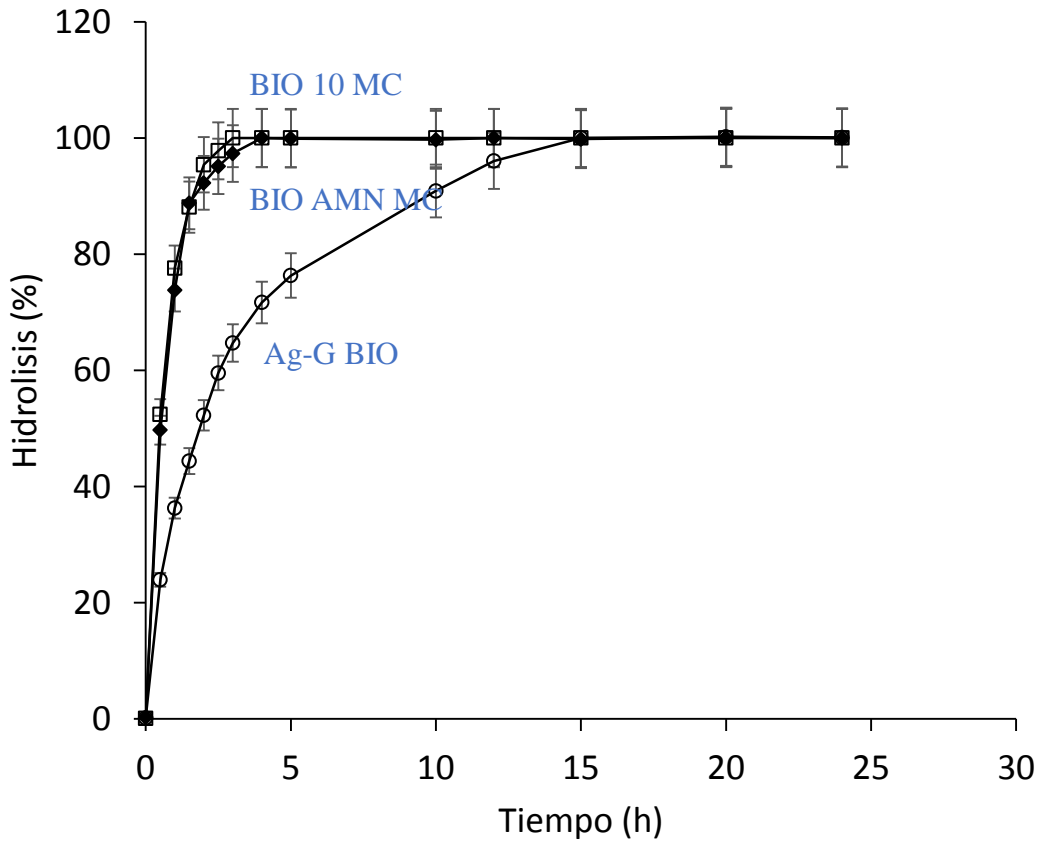


Figura 15 - Cinética de hidrólisis de xilano llevada a cabo por los biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC. La hidrólisis de xilano de madera de haya solubilizada al 4% (p / v) se realizó a pH 5,5 y a 50° C, 150 rpm, usando 0,1 g de cada biocatalizador. Símbolos: Ag-G BIO (○); BIO AMN MC (◆) y BIO 10 MC (□).

Tabla 5 - Composición de la mezcla de XOS obtenida de hidrólisis de xilano de madera de haya utilizando biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC.

Biocatalizadores	Tiempo de Reacción (h)	Xilooligosacáridos (%)		
		Xilosa	Xilobiosa	Xilotriosa
Ag-G BIO	15	5	91	4
BIO AMN MC	4	7	87	6
BIO 10 MC	3	7	85	8

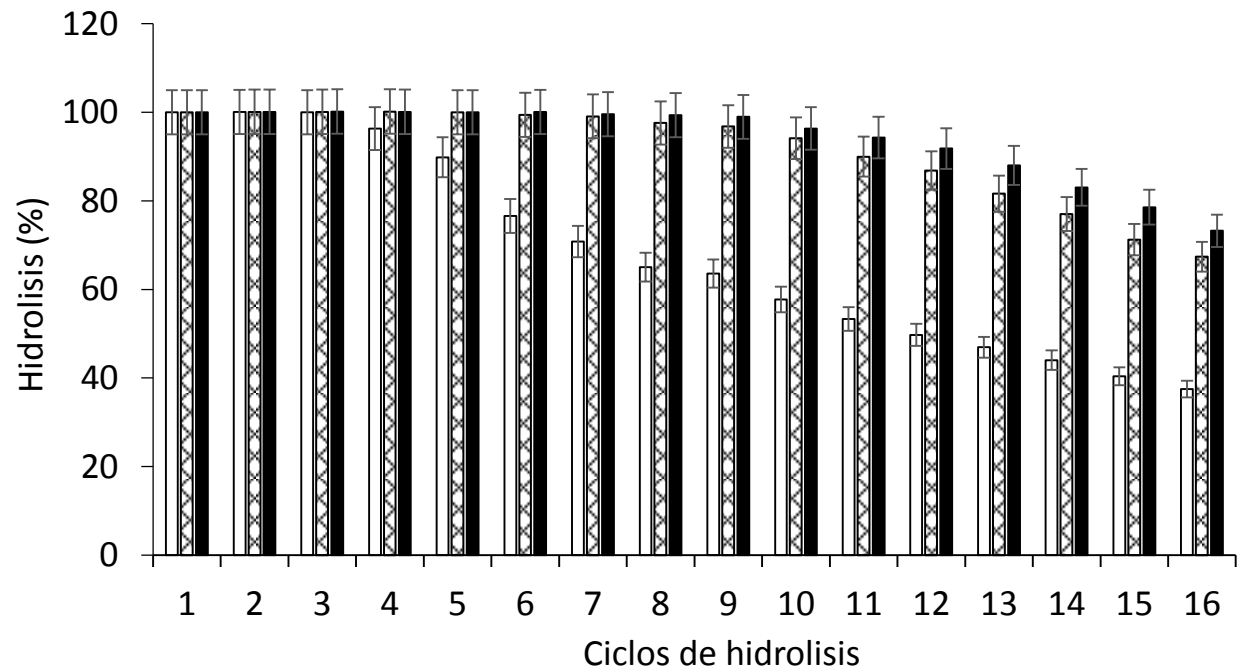


Figura 16 - Estabilidad de biocatalizadores Ag-G BIO, BIO AMN MC y BIO 10 MC durante ciclos operativos de hidrólisis de xilano. Cada ciclo se realizó con xilano de madera de haya solubilizado al 4% (p / v) a pH 5,5 y a 50° C, 150 rpm, utilizando 0,1 g de cada biocatalizador (2,66 mg prot / g de soporte) . Símbolos: Ag-G BIO (□); BIO AMN MC (⊠) y BIO 10 MC (■). La actividad antes del primer ciclo fue considerada como 100%.

Covalent immobilization-stabilization of β -1,4-endoxylanases from *Trichoderma reesei*: Production of xylooligosaccharides

Sandro Martins de Oliveira^a, Sonia Moreno-Perez^{a,b}, César Rafael Fanchini Terrasan^a, María Romero-Fernández^a, Marcelo Fernandes Vieira^c, Jose M. Guisan^a, Javier Rocha-Martin^{a,*}

^a Department of Biocatalysis, Institute of Catalysis and Petrochemistry (ICP) - CSIC, Campus UAM, Calle Marie Curie, 2, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain

^b Pharmacy and Biotechnology Department, School of Biomedical Sciences, Universidad Europea, 28670, Madrid, Spain

^c Department of Chemical Engineering (DCE), State University of Maringá - UEM, Campus Maringá, 87020-900, Maringá, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Enzyme immobilization-stabilization
Xylan hydrolysis
 β -1,4-Endoxylanases
Xylooligosaccharides

ABSTRACT

The production of xylooligosaccharides (XOS) was evaluated using immobilized and stabilized biocatalysts of a commercial enzymatic cocktail, BioXylanase 1 PLUS (BIO), which is based on the xylanolytic enzymes produced by *Trichoderma reesei*. BIO was immobilized by multipoint covalent attachment under alkaline conditions on agarose beads highly activated with aldehyde groups (Ag-G BIO) resulting in a highly active and stable biocatalyst (half-life was approximately 50 h at pH 7.0 and 60 °C). Ag-G BIO was 10-fold more stable than soluble preparation at pH 7.0 and 60 °C. Ag-G BIO was also physically modified by surface coating with poly-ethyleneimine (PEI) which promotes an ionic interaction with the anionic groups of the enzyme surface. Ag-G BIO covered with a layer of PEI 10 kDa (Ag-G BIO-PEI 10) was > 100-fold more stable than soluble BIO preparation. The optimal biocatalyst (Ag-G BIO-PEI 10) allowed to perform ten cycles of beechwood xylan hydrolysis reaction at high concentration (4% (w/v)) with a high conversion degree (> 80%). Moreover, Ag-G BIO-PEI 10 reached 90% of conversion in only 8 h and so, it could be used for short reaction times, which would extend its useful life, thus allowing its application for industrial processes.

1. Introduction

Xylanases (endo-1,4- β -D-xylanase) are enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bonds between xylose units in the hemicellulose fraction of plant cell walls. Endoxylanases hydrolyze the main chain of the polymer, while β -xylosidases act on non-reducing ends, releasing xylose [1,2]. These enzymes are produced by different microorganisms (filamentous fungi, yeasts, and bacteria), notably those from genera *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fibrobacter*, *Clostridium* and *Bacillus* [3,4]. Although, most commercial xylanase cocktails are from fungal origin (Allzyme PT, produced by *Aspergillus niger*; Multifect Xylanase, Depol D333MDP and BioXylanase, produced by *Trichoderma reesei*). Among them, the filamentous fungus *Trichoderma reesei* (anamorph *Hypocrea jecorina*) is one of the best producers of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes, producing all necessary enzymes for cellulose and hemicellulose degradation [5,6]. Several commercial enzyme preparations are currently manufactured using *T. reesei* strains [7].

Xylooligosaccharides (XOS) chain length can vary from 2 to 10 xylose residues linked by β -(1-4) bonds and with different substituents such as acetyl groups, uronic acids and arabinose residues among

others. They are naturally present in fruits, bamboo, vegetables, honey and milk, and can also be produced at industrial scale via chemical or enzymatic routes from xylan-rich materials, which are available widely and at low cost [3]. The enzymatic production is preferred in food industry due to the lack of undesirable side reactions and products [3]. For XOS production, xylan degradation should be partial, i.e., the production of xylose should be avoided. Thus, enzyme preparations with low β -xylosidase and exo-xylanase activities are required [8,9]. XOS are currently considered important prebiotic ingredients which can promote an increase in the number of bifidobacteria, which are among the first microbes to colonize the human gastrointestinal tract and are believed to exert positive health benefits on their host [3,10,11]. They are advantageous over other non-digestible oligosaccharides regarding health as well as technologically related properties. However, the currently high cost of production indicates the necessity of further development in processing and purification technologies [3,8].

Several factors can affect the enzyme activity and stability. They can undergo structural changes caused by extreme variations in the pH values or the presence of denaturing agents. According to previous reports [1,12], most xylanases have optimum activity at pH between 5.0

* Corresponding author.
E-mail address: javirocha@icp.csic.es (J. Rocha-Martin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2017.09.018>
Received 22 August 2017; Received in revised form 15 September 2017; Accepted 18 September 2017
1359-5113/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

CHAPTER THREE

Intense PEGylation of Enzyme Surfaces: Relevant Stabilizing Effects

S. Moreno-Pérez, A.H. Orrego, M. Romero-Fernández, L. Trobo-Maseda, S. Martins-DeOliveira, R. Munilla, G. Fernández-Lorente¹, J.M. Guisan¹

Institute of Catalysis, Spanish Research Council, CSIC, Madrid, Spain

¹Corresponding authors: e-mail address: gllorente@icp.csic.es; jmguisan@icp.csic.es

Contents

1. Introduction	56
2. Theory	57
3. Protocols	62
3.1 PEGylation of Chemically Aminated Enzymes	62
3.2 PEGylation of Enzymes Coated with Polymers	65
4. Inactivation of Modified Enzyme Derivatives	68
5. Conclusions	70
Acknowledgments	71
References	71

Abstract

This chapter describes the physicochemical coating of the surface of immobilized enzymes with a dense layer of polyethylene glycol (PEG) to improve enzyme stability. One hypothesis is that a dense, viscous, polar PEG layer around the enzyme would enhance enzyme thermal stability, while still providing access to the active site. PEG groups were attached by using aldehyde-dextran polymers, the dextran polymers are in turn attached to the enzyme surface that have been enriched with excess primary amino groups. The enzymes themselves were initially attached onto porous solids such that they may be separated easily from the reaction mixtures for easy downstream processing and that they may be recycled to reduce the cost of the biocatalyst. The hierarchical modification of enzyme surface with three different sublayers, under chemical design, provided a rational control at several structural levels. Few methods for increasing the number of amino groups on the surface of the enzyme are described: (a) chemical amination of carboxyl residues and (b) coating of the enzyme surface with cationic polymers containing a high percentage of primary amines. Reliable protocols for the PEGylation of four different enzymes are described here. For example, lipases from *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica* B, and *Rhizomucor miehei* attached



29 E 30 DE AGOSTO 2019

ENBRA

**ENCONTRO BRASILEIRO DE
ALIMENTOS FUNCIONAIS**

Maringá - PR - Brasil



3. Benefícios na alimentação animal.

Benefícios na alimentação animal

Prebióticos

- Melhoram o trânsito intestinal e regulam parâmetros como triglicérides e glicemia no sangue.
- Gera substâncias importantes às células intestinais, que quanto mais saudáveis estão, mais nutrientes absorvem.
- Favorece um ambiente intestinal um pouco mais ácido, favorável às bactérias boas ao organismo.

Benefícios na alimentação animal

- A produção animal vem se desenvolvendo a cada ano e aderindo a novas técnicas e tecnologias.
- Nesse cenário, aumenta também a preocupação com a segurança alimentar e na saúde animal.
- Uma alternativa é o uso de aditivos probióticos na alimentação de animais.

Benefícios na alimentação animal

- Os probióticos são utilizados desde o nascimento até a velhice do animal, em situações de estresse, como:
- Desmame;
- mudanças de ração;
- período de vacinação;
- medicações;
- mudanças de ambiente

Benefícios na alimentação animal

- Probióticos têm sido utilizados entre as diversas espécies de animais.
- Tem a função de auxiliar a colonização de bactérias benéficas, melhorar a absorção de nutrientes e auxiliar na síntese de vitaminas e proteínas.
- Redução da necessidade de emprego de medicamentos e até mesmo aumentar a eficiência dos sistemas de produção.

Benefícios na alimentação animal

- Para vacas em lactação o emprego de probióticos pode proporcionar menor quantidade de células somáticas no leite, melhorando os indicadores de qualidade da produção e também reduzindo a ocorrência de mastite.
- Aumento em até 1 kg/dia a produção de leite por vaca; aumentar em até 7% a quantidade de gorduras do leite; reduzir a concentração ácidos lácticos no rúmen em até 0,9 mM; (Desnoyer et al., 2009).

Benefícios na alimentação animal

- Reduz ou elimina o emprego de antibióticos.
- A prática de uso de antibióticos como promotores de crescimento pode estar com seus dias contados.
- Ajuda no controle de Peso do animal.

Existe um grande desafio pela frente a ser enfrentado com o uso de novas alternativas para prevenção da colonização intestinal de bactérias causadoras de doenças, especialmente quando o rebanho é confinado.

A seleção de boas linhagens probióticas e seu emprego nos sistemas de produção animal geram muitos benefícios, como abertura de mercado com consumidores que buscam produtos diferenciados (saudabilidade do alimento), melhorias à saúde dos animais e por consequência à humana.

Indicação de leitura:

- Probióticos – microrganismos a favor da vida

(BARBOSA, Flávio Henrique Ferreira et al. Probióticos-microrganismos a favor da vida. Revista de Biologia e Ciências da Terra, v. 11, n. 1, p. 11-21, 2011).

- Probióticos, prebióticos e simbióticos.

(FOOD INGREDIENTS BRASIL Nº 17 – 2011 -)

Contatos:

Dr. Sandro Martins de Oliveira

Celular: (43) 996 924 606

e-mail: osordnas@yahoo.com.br

Obrigado.



29 E 30 DE AGOSTO 2019
ENBRA
**ENCONTRO BRASILEIRO DE
ALIMENTOS FUNCIONAIS**
Maringá - PR - Brasil



Alimentos Probióticos

fontes de origens e Biotecnologia em benefícios
da alimentação animal

Dr. Sandro Martins de Oliveira

Maringá, Agosto de 2019.