



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DIEYSSI ALVES DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR *Bacillus subtilis* natto CCT7712 E APLICAÇÃO COMO PREBIÓTICO EM ALIMENTO**

---

Londrina  
2014

DIEYSSI ALVES DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR *Bacillus subtilis* natto CCT7712 E APLICAÇÃO COMO PREBIÓTICO EM ALIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-Orientadora: Sandra Garcia

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S237p Santos, Dieyssi Alves dos.  
Produção de frutooligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto CCT7712 e  
aplicação como prebiótico em alimento / Dieyssi Alves dos Santos. –  
Londrina, 2014.  
96 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Coorientador: Sandra Garcia.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.  
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia industrial – Teses. 2. Oligossacarídeos – Teses. 3. Cereais  
como alimento – Teses. 4. Alimentos funcionais – Indústria – Teses. 5. *Bacillus  
subtilis* – Teses. 6. Prebióticos – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone.  
II. Garcia, Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas.  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

DIEYSSI ALVES DOS SANTOS

**PRODUÇÃO DE FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS POR *Bacillus subtilis*  
natto CCT 7712 E APLICAÇÃO COMO PREBIÓTICO EM ALIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção de título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonia Pedrine  
Colabone Celligoi  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Flora Dalberto Vasconcelos  
Universidade Estadual Paulista –  
UNESP/Presidente Prudente

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Prudêncio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de Maio de 2014

***Dedico este trabalho***

*Aos meus pais, que me apoiaram, incentivaram e não mediram esforços para que eu chegasse a essa etapa da minha vida!*

*Ao meu irmão Diuesley, pelo apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos!*

*Ao Júnior, meu amor, pessoa com quem compartilho alegrias, angústias, conquistas, dificuldades... e que em todos os momentos, tem o dom de me transmitir paz!*

## **AGRADECIMENTOS**

### **A Deus,**

*Por ter me provido de fé, forças e perseverança ...por ter me ajudado a transpor dificuldades que, a mim, pareciam montanhas intransponíveis...por sua presença ter acalentado meu coração nos momentos de desesperanças e fraquezas e por ter me conduzido sempre no caminho do bem, da paz e do amor!*

### **À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi,**

*Que dedicou seu tempo e compartilhou suas experiências para que esse trabalho fosse possível. Agradeço pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade!*

### **À Prof<sup>a</sup> Dra Sandra Garcia, co-orientadora**

*Por ter se disponibilizado em ajudar na parte da aplicação do produto deste trabalho (FOS), pelos conhecimentos transmitidos e experiências compartilhadas!*

### **À Prof<sup>a</sup> Dra. Sandra Helena do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos**

*Pela valiosa colaboração nas análises sensoriais das barras de cereais desenvolvidas!*

### **Ao professor Dionísio Borsato do Departamento de Química**

*Por sua dedicação e ajuda nas análises estatísticas.*

### **Aos queridos amigos de laboratório**

*Odair, Janaína, Tamires, Agnes (Biotecnologia) e Marsílvio, Marli, Karla e Naiara (Ciência e Tecnologia de Alimentos) pelo compartilhamento de materiais e experiências, ajuda nos trabalhos e suporte emocional nos momentos de dificuldade!*

**Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia**

*Pela atenção, apoio, colaboração e auxílios prestados.*

**À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

*Pelo apoio financeiro.*

**Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

*Pela oportunidade e possibilidade de desenvolver este trabalho.*

*“As coisas que realizamos, nunca são tão belas quanto às que sonhamos. Mas, às vezes, nos acontecem coisas tão belas que nunca pensamos em sonhá-las.”*

***(Erick Douglas Falcão)***

SANTOS, Dieyssi Alves dos. **Produção de frutooligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto CCT7712 e aplicação como prebiótico em alimento.** 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

Frutooligossacarídeos (FOS) são carboidratos de cadeias curtas representados, principalmente, por cetoose, nistose e frutofuranosil-nistose, considerados prebióticos por promoverem o crescimento seletivo de probióticos. São candidatos a aplicação na indústria alimentícia, considerando a crescente demanda por alimentos funcionais. A produção microbiana de FOS é uma alternativa para a obtenção destes produtos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto CCT7712 para aplicação como ingrediente em formulações de barras de cereais. Inicialmente, utilizou-se delineamentos Box-Behnken variando a concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação. A melhor condição para a produção de FOS foi em sacarose a 475 g.L<sup>-1</sup>, 35 °C e 24 horas com produção de 195,27 g. L<sup>-1</sup>. A sacarose foi o parâmetro de maior influência para essa resposta. A maior produtividade foi a de 9,36 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> em sacarose a 300 g.L<sup>-1</sup>, 35°C e 12 horas. Na segunda etapa, utilizou-se delineamento experimental de mistura para analisar o efeito e interação dos sais (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e NaCl na produção de FOS. A análise do efeito dos sais demonstrou que interação de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> foi a mais significativa, estimulando a produção. O melaço e caldo de cana foram utilizados como substratos nas fermentações, alcançando produção de 97,93 g. L<sup>-1</sup> de FOS em meios com caldo de cana e 42,58 g. L<sup>-1</sup> de FOS em meios com melaço. Na condição de produção otimizada, foram realizadas fermentações em maior escala para a produção e purificação dos FOS e estes foram utilizados na elaboração de barras de cereais. Quatro formulações de barras de cereais foram elaboradas, sendo uma controle, por ser isenta de FOS e três com concentrações de FOS em 5, 10 e 15% (g/g). As barras foram avaliadas sensorialmente quanto a aparência, aroma, sabor, textura e, avaliação global, representada pela intenção de compra. Índices satisfatórios de aprovação foram obtidos para as quatro formulações, com destaque para as que continham 10 e 15 % de FOS, com 63 e 64 % de respostas positivas para intenção de compra.

**Palavras-chave:** Frutooligossacarídeos. Nistose. *Bacillus subtilis*. Sulfato de Manganês. Melaço de cana. Caldo de cana. Barra de cereais.

SANTOS, Dieyssi Alves dos. **Production of fructooligosaccharides by *Bacillus subtilis* natto CCT7712 and application as prebiotic in food.** 2014. 96p. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology) – Estadual University of Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are short-chain carbohydrates represented mainly by kestose, nystose and fructofuranosyl – nistose. They are considered as prebiotics for promoting probiotics selective growth. Are candidates for application in the food industry as the growing demand for functional foods is increasing. Microbial production of FOS is an alternative of obtaining these prebiotics. Thus, this work aimed FOS production by *Bacillus subtilis* natto CCT7712 for application as ingredient in formulations of cereal bars. Initially, a Box- Behnken designs (sucrose concentration, temperature and fermentation time as variables) was used. The FOS production best condition achieved 195,27 g. L<sup>-1</sup> when the following conditions were applied: sucrose concentration: 475 g. L<sup>-1</sup>; temperature: 35°C and fermentation time: 24 h. Sucrose was the most influential parameter for this answer. The highest productivity was 9.36 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> at sucrose 300 g. L<sup>-1</sup>, 35 ° C and 12 hours. In the second step, a mixture experimental design was used to examine both the effect and interaction of salts (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> and NaCl on FOS production. The analysis of the effect of salts demonstrated that the interaction of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub> and ZnSO<sub>4</sub> was the most significant on production. When sugar cane juice and molasses were used as substrate in fermentation, the FOS production were 97,93 g. L<sup>-1</sup> and 42,58 g. L<sup>-1</sup>, respectively. The optimized conditions fermentations were carried out on a larger scale trial for production followed by purification and preparation of cereal bars. Four cereal bars formulations were prepared: one control (free of FOS) and three concentration FOS: 5, 10 and 15% (w/w). The bars were sensorially evaluated for appearance, aroma, flavor, texture and overall assessment (represented by purchase intent). Satisfactory approval ratings were obtained for the four formulations, particularly those containing 10 and 15% of FOS, with 63 and 64 % of positive responses of purchase intent.

**Keywords:** Fructooligosaccharides. Nystose. *Bacillus subtilis*. Manganese Sulphate. Molasses. Sugarcane juice. Cereal bar.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos. (A) 1-  
cestose, (B) nistose, (C) frutofuranosil-nistose.....18
- Figura 2** - Fluxograma de elaboração das barras de cereais .....45
- Figura 3** - Gráfico de textura instrumental para análise de dureza e  
fraturabilidade .....47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Meio de preservação para <i>B. subtilis</i> natto. ....	35
<b>Tabela 2 -</b>	Meio de inóculo para <i>B. subtilis</i> natto.....	35
<b>Tabela 3 -</b>	Meio de fermentação.....	36
<b>Tabela 4 -</b>	Meio de fermentação para o efeito de sais na produção de FOS.....	36
<b>Tabela 5 -</b>	Meio de fermentação com caldo de cana.....	37
<b>Tabela 6 -</b>	Meio de fermentação com melão de cana.....	37
<b>Tabela 7 –</b>	Ingredientes secos e aglutinantes utilizados nas formulações de barras de cereais.....	38
<b>Tabela 8 –</b>	Delineamento experimental Box- Behnken para testar o efeito da concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação na produção e produtividade de FOS por <i>B. subtilis</i> natto .....	40
<b>Tabela 9 -</b>	Delineamento estatístico de mistura para avaliar o efeito de sais na produção de FOS por <i>B.subtilis</i> natto. ....	42

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
2.1	FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS.....	16
2.2	PRODUÇÃO DE FOS .....	17
2.2.1	<i>Bacillus subtilis</i> natto.....	19
2.2.2	Parâmetros Fermentativos na Produção de FOS .....	21
2.2.3	Efeito de Sais na Produção de FOS.....	23
2.2.4	Substratos Alternativos na Produção de FOS.....	24
2.3	FUNCIONALIDADE DOS FOS .....	25
2.4	ALIMENTOS FUNCIONAIS E SAÚDE HUMANA .....	26
2.5	FOS COMO INGREDIENTE ALIMENTAR FUNCIONAL.....	28
2.6	BARRAS DE CEREAIS .....	29
2.7	PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO .....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
4.1	MATERIAL .....	35
4.1.1	Microrganismo.....	35
4.1.2	Substratos alternativos para fermentações .....	35
4.1.3	Meios de cultivo .....	35
4.1.3.1	Meio de preservação.....	35
4.1.3.2	Meio de inóculo .....	35
4.1.3.3	Meio de fermentação.....	36
4.1.3.4	Meio de fermentação para verificação do efeito de sais .....	36
4.1.3.5	Meios de fermentação com substratos alternativos .....	37
4.1.4	Ingredientes Utilizados na Elaboração de Barras de Cereais .....	37

4.2	MÉTODOS .....	38
4.2.1	Preservação dos Microrganismos.....	38
4.2.2	Métodos Fermentativos.....	38
4.2.2.1	Inóculo.....	38
4.2.2.2	Produção de FOS.....	39
4.2.2.3	Cinética de produção de FOS.....	41
4.2.2.4	Influência de sais na produção de FOS .....	41
4.2.2.5	Produção de FOS utilizando substratos alternativos .....	42
4.2.2.6	Produção de FOS para aplicação como ingrediente em barras de cereais.....	43
4.2.3	Métodos Analíticos .....	43
4.2.3.1	Curva de biomassa .....	43
4.2.3.2	Quantificação da biomassa.....	44
4.2.3.3	Determinação de FOS .....	44
4.2.4	Elaboração de Barras de Cereais.....	45
4.2.4.1.	Composição química centesimal .....	46
4.2.4.2	Análise de textura instrumental.....	47
4.2.4.3	Análise microbiológica .....	48
4.2.4.4	Avaliação sensorial .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO .....	52
5.2	DEPÓSITO DE PATENTE.....	71
5.3	RESULTADOS COMPLEMENTARES .....	76
5.3.1	Cinética de produção de FOS.....	76
5.3.2	Composição Química Centesimal de Barras de Cereais com FOS .....	77
5.3.3	Análise de Textura Instrumental de Barras de Cereais com FOS.....	78
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	.....	<b>89</b>
ANEXO A -	Normas para a submissão do artigo para o periódico <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> .....	89

## 1. INTRODUÇÃO

Observa-se, nas últimas décadas, um acelerado aumento na demanda por alimentos de valor nutricional, composto por substâncias que tenham potencial de beneficiar o funcionamento do organismo e prevenir doenças: os alimentos funcionais. O conceito de alimentos funcionais foi introduzido pela primeira vez no Japão e, em 1991, vários oligossacarídeos foram classificados como “alimentos promotores da saúde”.

Frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(2→1) com ou sem unidade terminal de glicose. São componentes naturais em várias espécies vegetais, sendo as principais fontes o trigo, cebola, banana, alcachofra, alho, raízes de chicória e, em quantidades expressivas na raiz da yacon.

Os FOS são considerados prebióticos, uma vez que são capazes de promover o crescimento seletivo de probióticos, bactérias do colón responsáveis por efeitos benéficos ao hospedeiro. O efeito prebiótico dos FOS resulta em outros benefícios ao organismo, dentre os quais se destacam a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, aumento da produção de compostos imunestimulantes, que possuem atividade antitumoral, redução na produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal durante terapia com antibióticos.

A obtenção de FOS pode ocorrer por processos fermentativos em meios com sacarose, sendo esta, hidrolisada a frutose e glicose. Esses processos são mediados por enzimas denominadas frutossiltransferases (FTases) capazes de realizarem três tipos de reações: (1) hidrólise da sacarose em frutose e glicose; (2) Polimerização das unidades frutossil e (3) transferência de frutoses para um aceptor, formando frutooligossacarídeos constituídos por cadeias lineares e ramificadas e com grau de polimerização variando entre 2 e 9 unidades frutossil.

FTases são produzidas por diversos microrganismos como *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, *Rhodotorula sp.*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus subtilis* natto. Dentre estes, o *Bacillus subtilis* natto, microrganismo isolado de um alimento japonês, tem se destacado em eficiência como produtor de exopolissacarídeos.

O estudo de fatores que interferem no processo de produção é importante para a otimização do mesmo. Variações na concentração de sacarose, temperatura, pH, agitação, tempo de fermentação, entre outros, podem influenciar a produção, tanto em termos quantitativos como na massa molecular destes compostos. Dessa forma, utilizando-se o mesmo microrganismo, é possível favorecer a produção de poli ou oligossacarídeos apenas pela manipulação de parâmetros fermentativos.

A adição de sais aos meios de fermentação também pode influenciar a biossíntese de exopolissacarídeos, intensificando ou reprimindo, de acordo com as especificações de cada microrganismo.

A utilização de subprodutos e resíduos agroindustriais como substratos em fermentações, tem se mostrado como uma tendência crescente em processos biotecnológicos, visando redução de custos na manufatura de produtos de interesse. O melaço e o caldo de cana-de-açúcar, produtos gerados na indústria sucroalcooleira no Brasil, são substratos complexos com elevada concentração de sacarose e grande variedade de sais necessários para a produção de metabolitos de interesse industrial como FOS, butanol, ácido lático. O melaço de cana-de-açúcar é conhecido por seu alto teor de açúcares e estes, geralmente, contribuem com 60-65% dos sólidos presentes. A sacarose, geralmente, compreende cerca de 65-70% dos açúcares totais e outros açúcares como glicose e frutose também estão presentes. Outros carboidratos, geralmente, compreendem 10-16% dos sólidos com compostos de pectina e produtos de reação presentes em quantidades significativas. Proteínas e aminoácidos representam cerca de 1-2% e minerais como cálcio, potássio, cloro e enxofre, contribuem com 8-17% dos sólidos no melaço. Vestígios de metais como ferro, zinco, cobre e magnésio também estão presentes no melaço de cana de açúcar.

Devido a suas propriedades e efeitos benéficos, os FOS são candidatos à aplicação na indústria alimentícia, para o desenvolvimento de produtos com “baixo teor de açúcares”, importantes na dieta de diabéticos e como alimentos funcionais; podem ser utilizados como ingrediente alimentar em bebidas e produtos lácteos (leite em pó, iogurte e outros fermentados), em sobremesas (sorvetes, pudins, doces, chocolates), em cereais matinais e barras de cereais.

Considerando a melhoria na qualidade de vida da população, a busca por alimentos funcionais tem tido uma crescente demanda. O foco principal desta pesquisa foi otimizar a produção de FOS por processo fermentativo e desenvolver um produto alimentício nutritivo, saudável e com característica funcional.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FRUTOOLIGOSSACARÍDEOS

Por definição, frutooligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, unidos por ligações do tipo  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) com ou sem unidade terminal de glicose. São componentes naturais em várias espécies vegetais, nas quais estão presentes como composto de reserva energética, sendo as principais fontes o trigo, cebola, banana, alcachofra, alho, raízes de chicória e, em quantidades expressivas na raiz da yacon (ROBERFROID, 2002; FORTES; MUNIZ, 2009).

Do ponto de vista químico, os FOS são formados por ligações específicas entre uma molécula de glicose e 2 a 9 unidades de frutose. Sua fórmula pode ser descrita como  $GF_n$ , onde G representa a molécula de glicose, F a molécula de frutose e  $n$  o número de unidades de frutose (BORNET et al., 2002; RAIZEL et al., 2011).

Os FOS formam cadeias de comprimento curto a médio sendo os principais a cestose, nistose e frutofuranosil nistose, contendo de 1 a 3 unidades frutossil ligadas na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) da sacarose (PASSOS; PARK, 2003). São considerados açúcares não convencionais sendo classificados como alimentos funcionais, prebióticos e fibras alimentares solúveis pois possuem compostos bioativos capazes de atuar no organismo, produzindo efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde (FORTES; MUNIZ, 2009).

FOS são considerados carboidratos não-digeríveis devido a configuração dos carbonos anoméricos, em suas unidades monossacarídicas, não ser suscetível a atividade hidrolítica de enzimas digestivas humanas, fato que caracteriza sua propriedade prebiótica. Os FOS chegam intactos ao cólon, onde são fermentados por bactérias nativas e, como produtos dessa fermentação, são gerados ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato, acetato) e lactato. Estes ácidos reduzem o pH do cólon, deixando o ambiente desfavorável à proliferação de bactérias patogênicas além de serem fonte de

energia primária para as células do epitélio colônico (MUSSATTO; MANCILHA, 2007).

Devido a não-digestibilidade, os FOS são considerados compostos pouco calóricos; os produtos da fermentação dos FOS por bactérias nativas no cólon (lactato e ácidos graxos de cadeia curta), são metabolizados gerando 1,5 kcal / g de energia útil (NINESS, 1999). Outra característica gerada pela não-digestibilidade dos FOS é a ausência de cariogenicidade (IKEDA, 1990).

Devido as suas características funcionais e aspectos fisiológicos, os FOS são chamados açúcares não convencionais e tem promovido considerável impacto no setor alimentício, principalmente na indústria de açúcares. Estes compostos são estáveis em pH acima de 3 e temperatura superior a 140 ° C, além de serem altamente solúveis em água (cerca de 80% a 25°C) e etanol; possuem cerca de um terço do poder adoçante da sacarose, o que, do ponto de vista comercial, é interessante para a elaboração de alimentos, nos quais o uso da sacarose é restrito por sua elevada doçura (BORNET, 2002; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; MORRIS; MORRIS, 2012).

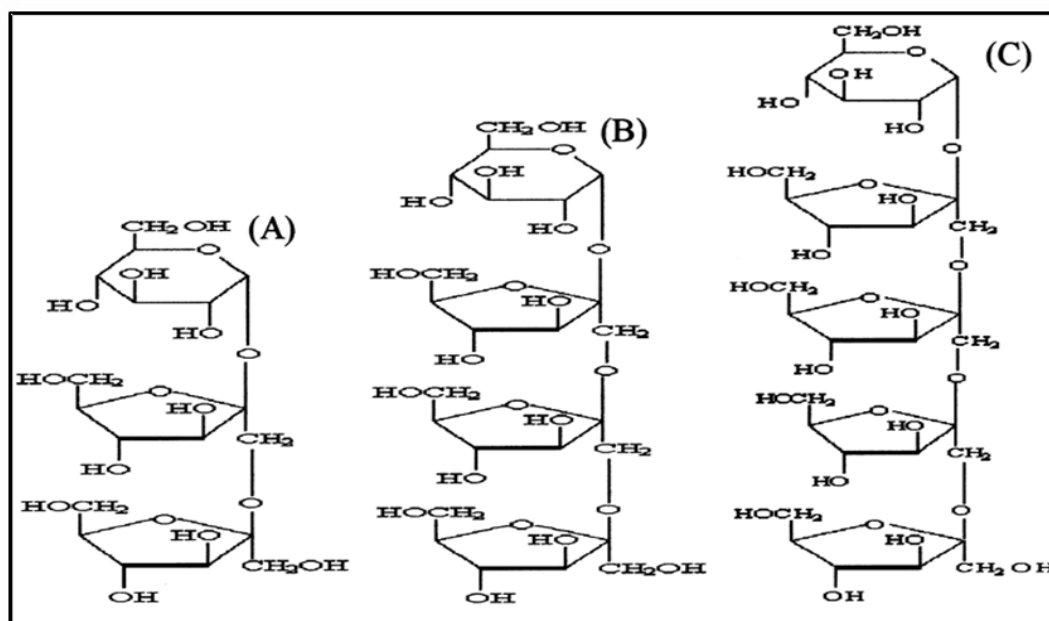
## **2.2 PRODUÇÃO DE FOS**

FOS são componentes naturais em várias espécies vegetais como alho, cevada, cebola, banana, beterraba, raiz da yacon etc. Além disso, muitas espécies microbianas também são produtoras de enzimas responsáveis pela síntese de FOS a partir de fontes de carbono, como a sacarose (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

São conhecidos três mecanismos de obtenção de FOS: por hidrólise (enzimática ou ácida) da inulina (polissacarídeos de origem vegetal), por síntese enzimática a partir da hidrólise da sacarose e, por último, através de processos fermentativos, quando se seleciona microrganismos produtores capazes de sintetizarem FOS em meios com sacarose como e em condições específicas (PASSOS; PARK, 2003; PATEL; GOYAL, 2011).

A produção microbiana de FOS por processos fermentativos, envolve enzimas com funções de hidrólise e transfrutoseilação, utilizando sacarose como substrato. Estas enzimas são denominadas  $\beta$ -frutofuranosidas ( $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, E.C.3.2.1.26) ou  $\beta$ -frutosiltransferase ( $\beta$ -D-frutofuranosídeo frutosiltransferase, E.C.2.4.1.9); são enzimas bifuncionais capazes de conduzir três reações características: (1) hidrólise da sacarose em frutose e glicose, (2) polimerização de unidades frutose e (3) reação de transferase de frutose para um aceptor (sacarose ou glicose), sintetizando oligossacarídeos com cadeias lineares ou ramificadas denominados cestose, nistose e frutofuranosil-nistose. Estes contêm de 1 a 3 unidades frutose ligadas na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) da sacarose, conforme ilustrado na Figura 1. (PASSOS; PARK, 2003; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005; PATEL; GOYAL, 2011).

**Figura 1** - Estrutura química dos principais frutooligossacarídeos. (A) 1-cestose, (B) nistose, (C) frutofuranosil-nistose.



Fonte: PASSOS; PARK (2003)

Para a síntese de FOS as enzimas envolvidas são as hidrolases (glicosidasas) e transferases (glicosil-transferases) sendo a maioria de origem microbiana. As glicosidasas catalizam reações de hidrólise de ligações osídicas

e, também, de síntese das mesmas. As reações de síntese podem ocorrer por reversão das reações de hidrólise ou por transferência de uma unidade glicosídica, de um doador para um aceptor, caracterizando reações de transglicosilação. As transferases são catalisadoras de reações de transferência intermolecular e intramolecular, mediando a transferência de radicais frutossil, no caso da síntese de FOS (HERNALSTEENS; MAUGERI 2010).

Ghazi et al. (2006) afirmam que a síntese de FOS a partir da sacarose, pode ser influenciada pela concentração de sacarose e pela taxa das reações de hidrólise /frutotransferase pois a água compete com a sacarose pelo sítio ativo da enzima. Dessa forma, quando a concentração de sacarose do meio é baixa, desloca-se o equilíbrio das reações no sentido da hidrólise da sacarose, liberando frutose para o meio. Quando a concentração de sacarose é alta, desloca-se o equilíbrio reacional no sentido de reações de transfrutossilação, liberando FOS como frutose, que, por sua vez, pode, também, ser hidrolisada ou transformada em nistose, por reação de transfrutossilação.

Em meios com sacarose, vários microrganismos são produtores de FOS, dentre estes *Aureobasidium pullulans* (VAŇKOVÁ et al., 2008), *Aspergillus aculeatus* (NEMUKULA et al., 2009), *Penicillium expansum* (PRATA et al., 2010), *Xanthophyces dendrorhous* (NING et al., 2010), *Aspergillus niger* (DRIOUCH et al., 2010), *Aspergillus japonicus* (MUSSATO, TEIXEIRA 2010), *Bacillus sp.* (BELGHITH et al., 2012), *Bacillus subtilis natto* (SILVA et al., 2014).

### 2.2.1 *Bacillus subtilis natto*

Espécies do gênero *Bacillus* inclui bactérias Gram-positivas que têm forma de bastonetes, formadoras de endósporos, podendo ser aeróbias ou facultativas anaeróbias. São capazes de habitar ambientes extremos como areias do deserto, nascentes de água quente e solos do Ártico uma vez que são, fisiologicamente, versáteis. Neste sentido, acrescenta-se o fato destes

microrganismos crescerem a valores de pH, temperatura e concentrações de sal intolerantes a outros organismos (HARWOOD, 1992).

*Bacillus subtilis* é uma espécie do gênero *Bacillus* amplamente conhecida no que se refere a sua biologia celular e molecular. São bactérias comumente encontradas no solo, água, ar e em resíduos vegetais em decomposição. Essa espécie produz endósporos que tornam possível sua sobrevivência em condições extremas (altas temperaturas e baixa umidade), além de secretarem grande variedade de enzimas que lhe permite degradar muitos substratos naturais, contribuindo para a reciclagem de nutrientes (HARWOOD, 1992).

*B. subtilis* é considerado uma espécie benigna uma vez que não apresenta patogenicidade ou toxicidade a seres humanos, animais ou plantas. A ausência de patogenicidade e a incapacidade de colonizar tecidos fazem com que o *B. subtilis* tenha denominação GRAS (generally regarded as safe) e, por isso, são utilizados como probióticos em alimentos, principalmente em países orientais e em parte da Europa (HONG; DUC; CUTTING, 2005).

*Bacillus subtilis* natto é um membro da espécie *B. subtilis* utilizado para a fabricação do natto, alimento tradicional no Japão. O natto é produzido a partir de grãos de soja fermentados pelo *Bacillus subtilis* natto, com objetivo de aumentar o valor nutricional do produto, através da quebra das proteínas da soja em seus respectivos aminoácidos, pela ação das enzimas excretadas pelo microrganismo (HIROYUKI, 2000).

Em estudos sobre o metabolismo da sacarose por *B. subtilis*, Sangiliyandi e Gunasekaran (2001) descobriram três enzimas importantes: uma sacarase intracelular (Inv ou SacA), uma sacarase extracelular (InvB ou B46) com função de hidrólise extracelular da sacarose e uma levanasacarase extracelular (SacB),  $\beta$ -frutofuranosidase, responsável pela hidrólise da sacarose e síntese de levana.

Este microrganismo tem sido reportado como eficiente produtor de exopolissacarídeos. Shih, Chen e Wu (2010) reportaram a produção de 86,3 g.L<sup>-1</sup> de levana por células de *Bacillus subtilis* natto imobilizadas em alginato por 80 horas de incubação em meio com sacarose em 200 g. L<sup>-1</sup>, pH 5,8 a 37

°C. Silva et al. (2014) observaram a eficiência deste microrganismo na produção de FOS alcançando 98,86 g. L<sup>-1</sup> em meio com 300 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,7 a 37 °C em 24 h de fermentação.

### 2.2.2 Parâmetros Fermentativos na Produção de FOS

Processos fermentativos em meios com sacarose originam exopolissacarídeos, com pesos moleculares variados. Variações no tamanho médio das cadeias polissacarídicas formadas são explicadas pelas condições utilizadas no processo, de forma que, modificando-se os parâmetros da fermentação, pode-se deslocar a produção em direção ao produto de interesse (CALAZANS et al., 2000). Dessa forma, utilizando-se o mesmo microrganismo, é possível favorecer a produção de poli ou oligossacarídeos apenas pela manipulação de parâmetros como pH, temperatura, tempo de fermentação, agitação, concentração de sacarose, entre outros (COIMBRA, 2006; LORENZONI et al., 2014; NEMUKULA et al., 2009; HERNALSTEENS; MAUGERI, 2010; DRIOUCH et al, 2010; EUZENAT, 1997; EL-REFAI et al., 2009, SILVA et al., 2014).

Utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis* ZAG 12, Coimbra et al. (2002) estudaram as melhores condições para a produção de levana e oligossacarídeos por fermentação submersa, com sacarose como substrato. Os resultados indicaram a influência da temperatura na produção de exopolissacarídeos, apresentando massas moleculares distintas, sendo que a temperatura mais alta estudada, 30 °C, favoreceu a síntese de oligossacarídeos (116,38 g. L<sup>-1</sup>), enquanto temperaturas menores favoreceram a produção de polímeros com pesos moleculares maiores, como a levana.

Em estudos sobre a produção de levana e FOS por *Zymomonas mobilis*, Coimbra (2006) testou as temperaturas de 30, 35 e 40 °C e o tempo de fermentação em 12, 24, 48 e 72 h. Os resultados indicaram 40 °C como a melhor temperatura para a produção de FOS, atingindo 32,4 g. L<sup>-1</sup> em meio com 150 g. L<sup>-1</sup> de sacarose em 24 horas de fermentação. Observou-se

também que a produção de FOS teve início antes das 12 horas e declínio após 24 horas quando iniciou-se a produção de levana.

Linhagens microbianas osmofílicas, isoladas a partir de amostras de favo mel e frutos do cerrado, foram testadas quanto a sua eficiência na produção de FOS por fermentação submersa, variando-se parâmetros como tempo de fermentação e concentração inicial de sacarose. Observou-se uma relação direta da concentração de sacarose com a produtividade, sendo as melhores produções obtidas nas maiores concentrações de sacarose do meio de cultivo (60 e 70%). Ainda neste trabalho, a influência do tempo de fermentação foi testada em 24, 48 e 72 horas observou-se aumento de frutofuranosil-nistose (GF<sub>4</sub>) e redução de cestose (GF<sub>2</sub>) a partir de 48 horas de fermentação para a linhagem *Penicillium sp.* LBJBS01 e para a linhagem *Penicillium sp.* LBJBS02 a produção foi crescente durante 24 horas de fermentação com posterior consumo de cestose para a produção de outros oligossacarídeos (SILVA, 2008).

O efeito de variações no pH (4,5 – 6,0), temperatura (28, 30 e 32 °C), agitação (150, 200 e 250 rpm), concentração de sacarose (200, 300 e 400 g. L<sup>-1</sup>) na produção de FOS por *Aureobasium pullulans* foi avaliado por Silva et al. (2011). Dentre os parâmetros testados, a concentração de sacarose e a temperatura mostraram efeito positivo na produção de FOS obtendo rendimentos de 54,7 % em fermentações com sacarose em 400 g. L<sup>-1</sup>, a 32 °C em 48 h de fermentação.

Silva et al. (2014) estudaram a produção de FOS por fermentação submersa de *Bacillus subtilis* natto, variando parâmetros fermentativos como concentração de sacarose (216 a 384 g. L<sup>-1</sup>), pH (4,3 a 7,7) e agitação (66 a 234 rpm) e os resultados indicaram a otimização da produção em 300 g L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,7 e agitação de 234 rpm, alcançando produção de 98,86 g. L<sup>-1</sup> em 24 horas de fermentação.

### 2.2.3 Efeito de Sais na Produção de FOS

A adição de sais minerais aos meios de fermentação pode influenciar a biossíntese de exopolissacarídeos de forma que esta pode ser intensificada ou reprimida de acordo as especificidades de cada microrganismo (VIGANTS et al., 1998; VIGANTS et al., 2000; ARUNDHATI et al., 2011; SILVA et al., 2011).

O efeito de diferentes concentrações de sais sobre a produção de FOS foi estudado por Vigants et al. (2000) que relataram aumento de 3,5 vezes na produção por *Z. mobilis* 113S, quando adicionado NaCl em concentração 0,6 M a um meio de fermentação com 10% de sacarose. Entretanto, quando a concentração de sacarose foi aumentada para 65%, o sal mostrou efeito inibitório sobre a produção de FOS. Os autores sugerem que a produção de FOS frente a este sal é justificada como um mecanismo de osmoproteção desenvolvido pelo microrganismo para a regulação da osmolaridade do meio.

Arundhati et al. (2011), em estudos de purificação e caracterização de levasacarase de uma cepa fixadora de nitrogênio - *Acetobacter nitrogenifigens* RG1, observaram que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  não afetaram a atividade enzimática, entretanto, houve ativação em 33% na atividade hidrolítica da enzima e cerca de 5 a 7 vezes na atividade de polimerização na presença do íon  $\text{Hg}^{2+}$ , quando comparado com o controle. Os autores sugeriram que o íon  $\text{Hg}^{2+}$  poderia estar envolvido na reorganização da estrutura tridimensional da enzima, compactando-a de forma a favorecer a ligação do substrato ao sítio ativo.

Silva et al. (2011) testaram o efeito de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na produção de FOS por biotransformação da sacarose utilizando *Aureobasium pullulans* verificando que o  $\text{MnSO}_4$  apresentou efeito significativo e positivo ( $\alpha=0,2$ ).

Belghith et al. (2012) estudaram a produção de levanasacarase de *Bacillus* sp para a síntese de FOS e levana, verificando que  $\text{FeSO}_4$  ativou em 4 vezes e  $\text{MgSO}_4$  ativou em 3 vezes a atividade da enzima.

#### 2.2.4 Substratos Alternativos na Produção de FOS

O uso de substratos alternativos (subprodutos ou resíduos industriais) tem sido uma tendência crescente em processos biotecnológicos, quando se visa minimizar os custos na manufatura de produtos passíveis de serem obtidos em processos fermentativos. O melão e caldo de cana-de-açúcar têm recebido especial atenção devido a seu baixo custo, alta disponibilidade e alto teor de açúcares fermentescíveis (BICAS, et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2007).

A produção de frutossiltransferases (FTases) por fermentação de *Aspergillus oryzae* CFR 202 utilizando farelo de arroz e farelo de trigo com substratos alternativos, foi testada por Sangeetha; Ramesh; Prapulla (2004). Estas enzimas mostraram alta produtividade de FOS – cerca de 60% (w/v) em 8 horas de reação.

Shin (2004) utilizou melão de cana-de-açúcar como substrato para a produção de FOS por *Aureobasidium pullulans* KCCM na concentração de 360 g. L<sup>-1</sup> a 55 °C por 24 horas, com rendimento de 166 g. L<sup>-1</sup>.

Silva (2008) isolou e identificou fungos *Penicillium sp* e *Aureobasidium pullulans* e uma bactéria *Bacillus sp* e testou a eficiência destes microrganismos na produção de FOS, em sacarose e melão de cana. O melão com 55,68% de açúcares redutores totais (ART) foi diluído a 20, 30 e 40% de ART. Os melhores rendimentos foram obtidos na diluição de 40% de ART e todas as linhagens apresentaram eficiência na produção de FOS, com rendimento na produção total de 60,07% para o meio sintético de sacarose e 40,8% em meio com melão como substrato em 24 horas de fermentação.

Ghazi et al. (2006) utilizaram xarope de açúcar e melão de beterraba, como substratos para a síntese enzimática de FOS. Utilizando aproximadamente 10U (unidade de atividade de transfrutossiltação) por grama de sacarose, a produção de FOS foi de 388 mg. mL<sup>-1</sup> em 30 horas de reação com xarope de açúcar como substrato e 235 mg. mL<sup>-1</sup> em 65 horas utilizando o melão de beterraba.

### 2.3 FUNCIONALIDADE DOS FOS

Frutooligosacarídeos desempenham funções importantes no organismo humano e animal sendo sua atividade prebiótica a de maior relevância.

O efeito prebiótico dos FOS no trato gastrointestinal resulta em outros benefícios ao organismo, dentre os quais se destacam a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, controle de glicemia, incremento na biodisponibilidade de nutrientes e minerais, aumento da produção de compostos imuno-estimulantes, que possuem atividade antitumoral, diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal normal durante terapia com antibióticos (BÚRIGO et al., 2007; FORTES; MUNIZ, 2009; LICHT; EBERSBACH; FRØKIÆR, 2012; KAUME et al., 2011; VAN VLIES et al., 2012).

Efeitos benéficos da ingestão de FOS são reportados em vários estudos. Búrigo et al. (2007) verificaram o efeito bifidogênico de FOS em pacientes com neoplasia hematológica, concluíram que a suplementação com FOS teve efeito positivo, promovendo um aumento significativo de bifidobactérias fecais em escala logarítmica de 11,8 para 14,8.

Tuohy et al. (2001) testaram o efeito prebiótico de biscoitos contendo goma-guar e FOS, em um estudo com voluntários humanos, e verificaram um aumento significativo de *Bifidobacterias* sp. com a ingestão dos biscoitos experimentais, quando comparado com os resultados da ingestão de biscoitos placebos. O número de *Bifidobacterias* aumentou de  $9,10 \log^{10}$  cel/g de fezes no pré-tratamento para  $9,59 \log^{10}$  cel/g de fezes após a ingestão dos biscoitos experimentais contendo 6,6 g de FOS e 3,4 g de goma-guar.

Kaume et al. (2011) investigaram efeitos da complementação de 5% (w / w) de FOS na dieta de ratos obesos, na melhoria dos perfis de lipídeos e glicose no soro e fígado e verificaram redução em 12% em níveis lipídicos totais no fígado e redução de insulina no soro sanguíneo em 3,6 vezes, quando comparado com o grupo controle.

O efeito de FOS e galactooligossacarídeos (GOS) na resposta imune foi testado por Van Vlies et al. (2012) em ratas grávidas verificando que, em comparação com ratas virgens, a suplementação com GOS e FOS suscitou reação imunológica mais tolerante, reduzindo a resposta de hipersensibilidade, além de um aumento significativo no número de macrófagos ativados na placenta. Ratas virgens que foram alimentadas com FOS e GOS, também tiveram melhora significativa na resposta a vacinação em comparação com ratos controle.

#### **2.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS E SAÚDE HUMANA**

Nos últimos anos, mudanças nos estilos de vida e nas dietas alimentares, em função do desenvolvimento econômico e da industrialização, são profundas e rápidas, causando impacto no estado nutricional das populações, com implicações na saúde, especialmente em condições crônicas como doenças cardiovasculares, sobrepeso, obesidade, hipertensão, dislipidemias, diabetes, síndrome metabólica, câncer e osteoporose. A Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, PNAD 2008, demonstrou que a medida em que a idade avança, aumenta a incidência das doenças crônicas, de tal modo que 79,1% dos brasileiros de 65 anos ou mais e 31,3% da população geral (60 milhões de pessoas) relatam ser portadores dessas doenças (BRASIL, 2012).

Por serem de longa duração, as doenças crônicas são as que mais demandam ações, procedimentos e serviços de saúde e estimativas de gastos com internações e atendimentos ambulatoriais relacionados a estas doenças estão em torno de R\$ 7,5 bilhões por ano (COUTINHO; GENTIL; TORAL, 2008).

Concomitante a essa problemática, observa-se um acelerado aumento na demanda por alimentos que satisfaçam as necessidades nutricionais básicas e tenham efeitos fisiológicos benéficos nos consumidores, inserindo-se, neste quesito, os alimentos funcionais (MORAES; COLLA, 2006).

A busca por alimentos funcionais teve início na década de 80, no Japão, através de um programa de governo que tinha como objetivo a redução de gastos com saúde pública através do desenvolvimento de alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida. A partir de então, em 1991, essa categoria de alimentos foi regulamentada, recebendo a denominação "*health foods*", que, na língua portuguesa fica denominado "alimentos funcionais" (ANJO, 2004).

Alguns critérios foram estabelecidos para que um alimento seja considerado funcional: devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual e seus efeitos devem ser obtidos em quantidades não tóxicas; devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças; devem ser compostos por componentes naturais; a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico; pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada e, por fim, não devem ser destinados a tratamentos ou cura de doenças (MORAES; COLLA, 2006; ROBERFROID, 2002).

A classificação dos alimentos funcionais insere-se fibras, ácidos graxos poli-insaturados, fito-químicos, peptídeos ativos (arginina e glutamina), probióticos (*Lactobacilos acidófilos*, *L.casei*, *L. bulgárico* e *L.lactis*) e prebióticos (inulina e frutooligossacarídeos) (MORAES; COLLA, 2006).

Prebióticos podem ser utilizados em uma ampla variedade de aplicações, principalmente na indústria alimentícia devido a suas propriedades e funcionalidade que, por sua alta relação com a saúde do sistema digestivo humano, impulsiona o mercado destes produtos (FEICK, 2009).

A maior parte do mercado prebiótico é regida pela fabricação de frutanos do tipo inulina e frutooligossacarídeos. Esse mercado movimentou, em 2008, cerca de 295,5 milhões de euros, com previsão de chegar a 766, 9 milhões em 2015, representando um volume de 204,8 toneladas e taxa de crescimento anual de 14%. Entretanto, os números conferidos em 2008 foram superiores aos previstos, o que demonstra a grande ascensão do mercado destes produtos (FEICK, 2009; MORRIS; MORRIS, 2012).

## 2.5 FOS COMO INGREDIENTE ALIMENTAR FUNCIONAL

No contexto atual, observa-se um acelerado aumento na demanda por alimentos que além de conterem ingredientes satisfatórios às necessidades nutricionais, de forma análoga, tenham funcionalidade na prevenção de doenças crônicas emergentes (PATEL; GOYAL, 2011).

Frutooligossacarídeos (FOS) são ingredientes alimentares por serem designados açúcares não convencionais com grande impacto na indústria alimentícia devido as suas características funcionais, aspectos fisiológicos e físicos: apresentam cerca de um terço do poder adoçante da sacarose e possuem alta solubilidade em água e solventes orgânicos. São açúcares não precipitáveis e, portanto, não promovem sensação de areia ou secura na boca; não são degradados na maioria dos processos de aquecimento, mas, podem ser hidrolisados em frutose quando submetidos a condições ácidas (FORTES; MUNIZ, 2009; YUN, 1996).

Considerando as características e funcionalidade dos FOS, estes podem ser aplicados na indústria alimentícia, sendo utilizados tanto para enriquecimento nutricional como para melhoramentos em características reológicas dos alimentos. FOS podem ser usados na fabricação de sorvetes, sobremesas lácteas, iogurtes, e outros produtos que tenham no rótulo especificações de “baixo teor de açúcar”, “sem adição de açúcar”, em formulações de produtos para diabéticos e em produtos funcionais que promovam efeitos adicionais como prebióticos, simbióticos e fibras dietéticas. Podem, também, ser utilizados em produtos de panificação, gerando produtos com teor reduzido de açúcar, em barras de cereais, sucos, néctares frescos, produtos de confeitaria, entre outros, e, também em produtos alimentares para animais (PASSOS; PARK, 2003).

Haully et al. (2005) avaliaram as características físico-químicas, microbiológicas e o índice de aceitação na elaboração de iogurte de soja suplementado com FOS, observando aumento da viabilidade das bactérias lácticas no iogurte, além de alterações em propriedades reológicas, neste caso, com aumento da viscosidade. Os autores sugeriram que o aumento da viscosidade esteja relacionado as características higroscópicas dos FOS, de

forma que estes se ligam as moléculas de água, formando uma rede coesa, o que promove o aumento da consistência do meio, através da formação de um gel estável. As análises sensoriais neste estudo mostraram índice de aceitação médio de 71,2%, sendo que 77,6% dos provadores atribuíram notas iguais ou superiores a 6.

Dutcosky et al. (2006) desenvolveram barras de cereais com propriedades prebióticas utilizando inulina (I), oligofrutose (OF) e goma acácia (GA) e, por teste de preferência obtiveram duas formulações otimizadas: 50 % de I + 50 % de OF + 0 % de GA e 8,46 % de I + 66,16 % de OF + 25,38 % de GA. A composição química das duas formulações otimizadas tiveram valores calóricos reduzidos em 18-20 % e aumento médio de 200 % em fibra total, quando comparadas com a formulação controle.

O efeito da suplementação de inulina e FOS sobre propriedades reológicas e sensoriais de pães foi estudado por Morris e Morris (2012) com objetivo de observar a viabilidade e aceitação destes produtos. Verificou-se que o efeito da suplementação de inulina / FOS em propriedades texturais e sensoriais depende do tipo de prebiótico (grau de polimerização), da quantidade acrescentada e da forma como o prebiótico é introduzido à massa (em pó ou gel, por exemplo). Os principais impactos sobre características reológicas relatados foram: redução no tamanho/volume do pão, aumento da dureza do miolo e crostas mais escuras. Os autores concluíram que a adição de 5% de inulina/FOS é viável e contribui para a ingestão de 0,7- 1,2 g de prebiótico por fatia de pão consumida.

A ingestão de FOS em 10 g /dia/ pessoa é considerada segura para efeitos colaterais como flatulência e desconfortos intestinais (PASSOS; PARK, 2003).

## **2.6 BARRAS DE CEREAIS**

O crescente interesse dos consumidores por alimentos nutritivos, naturais, seguros e com aporte calórico balanceado levou ao desenvolvimento

e ascensão das barras de cereais, com avanço de pesquisas voltadas a formas inovadoras de apresentação deste alimento.

No Brasil, a primeira barra de cereais foi lançada pela empresa Nutrimental em 1992 com a denominação *Chonk* mas, somente dois anos depois, quando a mesma empresa lançou a barra Nutry, ganhou espaço no mercado e atualmente é um de seus principais produtos. Já em 2005, várias empresas fabricavam barras de cereais disputando um mercado de R\$ 80 milhões a um crescimento de 25 % ao ano (SANTOS, 2010).

Cereais em barras constituem uma categoria particular de produtos de confeitaria de forma retangular, que se modificou com o passar dos anos, de um produto “duro” e crocante para um produto “macio” e mastigável. São vendidos em embalagens individuais, são fáceis de transportar, apresentando-se como um meio prático e conveniente de ingerir nutrientes e repor energia (BRITO et al., 2004).

Ingredientes para as formulações de barras de cereais podem ser classificados em três grupos: secos, aglutinantes e compostos de revestimento, sendo o último opcional. Os principais aspectos considerados na elaboração desses produtos incluem a escolha do cereal (aveia, trigo, arroz, entre outros); a seleção do carboidrato apropriado de forma a manter o equilíbrio entre o sabor, valor nutricional, preservação da estabilidade durante o processamento e do prazo de validade do produto (CARVALHO, 2008).

Atributos sensoriais como aroma, sabor, textura e aparência são fatores importantes e interferentes na intenção de compra dos consumidores de forma que, associados à procura por benefícios à saúde, têm possibilitado o desenvolvimento de barras de cereais com novos ingredientes alimentícios, nutritivos e funcionais (MATSUURA, 2005; SILVA et al., 2009).

As formulações das barras podem ter níveis de complexidade variados e as proporções entre os grupos de ingredientes podem ser estabelecidas em 20-60% de grãos integrais do grupo de aveia, trigo, flocos de trigo, cevada, flocos de cevada com casca, sorgo e milho; 35-60% de aglutinantes, incluindo composições de carboidratos como xaropes, caramelos compostos por oligofrutoses, inulina e misturas dos mesmos, e 5-40% de

compostos de revestimento podendo conter gordura, carboidratos, flavorizantes e fibras (COLEMAN et al., 2007 *apud* TORRES, 2009).

Em formulações de barras de cereais, os componentes e suas proporções ocorrem de forma variada. Ramakrishna, Reddy, Reddy (2005), patentearam uma formulação de barra de cereal que inclui açúcar mascavo de 30 a 50%; xarope de glucose de 25 a 45%; gordura de 0 a 15%; produtos de arroz extrusado de 8 a 20%; amidos de 0,5 a 5.0%; amendoins torrados de 0 a 15%; e água de 5 a 12%. Becker e Krüger (2010) desenvolveram barras de cereais utilizando ingredientes alternativos: sementes e farinha de casca de maracujá e sementes de abóbora, melão e melancia além dos ingredientes básicos, flocos de aveia, açúcar mascavo, flocos de arroz, gergelim, linhaça e mel.

## **2.7 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO**

Os planejamentos experimentais são ferramentas importantes quando o objetivo é obter às condições otimizadas de um processo, desenvolver formulações de produtos dentro das especificações desejadas e avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm nas respostas desejadas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001)

O uso de planejamentos experimentais é uma prática crescente sendo aplicado em uma variedade de atividades científicas e industriais visando obter vantagens como redução de variações nos processos e melhor concordância entre os dados obtidos e redução em tempo e custo nos processos. A economia e eficiência dos planejamentos experimentais se deve ao fato de os dados gerados resultarem em modelos matemáticos que descrevem os fenômenos com um número reduzido de experimentos (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Para a organização dos planejamentos, deve-se definir os parâmetros do processo, as variáveis controle e as variáveis resposta para se obter como resultados, coeficientes numéricos, superfícies de resposta e

variáveis estatísticas que permitam validar o experimento, mensurar sua capacidade preditiva e fazer previsões. A validação do experimento e da sua capacidade preditiva ocorre pela análise de variáveis estatísticas como o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) que pode variar de 0 a 1 de maneira que quanto mais próximo a 1, maior é a sua capacidade preditiva. Outra variável importante é a probabilidade de significância do modelo; esta determina se o modelo ajustado pode ser utilizado para descrever a relação entre os fatores testados e as respostas obtidas (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

A metodologia de superfície de resposta é um delineamento estatístico de experimentos que utiliza técnicas matemáticas e estatísticas para a modelagem e análise de problemas nos quais a resposta de interesse é influenciada por uma ou mais variáveis e o objetivo é otimizar esta resposta. Dessa forma, os fatores que afetam o processo podem ser otimizados de acordo com as especificações do produto final requerido. Isso pode ser expresso como:

$$y = f(x_1, x_2, \dots) + e$$

onde  $x_1$ ,  $x_2$  são as variáveis independentes e  $y$  a resposta dependente das variáveis. A variável dependente  $y$  é uma função de  $x_1$ ,  $x_2$  e a extensão do erro experimental  $e$ . O termo erro experimental é denotado como a medição do erro de uma resposta bem como outros tipos de variações que porventura ocorrer em  $f$ , sendo, portanto, um erro estatístico assumido para a distribuição normal de médias e variância (KHURI; MUKHOPADHYAY, 2010).

A análise de variância (ANOVA) é empregada para a determinação das variáveis significativas no processo uma vez que permite a classificação e classificação cruzada dos resultados estatísticos sendo estes testados por diferenças específicas destas classificações através do teste  $F$ . O valor de  $F$  é definido pela razão entre a raiz quadrada da média de regressão e o erro, representando a significância de cada variável no modelo testado (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A metodologia de superfície de resposta é uma ferramenta importante em concepções, formulações, desenvolvimento e análise de produtos de interesse científico, uma vez que possibilita a otimização de

processos. A produção de FOS pode utilizar esta metodologia estatística para a otimização de meios de cultivos e parâmetros fermentativos que possam influenciar as respostas pretendidas (SANGEETHA et al., 2004; LIU et al., 2010; SILVA et al., 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de frutooligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 por metodologias estatísticas para aplicação como prebiótico em barras de cereais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção de FOS por *B. subtilis* natto variando temperatura, tempo e concentração de sacarose por metodologia de superfície de resposta;
- Verificar o efeito de sais na produção de FOS com delineamento experimental de mistura;
- Testar o efeito do melaço e caldo de cana-de-açúcar na produção FOS;
- Produzir, separar e purificar os FOS;
- Desenvolver formulações de barras de cereais utilizando diferentes concentrações de FOS;
- Caracterizar as barras de cereais quanto a sua composição centesimal;
- Avaliar as propriedades sensoriais das barras de cereais desenvolvidas em testes de aceitação e intenção de compra.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Microrganismo

Para a produção de FOS, foi utilizado o *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, microrganismo isolado do alimento japonês Natto pelo Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello – Campinas – SP.

#### 4.1.2 Substratos alternativos para fermentações

O melaço de cana-de-açúcar, utilizado para a produção de FOS, foi cedido pela COROL Cooperativa Agroindustrial e o caldo de cana adquirido no comércio local.

#### 4.1.3 Meios de cultivo

##### 4.1.3.1 Meio de preservação

**Tabela 1** - Meio de preservação para *B. subtilis* natto.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Peptona	50
Extrato de carne	30
Ágar	20

##### 4.1.3.2 Meio de inóculo

**Tabela 2** - Meio de inóculo para *B. subtilis* natto.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sacarose (comercial)	100
Extrato de levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,5

**Fonte:** CALAZANS et al., 2000

## 4.1.3.3 Meio de fermentação

**Tabela 3** - Meio de fermentação

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sacarose	*
Extrato de Levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,6
MnSO <sub>4</sub>	0,2

\* Concentração variável de acordo com as condições dos delineamentos experimentais.

**Fonte:** EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997, modificado

## 4.1.3.4 Meio de fermentação para verificação do efeito de sais

**Tabela 4** - Meio de fermentação para o efeito de sais na produção de FOS.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sacarose	*
Extrato de Levedura	2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	**
MnSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	**
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	**
NaCl	**
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,6

\* Concentração otimizada em estudos anteriores;

\*\* Valores variáveis de acordo com o planejamento estatístico de mistura de sais (item 4.2.2.4).

**Fonte:** SILVA, et al. (2011), modificado.

## 4.1.3.5 Meios de fermentação com substratos alternativos

**Tabela 5** - Meio de fermentação com caldo de cana.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Sacarose + caldo de cana	*
Extrato de Levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,6
MnSO <sub>4</sub>	0,2

\* Associação do caldo de cana e sacarose para obtenção da concentração de sacarose otimizada em etapas anteriores da síntese microbiológica de FOS.

**Tabela 6** - Meio de fermentação com melaço de cana.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Melaço de cana	*
Extrato de Levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,6
MnSO <sub>4</sub>	0,2

\*Diluição do melaço para obtenção da concentração de sacarose otimizada em etapas anteriores da síntese microbiológica de FOS.

## 4.1.4 Ingredientes Utilizados na Elaboração de Barras de Cereais

Os ingredientes utilizados na elaboração de barras de cereais estão listados na Tabela 7. Estes foram adquiridos no comércio local, com exceção dos FOS, que foram produzidos por fermentação nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

**Tabela 7** - Ingredientes secos e aglutinantes utilizados nas formulações de barras de cereais.

	Formulações (g/1000g)			
	A	B	C	D
<b>Ingredientes Secos</b>				
Aveia flocos finos	140	140	140	140
Farinha de trigo integral	100	100	100	100
Castanha do Pará	60	60	60	60
Amendoim	50	50	50	50
Flocos de arroz	120	120	120	120
Fruta desidratada (morango)	60	60	60	60
<b>Aglutinantes</b>				
Açúcar mascavo	100	100	100	100
Água (mL)	180	180	180	180
Gordura Vegetal	40	40	40	40
Xarope de glicose	150	100	50	*
FOS	*	50	100	150

\* Ausência do ingrediente

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação dos Microrganismos

O *Bacillus subtilis* natto foi crescido a 37°C, por 48 horas em meio de preservação descrito no item 4.1.2.1, Tabela 1 e mantido a 4°C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada quarenta e cinco dias.

### 4.2.2 Métodos Fermentativos

#### 4.2.2.1 Inóculo

O inóculo foi obtido por fermentação submersa a 37 °C por 48 horas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio (composição descrita no item 4.1.3.2). Após o tempo de cultivo, o meio foi centrifugado por 15 minutos a 9056 xg e as células ressuspensas

asépticamente em solução salina (NaCl 0,9 %). Realizou-se leituras de absorvância a 400nm e estas foram correlacionadas com a curva de biomassa em  $\text{g.L}^{-1}$ . Todas as fermentações foram padronizadas com inóculo de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  de células.

#### 4.2.2.2 Produção de FOS

Com objetivo avaliar o efeito de parâmetros fermentativos e obter a otimização da produção de FOS, as fermentações seguiram delineamento experimental Box-Behnken, com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Tabela 8). As variáveis testadas foram: concentração de sacarose ( $X_1$ ), temperatura ( $X_2$ ) e tempo de fermentação ( $X_3$ ).

Realizou-se dois delineamentos experimentais nos quais foram testados diferentes níveis das variáveis (Tabela 8) com objetivo de obter a faixa de variação que correspondesse a otimização nas respostas: produção ( $Y_1$ ) e produtividade ( $Y_2$ ) de FOS. Os níveis decodificados das variáveis testadas nos delineamentos são representados na Tabela 8. O pH e a agitação foram fixados em 7,7 e 230 rpm, respectivamente; condições estabelecidas em estudo anterior (Silva et al. 2014).

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio com composição descrita no item 4.1.3.3; a interrupção das mesmas ocorreu por centrifugação a  $9056 \times g$ , 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para separação da biomassa. A partir do sobrenadante foram analisadas a produção ( $\text{g. L}^{-1}$ ) e produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) de FOS.

Os resultados obtidos foram comparados com o valor esperado ao nível de 5% de significância, realizado no programa Statistica 9.0.

**Tabela 8** – Delineamento experimental Box- Behnken para testar o efeito da concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação na produção e produtividade de FOS por *B. subtilis* natto

Ensaio	Níveis codificados			Respostas	
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	( $Y_1$ ) FOS (g. L <sup>-1</sup> )	( $Y_2$ ) FOS (g. L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )
1	+	+	0		
2	+	-	0		
3	-	+	0		
4	-	-	0		
5	+	0	+		
6	+	0	-		
7	-	0	+		
8	-	0	-		
9	0	+	+		
10	0	+	-		
11	0	-	+		
12	0	-	-		
13	0	0	0		
14	0	0	0		
15	0	0	0		

Variáveis		Níveis reais		
		-	0	+
Delineamento experimental I	( $X_1$ ) Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	200	300	400
	( $X_2$ ) Temperatura (°C)	35	45	55
	( $X_3$ ) Tempo (h)	12	24	36
Delineamento experimental II	( $X_1$ ) Sacarose (g. L <sup>-1</sup> )	325	400	475
	( $X_2$ ) Temperatura (°C)	30	35	40
	( $X_3$ ) Tempo (h)	24	36	48

#### 4.2.2.3 Cinética de produção de FOS

Para avaliar a influência do tempo de fermentação na produção de FOS, foram realizadas fermentações variando o tempo em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas.

As fermentações foram em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio com composição descrita no item 4.1.3.3 com sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup>; pH 7,7; 230 rpm e 35°C. Os ensaios foram em triplicata e, após cada tempo, as fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9056 x g, 15 minutos a 4°C para separação da biomassa e obtenção do extrato livre de células (ELC). A partir do ELC, foram analisado a produção (g. L<sup>-1</sup>) e produtividade (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de FOS. As determinações de FOS total foram definidas como a soma das produções de nistose e cestose.

#### 4.2.2.4 Influência de sais na produção de FOS

A partir das condições otimizadas na etapa anterior (Item 4.2.2.2) realizou-se nova fermentação para verificar a influência de sais na produção de FOS utilizando delineamento estatístico de misturas, com quatro repetições no ponto central, totalizando 14 experimentos (Tabela 9).

A concentração dos sais variou em (g. L<sup>-1</sup>): (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (X<sub>1</sub>) de 3 a 12; MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (X<sub>2</sub>) de 0,2 a 0,8; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (X<sub>3</sub>) de 0,0063 a 0,025 e NaCl (X<sub>4</sub>) de 8,75 a 35.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio com composição descrita no item 4.1.3.4, a interrupção das mesmas ocorreu por centrifugação a 9056 x g, 15 minutos a 4°C para separação da biomassa. A partir do sobrenadante foram analisadas a produção (g. L<sup>-1</sup>) e produtividade (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de FOS.

**Tabela 9** - Delineamento estatístico de mistura para avaliar o efeito de sais na produção de FOS por *B.subtilis* natto.

Ensaio	Variáveis codificadas				Componentes			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g. L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> MnSO <sub>4</sub> (g. L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> ZnSO <sub>4</sub> (g. L <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> NaCl (g. L <sup>-1</sup> )
1	1,00	0,00	0,00	0,00	12	0	0	0
2	0,00	1,00	0,00	0,00	0	0,8	0	0
3	0,00	0,00	1,00	0,00	0	0	0,0255	0
4	0,00	0,00	0,00	1,00	0	0	0	35
5	0,50	0,50	0,00	0,00	6	0,4	0	0
6	0,50	0,00	0,50	0,00	6	0	0,0125	0
7	0,50	0,00	0,00	0,50	6	0	0	17,5555
8	0,00	0,50	0,50	0,00	0	0,4	0,0125	0
9	0,00	0,50	0,00	0,50	0	0,4	0	17,5555
10	0,00	0,00	0,50	0,50	0	0	0,0125	17,5555
11 <sup>(a)</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25	3	0,2	0,0063	8,7555
12 <sup>(b)</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25	3	0,2	0,0063	8,7555
13 <sup>(b)</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25	3	0,2	0,0063	8,7555
14 <sup>(b)</sup>	0,25	0,25	0,25	0,25	3	0,2	0,0063	8,7555

<sup>(a)</sup> Ponto central;

<sup>(b)</sup> Replicatas do ponto central.

#### 4.2.2.5 Produção de FOS utilizando substratos alternativos

A partir das condições previamente otimizadas quando aos parâmetros fermentativos (concentração de sacarose, temperatura, tempo de fermentação) e adição de sais, realizou-se fermentações utilizando caldo e melaço de cana para analisar a produção de FOS.

O caldo e o melaço foram, previamente, quantificados quanto aos teores de açúcares totais (AT) pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956). As concentrações de açúcares dos meios de fermentação foram ajustadas em 200, 300 e 400 g. L<sup>-1</sup>. Para o melaço foram realizadas diluições até atingir as

concentrações e para o caldo os ajustes foram com adição de sacarose comercial. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio (item 4.1.3.5) mantidas em incubação por 24 horas a 230 rpm e 35 °C. As fermentações foram em triplicata e a produção de nistose foi determinada no sobrenadante, após centrifugação.

#### 4.2.2.6 Produção de FOS para aplicação como ingrediente em barras de cereais

Na melhor condição dos parâmetros testados (sacarose, temperatura, tempo de fermentação e adição de sais) na produção de FOS, estabelecida nas etapas anteriores, foram realizadas fermentações em escala maior para a obtenção e aplicação como ingrediente em barras de cereais.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 1L, contendo 250 mL de meio (item 4.1.3.3) em sacarose a 475 g. L<sup>-1</sup>, em pH 7,7 a 230 rpm, 35 °C por 24 h. As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9056 xg para a obtenção do extrato livre de células (ELC). O ELC foi filtrado em membrana Ultracel YM de porosidade de 3 kDa para remoção dos polissacarídeos. Após filtração do ELC, os FOS foram precipitados com etanol absoluto gelado na proporção (1:3 v/v) (BEKERS et al., 2002). O precipitado foi seco a 70°C até completa eliminação do solvente. As determinações de FOS foram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4.2.3 Métodos Analíticos

##### 4.2.3.1 Curva de biomassa

Para confeccionar a curva de biomassa do *Bacillus subtilis* natto CCT7712, um cultivo foi realizado em sacarose e a biomassa, obtida após centrifugação foi lavada com água destilada e ressuspensa em solução salina NaCl 0,9 g/%. Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma sequência de diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,7 de absorvância em  $\lambda = 400$  nm. Paralelamente, 3 alíquotas de 1 mL foram distribuídas em cadinhos,

previamente tarados e levados à estufa (70°C), até atingir peso constante. Em seguida, os dados foram plotados relacionando absorvância x peso seco g. L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.2 Quantificação da biomassa

Ao final das fermentações, os meios de cultivo foram centrifugados a 9056 xg por 15 minutos a 4°C, a biomassa foi ressuspensa em solução salina (NaCl 0,9 g/%) e determinada por espectrofotometria a  $\lambda = 400$  nm. O valores obtidos foram relacionados à curva de biomassa em g.L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.3 Determinação de FOS

As fermentações foram interrompidas por centrifugação para separação da biomassa e obtenção do extrato livre de células (ELC). O ELC foi submetido a ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa para concentração dos FOS e remoção dos polissacarídeos. A partir do ELC ultrafiltrado, determinou-se a produção de FOS.

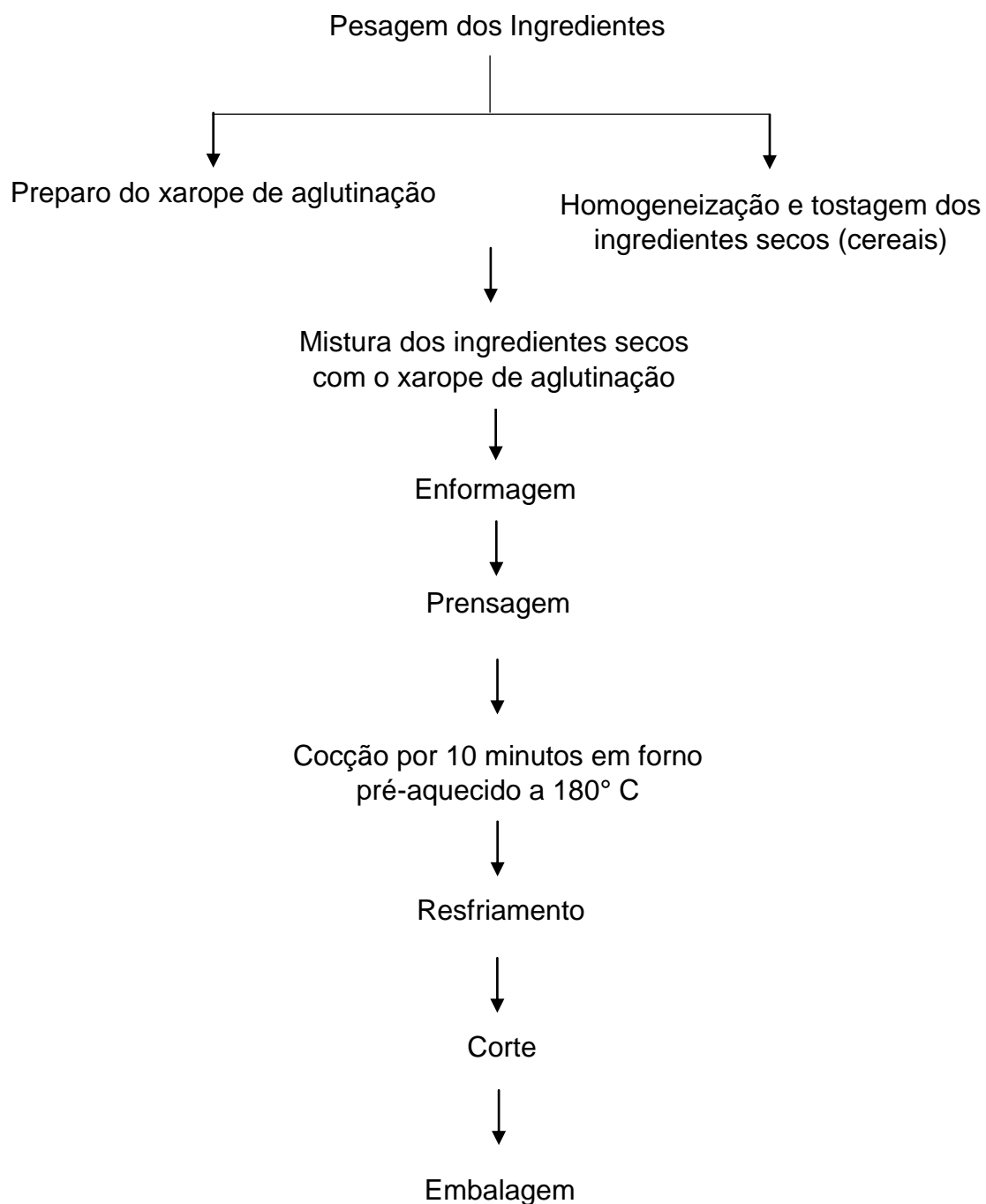
A quantificação dos FOS foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando equipamento Shimadzu acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10<sup>a</sup> e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm Biorad). A coluna foi mantida a 80 °C e as amostras (20  $\mu$ L) foram eluídas a um fluxo de 0,6 mL/min com água Milli-Q. Os FOS foram quantificados utilizando curvas de calibração de cestose (GP<sub>2</sub> – 504,44 Da) e nistose (GP<sub>3</sub> - 666,58 Da), grau HPLC da Sigma-Aldrich, como padrões. A produção de FOS total foi determinada pela soma de cestose e nistose e expressa em g. L<sup>-1</sup>.

As respostas obtidas dos modelos experimentais foram submetidas ao programa STATISTICA 9.0 para análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5%.

#### 4.2.4 Elaboração de Barras de Cereais

Os FOS, obtidos por fermentação em larga escala, na condição otimizada, foram aplicados, juntamente aos demais ingredientes (Tabela 7) para a elaboração de barras de cereais. As barras foram elaboradas em lotes de 1,5 Kg de acordo com o fluxograma ilustrado na Figura 2.

**Figura 2** - Fluxograma de elaboração das barras de cereais



As barras de cereais foram elaboradas no Laboratório de Avaliação Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL e o processo foi realizado em duas etapas: primeiro foi preparado o xarope de aglutinação por aquecimento dos ingredientes aglutinantes (Tabela 7) e por último, os ingredientes secos (Tabela 7) foram tostados e misturados ao xarope aglutinação.

A formulação base foi composta por 53% de insumos secos e 47% de xarope de aglutinação, sendo isenta de FOS. Nas formulações testes, os FOS foram adicionados em 5, 10 e 15% em substituição ao xarope de glicose. As concentrações de FOS definidas de acordo Franck (2002), que relata como concentração ideal de oligofrutoses em cereais os valores entre 2 a 15% (v/v), e com Passos e Park (2003) que recomendam o consumo de doses diárias de FOS de 10 g/dia.

#### 4.2.4.1. Composição química centesimal

Análises de composição química centesimal foram realizadas nos Laboratórios de Análises Físico/Químicas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UEL. As determinações de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas foram realizadas de acordo com as normas da AOAC (1997). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem.

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa, baseando-se na perda de peso do material submetido a aquecimento a 105 °C até peso constante.

A determinação de proteína foi realizada pelo método Kjeldahl, no qual determina-se, primeiramente o percentual de nitrogênio orgânico, após digestão, destilação e titulação da amostra e o valor encontrado é multiplicado pelo fator de conversão (6,25) em proteína bruta.

O percentual de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet, realizando-se extração a quente com éter de petróleo em refluxo por 6 horas após o que, faz-se a quantificação por gravimetria.

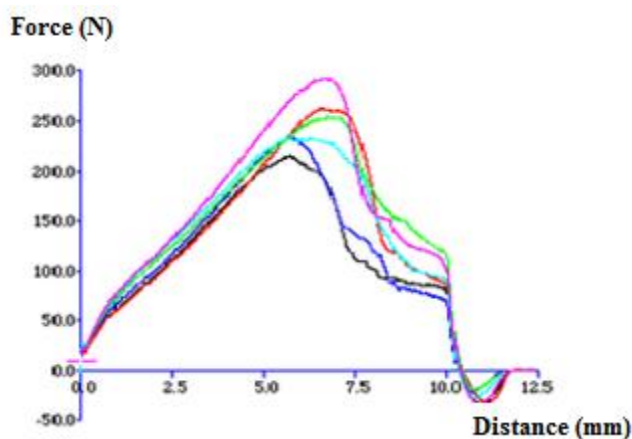
O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado pela calcinação das amostras em mufla a 550 °C, até a obtenção de cinzas claras e ligeiramente acinzentadas, sendo estas, após resfriamento, quantificadas por gravimetria.

Carboidratos totais foram estimados por diferença, conforme segue: % Carboidratos Totais = 100 – (Umidade + Lipídeos + Proteínas + Cinzas).

#### 4.2.4.2 Análise de textura instrumental

A textura das barras de cereais foi analisada quanto a dureza e fraturabilidade em analisador de textura TA.XT. plus (Stable Micro Systems) com acessório HDP/3PB e macro Biscuits BIS4-3-PB. O equipamento operou nas seguintes condições: medida de força em compressão; velocidade do pré-teste: 1 mm / s; velocidade do teste: 2 mm / s; velocidade do pós-teste: 10 mm / s e distância de 15 mm. As medições ocorreram na parte central das amostras; a força (N) necessária para fraturá-las foi considerada como a medida da dureza, enquanto a fraturabilidade foi referida como a distância até ao ponto de quebra, sendo esta, inversamente proporcional a fraturabilidade da amostra. Em gráfico bidimensional, a dureza é representada pela abscissa e a fraturabilidade pela ordenada, conforme exemplo na Figura 3.

**Figura 3.** Gráfico de textura instrumental para análise de dureza e fraturabilidade



Fonte: Stable Micro Systems

A análise seguiu delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 repetições e os dados foram tratados por ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ( $p = 0,005$ ).

#### 4.2.4.3 Análise microbiológica

Análises microbiológicas foram procedidas previamente à avaliação sensorial para verificação da conformidade ao Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, de acordo com o órgão competente, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.

Os microrganismos analisados foram *Bacillus cereus*, Coliformes a 45 °C e *Salmonella* sp e as análises seguiram metodologia recomendada por SILVA et al. (1997).

As análises de coliformes a 45°C foram realizadas através da técnica do Número Mais Provável (NMP) em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e contagem em Caldo Verde Brilhante Bile (VB) com tubos de Durhan.

Para a detecção de *Bacillus cereus*, utilizou-se a técnica de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em meio Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP), seguindo etapas de preparação e diluições seriadas da amostra, inoculação em ágar MYP, incubação, contagem das colônias presuntivas, confirmação das colônias em ágar nutriente e cálculo dos resultados expressos em UFC/g ou mL em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

A detecção de *Salmonelas* sp também seguiu a metodologia recomendada por SILVA et al. (1997) com aplicação para qualquer tipo de alimento, em quatro etapas, conforme segue: 1- Pré-enriquecimento em caldo seletivo para recuperação de células injuriadas; 2- Enriquecimento em caldo seletivo para inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação do número de células de *Salmonella* sp; 3- Plaqueamento seletivo

diferencial para promover o desenvolvimento preferencial de *Salmonella* sp, com características distintivas e 4- Verificação das colônias típicas.

A quantidade máxima aceitável para *Bacillus cereus* segundo essa categoria de produto é de  $5 \times 10^2$  UFC/g, para Coliformes,  $5 \times 10^2$  NMP e *Salmonella* sp, ausente em 25 g de amostra. Estas especificações seguiram o requerido pela Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos e determina os critérios para a interpretação e conclusão dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano.

#### 4.2.4.4 Avaliação sensorial

A análise sensorial das barras de cereais foi procedida através de teste de aceitação, no qual avaliou-se os atributos aparência, aroma, sabor e textura, utilizando escala hedônica estruturada numérica verbal com nove pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = “gostei muitíssimo”). Paralelamente, foi requerido a cada julgador indicar sua intenção de compra utilizando escala de 5 pontos com os termos “decididamente eu compraria” e “decididamente eu não compraria” em seus extremos.

A análise sensorial, previamente aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina, (CAAE: 18509313.8.0000.5231; Parecer: 388.540, 2013), foi realizada no laboratório de avaliação sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e o teste foi aplicado a uma equipe composta por 99 julgadores não treinados, de ambos os sexos, recrutados entre alunos e funcionários da Universidade Estadual de Londrina.

A avaliação ocorreu em cabines individuais, sob luz branca equivalente a luz do dia; a sessão foi conduzida para avaliar as quatro formulações (A, B, C e D) que diferiram na concentração de FOS em 0, 5, 10 e 15 % (v/v), respectivamente. As amostras, em temperatura ambiente, foram apresentadas em ordem aleatória aos julgadores em pratos descartáveis com códigos de três dígitos aleatórios.

A análise sensorial seguiu delineamento de blocos completos casualizados no qual os tratamentos representaram as formulações e os blocos representaram os julgadores.

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey utilizando-se o Programa SAS 9.0. O nível de significância empregado foi de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho foram apresentados na forma de artigo científico, registro de patente e resultados complementares.

O artigo científico intitulado “Alta produção de nistose por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712: estudo de fatores fermentativos e substratos alternativos” é apresentado no item 5.1 e será submetido de acordo com as normas do periódico Applied Microbiology and Biothechnology (anexo A).

O pedido de patente intitulado “Obtenção biotecnológica de frutooligossacarídeos: otimização de processo e aplicação em alimento” é apresentado, parcialmente, no item 5.2. O tópico “Descrição detalhada” foi retirado do Formulário de Declaração de Invenção por necessidade de sigilo até a efetivação do registro da patente.

Resultados complementares são apresentados no item 5.3.

## 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

### **Alta produção de nistose por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712: estudo de fatores fermentativos e substratos alternativos**

Dieyssi Alves dos Santos<sup>a</sup>, Dionísio Borsato<sup>b</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Bioquímica e Biotecnologia e <sup>b</sup>Departamento de Química  
Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380,  
Campus Universitário Cx. Postal 10.011 CEP 86.057-970 Londrina, Paraná, Brasil.

\* Autor para correspondência Tel.: +55 43 33714513

E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

#### **Resumo**

Nistose é um oligômero de frutose considerado açúcar não-convencional com propriedade prebiótica, podendo ser utilizado no desenvolvimento de produtos alimentícios que conferem benefícios fisiológicos aos consumidores. A produção de nistose por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 foi avaliada quanto a concentração de substrato, temperatura, tempo de fermentação e adição de sais aos meios de cultivo, utilizando metodologias estatísticas. Também foram avaliados substratos alternativos, o melaço e caldo de cana-de-açúcar, na produção de nistose. As fermentações ocorreram em batelada com inóculo de 0,2 g. L<sup>-1</sup> de células a 230 rpm e pH 7,7 e os demais parâmetros foram ajustados de acordo com os delineamentos experimentais. A concentração de sacarose e a adição de MnSO<sub>4</sub> foram os parâmetros de maior influência na produção de nistose, mostrando efeito positivo. O microrganismo mostrou alta eficiência com produção de 179,77 g. L<sup>-1</sup>, produtividade de 7,49 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> e rendimento de 71,73% em sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C em 24 h e com adição de 0,8 g. L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>. A maior produtividade alcançada foi de 9,36 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> em sacarose a 300 g.L<sup>-1</sup>, 35 °C e 12 h. O caldo de cana como substrato nas fermentações, mostrou ser uma alternativa viável para a obtenção microbiana de nistose, atingindo a produção de 97,93 g. L<sup>-1</sup>, produtividade de 4,08 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> e rendimento de 52,17% em 24 h a 230 rpm, 35 °C em 300 g. L<sup>-1</sup> de açúcares totais.

**Palavras-chave** Frutooligossacarídeos. Prebióticos. *Bacillus subtilis* natto. Caldo de cana. Melaço de cana

## **Introdução**

Nos últimos anos, o consumo de alimentos com valor nutricional, que mantenham a saúde e previnam doenças, tem aumentado. Carboidratos não digeríveis como os oligossacarídeos tem ganhado destaque devido aos benefícios fisiológicos conferidos aos consumidores (Patel e Goyal 2011).

O mercado de prebióticos, principalmente polímeros e oligômeros de frutose como inulina e frutooligossacarídeos (FOS), respectivamente, movimentou, em 2008, cerca de 295,5 milhões de euros, com previsão de chegar a 766,9 milhões em 2015, representando um volume de 204,8 toneladas com um crescimento anual de 14%, demonstrando a grande ascensão do mercado destes produtos. (Morris e Morris 2012)

FOS são constituídos principalmente por nistose, cestose e frutofuranosil-nistose nos quais as unidades frutossil são ligadas na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) da sacarose (Yun 1996); são carboidratos não-digeríveis devido a configuração dos carbonos anoméricos nas unidades monossacarídicas não serem suscetíveis a atividade hidrolítica das enzimas digestivas humanas. Os FOS chegam intactos ao cólon, onde são fermentados pelas bactérias nativas, liberando ácidos graxos de cadeia curta como o butirato, propionato e acetato. Estes compostos reduzem o pH do cólon, deixando o ambiente desfavorável à proliferação de bactérias patogênicas além de serem fonte de energia primária para as células do epitélio colônico (Mussatto e Mancilha 2007). Nistose é um tetrassacarídeo formado por duas unidades frutossil ligadas na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) da sacarose; devido a sua estrutura química é considerado um composto anticariogênico, possui cerca de 30 % da doçura da sacarose, podendo ser aplicado na indústria de alimentos em substituição a açúcares convencionais (Ikeda et al. 1990).

A produção de FOS por microrganismos ocorre pela atividade de enzimas denominadas  $\beta$ -frutossiltransferases ou  $\beta$ -frutofuranosidases que sintetizam FOS a partir de substratos como a sacarose por três reações enzimáticas: (1) hidrólise da sacarose em frutose e glicose, (2) polimerização de unidades frutossil e (3) reação de transferência de frutose para um aceptor, sintetizando um oligossacarídeo (Hijum 2003). A obtenção de FOS por microrganismo é uma alternativa viável considerando que ocorre por cultivos diretos com as células microbianas em substratos ricos em sacarose e em condições que podem ser manipuladas, tornando possível a otimização do processo (Yun 1996).

A produção de FOS também pode ser por via enzimática que ocorre em duas etapas: na primeira ocorre a produção da enzima e, na segunda, as enzimas produzidas são utilizadas para a síntese de FOS em sacarose e em condições específicas (Nemukula et al. 2009; Belghith et al. 2012; Chen et al. 2013; Dahech et al. 2013; Ganaie et al. 2014). A produção microbiana de FOS por fermentação é uma alternativa viável considerando que a etapa de purificação da enzima não é obrigatória reduzindo tempo e custo do processo (Prata et al. 2010).

Diversos microrganismos são produtores de FOS como *Aureobasidium pullulans* (Vaňková et al. 2008), *Aspergillus aculeatus* (Nemukula et al. 2009), *Penicillium expansum* (Prata et al. 2010), *Xanthophyces dendrorhour* (Ning et al. 2010), *Aspergillus niger* (Driouch et al. 2010), *Aspergillus japonicus* (Mussato e Teixeira 2010), *Bacillus* sp. (Belghith et al. 2012), *Bacillus subtilis* natto (Silva et al. 2014), *Aspergillus aculeatus* (Lorenzoni et al. 2014). Dentre estes microrganismos, o *Bacillus subtilis* natto tem se destacado em eficiência na produção de levana e FOS (Shih et al. 2010, Gonçalves et al. 2013). *B.subtilis* é utilizado para a fabricação do natto, alimento tradicional no Japão, produzido a partir de grãos de soja fermentados no qual o microrganismo é usado para aumentar o valor nutricional do produto (Hiroyuki 2000).

A produção de FOS pode ser influenciada por parâmetros fermentativos como concentração inicial de sacarose, pH, agitação, tempo de fermentação, temperatura e adição de sais aos meios de cultivo. A síntese de FOS por frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus*, foi estudada por Nemukula et al. (2009) em sacarose a 200, 400 e 600 g. L<sup>-1</sup>, observando que tanto as atividades de hidrólise da sacarose como as de transfrutossilção foram aumentadas em 88 % em meios com sacarose a 600 g. L<sup>-1</sup>. Silva et al. (2011) testaram diferentes parâmetros fermentativos na produção de FOS por *Aureobasium pullulans* dentre estes a concentração de sacarose em 200, 300 e 400 g. L<sup>-1</sup>, temperatura em 28, 30 e 32 °C e tempo de fermentação em 24, 48 e 72 h e verificaram maiores produções em meios com 400 g. L<sup>-1</sup> de sacarose a 32°C em 24 e 48 h com rendimento de 49,97 e 54,70 %, respectivamente. Silva et al. (2014) avaliaram as melhores condições para a produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto CCT7712 variando a concentração de sacarose em 216 a 384 g. L<sup>-1</sup>, o pH de 4,3 a 7,7 e a agitação de 66 a 234 rpm e determinaram as condições ótimas em 300 g. L<sup>-1</sup>, pH 7,7 e agitação em 234, alcançando produção de 98,86 g.L<sup>-1</sup>, comprovando que a produção de FOS é sujeita as condições de fermentação e que a manipulação de parâmetros fermentativos é de grande importância para a otimização do processo.

A adição de sais e íons aos meios de fermentação pode influenciar a produção de poli e oligossacarídeos, podendo ser intensificada ou reprimida, de acordo as especificidades de cada microrganismo e o sal testado. O NaCl aumentou em 10 vezes a produtividade de FOS por *Zymomonas mobilis* (Bekers et al. 2000),  $Hg^{2+}$  aumentou as atividades de hidrólise e polimerização de unidades frutossil em levanasacarase de *Acetobacter nitrogenifigens* (Paul et al. 2011),  $MnSO_4$  afetou positivamente a produção de FOS por *Aureobasidium pullulans* (Silva et al. 2011),  $FeSO_4$  ativou em 4 vezes e  $MgSO_4$  ativou em 3 vezes a atividade de levanasacarase de *Bacillus* sp. (Belghith et al. 2012).

O melaço e o caldo de cana-de-açúcar, produtos gerados na indústria sucroalcooleira no Brasil, são substratos complexos com elevada concentração de sacarose e grande variedade de sais necessários para a produção de metabolitos de interesse industrial como FOS (Shin et al. 2004), butanol (Ni et al. 2012), ácido láctico (Xu e Xu 2014). O melaço de cana-de-açúcar é conhecido por seu alto teor de açúcares e estes, geralmente, contribuem com 60-65% dos sólidos presentes. A sacarose, geralmente, compreende cerca de 65-70% dos açúcares totais e outros açúcares como glicose e frutose também estão presentes. Outros carboidratos, geralmente, compreendem 10-16% dos sólidos com compostos de pectina e produtos de reação presentes em quantidades significativas. Proteínas e aminoácidos representam cerca de 1-2% e minerais como cálcio, potássio, cloro e enxofre, contribuem com 8-17% dos sólidos no melaço. Vestígios de metais como ferro, zinco, cobre e magnésio também estão presentes no melaço de cana de açúcar (Oliveira et al. 2007).

A produção microbiana de FOS depende de avaliação de vários fatores que influenciam na otimização do processo e, para isso, o uso de planejamentos experimentais é uma prática crescente visando obter vantagens, como redução de variações nos processos, melhor concordância entre os dados obtidos além de redução em tempo e custo (Sangeetha et al. 2004, Driouch et al. 2010, Berté et al. 2013, Marques et al. 2014). Os planejamentos experimentais resultam em modelos matemáticos que descrevem os fenômenos com um número reduzido de experimentos (Granato e Ares 2014).

A produção de nistose por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 foi avaliada quanto ao efeito de fatores fermentativos (concentração de substrato, temperatura, tempo de fermentação) e adição de sais aos meios de cultivo, utilizando metodologias estatísticas

e, também, foi avaliada a produção de nistose em meios de fermentação com melaço e caldo de cana-de-açúcar como substratos alternativos.

## Material e Métodos

### Microrganismo, inóculo e fermentações

O *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 foi isolado do “natto”, um alimento japonês produzido a partir de grãos de soja fermentado, no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Brasil, e identificado pela Coleção de Culturas Tropicais - Fundação André Tosello – Campinas – Brasil. O microrganismo foi mantido a 4 °C em meio inclinado contendo (g. L<sup>-1</sup>): peptona 50, extrato de carne 30, ágar 20. As culturas foram renovadas a cada quatro semanas.

O inóculo foi preparado pela transferência da cultura estoque para frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio composto por (g. L<sup>-1</sup>): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 e MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 0,5. Após incubação por 48 horas a 150 rpm e 37°C, os meios foram centrifugados por 15 minutos a 9056 xg e as células foram ressuspensas assepticamente em solução salina (NaCl a 0,9 g/%). A concentração de células foi determinada por turbidimetria e o inóculo foi padronizado em 0,2 g. L<sup>-1</sup> de células em todas as fermentações.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio composto por (g. L<sup>-1</sup>): sacarose (Tabela 1), extrato de levedura, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3; MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 0,6; MnSO<sub>4</sub>, 0,2 a 230 rpm em pH 7,7, condição estabelecida em estudo anterior (Silva et al. 2014). A concentração de sacarose, temperatura e o tempo de fermentação foram ajustados de acordo com o delineamento estatístico (Tabela 1). As fermentações foram interrompidas por centrifugação a 9056 xg, 15 minutos a 4° e, do sobrenadante, foi determinado a produção (g. L<sup>-1</sup>) de nistose.

Efeito da concentração de sacarose, temperatura, tempo de fermentação e adição de sais na produção de nistose

Dois delineamentos experimentais foram realizados. O primeiro delineamento foi realizado para avaliar a influência da concentração de sacarose (X<sub>1</sub>) em 200, 300 e 400 g.L<sup>-1</sup>, temperatura (X<sub>2</sub>) em 35, 45 e 55 °C e tempo de fermentação (X<sub>3</sub>) em 12, 24 e

36 h na produção ( $Y_1$ ) e produtividade ( $Y_2$ ) de nistose utilizado delineamento experimental Box-Behnken, com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Tabela 1).

O segundo delineamento foi de mistura do tipo simplex-centróide com 4 repetições no ponto central, totalizando 14 experimentos. Este delineamento foi utilizado para verificar o efeito dos sais  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ),  $\text{MnSO}_4$  ( $X_2$ ),  $\text{ZnSO}_4$  ( $X_3$ ) e  $\text{NaCl}$  ( $X_4$ ) na produção ( $\text{g. L}^{-1}$ ) e produtividade ( $\text{g. L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) de nistose (Tabela 3).

#### Utilização do caldo e melaço de cana-de-açúcar na produção de nistose

O melaço de cana-de-açúcar, utilizado neste estudo, foi cedido pela Corol Cooperativa Agroindustrial de Rolândia, Paraná, Brasil e o caldo de cana foi adquirido no comércio local (Londrina, Paraná, Brasil).

O caldo e o melaço foram, previamente, quantificados quanto aos teores de açúcares totais (AT) pelo método fenol-sulfúrico (Dubois et al. 1956), apresentando, respectivamente, 166 e 570  $\text{g. L}^{-1}$  de AT. As concentrações de açúcares dos meios de fermentação foram ajustadas em 200, 300 e 400  $\text{g. L}^{-1}$ . Para os meios com melaço foram realizadas diluições até atingir as diferentes concentrações e para o caldo os ajustes foram com adição de sacarose comercial. As fermentações foram em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio, mantidas em incubação por 24 horas a 230 rpm e 35 °C. As fermentações foram em triplicata e após centrifugação foi determinado a produção de nistose por HPLC.

#### Determinação de nistose

A produção de nistose foi determinada a partir dos sobrenadantes das fermentações. O sobrenadante foi submetido a ultrafiltração em membrana Ultracel YM com porosidade de 3 kDa. No filtrado, foram realizadas as determinações de nistose.

A nistose foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando equipamento Shimadzu acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10<sup>a</sup> e coluna AMINEX Carbohidrate HPX-87C (300 x 7,8 mm Biorad). A coluna foi mantida a 80 °C e as amostras (20  $\mu\text{L}$ ) foram eluídos a um fluxo de 0,6 mL/min com água Milli-Q. A nistose foi quantificada utilizando curva de calibração (variando de 75 a 300  $\mu\text{g/mL}$ ) do padrão de nistose (GP<sub>3</sub>- 666,58 Da) grau HPLC da Sigma-Aldrich.

## Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o software Statistica 9.0, incluindo a estimativa dos parâmetros (regressão múltipla) e análise de variância (ANOVA). Os valores foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .

## Resultados

Efeito da concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação na produção de nistose por *B. subtilis* natto CCT 7712

Os resultados estão na Tabela 1 e mostram que a melhor produção de nistose foi a de 142,97 g. L<sup>-1</sup> com produtividade de 5,96 g. L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> a 400 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, 35 °C e 24 h de fermentação (Tabela 1, ensaio 2).

**Tabela 1** - Produção (Y<sub>1</sub>) e produtividade (Y<sub>2</sub>) de nistose por *B. subtilis* natto CCT 7712 variando a concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação utilizando delineamento experimental Box-Behnken com pH e agitação fixados em 7,7 e 230 rpm.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X <sub>1</sub> [Sac.] g. L <sup>-1</sup>	X <sub>2</sub> Temp. (°C)	X <sub>3</sub> Tempo (h)	Y <sub>1</sub> Nistose (g. L <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub> Nistose (g. L <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )
1	400 (+)	55 (+)	24 (0)	121,60	5,07
2	400 (+)	35 (-)	24 (0)	142,97	5,96
3	200 (-)	55 (+)	24 (0)	37,63	1,57
4	200 (-)	35 (-)	24 (0)	42,57	1,77
5	400 (+)	45 (0)	36 (+)	107,29	2,98
6	400 (+)	45 (0)	12 (-)	109,54	9,13
7	200 (-)	45 (0)	36 (+)	27,33	0,76
8	200 (-)	45 (0)	12 (-)	23,56	1,96
9	300 (0)	55 (+)	36 (+)	72,61	2,02
10	300 (0)	55 (+)	12 (-)	69,20	5,77
11	300(0)	35 (-)	36 (+)	98,46	2,73
12	300 (0)	35 (-)	12 (-)	112,33	9,36
13	300 (0)	45 (0)	24 (0)	65,70	2,74
14	300 (0)	45 (0)	24 (0)	66,39	2,77
15	300 (0)	45 (0)	24 (0)	69,32	2,89

A análise de variância dos resultados é mostrada na Tabela 2 onde pode ser observado que houve efeito significativo para a concentração de sacarose (X<sub>1</sub>)

( $p=0,0002$ ), para a temperatura ( $X_2$ ) ( $p=0,0032$ ) e para a interação das variáveis temperatura e tempo de fermentação ( $X_2X_3$ ) ( $p=0,0460$ ).

**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) para a produção de nistose por *B. subtilis* natto CCT 7712

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F-valor	p-valor
( $X_1$ ) [Sacarose] (L)	15339,64	1	15339,64	4152,31	0,0002
[Sacarose] (Q)	4,32	1	4,32	1,17	0,3924
( $X_2$ ) Temperatura (L)	1135,02	1	1135,02	307,24	0,0032
Temperatura (Q)	1497,36	1	1497,36	405,32	0,0024
( $X_3$ ) Tempo de fermentação (L)	9,99	1	9,99	2,70	0,2418
Tempo de fermentação (Q)	2,83	1	2,83	0,76	0,4737
$X_1X_2$	67,49	1	67,49	18,26	0,0506
$X_1X_3$	9,06	1	9,06	2,45	0,2578
$X_2X_3$	74,65	1	74,65	20,20	0,0460
Lack of fit	287,99	3	96,00	25,98	0,0372
Erro puro	7,39	2	3,69		
Total	18455,18	14			

L: efeito linear. Q: efeito quadrático.  $R^2=0,983$ .

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido foi 0,983, indicando que 98% da variabilidade das respostas experimentais foram explicadas pelo modelo.

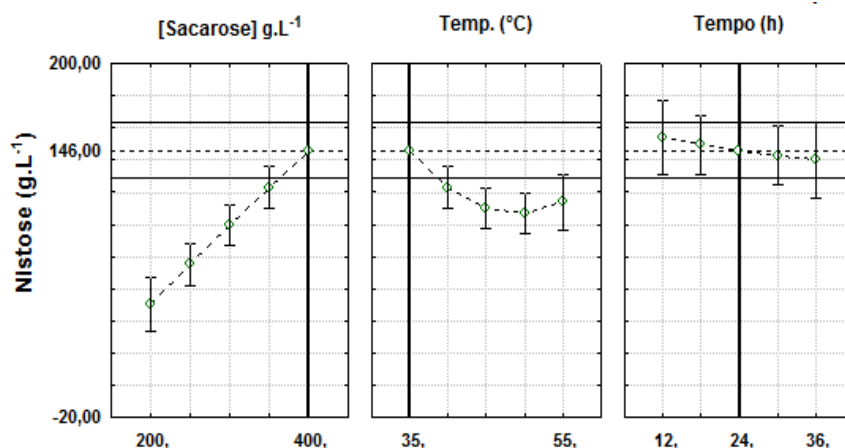
A análise de múltipla regressão originou uma equação polinomial de segunda ordem na qual apenas os termos significativos foram considerados para estimar a produção de nistose:

$$Y_1 = 67,1367 + 43,7888 x_1 - 11,9113 x_2 + 20,1379 x_2^2 + 4,32 x_2x_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde,  $Y_1$  representa a produção de nistose,  $x_1$  a concentração de sacarose,  $x_2$  a temperatura e  $x_3$  o tempo de fermentação.

A Fig. 1 representa a otimização das condições para a produção de nistose obtida pelo modelo preditivo, indicando que a condição de 400 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, 35 °C e 24 h de fermentação permite produção máxima teórica de 146 g. L<sup>-1</sup> de nistose. Com objetivo de validar a equação do modelo, três ensaios adicionais nas condições ótimas descritas foram realizados. A produção média de nistose foi 140,06 g. L<sup>-1</sup> com rendimento de 58,73 % o qual está muito próximo da produção predita pelo modelo e, quando comparado por teste de Tukey ( $p<0,05$ ), não mostrou diferença significativa.

**Fig. 1** Otimização da produção de nistose por *B. subtilis natto* usando software Statistica 9.0



Os resultados de produtividade mostraram que a melhor condição das variáveis para esta resposta foi a de sacarose em 300 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C e 12 h, com produtividade de 9,36 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> (Tabela 1, ensaio 12). Essa produtividade foi reduzida em 3 vezes com o aumento do tempo de fermentação de 12 para 36 horas (Tabela 1, ensaios 5 e 6). A análise estatística dos resultados mostrou efeito significativo para as três variáveis testadas e pela análise de regressão múltipla obteve-se a seguinte equação polinomial de segunda ordem:

$$Y_2 = 2,79 + 2,1337 x_1 + 1,0287 x_2^2 - 2,2162 x_3 + 1,1462 x_3^2 - 1,2325 x_1 x_2 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde,  $Y_2$  representa a produtividade de nistose,  $x_1$  a concentração de sacarose,  $x_2$  a temperatura e  $x_3$  o tempo de fermentação. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para esta resposta foi 0,9715, indicando que 97 % da variabilidade das respostas foram significativamente explicadas pelo modelo.

#### Influência de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{MnSO}_4$ , $\text{ZnSO}_4$ e $\text{NaCl}$ na produção de nistose

A influência dos sais na produção de nistose foi avaliada em meios com sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C e 24 h de fermentação (condição estabelecida na etapa anterior). Nesta etapa, foi utilizado delineamento experimental de mistura e o domínio experimental foi composto por diferentes proporções dos sais, variando de 0 a 100 %, conforme Tabela 3.

**Tabela 3.** Produção de nistose por *B. subtilis* natto utilizando delineamento experimental de mistura para efeito de sais com concentração de sacarose em 400 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C, 24 h de fermentação, pH 7,7 e 230 rpm.

Ensaio	Misturas	Componentes*				Y <sub>1</sub> Nistose (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>2</sub> Nistose (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
		X <sub>1</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> MnSO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>3</sub> ZnSO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> NaCl (g.L <sup>-1</sup> )		
1	(1; 0; 0; 0)	12	0	0	0	18,77	0,78
2	(0; 1; 0; 0)	0	0,8	0	0	179,77	7,49
3	(0; 0; 1; 0)	0	0	0,025	0	125,10	5,21
4	(0; 0; 0; 1)	0	0	0	35	31,72	1,32
5	(0,5; 0,5; 0; 0)	6	0,4	0	0	125,93	5,25
6	(0,5; 0; 0,5; 0)	6	0	0,012	0	119,99	5,00
7	(0,5; 0; 0; 0,5)	6	0	0	17,5	30,17	1,26
8	(0; 0,5; 0,5; 0)	0	0,4	0,012	0	125,23	5,22
9	(0; 0,5; 0; 0,5)	0	0,4	0	17,5	126,86	5,29
10	(0; 0; 0,5; 0,5)	0	0	0,012	17,5	51,98	2,17
11	(0,25; 0,25; 0,25; 0,25)	3	0,2	0,006	8,75	126,23	5,26
12	(0,25; 0,25; 0,25; 0,25)	3	0,2	0,006	8,75	131,32	5,47
13	(0,25; 0,25; 0,25; 0,25)	3	0,2	0,006	8,75	135,77	5,66
14	(0,25; 0,25; 0,25; 0,25)	3	0,2	0,006	8,75	133,28	5,55

\* Os componentes foram estabelecidos com base em dados da literatura para a produção microbiana de FOS.

A maior produção de nistose foi obtida quando apenas o MnSO<sub>4</sub> foi adicionado ao meio de fermentação alcançando 179,77 g. L<sup>-1</sup> com rendimento de 71,73 % (Tabela 3, ensaio 2) e a mistura de 25% de cada sal resultou em uma produção média de 133,45 g. L<sup>-1</sup> com rendimento de 53,17% (Tabela 3, ensaios 11 ao 14).

A Tabela 4 descreve a análise de regressão para o efeito dos sais na produção de nistose. Houve efeito significativo para todos os sais testados, destacando-se o efeito positivo do sulfato de manganês, no qual, quando analisado individualmente, obteve-se a resposta máxima: 179,77 g. L<sup>-1</sup> de nistose. Na análise de interação dupla dos sais, as misturas de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com MnSO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com ZnSO<sub>4</sub> mostrou forte efeito positivo e as misturas de MnSO<sub>4</sub> com ZnSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub> com NaCl teve efeito negativo na produção de nistose.

**Tabela 4.** Análise de regressão para o efeito de sais na produção de nistose por *B. subtilis* natto.

Componentes	Coefficientes	Erro padrão	t-valor	p-valor
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (X <sub>1</sub> )	18,77	4,04	4,63	0,01887
MnSO <sub>4</sub> (X <sub>2</sub> )	179,77	4,04	44,42	0,00002
ZnSO <sub>4</sub> (X <sub>3</sub> )	125,10	4,04	30,91	0,00007
NaCl (X <sub>4</sub> )	31,72	4,04	7,83	0,00432
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	106,64	19,82	5,37	0,01257
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	192,22	19,82	9,69	0,00232
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	19,70	19,82	0,99	0,39356
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	-108,82	19,82	-5,48	0,01189
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	84,46	19,82	4,26	0,02371
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	-105,72	19,82	-5,33	0,01288
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1985,92	214,71	9,24	0,00267
R <sup>2</sup> = 0,998    R <sup>2</sup> ajustado= 0,993				

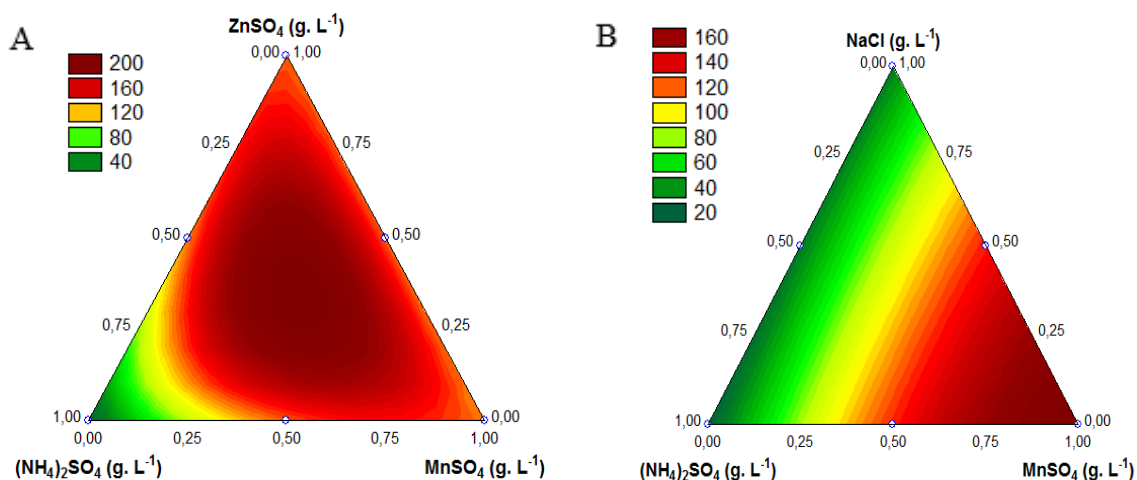
Os dados experimentais originaram uma equação canónica para estimar a produção de nistose:

$$Y_1 = 18,77x_1 + 179,77x_2 + 125,1x_3 + 31,72x_4 + 106,64x_1x_2 + 192,22x_1x_3 - 108,82x_2x_3 + 84,46x_2x_4 - 105,72x_3x_4 + 1985,92x_1x_2x_3 \quad (\text{Eq.3})$$

onde, Y<sub>1</sub> representa a produção de nistose e x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub> e x<sub>4</sub> são respectivamente, as variáveis (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e NaCl. Neste modelo o coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) foi de 0,998, o que significa que 99 % da variabilidade dos dados experimentais pode ser explicada pelo modelo e a equação obtida pode ser utilizada para fins preditivos.

O modelo utilizado para descrever cada componente e a interação entre estes, resultou os gráficos de contorno, representados na Fig. 2 (A-B).

**Fig. 2** Gráficos de contorno para o efeito de sais na produção de nistose ( $\text{g. L}^{-1}$ ) por *B. subtilis* natto. (A) Interação  $\text{ZnSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$ ; (B) Interação  $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MnSO}_4$ .



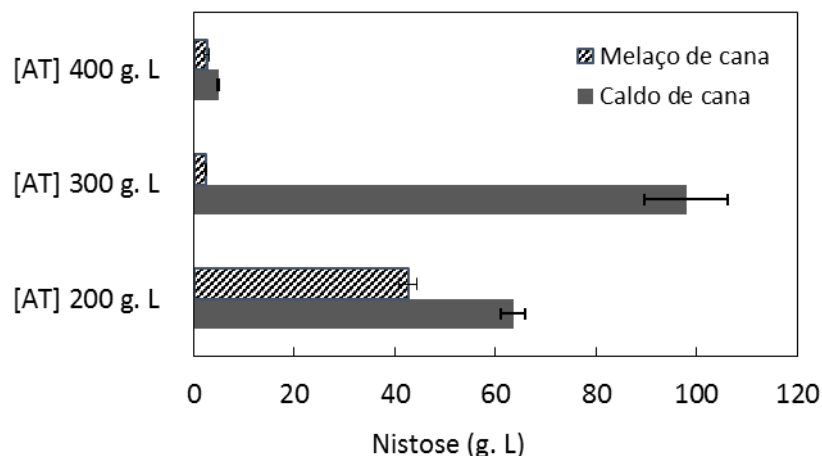
A Fig. 2-A representa uma estimativa da produção de nistose em torno de  $200 \text{ g. L}^{-1}$  na interação dos sulfatos de zinco, amônio e manganês, em uma mistura com proporções iguais destes componentes. A Fig 2-B representa o efeito da interação do cloreto de sódio com os sulfatos de amônio e manganês, estimando produções em torno de  $160 \text{ g. L}^{-1}$  com apenas o sulfato de manganês em 100% da mistura.

A produtividade de nistose ( $Y_2$ ) alcançou  $7,49 \text{ g. L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , quando apenas o sulfato de manganês foi adicionado (Tabela 3, ensaio 2), indicando, mais uma vez, o efeito positivo deste sal. A análise de regressão dos dados para a produtividade ( $Y_2$ ) indicou efeito significativo para todos os sais testados, destacando o  $\text{MnSO}_4$  ( $p=0,0002$ ) e o  $\text{ZnSO}_4$  ( $p=0,00007$ ).

#### Produção de nistose em meios com caldo e melaço de cana-de-açúcar

A produção de nistose foi avaliada em meios com caldo e melaço de cana-de-açúcar. A Fig. 3 representa as produções médias de nistose em meios com melaço e caldo de cana em concentrações de 200, 300, e  $400 \text{ g. L}^{-1}$  de AT.

**Fig. 3.** Produção de nistose por *B. subtilis* natto em meios com melaço e caldo de cana-de-açúcar a 200, 300 e 400 g. L<sup>-1</sup> de AT, 35 °C, pH 7,7 em 24 h e 234 rpm de agitação



No meio com melaço, as maiores produções foram a 200 g. L<sup>-1</sup> de AT, com produção média de 42,58 g. L<sup>-1</sup> de nistose. Em caldo de cana, a produção foi favorecida quando em concentração de 300 g. L<sup>-1</sup> de AT com produção média de 97,93 g. L<sup>-1</sup>.

### Discussão

A avaliação de efeitos da concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação indicou que a concentração de sacarose foi o parâmetro de maior influência na produção de nistose, mostrando efeito positivo. Comparando-se os ensaios 2 e 4 da Tabela 1, verifica-se que quando a temperatura e o tempo de fermentação foram mantidos (35 °C e 24 h) e a concentração de sacarose foi reduzida de 400 g. L<sup>-1</sup> (ensaio 2) para 200 g. L<sup>-1</sup> (ensaio 4), a produção foi 3 vezes menor quando comparada com o melhor resultado (142,97 g. L<sup>-1</sup>). A produção microbiana de FOS em altas concentrações de sacarose é justificada como resultado da baixa atividade de água causada pela alta concentração de sacarose, favorecendo as reações de transfrutossilação da  $\beta$ -frutofuranosidase que hidrolisa a sacarose e transfere os resíduos frutossil, não ao grupo hidroxila da água, mas a outro carboidrato, resultando na síntese de oligossacarídeos (Vandamme e Soetaert 1995).

O *B. subtilis* natto mostrou alta produtividade, alcançando 9,36 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup> de nistose em sacarose em 300 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C e 12 h de fermentação. Avaliando a produção de FOS por *B. subtilis* natto, Silva et al. (2014) testaram o efeito da concentração de

sacarose (216 a 384 g. L<sup>-1</sup>), pH (4,3 a 7,7) e agitação (66 a 234 rpm) e obtiveram produção de 98,86 g. L<sup>-1</sup> em 300 g. L<sup>-1</sup> de sacarose a 37 °C e 24 h de fermentação com produtividade de 4,12 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>.

As condições ótimas dos parâmetros avaliados (sacarose em 400 g. L<sup>-1</sup>, 35° C e 24 h) estão próximas as reportadas por outros autores em estudos relativos a produção microbiana de FOS. Ning et al. (2010) testaram os efeitos da concentração de sacarose (de 100 a 600 g. L<sup>-1</sup>) e da temperatura (20 a 60 °C) na biotransformação de sacarose por células livres de *Xanthophyllomyces dendrorhous* e relataram maior produção de neo-FOS (227,72 g. L<sup>-1</sup>) em sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup> a 30 °C. Silva et al. (2011) avaliaram parâmetros fermentativos, dentre estes, a concentração de sacarose, temperatura e tempo de fermentação na produção de FOS por *Aureobasium pullulans* obtendo rendimentos de 49,34% em 24 h e 54,7% em 48 h de fermentação em meios com sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup> a 32 °C.

No presente estudo, alto rendimento de nistose foi observado, alcançando 71,73% em meios com sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup> a 35 °C em 24 h de fermentação e com adição de 0,8 g. L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>. Nemukula et al. (2009) avaliaram a influência do pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e concentração de sacarose na síntese de FOS por frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus*, verificando que, tanto as atividades de hidrólise como as de transfrutossilção, foram aumentadas em 88 % em meios com a sacarose a 600 g. L<sup>-1</sup> alcançando rendimento de 39,46 % de nistose após 12 h de incubação com 50 U mL<sup>-1</sup> de enzima. Ganaie et al. (2014), avaliaram a produção de FOS por frutossiltransferases de *Aspergillus flavus*, imobilizadas em quitosana e alginato e relataram maiores atividades de transfrutossilção com a enzima imobilizada em alginato em pH 7,0 a 55 °C, com rendimento de 15,7 % de nistose em 36 h de reação a 60° C.

Os resultados para o efeito de sais na produção de nistose observados neste estudo, colocam em destaque o MnSO<sub>4</sub> em relação aos demais sais testados. A produção obtida no ensaio utilizando apenas o MnSO<sub>4</sub> foi cerca de 8 vezes maior, quando comparada ao (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Tabela 3, ensaio 1) e 5 vezes maior comparando-o com o NaCl (Tabela 3, ensaio 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2011) em estudo sobre parâmetros de produção de FOS por *Aureobasium pullulans* no qual testou o efeito de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub>, verificando que o MnSO<sub>4</sub> foi o único que apresentou efeito significativo positivo na produção de FOS. Em estudo da produção de levansase de cepas isoladas de fonte termal, Dahech et al. (2013)

verificaram o efeito de NaCl, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, MnCl, EDTA e β-Mercapto, observando que o Mn<sup>2+</sup>, em concentração de 75 mM, ativou fortemente a atividade enzimática.

Na avaliação da produção de nistose em caldo e melaço de cana, observou-se que a produção em caldo foi 56 % maior que a produção em melaço, fato que pode ser justificado pela alta concentração carboidratos, produtos de reações, minerais como cálcio, potássio, cloro e enxofre e metais como ferro, zinco, cobre e magnésio presentes no melaço que podem ter influenciado negativamente a produção. A concentração de AT nos meios também influenciou a produção de nistose. Em meios com melaço, quando a concentração de açúcar foi aumentada de 200 para 300 e 400 g. L<sup>-1</sup>, a produção foi reduzida em cerca de 16 vezes e, em caldo de cana, a produção foi reduzida em cerca de 20 vezes quando a concentração de açúcares foi aumentada de 300 para 400 g. L<sup>-1</sup>. Shin et al 2004 utilizaram células de *Aureobasidium pullulans* KCCM 12017 para produção de FOS, alcançando produção de nistose em torno de 50 g. L<sup>-1</sup> com melaço em concentração de 360 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, entretanto, os autores relataram inibição na produção pela glicose, frutose e outros componentes não identificados presentes no melaço. Estudos sobre mecanismo e modelo cinético na síntese de FOS a partir de sacarose sugerem que frutossiltransferases apresentam diferentes eficiências catalíticas, dependendo da composição do substrato no meio reacional, podendo as reações de hidrólise serem negligenciadas mesmo em meios pouco concentrados, uma vez que a enzima catalisa reações de transfrutosilação convertendo frutose em nistose, gerando sacarose como subproduto (Vega e Zuniga-Hansena 2014).

Os resultados deste estudo colocam em destaque a alta eficiência do *B. subtilis* natto ATCC 7712 na produção de nistose, alcançando 179,77 g. L<sup>-1</sup>, rendimento de 71,73% em meios com sacarose a 400 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C em 24 horas de fermentação com adição de 0,8 g. L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>. A utilização de resíduos agroindustriais (caldo e melaço de cana-de-açúcar) como substrato nas fermentações mostrou ser uma alternativa viável para a obtenção microbiana de nistose, produto com ampla aplicação na indústria alimentícia, utilizado para o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedade prebiótica.

## Referências

- Bekers M, Vigants A, Laukevics J, Toma M, Rapoport A, Zikmanis P (2000) The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Int J Food Microbiol* 55:147-150. doi:10.1016/S0168-1605(00)001860
- Belghith K S, Dahecha I, Belghithb H, Mejdouba H (2012) Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *Int J Biol Macromol*. 50:451-458. doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.12.033
- Berté S D, Borsato D, Silva P B, Vignoli, J A, Celligoi M A P. C (2013) Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. *Afr J Microbiol* 7:898-904. doi:10.5897/AJMR12.2302
- Chen S, Sheu D, Duan K (2013) Production of fructooligosaccharides using  $\beta$ -fructofuranosidase immobilized onto chitosan-coated magnetic nanoparticles. *J Taiw I Chem Engin*. In press. doi:10.1016/j.jtice.2013.10.003
- Dahecha I, Ayeda H B, Belghitha K S, Belghith H; Mejdouba, H (2013) Microbial production of levansucrase for specific hydrolysis of levan. *Int J Biol Macromol* 60:128-133. doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.05.002
- El-refai H A, Abdel-fattah A F, Mostafa, F A (2009) Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World J Microb Biot* 25:821–827. doi:10.1007/s 11274-0009-9957-x
- Ganaiea M A, Rawatb, H K, Wania O A, Guptaa U S, Kango N (2014) Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate forefficient production of fructooligosaccharides. *Process Biochem*. In press. doi:10.1016/j.procbio.2014.01.026
- Ghazi I, Fernandez-arrojo L, Segura A G, Alcalde M, Plou F J, Ballesteros A (2006) Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. *J Agr Food Chem*54:2964-2968. doi:10.1021/jf053023b
- Gonçalves B C M, Mantovan J, Ribeiro M L L, Borsato D, Celligoi M A P C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 1:1-8. doi:10.7324/JABB. 2013.1201

- Granato D, Are G (2014) Mathematical and statistical methods in food science and technology. Wiley-Blackwell, Noida
- Hijum S A F T (2003) Kinetics properties of  $\alpha$ -glucosidase from *Lactobacillus reuteri*. FEBS Lett 534:207-210. doi:10.1016/S0014-5793(02)03841-3
- Ikeda T, Kurita T, Hidaka H, Michalek S M, Hirasawa M (1990) Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose. Gen Pharmacol 21:175-179. doi: 0306-3623/90
- Lorenzoni, A S G, Aydos L F, Klein M P, Rodrigues R C, Hertz P F (2014) Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. Carbohydr Polym 103:193-197. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.12.038
- Marques T A, Baldo C, Borsato D, Buzato J B, Colabone M A P C (2014) Utilization of dairy effluent as alternative fermentation medium for microbial lipase production. Romanian Biotechnol Lett 19:9042-9050. In press
- Morris C, Morris G A (2012) The effect of inulin and fructo-oligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. Food Chem 133:237-248. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.01.027
- Mussatto S I, Teixeira J A (2010) Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. Biochem Eng J 53:154-157. doi:10.1016/j.bej.2010.09.012
- Mussatto S I, Mancilha, I M (2007) Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydr Polym 68:587-597. doi:10.1016/j.carbpol.2006.12.011
- Nemukula A, Mutanda T, Wilhelmi B S, Whiteley C G (2009) Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. Bioresource Technol 100:2040-2045. doi:10.1016/j.biortech.2008.10.022
- Ni Y, Wang Y, Sun Z (2012) Butanol Production from Cane Molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and Semicontinuous Fermentation. Appl Biochem Biotech 166:1896-1907. doi:10.1007/s12010-012-9614-y
- Ning Y, Wang J, Chen J, Yang N, Jin Z, Xu X (2010) Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Bioresource Technol 101:7472-7478. doi: 10.1016/j.biortech.2010.04.02

- Oliveira M R, Silva R S S F, Busato J B, Celligoi M A P C (2007) Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate source. *Biochem Eng J* 37:177-183. doi:10.1016/j.bej.2007.04.009
- Paul A, Samaddar N, Dutta D, Bagchi A, Chakravorty S, Chakraborty W, Gachhui R (2011) Mercuric Ion Stabilizes Levansucrase Secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* Strain RG1. *The Protein J* 30:262-272. doi: 10.1007/s10930-011-9328-y
- Patel S, Goyal A (2011) Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World J Microb Biot* 27:1119–1128. doi:10.1007/s11274-010-0558- 5
- Prata M B, Mussatto S I, Rodrigues L R, Teixeira J A (2010) Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnol Lett* 32:837-840. doi: 10.1007/s10529-010-0231-y
- Roberfroid M (2002) Functional food concept and its application to prebiotics. *Digest Liver Dis* 34:105-110. doi:10.1016/S1590- 8658(02)80176-1
- Shin H T, Baig S Y, Lee S W, Suh D S, Kwon S T, Lim Y B, Lee J H (2004) Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresource Technol* 93:52-62. doi: 10.1016/j.biortech.2003.10.008
- Shih I L, Chen L D, Wu J W (2010) Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydr Polym* 82:111-117. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.030
- Silva J B, Fai A E C, Santos R, Basso L C, Pastore, G M (2011) Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. *Procedia Food Sci* 1:1547-1552. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.229
- Silva P B, Borsato D, Celligoi M A P C (2014) Optimization of hilg production of fructooligosaccharides of *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Am J food technol*. doi: 10.3923/ajft.2014
- Vaňková K, Onderková Z, Antošová M, Polakovič M (2008) Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides. *Chem Pap* 62:375-381. doi:10.2478/s11696-008-0034-y
- Vandamme E J, Soetaert W (1995) Biotechnical modification of carbohydrates. *FEMS Microbiol Rev* 16:163-186. doi:10.1016/0168-6445(94)00051-Y

Vega R, Zuniga-Hansena M E (2014) A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose.

Biochem Eng J 82:158-165. doi:10.1016/j.bej.2013.11.012

Xu K, Xu P (2014) Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. Bioresource Technol 153:23-29.

doi:10.1016/j.biortech.2013.11.057

## 5.2 DEPÓSITO DE PATENTE

### Formulário de Declaração de Invenção

O Formulário de Declaração de Invenção (FDI) deve ser usado por professores, funcionários e alunos da UEL e pelas empresas da Intuel/Aintec para declarar a criação de uma invenção e solicitar sua propriedade intelectual.

Após o preenchimento do FDI coloque-o em envelope fechado, protocole na UEL (na ASUEL) endereçando-o para:

#### **AINTEC/UEL**

#### **Escritório de Propriedade Intelectual – EPI**

Com isto sua Declaração de Invenção fica oficialmente registrada e será enviados ao Escritório de Propriedade Intelectual (EPI) da Aintec para análise, parecer e outras providências.

Os inventores devem ler os documentos sobre a Política de Propriedade Intelectual da UEL, no endereço [www.aintec.uel.br/aintec/legislação](http://www.aintec.uel.br/aintec/legislação).

Havendo dúvidas no preenchimento da FDI contate o EPI da Aintec pelo e-mail: [aintecepi@uel.br](mailto:aintecepi@uel.br)

**1. INFORMAÇÃO PESSOAL****Nome para contato:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**Depto. na UEL./Empresa:** Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE**Tel:** (43) 3371-4270 **e-mail:** macelligoi@uel.br**2. TÍTULO PROPOSTO PARA A INVENÇÃO:**

Obtenção biotecnológica de frutooligossacarídeos: otimização de processo e aplicação em alimento

**Palavras-chave:** Frutooligossacarídeos; *Bacillus subtilis* natto; parâmetros fermentativos; barra de cereais.

**3. ÁREA/SUB-ÁREA/ESPECIALIDADE DA INVENÇÃO (SE SOUBER):**

multidisciplinar/biotecnologia

**4. CAMPO DA INVENÇÃO. ESTA INVENÇÃO DIZ RESPEITO FUNDAMENTALMENTE**

**A:** Otimização da produção de frutooligossacarídeos por fermentação de *Bacillus subtilis* natto para aplicação como prebiótico em alimentos.

**5. ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

**5.1. Descreva o problema ou desafio técnico que a presente invenção se propõe a solucionar:** O conhecimento e a adoção de hábitos alimentares saudáveis tem íntima relação á incidência das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) - infarto do miocárdio, obesidade, diabetes, hipertensão, cânceres, etc. Essas doenças estão fortemente associadas às causas de morte mais comuns e, por serem de longa duração, são as que mais demandam ações, procedimentos e serviços de saúde, gerando uma sobrecarga no Sistema Único de Saúde (SUS). Estimativas de gastos com internações e atendimentos ambulatoriais relacionados a estas doenças estão em torno de R\$ 7,5 bilhões/ano. Concomitante a essa problemática, observa-se um acelerado aumento na demanda pelos alimentos funcionais: aqueles que, além de um valor nutricional, possuem substâncias que tenham potencial de beneficiar o funcionamento do organismo e prevenir doenças. Á classificação dos alimentos funcionais, insere-se os frutooligossacarídeos (FOS): açúcares não-convencionais que não podem ser degradados por enzimas digestivas humanas e animais, sendo, portanto, compostos não-calóricos e não cariogênicos. São compostos com propriedade prebiótica, uma vez que chegam

intactos ao cólon, onde são metabolizados por espécies nativas benéficas, promovendo o crescimento seletivo das mesmas e, por conseqüente, beneficiam a saúde do hospedeiro atuando, também, na prevenção de doenças. O efeito prebiótico dos FOS resulta em outros benefícios ao organismo, dentre estes a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, aumento da produção de compostos imuno-estimulantes, que possuem atividade antitumoral, redução na produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal durante terapia com antibióticos. FOS podem ser obtidos por síntese microbiana em processos fermentativos sendo essa uma alternativa viável do ponto de vista econômico e funcional pela possibilidade de manipulação de parâmetros que favoreçam a otimização do processo de produção.

**5.2. Descreva as conhecidas soluções já existentes ao problema ou desafio, seus limites e deficiências:** O conhecimento e a adoção de hábitos alimentares saudáveis é crescente na população mundial visando benefícios a saúde e qualidade de vida. Neste sentido, vale ressaltar a ingestão de alimentos com propriedades funcionais como os prebióticos, nos quais enserem-se os FOS. Ocorre, porém, que o acesso a estes alimentos, principalmente à classe menos favorecida da população, se torna economicamente inviável, sendo esta uma problemática, relacionada a complexidade e altos custos na manufatura dos produtos. FOS podem ser obtidos por hidrólise da inulina (polissacarídeos de origem vegetal), por síntese enzimática a partir da hidrólise da sacarose e através de processos fermentativos por microrganismos produtores em meios com sacarose e em condições específicas. Quando se compara a obtenção por síntese enzimática e síntese microbiana, esta última tem viabilidade superior considerando que etapas de purificação e imobilização enzimática são eliminadas, reduzindo custos e tempo no processo. Outro sim, enzimas de origem vegetal possuem algumas limitações quando comparadas com enzimas microbianas: é necessário a extração de grande quantidade de massa vegetal para a obtenção de pouco extrato enzimático, além do problema de sazonalidade na produção dos vegetais.

**5.3. Descreva como sua invenção supera estes limites e deficiências, destacando suas vantagens e ganhos:** A obtenção de FOS por síntese microbiana é uma alternativa conveniente, considerando que as condições para a produção podem ser manejadas, tornando possível a otimização do processo. Além disso, esse tipo de obtenção é economicamente viável uma vez que o substrato para as fermentações é a sacarose, açúcar de baixo custo e de fácil obtenção. Outro sim, o microrganismo utilizado, *Bacillus subtilis* natto, é de fácil manipulação e manutenção, não possui toxicidade e não é carcinogênico, possui denominação GRAS, sendo, inclusive, utilizado

como probiótico em alimentos. Este microrganismo é produtor de grande variedade de enzimas, dentre estas, as envolvidas no metabolismo da sacarose, e, dessa forma, são produtores de FOS, sendo observadas produções de  $195,27 \text{ g.L}^{-1}$  em 24 horas de fermentação correspondendo a uma produtividade de  $8,14 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  de FOS, quando cultivados em condições específicas. A purificação dos FOS nos meios de cultivo ocorre por sistema de ultrafiltração e a separação dos mesmos por precipitação em solvente orgânico (etanol). Após a eliminação do solvente, obtém-se um composto contendo cerca de 68% de FOS, sendo o restante da composição caracterizada por sacarídeos de peso molecular inferior aos FOS, como glicose, sacarose e frutose. O concentrado de FOS obtido tem consistência úmida característica de gel e pode ser utilizado convenientemente como ingrediente aglutinante na elaboração de alimentos como produtos lácteos, biscoitos e cereais compactados (barras de cereais); estes, além de um valor nutritivo, terão propriedade funcional, conferida pelo efeito prebiótico dos FOS.

**INVENTOR 1****Nome completo:** Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**Depto. da UEL onde atua/estuda:** Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE**Endereço residencial completo:** Av. Gil de Abreu e Souza, 1501 - Londrina/PR**Tel:** (43) 9995 7993      **e-mail:** macelligoi@uel.br**Atividade na UEL:** Docente**Percentual da participação na invenção:** 25% **Tempo de participação:** 10 anos**INVENTOR 2****Nome completo:** Dieyssi Alves dos Santos**Depto. da UEL onde atua/estuda:** Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE**Endereço residencial completo:** Rua Luiz Lerco, 399, apto 1902, Torre 2 - Londrina/PR**Tel:** (43) 3027-1917      **e-mail:** dieyssi@hotmail.com**Atividade na UEL:** Mestranda**Percentual da participação na invenção:** 25% **Tempo de participação:** 3 anos**INVENTOR 3****Nome completo:** Patrícia Bittencourt da Silva**Depto. da UEL onde atua/estuda:** Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE**Endereço residencial completo:** Rua Oscar Mohr, 77 -apartamento 205, Centro, Jaraguá do Sul - SC.**Tel:** (47) 9722-1737      **e-mail:** pat.bittencourt@hotmail.com

<b>Atividade na UEL:</b> Mestranda
<b>Percentual da participação na invenção:</b> 25% <b>Tempo de participação:</b> 2 anos

<b>INVENTOR 4</b>
<b>Nome completo:</b> Sandra Garcia
<b>Depto. da UEL onde atua/estuda:</b> Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos
<b>Endereço residencial completo:</b> Rua Anísio Figueiredo, 112 Jardim Messianico, Londrina -PR
<b>Tel:</b> 3371-5966 <b>e-mail:</b> sgarcia@uel.br
<b>Atividade na UEL:</b> Docente
<b>Percentual da participação na invenção:</b> 10% <b>Tempo de participação:</b> 1 ano

<b>INVENTOR 5</b>
<b>Nome completo:</b> Sandra Helena Prudêncio
<b>Depto. da UEL onde atua/estuda:</b> Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos
<b>Endereço residencial completo:</b>
<b>Tel:</b> (43) 3371-4986 <b>e-mail:</b> sandrah@uel.br
<b>Atividade na UEL:</b> Docente
<b>Percentual da participação na invenção:</b> 10% <b>Tempo de participação:</b> 1 ano

<b>INVENTOR 6</b>
<b>Nome completo:</b> Josiane Alessandra Vignoli
<b>Depto. da UEL onde atua/estuda:</b> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia - CCE
<b>Endereço residencial completo:</b> Av. José Gabriel de Oliveira, 915, apto 1502/ TII - Londrina/PR
<b>Tel:</b> (43) 9992 8110 <b>e-mail:</b> javignoli@uel.br
<b>Atividade na UEL:</b> Docente
<b>Percentual da participação na invenção:</b> 5% <b>Tempo de participação:</b> 1 ano

### 5.3 RESULTADOS COMPLEMENTARES

#### 5.3.1 Cinética de produção de FOS

A produção de FOS por fermentação submersa de *Bacillus subtilis* natto CCT7712 foi avaliada variando o tempo de fermentação em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. Os resultados para a produção e produtividade de FOS são mostrados na Tabela 1. A 12 horas do processo, houve a produção de 0,87 g. L<sup>-1</sup> de FOS sendo essa produção representada unicamente pela cestose. A produção máxima de FOS, 184,58 g. L<sup>-1</sup>, foi obtida a 24 horas do processo e neste mesmo tempo, ocorreu a melhor produtividade, 7,16 g. L. h<sup>-1</sup>. Ainda a 24 horas, a produção de nistose foi predominante representando 87 % da produção de FOS total. A 48 horas, cerca de 95 % da produção máxima foi mantida, entretanto, a produtividade foi reduzida em 49 % e a produção de nistose representou 85 % da produção total. Em última instância, a 72 horas houve redução na produção e produtividade em 20 e 71 %, respectivamente e a produção de nistose representou 78 % da produção total.

**Tabela 1.** Produção de FOS por *B. subtilis* natto a 35 °C, pH 7,7 a 230 rpm variando o tempo de fermentação de 12 a 72 horas.

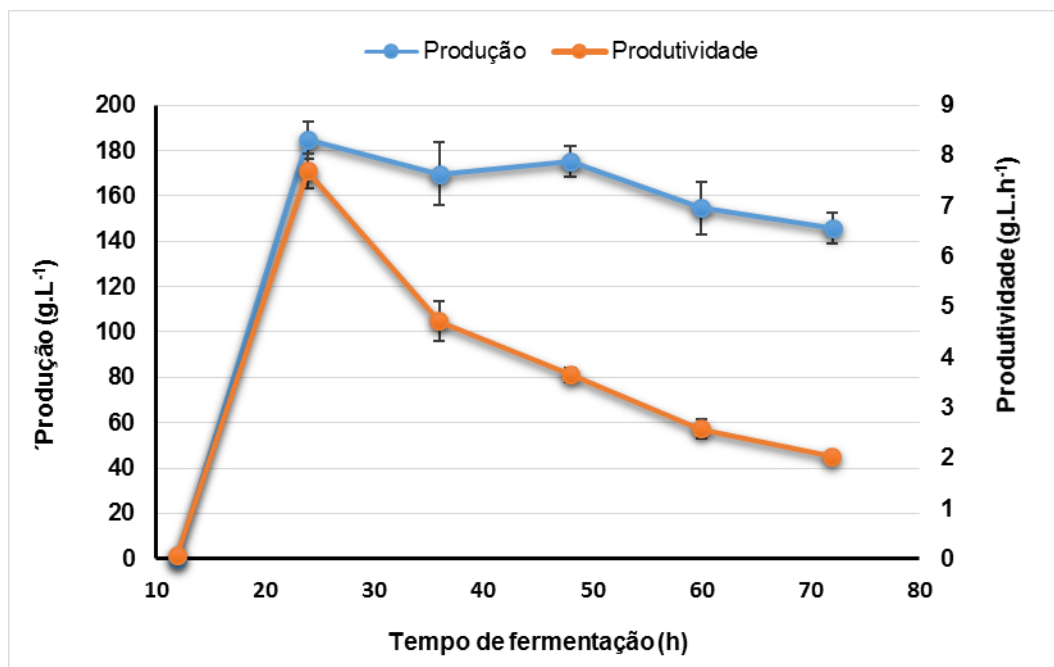
Tempo de fermentação (h)	Nistose (g. L <sup>-1</sup> )*	Cestose (g. L <sup>-1</sup> )*	FOS Total (g. L <sup>-1</sup> )*	FOS Total (g. L. h <sup>-1</sup> )*
12	-	0,87 ± 0,09	0,87 ± 0,09	0,07 ± 0,008
24	161,50 ± 9,43	23,28 ± 0,92	184,58 ± 8,22	7,16 ± 0,95
36	155,49 ± 11,45	14,20 ± 2,51	169,69 ± 13,93	4,71 ± 0,38
48	149,67 ± 6,62	25,44 ± 1,80	175,12 ± 6,80	3,65 ± 0,14
60	132,20 ± 10,98	22,42 ± 0,83	154,62 ± 11,72	2,58 ± 0,19
72	115,01 ± 5,75	30,83 ± 1,24	145,84 ± 6,58	2,03 ± 0,09

\* Valores médios ± desvio-padrão

A Figura 1 representa a produção e produtividade de FOS variando o tempo de fermentação de 12 a 72 horas, demonstrando que a

produção foi pouco afetada pelo tempo, entretanto, para a produtividade houve redução acentuada após 24 horas de fermentação.

**Figura 1.** Produção e produtividade de FOS por *B. subtilis* natto em fermentação submersa a 35 °C, pH 7,7 á 230 rpm variando o tempo de fermentação de 12 a 72 horas.



### 5.3.2 Composição Química Centesimal de Barras de Cereais

Os resultados das análises de composição química centesimal das barras de cereais, elaboradas conforme item 4.2.4, foram expressos em base seca e estão listados na Tabela 2.

O resíduo mineral fixo (cinzas) representou 1 % da composição química centesimal. O teor lipídico representou de 12 a 13 % da composição centesimal e, provavelmente, estes valores estão relacionados a aveia e as sementes de castanha e amendoim, que possuem elevados teores lipídicos em sua composição.

O teor de proteína bruta nas formulações foi de 8,77 a 9,19 e os valores médios de umidade variaram de 7 a 11 %, sendo estes crescentes de forma proporcional a concentração de FOS nas formulações, o que remete a confirmação da característica higroscópica deste composto.

**Tabela 2** – Percentuais  $\pm$  desvio padrão para a composição química centesimal das barras de cereais.

Formulações	Umidade (%)	Cinzas* (%)	Lipídeos* (%)	Proteínas* (%)	Carboidratos* (%)
<b>A</b>	7,01 $\pm$ 0,20	1,25 $\pm$ 0,06	12,45 $\pm$ 0,86	8,77 $\pm$ 0,10	77,53 $\pm$ 0,46
<b>B</b>	7,88 $\pm$ 0,10	1,31 $\pm$ 0,06	12,70 $\pm$ 0,12	9,05 $\pm$ 0,04	76,94 $\pm$ 0,05
<b>C</b>	9,39 $\pm$ 0,16	1,45 $\pm$ 0,02	12,88 $\pm$ 0,97	9,19 $\pm$ 0,17	76,49 $\pm$ 0,80
<b>D</b>	11,74 $\pm$ 0,18	1,48 $\pm$ 0,02	13,49 $\pm$ 0,39	8,02 $\pm$ 0,07	75,96 $\pm$ 0,48

\*Valores expressos em base seca

As porcentagens de carboidratos, estimadas por diferença, variaram de 75 a 77 %.

### 5.3.3 Análise de Textura Instrumental de Barras de Cereais com FOS

Os resultados da análise de textura instrumental das barras de cereais estão listados na Tabela 3.

Para o parâmetro dureza, observaram-se variações significativas entre as formulações. Analisando as formulações A, C e D, a força necessária para romper as amostras nas formulações C e D foi 5 vezes menor quando comparada com a formulação A, permitindo concluir que a adição de FOS a concentrações de 10 e 15 %, contribuiu para a redução da dureza, em cerca de 80 %.

**Tabela 3** - Resultados da análise de textura instrumental das barras de cereais.

Formulações	Dureza (N)*	Fraturabilidade (mm)*
<b>A</b>	23,28 $\pm$ 2,43 <sup>a</sup>	89,76 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>
<b>B</b>	18,48 $\pm$ 2,98 <sup>b</sup>	90,29 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>
<b>C</b>	4,73 $\pm$ 0,66 <sup>c</sup>	90,67 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup>
<b>D</b>	4,51 $\pm$ 1,09 <sup>c</sup>	90,11 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>

\*Valores médios  $\pm$  desvio padrão;

Médias nas colunas acompanhadas de letras iguais não diferem a ( $p = 0,05$ ).

Quanto a fraturabilidade, não houve diferença significativa entre as formulações. A menor distância para fratura das amostras (89.76 mm) foi observada na formulação A, e a maior (90,67 mm) na formulação C, não havendo, portanto, variações para este atributo, entre as formulações.

## 6. CONCLUSÕES

No primeiro delineamento experimental, a maior produção de FOS, 142,97 g. L<sup>-1</sup>, ocorreu em sacarose 400 g. L<sup>-1</sup>, 35°C e 24 h de fermentação. Para a produtividade, seguindo o mesmo delineamento, o valor máximo, 9,36 g. L<sup>-1</sup>, foi observado em sacarose 300 g. L<sup>-1</sup>, 35 °C e 12 h. No segundo delineamento, a produção de FOS foi aumentada para 195,27 g. L<sup>-1</sup>, em condições de sacarose em 475 g. L<sup>-1</sup>, 35 ° C e 24 h e a produtividade máxima foi 8,14 g. L<sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>, na mesma condição. A variável de maior impacto na produção foi a concentração de sacarose.

No que se refere ao efeito de sais na produção de FOS, observou-se efeito positivo para os quatro sais quando analisados individualmente, destacando-se entre estes, o efeito positivo do MnSO<sub>4</sub>. A análise de regressão para o efeito conjunto dos sais indicou que a mistura com proporções iguais de ZnSO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MnSO<sub>4</sub> foi a mais significativa.

No meio com caldo de cana obteve-se produção 97,93 g. L<sup>-1</sup> de FOS em meios com 300 g. L<sup>-1</sup> de AT. Em melaço, a produção máxima foi a de 42,58 g. L<sup>-1</sup> de FOS, em concentração de 200 g. L<sup>-1</sup> de AT.

A composição química centesimal das barras de cereais, estimada em base seca, foi caracterizada em 1 % de matéria inorgânica (cinzas), 12-13 % de lipídeos, 8- 9 % de proteínas e 75- 77 % de carboidratos (valores estimados em base seca).

A aceitação, em relação as propriedades sensoriais (aroma, aparência, sabor e textura) das barras de cereais, foi avaliada positivamente, com índices de aprovação superiores aos de indiferença e reprovação. Em teste de intenção de compra, representando a avaliação global, obteve-se índices satisfatórios de aprovação para as quatro formulações, com destaque para as que continham 10 e 15 % de FOS, com 63 e 64 % de respostas positivas, respectivamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.3, p.145-154, 2004.

ARUNDHATI, Paul ; NEELOY, Samaddar ; DEBASREE, Dutta ; ABHISHEK, Bagchi ; SOMNATH, Chakravorty; WRITACHIT, Chakraborty; RATAN, Gachhui. Mercuric Ion Stabilizes Levansucrase Secreted by *Acetobacter nitrogenifigens* Strain RG1. **The Protein Journal**, v.30, p.262–272, 2011.

BRASIL. Organização Pan-Americana da Saúde. O cuidado das condições crônicas na atenção primária á saúde: o inperativo da consolidação da estratégia da saúde da família, 2012.

BARRETEAU, Hélène; DELATTRE, Cédric; MICHAUD, Philippe. Production of Oligosaccharides as Promising New Food Additive Generation. **Food Technology Biotechnology**, v.44, p.323–333, 2006.

BARROS Neto, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas: EDUNICAMP, p. 406, 2001.

BECKER, Taniclear dos Santos; KRÜGER, Roberta Letícia. Elaboração de barras de cereais com ingredientes alternativos e regionais do oeste do Paraná. **Arquivos de Ciência e Saúde da Unipar**, v.14, p.217-214, 2010.

BELGHITH, Karima Srih; DAHECHA, Imen; BELGHITHB, Hafedh; MEJDOUBA, Hafedh. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p.451-458, 2012.

BICAS, Juliano Lemos; SILVA, Júnio Cota; DIONÍSIO, Ana Paula; PASTORE, Gláucia Maria. Produção biotecnológica de bioaromas e açúcares funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 7-18, 2010.

BORNET, F.R.; BROUNSL, J. F.; TASHIRO, Y.; DUVILLIER, V. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. **Digestive and Liver Disease**. v.2, p.111-120, 2002.

BÚRIGO, Telma; FAGUNDES, Regina Lúcia Martins; TRINDADE, Erasmo Benício S. M.; VASCONCELOS, Helena Cristina Ferreira F. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista de Nutrição**: Campinas, v. 20, n. 5, p. 491-497, 2007.

BRITO, I. P.; CAMPOS, J. M.; SOUZA, T. F. L.; WAKIYAMA, C.; AZEREDO, G. A. Elaboração e avaliação global de barra de cereais caseira. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.22, p.35-50, 2004.

CALADO, Verônica; MONTGOMERY, Douglas C. **Planejamento de experimentos usando o *Statística***. Rio de Janeiro: E-papers, 260 p, 2003.

CALAZANS, G. et al. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245–247, 2000.

CARVALHO, Michelle Garcêz de. **Barras de cereais com amêndoas de chichá, sapucaia, e castanha-do-gurguéia, complementadas com cascas de abacaxi**. 93 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

COIMBRA, C. G. O. **Produção de fructo-oligossacarídeos e aspectos da biosseparação das frações leves de levana hidrolisada**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

COIMBRA, C.G.O.; MELO, I.R.; PINHEIRO, I.O.; LOPES, C.E.; CALAZANS, G.M.T. **Estudo da produção de frutoligossacarídeos por *Zymomonas mobilis* ZAG 12**. XLII Congresso Brasileiro de Química, 2002, Florianópolis, anais; Associação Brasileira de Química.

COLEMAN, E. C.; SCHMID, A. H.; KATZ, M. C.; BIRNEY, S. Kraft Foods Holdings. Barra de cereal, e, método para fabricar uma barra de cereal. A23L 1/164.BR.PI 0604519-7A. 01 nov. 2006, 28 ago. 2007. Revista da Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, n.1912, p.66. In TORRES, Edmilson Rebelo. **Desenvolvimento de barra de cereais formuladas com ingredientes regionais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade Tiradentes – Aracajú, 2009.

COUTINHO, Janine Giuberti; GENTIL, Patrícia Chaves; TORAL, Natacha. A desnutrição e a obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. Rio de Janeiro: **Caderno de Saúde Pública**, n. 24, p. 332-340, 2008.

DUTCOSKY, Silvia D.; GROSSMANN, M<sup>a</sup> Victória E.; SILVA, Rui Sérgio S.F.; WELSCH, Anette K. Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. **Food Chemistry**, v.98, p.630-638, 2006.

DRIOUCH, Habib; ROTH, Andreas; Petra DERSCH, Petra; WITTMANN, Christoph. Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.87, p.2011–2024, 2010.

EL-REFAI, Heba A.; ABDEL-FATTAH, Ahmed F.; MOSTAFA, Faten A. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 25, p. 821–827, 2009.

EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBERT, D. Production of the fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, n.32, v.3, p. 237-243, 1997.

FEICK, K. **European Prebiotics Market Diversifies Strongly across New Application Sectors in Food and Beverage Industry, Finds Frost & Sullivan** (2009). Disponível em:<<http://www.frost.com/prod/servlet/pressrelease.pag?docid=168776171>> (acesso em 24.09.12).

FORTES, Renata Costa; MUNIZ, Lidiane Batista. Efeitos da suplementação dietética com frutooligosacarídeos e inulina no organismo humano: estudo baseado em evidências. **Ciencia & Saúde**, v.20, p. 241-252, 2009.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.287–291, 2002.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the concept of Prebiotics. **Journal of Nutrition**. v.125, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R., PROBERT, H. M., VAN LOO, J., RASTALL, R. A., & ROBERFROID, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, p.259–275, 2004.

GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; VAN LOO J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria implications for health. In : SILVA, A.S.S.; HAAS, P.; SARTORI,

N.T.; ANTON, A.A.; FRANCISCO, A. Fructooligosacarídeos: Fibras Alimentares Ativas. **B.CEPPA**: Curitiba, v.25, n.2, p. 295-304, 2007.

GHAZI, I. et al. Beet sugar syrup and molasses as low-cost feedstock for the enzymatic production of fructo-oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2964-2968, 2006.

HARWOOD, C.R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol**, v.10, p.247-256, 1992.

HAULY, Maria Célia de Oliveira; FUCHS, Renata Hernandez Barros; PRUDENCIO-FERREIRA, Sandra Helena. Suplementação de iogurte de soja com fructooligosacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, p.613-622, 2005.

HERNALSTEENS, Saartje; MAUGERI, Francisco. Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula sp.* **Journal of Food Biochemistry**. v.34, p. 520–534, 2010.

HIJUM, S.A.F.T. Kinetics properties of  $\alpha$ -D-glucosidase from *Lactobacillus reuteri*. **FEBS Letters**. v.534, p.207-210, 2003.

HIROYUKI, Sumi. Determination and Properties of Fibrinolysis Accelerating Substance (FAS) in Japanese Fermented Soybean “Natto”. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan (Nippon Nogeikagaku Kaishi)**, v. 74, p. 1259-1264, 2000.

HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

IKEDA, Tadashi; KURITA, Tomoko; HIDAKA, Hidemasa; MICHALEK, Suzanne M.; HIRASAWA, Masatomo. Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose. **Gen. Pharmac**, v. 21, p. 175-179, 1990.

KAUME, Lydia; GILBERT, William; GADANG, Vidya; DEVAREDDY, Latha. Dietary Supplementation of Fructooligosaccharides Reduces Hepatic Steatosis Associated with Insulin Resistance in Obese Zucker Rats. **Functional Foods in Heals and Disease**. v. 5, p. 199-213, 2011.

KHURI, André I.; MUKHOPADHYAY, Siuli. Response surface methodology. **WIREs Computational Statistics**, v.2, p.128-149, 2010.

LICHT, Tine Rask; EBERSBACH, Tine; FRØKIÆR, Hanne. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v.23, p.70-82, 2012.

LIU, J.; LUO, J.; YE, H.; SUN, Y.; LU, Z.; ZENG, X..Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Carbohydrates Polymers** v. 79, p.206-213, 2010.

LORENZONI, André S.G.; AYDOS, Luiza F.; KLEIN, Manuela P. Rafael C. RODRIGUES, Rafael C.; HERTZ, Plinho F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. **Carbohydrate Polymers**, v.103, p.193-197, 2014.

MATSUURA, F. C. A. U. **Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, SP, 2005.

MORAES, Fernanda P.; COLLA, Luciane M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.109-122, 2006.

MUSSATTO, Solange I.; MANCILHA, Ismael M. Non-digestible oligosaccharides: A review. **Carbohydrate Polymers**, v.68, p. 587–597, 2007.

MUSSATTO, Solange I.; TEIXEIRA, José A. Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochemical Engineering Journal*, v.53, p.154–157, 2010.

MORRIS, Cécile; MORRIS, Gordon A. The effect of inulin and fructooligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of bread and their role in weight management: A review. **Food Chemistry**, v. 133, p, 237-248, 2012.

NEMUKULA, A.; MUTANDA, T.; WILHELMI, B. S.; WHITELEY, C. G. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. **Bioresource Technology**. v.100, p. 2040–2045, 2009.

NI, Y; WANG, Y; SUN, Z. Butanol Production from Cane Molasses by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864: Batch and Semicontinuous Fermentation. **Appl Biochem Biotechnol**, v.166, p.1896–1907, 2012.

NINESS, Kathy R. Inulin and Oligofructose: What are they? **The Journal of nutrition**. v.129, suppl., p.1402-1406, 1999.

NING, Yawei; WANG, Jinpeng; CHEN, Jing; YANG, Na; JIN, Zhengyu; XU, Xueming. Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Bioresource Technology**, v.101, p.7472-7478, 2010.

OLIVEIRA, Marcos Roberto; SILVA, Rui Sérgio Santos Ferreira; BUSATO, João Batista, CELLIGOI Maria Antonia Pedrine C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate source. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.177-183, 2007.

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Fructooligosacarídeos: Implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, 2003.

PATEL, Seema; GOYAL, Arun. Functional oligosaccharides: production, properties and applications. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. n. 27, p. 1119–1128, 2011.

PRATA, Margarida B.; MUSSATTO, Solange I.; RODRIGUES, Lígia R.; TEIXEIRA, José A. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. **Biotechnol Lett**, v.32, p.837-840, 2010.

RAIZEL, Raquel; SANTINI, Eliana; KOPPER, Andressa Magali; REIS FILHO, Adilson Domingos dos. Effects of probiotics, prebiotics and synbiotics consumption on the human organism. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RAMAKRISHNA, C.; REDDY, Y.; REDDY, S. Council of Scientific & Industrial Research. Cereal bar formulation and process therefor. A23L 1/164. EUA WO 2005/063047 A1. 31 dez. 2003, 14 jul. 2005. World Intellectual Property Organization.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. 105-10, 2002.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Production of fructosyl transferase by *Aspergillus oryzae* CRF 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 530-537, 2004.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the

microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.442-457, 2005.

SANGILYANDI, G., GUNASEKARAN,P. Polymerase and hydrolase activities of *Zymomonas mobilis* levansucrase separately modulated by in vitro mutagenesis and elevated temperature. **Process Biochemistry**. v.36, p. 543-548, 2001.

SANTOS, Juliana Ferreira dos. **Avaliação das propriedades nutricionais de barras de cereais elaboradas com farinha de banana verde**. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SHIN, H.T. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. **Bioresource Technology**, v. 93, p.52-62, 2004.

SHIH,I. L.; CHEN,L. D.; WU, J.W. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. **Carbohydrates Polymers**. v. 82, p. 111-117, 2010.

SILVA, Juliana Bueno da. **Seleção de microrganismos osmofílicos isolados de favo-de-mel para produção de fructooligosacarídeos por fermentação**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas – São Paulo.

SILVA, Ivonete Quaresma; OLIVEIRA, Brenda Cristina Freitas; LOPES, Alessandra Santos; PENA, Rosinelson da Silva. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. **Alimentos e nutrição**. v.20, p. 321-329, 2009.

SILVA, Juliana Bueno da; FAI, Ana Elizabeth Cavalcante; SANTOS, Rosângela dos; BASSO, Luiz Carlos; PASTORE, Gláucia Maria. Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. 11º Congresso Internacional de Engenharia de Alimentos (ICEF11). **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1547-1552, 2011.

SILVA, Patrícia Bittencourt, BORSATO, Dionisio, CELLIGOI, Maria Antonia Pedine C. Optimization of hilg production of fructooligosaccharides of *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **American Journal of food technology**. In press, 2014.

TUOHY, K. M; KOLIDA, S; LUSTENBERGER, A. M.; GIBSON, G. R. The prebiotic effects of biscuits containing partially hydrolysed guar gum and fructo-

oligosaccharides – a human volunteer study. **British Journal of Nutrition**, v. 86, p. 341–348, 2001.

VAŇKOVÁ, Katarína; ONDERKOVÁ, Zdenka; ANTOŠOVÁ, Monika; POLAKOVIČ, Milan. Design and economics of industrial production of fructooligosaccharides. **Chemical Papers**, v.62, p.375-381, 2008.

VAN VLIES, N; HOGENKAMPA, A.; THIJSSENA, S.; DINGJANA, G. M.; KNIPPINGA, K.; GARSSENA, J.; KNIPPELSA, L. M. J. Effects of short-chain galacto- and long-chain fructo-oligosaccharides on systemic and local immune status during pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, Article in press, JRI-2114, 2012.

VIGANTS, M. B. A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. **International Journal of Food Microbiology**, v.55, p.147–150, 2000.

VIGANTS, Armands,; KRUCE, Ramona; BEKERS, Martins; ZIKMANIS Peteris. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. **Biotechnology Letters**, v.20, p.1017-1019, 1998.

VAN VLIES, N; HOGENKAMPA, A.; THIJSSENA, S.; DINGJANA, G. M.; KNIPPINGA, K.; GARSSENA, J.; KNIPPELSA, L. M. J. Effects of short-chain galacto- and long-chain fructo-oligosaccharides on systemic and local immune status during pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, Article in press, JRI-2114, 2012.

VEGAA, Roberto; M.E. ZUNIGA-HANSENA. A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. **Biochemical Engineering Journal**, v.82, p.158-165, 2014.

Xu, K; Xu, P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v.153, p.23-29, 2014.

YUN, J.W.; Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.107-117, 1996.



### *Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### *Online Submission*

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### **Title Page**

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

### **Abstract**

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

### **Keywords**

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### **Text Formatting**

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- [LaTeX macro package \(zip, 182 kB\)](#)

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

**Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").**

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

- *Abstract*

Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.

- *Footnotes*

Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

- *Introduction*

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

- *Materials and methods*

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein

Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

- *Results*

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

- *Discussion*

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

#### Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

#### *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

*Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

*Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

*Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

*Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

*Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

*Dissertation*

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN Website](#)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote Style](#)

Please note:

- All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts!
- Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al."!
- All tables are to be numbered using Arabic numerals.

- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

#### *Electronic Figure Submission*

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

#### *Line Art*

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

#### *Halftone Art*

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.
- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

#### *Color Art*

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

#### *Figure Lettering*

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

#### *Figure Numbering*

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

#### *Figure Captions*

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### *Figure Placement and Size*

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### *Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

### *Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1