



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto:
SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PARA
APLICAÇÃO EM FILMES COMESTÍVEIS

Londrina
2016

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

**LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto:
SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PARA
APLICAÇÃO EM FILMES COMESTÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bersaneti, Gabrielly Terassi.

Levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto: síntese de fruto-oligossacarídeos para aplicação em filmes comestíveis / Gabrielly Terassi Bersaneti. - Londrina, 2016.
127 f. : il.

Orientador: Maria Antonia P. Colabone Celligoi.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Levanasacarase - Teses. 2. Fruto-oligossacarídeos. Prebióticos - Teses. 3. *Bacillus subtilis* natto - Teses. 4. Filmes comestíveis. Biotecnologia - Teses. I. Celligoi, Maria Antonia P. Colabone. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

GABRIELLY TERASSI BERSANETI

**LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto: SÍNTESE DE
FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PARA APLICAÇÃO EM FILMES
COMESTÍVEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia
Pedrine Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de Abril de 2016.

*Dedico esse trabalho a Deus, a minha família,
e ao meu noivo por todo amor e apoio.*

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, por toda a paciência, pelos conhecimentos transmitidos por todo esse período e pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

A professora Susana Mali de Oliveira pela grande ajuda e dedicação com relação à aplicação deste estudo.

Ao professor Dionísio Borsato, pela atenção e ajuda nas análises estatísticas.

Ao técnico do laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pelo seu apoio e ajuda em tudo que precisei no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Agradeço a Deus, por ter me dado forças para continuar meus estudos e ter me guiado ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Valdirene e Valterney, por ter me incentivado a continuar lutando pelos meus sonhos.

Ao meu noivo, Derique por estar comigo todos os dias e dar apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus avós, Armelindo e Agenir, por todo amor e apoio durante esta caminhada.

Aos amigos do Mestrado em Biotecnologia, com os quais foram compartilhadas preocupações, experiências e trabalho. E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

BERSANETI, Gabrielly Terassi. **Levanasacarase de Bacillus subtilis natto: síntese de fruto-oligossacarídeos para aplicação em filmes comestíveis.** 2016. 127f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Levanasacarase é uma frutossiltransferase responsável pela síntese de levana e fruto-oligossacarídeos (FOSs) em sacarose como substrato. O *Bacillus subtilis natto* é um microrganismo que se destaca como produtor destas moléculas. Neste estudo os objetivos foram otimizar a produção da levanasacarase de *Bacillus subtilis natto* variando a concentração de sacarose e pH, caracterizar parcialmente a enzima quanto à estabilidade térmica e massa molecular e aplicar na síntese de fruto-oligossacarídeos, variando os volumes de reação, 2,5 mL em tudo de ensaio (variando sacarose, temperatura e tempo por delineamento Box Behnken), a melhor condição obtida foi testada em volumes de 250 mL (frascos de Erlenmeyer) e 2,5 L (biorreator). Também foi objetivo deste estudo utilizar os FOSs (0, 1, 5 e 10 g/ 100 g sólidos) produzidos por fermentação com *B. Subtilis*, em filmes de amido de mandioca, pela técnica de casting. Os filmes foram caracterizados quanto à microestrutura, propriedades de barreira e mecânica. A melhor produção de levanasacarase foi de 23,9 U/mL em sacarose a 420,7 gL⁻¹ e pH 7,0. A enzima foi estável até 90 °C por 2 h, demonstrando ser termoestável e apresentou massa molecular de 56 kDa. A maior síntese dos FOSs pela levanasacarase foi de 69,8 gL⁻¹ em 2,5 mL (350 gL⁻¹, 40 °C por 36 h). Em 250 mL e 2,5 L as produções foram 63,7 e 38,7 gL⁻¹ respectivamente, o aumento de volume reduziu em 40 % a produção dos FOSs. Os filmes produzidos com FOSs de *B. subtilis* apresentaram boa aparência, sem poros ou bolhas, e os resultados de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) indicaram fortes indícios de interação entre o amido e esses oligômeros. A adição dos FOSs levou ao aumento da solubilidade e da alongação e ao decréscimo da permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Os resultados mostraram que a levanasacarase de *B. subtilis* teve potencial de produzir altas concentrações dos FOSs em meio de sacarose e esses mostraram ser compatíveis com a matriz polimérica do amido. Sendo assim, os fruto-oligossacarídeos de *B. subtilis natto* podem ser indicados como um promissor ingrediente funcional.

Palavras-chave: Levana. Fruto-oligossacarídeos. Filmes biodegradáveis. Prebióticos.

BERSANETI, Gabrielly Terassi. **Levansucrase of *Bacillus subtilis natto***: synthesis of fructooligosaccharides for use in edible films. 2016. 127p. Dissertation (Master degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Levansucrase is a fructosyltransferase that synthesizes levan and fructooligosaccharides (FOSs) in sucrose. *Bacillus subtilis natto* is a microorganism that stands out as a producer of these molecules. The aims of this study were to optimize the production of levansucrase of *B. subtilis natto* varying the sucrose concentration and pH, characterize the enzyme as to thermal stability and molecular weight and verify the FOSs synthesis in 2,5 mL (ranging sucrose, temperature and time by Box Behnken design), the best condition obtained was tested in 250 mL (Erlenmeyer frasks) and 2,5 L (bioreactor). Also in this work were produced FOSs by microorganism and were employed as a functional ingredient in cassava starch edible films, which were characterized according to their microstructure, mechanical and barrier properties. The best production of levansucrase was 23,9 U/mL in sucrose 420,7 gL⁻¹ and pH 7,0. The enzyme was stable until to 90 °C for 2 h, proving to be thermostable and the molecular weight was of 56 kDa. The greater synthesis of FOSs by levansucrase was 69,8 gL⁻¹ in 2,5 mL (350 gL⁻¹, 40 °C for 36 h). In 250 mL and 2,5 L the FOSs productions were 63,7 and 38.7 gL⁻¹ respectively, the increase in volume reduced in 40 % the production. Films produced with FOSs *B. subtilis* had good appearance without cracks or bubbles, and the results of infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR) and differential scanning calorimetry (DSC) indicated strong evidence of interaction between starch and these oligomers. The addition of FOSs led to increased solubility and elongation and decreased the permeability of the films water vapor. The results showed that the levansucrase of *B. subtilis* has potential to produce high concentrations of FOSs in sucrose medium and these were compatible with the polymeric starch matrix. Thus, fructooligosaccharides *B. subtilis natto* can be indicated as a promising functional ingredient.

Keywords: Levan. Fructooligosaccharides. Biodegradable films. Prebiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Reações catalisadas pela levanasacarase.	17
Figura 2 -	Sítio ativo da levanasacarase: (a) visão superior da enzima (b) distância interatômica entre os resíduos do sítio ativo, representadas pelas linhas descontínuas e as pontes de hidrogênio pelas contínuas. (c) Contato entre a sacarose e a levanasacarase. As moléculas de água são representadas por asteriscos e interação de Glu342 com sacarose.....	18
Figura 3 -	Produção de fruto-oligossacarídeos pela frutossiltransferase a partir da sacarose.....	28
Figura 4 -	Fluxograma da produção da levanasacarase e síntese de FOSs variando os volumes de reação e a produção de FOSs por <i>Bacillus subtilis</i> para incorporação em filmes de amido de mandioca.....	36

ANEXO A

Figura 1-	Superfície de resposta na produção de levanasacarase produzida por <i>Bacillus subtilis natto</i> variando sacarose e pH.....	80
Figura 2-	Estabilidade térmica da levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i> em pH 5.0.....	80
Figura 3 -	Gel SDS-PAGE com (M) marcador de massa molecular (1) extrato bruto enzimático.	81
Figura 4 -	Superfície de resposta na síntese dos FOSs pela levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i> , variando sacarose, temperatura e tempo.	83
Figura 5 -	(a) Síntese dos FOSs pela levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i> e atividade enzimática em biorreator por 36 h e (b) perfil dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) durante a síntese enzimática dos FOSs	83

ANEXO B

- Figura 1** - Imagens da superfície dos filmes com aumento de 800x. Onde: (A) Amido, (B) AM-FOSs 1 %, (C) AM-FOSs 5 % e (D) AM-FOSs 10 %, todas as formulações com 20 % de glicerol.....101
- Figura 2** - Espectroscopia de infravermelho com transformada no Fourier (FTIR) de filmes comestíveis a base de amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos102
- Figura 3** - Calorimetria diferencial de varredura em filmes com amido e fruto-oligossacarídeos.....102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade de levanasacarase produzida por diferentes microrganismos e suas respectivas condições de cultivo	23
Tabela 2 -	Delineamento composto central rotacional (2^2) para avaliar as concentrações de sacarose e pH na produção da levanasacarase por <i>Bacillus subtilis natto</i> , 24 h de cultivo a 37 °C, 150 rpm	37
Tabela 3 -	Delineamento experimental Box-Behnken 2^3 para testar o efeito da concentração de sacarose, temperatura e tempo na produção dos FOSs pela levanasacarase	40
Tabela 4 -	Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de fruto-oligossacarídeos	43

ANEXO A

Tabela 1 -	Atividade da levanasacarase e produção de levana por <i>Bacillus subtilis natto</i> a 37 °C durante 24 h utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2^2	79
Tabela 2 -	Análise de variância (ANOVA) da produção de levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i>	79
Tabela 3 -	Síntese enzimática dos FOSs (gL^{-1}) e rendimento (%) pela levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i> , variando a sacarose, temperatura e tempo por Delineamento Box e Behnken 2^3	82
Tabela 4 -	Análise de variância (ANOVA) demonstrando os efeitos da concentração de sacarose, temperatura e tempo na síntese dos FOSs pela levanasacarase de <i>B. subtilis natto</i>	82

ANEXO B

Tabela 1 -	Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de fruto-oligossacarídeos	101
-------------------	---	-----

Tabela 2 -	Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água de filmes com amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos.....	103
Tabela 3 -	Propriedades mecânicas dos filmes de amido de mandioca com adição dos FOSs nas formulações e 20 % de glicerol como plastificante	103

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amido de Mandioca
ASTM	American Society for Testing and Material
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EB	Extrato Bruto
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
FOSs	Fruto-oligossacarídeos
FTase	Frutossiltransferase
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com transformada no Fourier
kDa	Kilodaltons
LS	Levanasacarase
MEV	Microscopia Eletrônica de varredura
MRS	Metodologia de Superfície de Resposta
PVA	Permeabilidade ao vapor de água
UR	Umidade Relativa
U	Unidade de Atividade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	GERAL.....	15
2.2	ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	ENZIMA LEVANASACARASE: PROPRIEDADES E FUNÇÕES.....	16
3.2	PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE POR VIA FERMENTATIVA.....	19
3.3	FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DA ENZIMA LEVANASACARASE.....	23
3.4	PROPRIEDADES PREBIÓTICAS DO FRUTO- OLIGOSSACARÍDEOS.....	27
3.5	APLICAÇÕES DOS FOSS EM FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	MICROORGANISMO.....	35
4.2	MEIO DE PRESERVAÇÃO.....	35
4.3	INÓCULO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA.....	35
4.4	MEIO DE FERMENTAÇÃO.....	36
4.5	PRODUÇÃO DA LEVANASACARASE.....	37
4.5.1	Caracterização Parcial da Levanasacarase.....	38
4.5.1.1	Estabilidade térmica da levanasacarase.....	38
4.5.1.2	Determinação da massa molecular da levanasacarase.....	38
4.6	SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PELA LEVANASACARASE.....	39
4.6.1	Síntese de Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Tubo de Ensaio.....	39
4.6.2	Síntese de Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Frascos de Erlenmeyers.....	40

4.6.3	Síntese de Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Biorreator	41
4.7	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FOSS DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NATTO EM BIORREATOR PARA APLICAÇÃO EM FILMES	41
4.8	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	42
4.8.1	Determinação dos Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)	42
4.8.2	Determinação da Atividade da Levanasacarase	42
4.8.3	Quantificação da Levana.....	42
4.8.4	Determinação de Fruto-oligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	43
4.9	PRODUÇÃO DOS FILMES COMESTÍVEIS	43
4.9.1	Caracterização dos Filmes.....	44
4.9.1.1	Microestrutura	44
4.9.1.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR).....	44
4.9.1.3	Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	45
4.9.1.4	Espessura	45
4.9.1.5	Solubilidade em água.....	45
4.9.1.6	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	46
4.9.1.7	Propriedades Mecânicas.....	47
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	ANEXOS	
	ANEXO A - SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PELA LEVANASACARASE DE <i>Bacillus subtilis</i> natto CCT7712 COM POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.....	61
	ANEXO B - FILMES COMESTÍVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA E FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE <i>Bacillus subtilis</i> natto CCT 7712.....	84

CONCLUSÃO	104
ANEXO C - Normas para submissão do artigo para o periódico Food Chemistry	105
ANEXO D - Normas para submissão do artigo para o periódico Carbohydrate Polymers.....	115

1 INTRODUÇÃO

Levanasacarase (EC 2.4.1.10) é uma frutossiltransferase responsável por sintetizar levana e fruto-oligossacarídeos (FOSs) utilizando sacarose como substrato. As frutossiltransferases pertencentes à família 68 das hidrolases glicosídicas são conhecidas por catalisar três reações distintas: *hidrólise*, quebra da molécula de sacarose em glicose e frutose; *transfrutosilação*, transferência do resíduo frutossil gerado pela hidrólise da sacarose para um aceptor, e *polimerização*, quando ocorre a síntese de levana.

Uma característica interessante desta enzima é a capacidade de usar diretamente a energia livre da clivagem da sacarose e transferir a sua porção frutossil, formando uma cadeia crescente do polímero de levana. Além disso, a formação de levana pode ser quantitativamente substituída pela formação de homo e hetero-FOSs, na presença de vários aceptores.

Levanasacarase é produzida por bactérias gram-positivas e gram-negativas. *B. subtilis* é considerado um modelo para estudar bactérias gram-positivas, devido a suas características genéticas e fisiológicas, e por não ser patogênico. Em processos biotecnológicos e industriais o *B. subtilis* tem chamado muita atenção, devido ao seu potencial de multiplicação e capacidade de secretar proteínas extracelulares, como também de produzir levanas e FOSs a partir da sacarose.

Os FOSs têm ganhado atenção devido às suas propriedades, tais como, apresentar um terço do poder adoçante da sacarose, não serem cariogênico, ser pouco calórico, não cristalizar, não precipitar e são classificados como prebióticos devido as suas propriedades promotoras de saúde como: melhorar a microbiota humana e promover mudanças na sua composição. Este prebiótico também atua como fibra solúvel, estimulando a absorção de cálcio e minerais e reduzindo a absorção do colesterol.

Também podem ser utilizados na indústria alimentícia, em formulações de sorvetes, sobremesas lácteas, biscoitos, produtos de panificação, barras de cereais, sucos, produtos de confeitaria, molhos, etc., substituindo os carboidratos, e gerando produtos com teor de açúcar reduzido, possibilitando o uso por diabéticos.

Além disso, os FOSs podem ser incorporados em formulações de filmes comestíveis com diferentes matrizes (amido, metilcelulose, etc.), com intuito de trazer benefícios ao organismo por exercer seu efeito prebiótico, porém os filmes são desenvolvidos com intuito de proteger os alimentos, aumentando sua vida de prateleira. Dentre as matrizes que podem ser empregadas, o amido é bastante utilizado, pois trata-se de uma matéria-prima de baixo custo, de elevada disponibilidade, um dos polissacarídeos mais estudados no momento e não representa risco a saúde humana, pois está associado à alimentação.

Com o aumento na demanda e diversas áreas de aplicações, os filmes comestíveis são desenvolvidos para revestir frutas, grãos e outros produtos, apresentando como principal vantagem a de serem consumidos junto com o produto final, contribuindo assim para redução da poluição ambiental.

Considerando a alta produção dos FOSs pelo *Bacillus subtilis* natto e seu potencial para ser utilizado como prebiótico, bem como a preocupação atual da população em melhoria na qualidade de vida, e a busca por alimentos funcionais. O objetivo desta pesquisa foi estudar a produção da levanasacarase para utilizar na síntese dos FOSs, bem como aplicar os FOSs produzidos por fermentação microbiana no desenvolvimento de um filme comestível à base de amido de mandioca.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Produzir e caracterizar levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 para síntese de fruto-oligossacarídeos, e avaliar a incorporação dos FOSs em filmes comestíveis.

2.2 ESPECÍFICOS

- Otimizar a produção da levanasacarase de *B. subtilis* natto por metodologia de superfície de resposta investigando as variáveis sacarose e pH;
- Caracterizar parcialmente a levanasacarase produzida com relação à estabilidade térmica e a massa molecular;
- Otimizar a síntese dos FOSs pela levanasacarase variando a concentração de sacarose, temperatura e tempo por Delineamento Box Behnken (2,5 mL em tubo de ensaio);
- Produzir FOSs por síntese enzimática em volumes de 250 mL (frascos de Erlenmeyer) e 2,5 L (biorreator);
- Produzir e purificar os FOSs em biorreator pelo *Bacillus subtilis* natto;
- Produzir filmes comestíveis à base de amido de mandioca com adição dos FOSs de *B. subtilis* natto;
- Caracterizar os filmes quanto à sua microestrutura, propriedades mecânicas e de barreira.

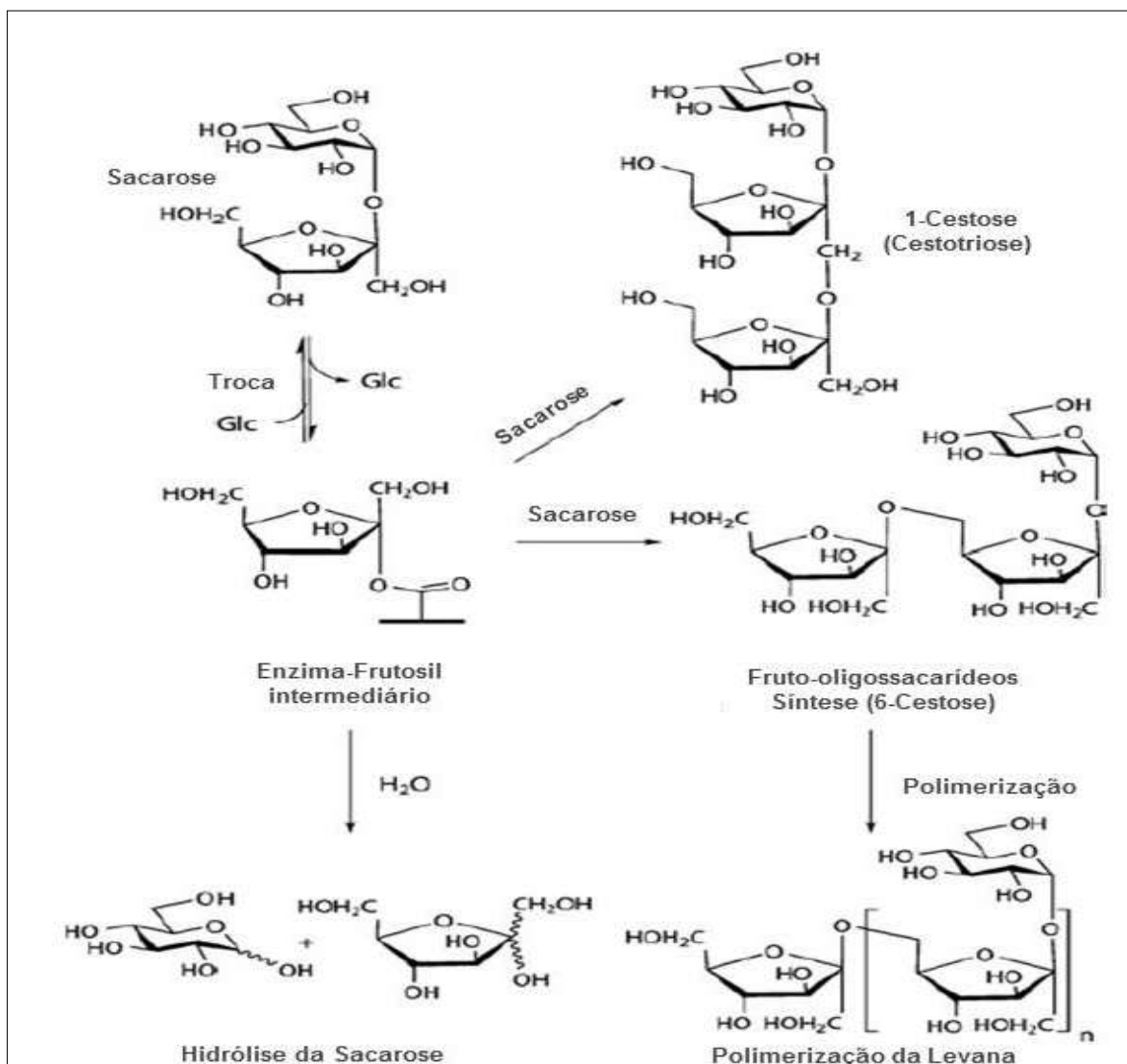
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ENZIMA LEVANASACARASE: PROPRIEDADES E FUNÇÕES

De acordo com a classificação encontrada na base de dados carbohydrate active enzymes, a levanasacarase (E.C. 2.4.1.10 Sacarose-2,6- β -D-Frutana-2,6- β -D-frutosiltransferase) bacteriana pertence à família 68 das hidrolases glicosídicas (GH), possuindo três atividades: transfrutoseilação, hidrólise e polimerização, liberando frutose, glicose, e sintetizando fruto-oligossacarídeos (FOSs) e levana, como demonstra a Figura 1 (AMMAR et al., 2002; GORREC et al., 2002; CANTAREL et al., 2009). A transfrutoseilação da sacarose ocorre através da clivagem da ligação glicosídica β -2,1 e a transferência da porção frutosil em outro acceptor como a água, glicose ou um oligossacarídeo. Esta síntese é um processo complexo em que várias reações ocorrem simultaneamente (ANTOSOVA et al., 2008).

Fruto-oligossacarídeos é a denominação dada aos oligômeros de frutose, nos quais as unidades frutosil são ligadas na posição β -2,1 da sacarose, com uma molécula de glicose terminal, que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996). As levanas também são sintetizadas pela levanasacarase e formadas a partir de sacarose, e consistem em cadeias lineares ou ramificadas de unidades de frutose ligadas à sacarose por ligação glicosídica β -2,6 (HERNANDEZ; BANGUELA 2006). Outra atividade que a enzima apresenta é de hidrólise, responsável por transferir a fração frutosil da sacarose à água (YUN, 1996), e a energia liberada a partir da hidrólise da sacarose é suficiente para transferir a unidade frutosil da sacarose para outro acceptor, e assim formar uma ligação de alta energia (SEIBEL et al, 2006a).

Figura 1- Reações catalisadas pela levanasacarase.



Fonte: Martinez-Fleites et al. (2005)

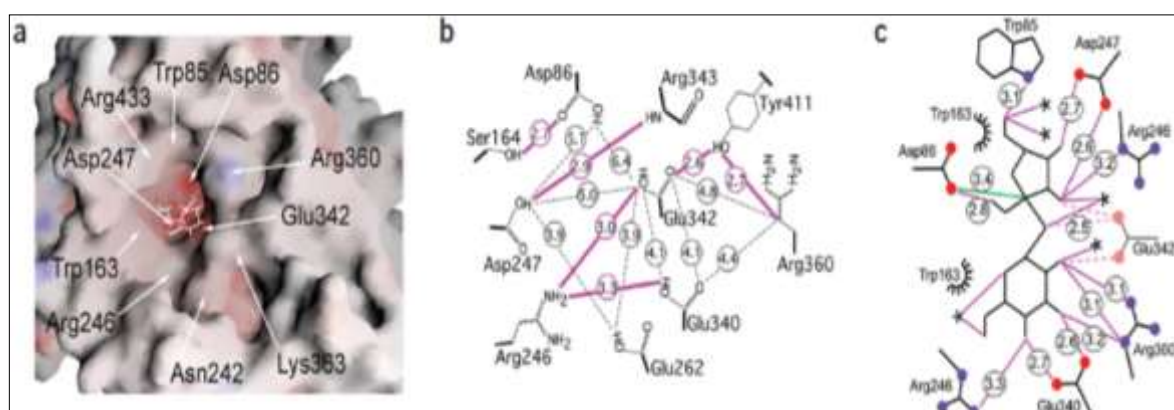
Dentre as propriedades da levanasacarase extracelular de *B. subtilis*, uma bastante importante é a dobradura rápida e eficiente em sua conformação nativa para ser secretada para o meio e impedir a ação proteolítica das proteases a ela associadas (BABÉ; SCHMIDT, 1998; CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1999).

Fouet et al. (1984) identificaram alguns genes estruturais da levanasacarase de *B. subtilis* que são induzidos pela sacarose. O gene *sacB*, codifica a levanasacarase extracelular e dentre os cinco loci regulatórios conhecidos, quatro controlam a expressão de *sacB*.

Quanto à sua conformação, Lebrun e Rapenbusch em 1980 determinaram a estrutura terciária da levanasacarase de *Bacillus subtilis* através de difração de Raios-X, com 3,8 Å. O mapa de densidade eletrônica sugeriu que a levanasacarase possui uma forma alongada elipsoide, com dimensões totais de 26 x 32 x 117 Å, com massa molar em torno de 49.900 Da constituída por uma cadeia polipeptídica simples desprovida do aminoácido cisteína.

A atividade catalítica é fortemente influenciada pelos aminoácidos do sítio ativo, Asp-Glu-Asp, que definidos por cristalografia de Raio-X, estão nas posições 86, 342, 247 na levanasacarase de *B. subtilis* (SEIBEL et al., 2006b). Os estudos de Martínez-Fleites et al. (2005) sobre a estrutura cristalina da levanasacarase de *B. subtilis* revelaram que resíduos de aminoácidos localizados no sítio ativo são importantes para o reconhecimento do substrato. A estrutura do complexo sacarose-levanasacarase sugere que Asp-86 e Glu-342 formam um par essencial ao sítio ativo, característico da maioria das hidrolases glicosídicas, enquanto Asp-247 parece não estar diretamente envolvida no mecanismo da reação química. A tríade Asp86/GLu342/Asp247 localizada no sítio ativo foi identificada em levanasacarase da bactéria gram-negativa *Gluconacetobacter diazotrophicus* e de bactérias gram-positivas como *Bacillus subtilis* (Figura 2) e *B. terium* (MENG; FUTTERER, 2003).

Figura 2- Sítio ativo da levanasacarase: (a) visão superior da enzima (b) distância interatômica entre os resíduos do sítio ativo, representadas pelas linhas descontínuas e as pontes de hidrogênio pelas contínuas. (c) Contato entre a sacarose e a levanasacarase. As moléculas de água são representadas por asteriscos e interação de Glu342 com sacarose.



Fonte: Meng; Futterer. (2003)

O sítio ativo da levanasacarase apresenta semelhanças entre bactérias gram-negativas, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (TAMBARA et al. 1999), *Zymomonas mobilis* (CRITTENDEN; DOELLE, 1993) que sintetizam principalmente FOSs e baixas quantidades de levana, e bactérias gram-positivas como *B. subtilis* (EUZENAT et al., 1997), *Lactobacillus reuteri* 121 (OZIMEK et al., 2006) e *Bacillus megaterium* (HOMANN et al., 2007) sintetizam FOSs, mas predominantemente levana.

Apesar da levanasacarase de bactérias gram-positivas e gram-negativas apresentarem sítio ativo com conformação semelhante, elas diferem na sequência dos aminoácidos (apresentando apenas 20 % de similaridade), no peso molecular, na secreção através da membrana celular, no grau de polimerização do produto sintetizado e na especificidade da região doadora ou aceptora (VAN HIJUM et al., 2006). Apenas algumas levanasacarases foram totalmente caracterizadas em relação à sua especificidade aceptora (SEIBEL et al., 2006b).

A cinética de reações catalisadas por aceptores (sacarose, lactose, maltose e xilose) de levanasacarase são termodinamicamente controladas. Estas reações são desafiadoras em relação à natureza das modificações de aceptores frutossil, e ainda falta compreensão sobre a síntese eficiente de diferentes tipos de FOSs. (TIAN; KARBOUNE, 2012).

Apesar da alta complexidade, vários modelos cinéticos são desenvolvidos, para prever o progresso da reação de síntese dos FOSs a partir de sacarose. Esses modelos são de grande interesse para a definição de estratégias para otimização e o aumento na escala industrial destes bioprocessos (GUIO et al., 2012; VOLL et al., 2011).

3.2 PRODUÇÃO DE LEVANASACARASE POR VIA FERMENTATIVA

O efeito de diferentes condições de fermentação na produção da levanasacarase é o objeto do estudo de vários autores, considerando as suas importantes aplicações. O primeiro estudo de produção e purificação de levanasacarase de *B. subtilis* encontrado foi publicado em 1966, por Dedonder. Na década de 80, Lyness e Doelle (1980, 1981, 1983) realizaram uma série de estudos relacionados à produção de levanasacarase de *Z. Mobilis*, e os resultados

demonstraram que a taxa de hidrólise de sacarose foi dependente da temperatura, concentração de sacarose e pH.

O estudo das condições de fermentação é de grande importância, pois as enzimas sofrem os mesmos efeitos estruturais das proteínas globulares quanto a variações do pH e da temperatura. Alterações extremas de pH podem alterar a estrutura da enzima, devido a uma repulsão entre as cargas elétricas iguais, enquanto que alterações de pH mais brandas podem levar a uma dissociação das cadeias (WILLIAMS; JONES; WATTING, 1976).

Youssef et al. (2014) otimizaram fontes de carbono, nitrogênio, temperatura e pH por fermentação submersa com *Pediococcus acidilactici* e reportaram que a fonte de carbono (sacarose) induziu a atividade da levanasacarase, na concentração de 300 gL⁻¹. A temperatura e pH ótimos encontrados foram de 30 °C e 6,0, respectivamente, apresentando atividade enzimática elevada após dois dias de fermentação, obtendo 39,5 U/mL de atividade com produção máxima de levana de 28,2 gL⁻¹.

A produção de levanasacarase (Lsc3) por *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 foi estudada por Mardo et al. (2014b), que confirmaram uma produção elevada dos FOSs, 15,4 g/mg de proteínas (2,7 U/mL), utilizando 410,8 gL⁻¹ de sacarose a 37 °C por 20 h.

Zhang et al. (2014) estudaram a produção de levana pela levanasacarase de *Bacillus methylotrophicus* cepa SK 21.002, testando as variáveis: concentração de sacarose, pH, temperatura e tempo. A condição que apresentou maior produção de levana foi 300 gL⁻¹ de sacarose, pH 6,0, 37 °C por 24 h, atingindo 100 gL⁻¹ com 6 U/mL.

Silva; Borsato; Celligoi, (2014a) verificaram a síntese dos FOSs pela levanasacarase em diferentes concentrações de sacarose, pH e agitação e com 6 U/mL de enzima, alcançaram a melhor produção com 342 gL⁻¹ de sacarose, pH 7,7 e 234 rpm agitação atingindo 98,86 gL⁻¹ de FOSs, resultado próximo ao encontrado por Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005). Esses autores relatam que concentrações altas de sacarose (200 gL⁻¹) estimulam a produção dos FOSs pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* NRC 33.

Ganaie; Dehariya; Gupta, (2013) relataram que para produção de levanasacarase de *Aspergillus flavus* NFCCI 2364, a sacarose deve estar a 10 %

(v/v), e que o excesso de sacarose no meio de cultura pode diminuir a taxa de transferência de oxigênio, devido ao aumento da viscosidade, o que reduz a produção da enzima. Outros resultados relatados pelos autores mostraram que o meio de cultivo deve apresentar 1 % (v/v) de peptona como fonte de nitrogênio, pH 6,0, 200 rpm por 24 h, para atingir máxima atividade de 37,4 U/mL, que resulta 65,87% de rendimento dos FOSs.

Para otimizar o processo de produção de levanasacarase por *B. subtilis* ATCC 6633, Berté et al. (2013) utilizaram a metodologia de superfície de resposta em fermentação com sacarose, e demonstraram que a condição ótima para a produção da enzima foi de 300 gL⁻¹ de sacarose, pH 6,0, 180 rpm durante 24 h, atingindo 6,57 U/mL. Esses resultados demonstram a importância da concentração de açúcares sob a atividade da levanasacarase.

Gonçalves et al. (2013) estudaram o efeito da concentração de sacarose, pH e agitação na produção da levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto empregando o delineamento Box-Behnken 2³ e a condição ótima para a produção da enzima foi de 300 gL⁻¹ de sacarose, pH 7,5, 160 rpm por 24 h, com atividade de 8,53 U/mL, o que resultou em um aumento da produção de levana (195,51 gL⁻¹). A levanasacarase também demonstrou ser termo-estável e termo-ativa a 30 °C e temperatura ótima de 50 °C.

A produção da levanasacarase utilizando *Bacillus subtilis* NRC1aza foi realizada por Esawy et al. (2013), empregando fermentações em estado sólido e utilizando amido como substrato. A otimização do processo foi realizada empregando planejamento fatorial. Os resultados apresentaram a máxima atividade enzimática de 170 U/g de glicose (60 gL⁻¹), com extrato de levedura (0,5 gL⁻¹), pH 8,0 após 24 h.

O uso de resíduos agroindustriais pode ser uma alternativa para a produção de levanasacarase. Ahmed (2008) estudou a produção da enzima por fermentação em estado sólido com *Bacillus megaterium*, em condições estáticas, utilizando como substrato diferentes resíduos agrícolas (casca de laranja, resíduos de limão e banana, serragem e farelo de trigo). A máxima produção da enzima foi 140,54 U/g de substrato sólido (serragem), em pH 6,0, 30 °C por 72 h. O estudo demonstrou também que a serragem foi mais adequada para a colonização do

microrganismo, observando-se crescimento na superfície do substrato, houve maior produção de enzima, além de ser um dos substratos mais baratos.

Abdel-Fattah et al. (2005) avaliaram a produção de levanasacarase de *B. subtilis* NRC33a utilizando sacarose e glicose como fontes de carbono. As atividades da levanasacarase foram de 14,5 U/mL e 14,1 U/mL em sacarose e glicose respectivamente a 30 °C, 0,15 gL⁻¹ de MgSO₄ e 2 % levedura de panificação, como fonte de nitrogênio. Os resultados indicaram que altas concentrações da enzima ocorreram em 18 h.

Ananthalakshmy; Gunasekaran, (1999) estudaram diferentes condições de fermentação para produção de levana e levanasacarase de *Zymomonas mobilis*, concluíram que a máxima produtividade de levana foi 1,72 gL⁻¹ h⁻¹ em pH 5,0, 25 °C em 150 gL⁻¹ de sacarose e a atividade máxima da levanasacarase foi de 36 U/mg de proteínas, durante 24 h de fermentação.

Vários microrganismos produzem a levanasacarase, dentre eles bactérias gram-negativas: *Erwinia amylovora* (GROSS et al., 1990), *Zymomonas mobilis* (LYNESS; DOELLE, 1983), *Acetobacter suboxydans* (LOITSYANSKAYA et al., 1971), *Gluconobacter oxydans* (ELISASHVILI 1980), e gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e (MANTSALA; PUNTALA 1982), *Bacillus subtilis* natto (TAKAHAMA et al., 1991), *Streptococcus mutans* (SATO et al., 1984), foram estudadas e são capazes de produzir enzimas.

A Tabela 1 apresenta as condições testadas para produção da levanasacarase de diferentes microrganismos por via fermentativa.

Tabela 1. Atividade de levanasacarase produzida por diferentes microrganismos e suas respectivas condições de cultivo.

Microrganismo	Sacarose	pH	Temperatura	Atividade enzimática	Autor
<i>Pediococcus acidilactici</i>	300 gL ⁻¹	6,0	30°C	39,5 U/mL	Youssef et al. (2014)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. DC3000	410,8 gL ⁻¹	6,0	37°C	2,7 U/mL	Mardo et al. (2014b)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> cepa SK21.002	300 gL ⁻¹	6,0	37°C	6 U/g	Zhang et al. (2014)
<i>Bacillus subtilis</i> CCT 7712	334 gL ⁻¹	7,7	37°C	6 U/mL	Silva; Borsato; Celligoi (2014b)
<i>Aspergillus flavus</i> NFCCI 2364	100 gL ⁻¹	6,0	28 °C	37,4 U/mL	Ganaie; Dehariya; Gupta (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	300 gL ⁻¹	6,0	37 °C	6,57 U/mL	Berté et al. (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> natto	300 gL ⁻¹	7,5	37 °C	8,53 U/mL	Gonçalves et al. (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> NRC1 aza	60 gL ⁻¹	8,0	37 °C	170 U/g	Esawy et al. (2013)
<i>Bacillus subtilis</i> NRC33a	50 gL ⁻¹	7,8	30 °C	14,5 U/mL	Abdel-Fattah et al. (2005)

Fonte: o próprio autor

3.3 FATORES QUE AFETAM A PRODUÇÃO DA ENZIMA LEVANASACARASE

Os efeitos dos parâmetros no processo de produção tais como a concentração de substrato, temperatura e pH podem afetar diretamente a produção de levanasacarase extracelular. Belghith et al. (2012) relataram uma atividade muito

baixa da levanasacarase em meios à base de glicose e frutose. No entanto, foi observado que o uso da sacarose em geral tem excelente efeito no crescimento e na atividade, sendo assim a produção da enzima é significativamente influenciada pela fonte de carbono.

Abdel-Fattah et al. (2005) definiram em seus estudos, que 10 % de sacarose foi à condição utilizada para produzir levanasacarase sem síntese de levana, evitando, portanto problemas criados pela alta viscosidade do meio de cultura. Chen; Liu (1996) sugeriram que em concentrações inferiores a 10 % de sacarose, a maior parte foi utilizada para o crescimento celular, enquanto que concentrações elevadas de 30 % resultaram na alta produção de levanasacarase por *Bacillus* sp. Nguyen et al. (2005) confirmam que as propriedades da frutossiltransferase microbianas podem variar de acordo com o microrganismo empregado e a composição do meio de cultura, especialmente a fonte de carbono, que possui papel indutor.

O extrato de levedura também possui papel importante, pois trata-se de fonte de vitaminas (ácido pantotênico, nicotínico, biotina, tiamina e piridoxina) essenciais para o crescimento celular, apresentando um fator estimulante para a síntese de levana (OLIVEIRA et al., 2007). No entanto, o alto custo do extrato de levedura tem um impacto negativo sobre a economia da sua utilização em escala industrial. Silbir et al. (2014) testaram as fontes de nitrogênio: peptona, triptona, uréia e extrato de levedura na produção de levana por *Z. mobilis*. A concentração máxima de levana produzida foi com extrato de levedura a $2,5 \text{ gL}^{-1}$. Segundo o estudo de Belghith et al. (2012) com *Bacillus* sp. utilizando extrato de levedura. Estes autores relataram que o microrganismo teve crescimento relativo e rendimentos de levana importantes com esta fonte de nitrogênio. Balasubramaniem et al. (2001) e Wang; Zhou (2006) otimizaram a produção de β -frutofuranosidase de *Aspergillus niger*, e relataram que o extrato de levedura foi considerado uma boa fonte de nitrogênio em níveis elevados (5 gL^{-1}) atingindo a produtividade da enzima de $58,3 \text{ U/mL/h}$.

Os resultados obtidos no estudo utilizando *Pediococcus acidilactici* realizado por Youssef et al. (2014), relatam que com 0,1 % sulfato de amônio a levanasacarase apresentou maior atividade ($39,5 \text{ U/mL}$), comparando a outras fontes de nitrogênio testadas (nitrato de sódio, ureia, peptona, triptona, extrato de levedura). Wang; Rakshit (1999) também observaram que sulfato de amônio e

nitrato de amônio podem ser indutores na produção de levana, porém limitam a produção da levanasacarase.

Outro fator determinante nas reações enzimáticas e no crescimento celular são o pH, as enzimas podem ser estudadas em torno de seu pH ótimo, assim sendo Inthanavong et al. (2013) demonstraram que o pH teve um efeito significativo sobre a seletividade das reações catalizadas pela levanasacarase de *Geobacillus stearothermophilus*, favorecendo a reação de transfrutossilacção em pH entre 6,0 e 6,5. Para máxima atividade na reação de hidrólise o pH observado foi 6,7.

Nos estudos realizados por Ganaie; Dehariya; Gupta, (2013) observaram que pH 6,0 foi o melhor para a produção de frutossiltransferase de *A. flavus* (NFCCI 2364), provando que este microrganismo foi um excelente produtor dos FOSs atingindo 63,4 %, neste pH. Belghith et al. (2012) verificaram que a enzima levanasacarase de *Bacillus* sp. produziu levana e oligossacarídeos também em pH 6,0. Entretanto Rairakhwada et al. (2010) utilizaram outro microrganismo, e relataram que o pH 8,0 foi o melhor para a formação de levana pela levanasacarase de *B. amyloliquefaciens*.

Segundo Meng; Futterer, (2003) a máxima atividade encontrada para levanasacarase foi em pH 6,0 utilizando *Bacillus subtilis*. O pH 6,0 também foi relatado ser o melhor no estudo de Ammar et al. (2002), utilizando a mesma enzima produzida por *Bacillus* sp. TH4-2. A maior parte das levanasacarases relatadas apresentaram valores de pH ótimos que variaram entre 5,0 e 6,5 (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2002; JIANG et al., 1995). O pH é um parâmetro que influencia na atividade da levanasacarase, e é específico para cada gênero e espécie de microrganismo.

O efeito da variação de temperatura sobre a atividade da levanasacarase também tem sido extensivamente estudado, mas a maioria dos autores apresentam a atividade total, em vez de quantificarem separadas as reações de transfrutossilacção e atividades hidrolíticas (INTHANAVONG, 2011).

A levanasacarase (LSC-3 mutante) de *Pseudomonas syringae* pv. apresentou elevada atividade e estabilidade térmica a 65,4 °C, o que a torna um catalisador biotecnológico promissor na síntese dos FOSs e levana (MARDO et al., 2014a).

Levanasacarase de *Erwinia amylovora* é mais ativa em uma ampla faixa de temperaturas, mas em 50 °C a enzima apresentou ótima atividade de hidrólise (na presença de 10 mM de sacarose), ao passo que atividade de transfrutoseilação foi mais elevada a 37 °C por 24 h (856 µmol/min de atividade) (CAPUTI et al., 2013).

Segundo estudos realizados por Silva; Borsato; Celligoi, (2014b) a levanasacarase de *B. subtilis* natto mostrou-se mais ativa em 45,8 °C, resultados semelhantes foram relatados por Belghith et al. (2012) utilizando levanasacarase de *Bacillus sp.*, que permaneceu ativa em 50 °C, exibindo notável estabilidade, e manteve 100 % de sua atividade original por mais de 1h, mostrando ser termoestável.

Para Abdel-Fattah et al. (2005) a temperatura ótima na produção da levanasacarase por *B. subtilis* NRC33a foi de 30 °C, e para *Erwinia herbicola* foi relatada ser em 25 °C (KEITH et al., 1991).

Portanto, o efeito da temperatura sobre a atividade de levanasacarase e seu produto final é dependente da sua origem microbiológica (INTHANAVONG, 2011).

Os sais adicionados nos meio de fermentação também podem influenciar na produção de levanasacarase. Gonçalves et al. (2013) estudaram o efeitos dos sais (NaCl, KCl, ZnCl₂, BaCl₂, CaCl₂, MnCl₂, Na₂SO₄, FeSO₄ e CuSO₄, em concentrações de 0,2 a 0,8 M) na produção da levanasacarase, e relataram que os sais NaCl, KCl e Na₂SO₄ induziram o aumento na atividade da enzima e na produção de levana. Em destaque o NaCl a 0,8 M que estimulou em 26 % a atividade da levanasacarase, e a 0,6 M estimulou em 60 % a produção de levana.

Belghith et al. (2012) adicionaram MgSO₄ no meio de fermentação a 100 mM, esta concentração induziu três vezes mais a atividade da levanasacarase. A adição de MgSO₄ em 0,15 gL⁻¹, segundo os autores foi mais favorável comparado a outras fontes (sulfato de amônio, peptona e uréia) para atividade enzimática alcançando 18 U/mL (ABDEL-FATTAH et al., 2005).

As enzimas também podem se tornar inativas ou reduzir sua atividade, dependendo da composição do meio. A levanasacarase de *Acetobacter diazotrophicus* (HERNANDEZ et al., 1995) e *Ranunculus aquatilis* (OHTSUKU et al. 1992) foram inativadas por FeSO₄. Outros íons metálicos como Zn₂₊ e Cu₂₊,

diminuíram a atividade da levanasacarase (BELGHITH et al., 2012). Entretanto a adição de K_2HPO_4 (2 gL^{-1}) apresentou efeito positivo na atividade da levanasacarase de *Erwinia herbícola*.

3.4 PROPRIEDADES PREBIÓTICAS DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO): um prebiótico é um componente alimentar não digerível que confere benefícios à saúde do hospedeiro associados com a modulação da microbiota (PIÑEIRO et al., 2008).

Para um componente alimentar ser classificado como prebiótico, ao menos três critérios são requeridos: o substrato não pode ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado; deve ser seletivo no benefício de bactérias do intestino grosso, como as bifidobactérias, e a fermentação do substrato devem induzir efeitos benéficos na luz intestinal do hospedeiro (PARRACHO, McCARTENEY, GIBSON, 2007).

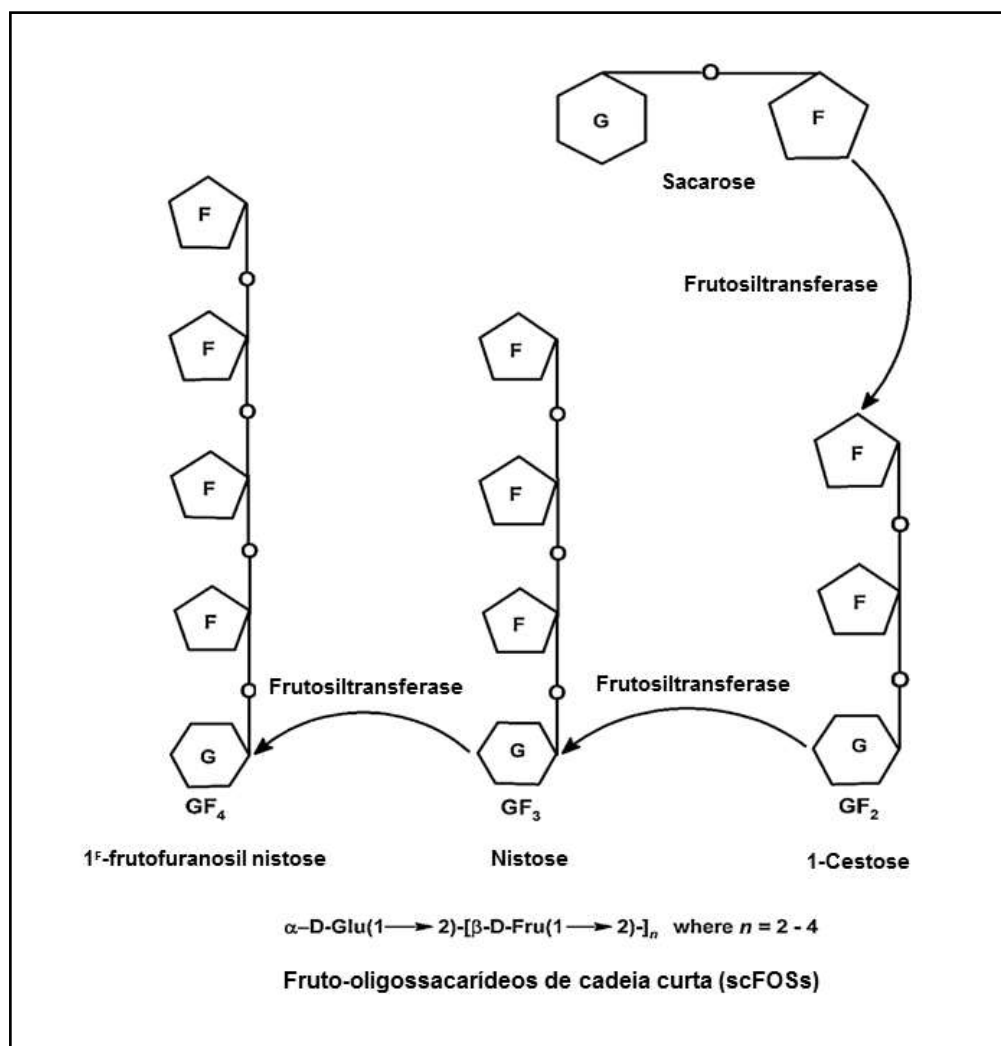
A microbiota intestinal fermenta uma gama de substâncias, principalmente fornecida pela dieta, que não podem ser digeridas pelo hospedeiro no intestino delgado e estão disponíveis para a fermentação pela microbiota do cólon. Estes incluem amido resistente, polissacarídeos (fibra alimentar), oligossacáridos, proteínas, aminoácidos, entre outros (GIBSON et al., 2004).

Dentre os oligossacarídeos que são fermentados no cólon estão os FOSs, são oligômeros de frutose, considerados açúcares não convencionais. Devido à sua configuração química, são resistentes a enzimas digestivas, de forma que chegam intactos ao intestino grosso onde são fermentados por bactérias nativas e benéficas, dessa forma exercem seu efeito prebiótico (BOUHNİK et al., 2006). A glicose presente nos FOSs e a sacarose sustentam o crescimento e a produção celular das bactérias, enquanto que a frutose permite a indução da produção de frutofuranosidase, enzima necessária para a síntese dos FOSs (PERRINS et al. 2002).

FOSs são oligômeros de frutose constituídos de uma unidade de glicose (G) e unidades frutossil (F) ligadas na posição β -(2→1) da sacarose (GF).

Sendo que os principais são 1-cestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-β-frutofuranosil nistose (GF₄) (GUIO et al., 2012) estão apresentados na Figura 3.

Figura 3- Produção de fruto-oligossacarídeos pela frutossiltransferase a partir da sacarose.



Fonte: Singh; Singh; Kennedy. (2016)

Como os FOSs não podem ser digeridos por enzimas do intestino delgado, são fermentados no intestino grosso a fim de estimular seletivamente o crescimento de bactérias probióticas, que fazem parte da microbiota intestinal, com esta fermentação são produzidos lactato e ácidos graxos de cadeia curta, como o butirato, o propionato e o acetato (BORNET et al., 2002), que atuam na remoção de bactérias potencialmente patogênicas como Clostrídios e Enterobactérias (GIBSON; ROBERFROID, 1995; YUN, 1996).

FOSs também exercem outras funções como a de inibir o crescimento de microrganismos nocivos no intestino humano, agir na prevenção do cancro do cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995; SANCHEZ et al, 2010) e aumentar a resposta imune do hospedeiro (FANARO et al., 2005), além de auxiliar na eliminação dos radicais livres (WANG et al., 2008).

No estudo realizado por Dominguez et al. (2014) a *Bifidobacterium breve* NRRL 41408 e *B. longum var. infantis* NRRL 41661 foram as cepas que apresentaram melhor crescimento com FOSs. Assim, os microrganismos de crescimento mais rápido são capazes de colonizar de forma mais eficiente o hospedeiro. Portanto, a vantagem não é apenas a capacidade de consumir o prebiótico, mas sim consumí-lo mais rapidamente.

Bacillus subtilis natto possui grande potencial para produção dos FOSs por fermentação. Silva et al. (2014a, 2014b) estudaram a produção dos FOSs utilizando este microrganismo e alcançaram $98,86 \text{ gL}^{-1}$ de FOSs em 300 gL^{-1} sacarose, pH 7,7, 234 rpm durante 24 h. Os autores também estudaram a síntese dos FOSs utilizando a enzima levanasacarase de *B. subtilis* natto e obtiveram $54,86 \text{ gL}^{-1}$ de FOSs com 334 gL^{-1} de sacarose, pH 6,0, $45,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em 12 h. Além disso, Silva et al. (2016) avaliaram a capacidade do *Lactobacillus* ssp. em utilizar os FOSs produzidos pelo *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 como única fonte de energia, atestando a sua ação prebiótica. Os resultados mostraram que os FOSs foram igualmente eficientes quando comparados à glicose para fornecer energia a este microrganismo, e as análises confirmaram a sua atividade prebiótica e sugeriram que as combinações específicas de probióticos (*L. Plantarum* ATCC14917 e *L. Casei* (LC-1)) e do prebiótico (FOSs) podem ser utilizadas como simbióticos em produtos lácteos e outros alimentos.

Em função de todos os benefícios mencionados, os FOSs têm atraído atenção devido ao aumento na demanda por ingredientes funcionais. Assim produtos alimentícios benéficos à saúde humana tornam-se uma tendência mundial por ajudar na prevenção de doenças (GANAI; GUPTA; KANGO, 2013).

Por esta razão, FOSs são atualmente utilizados como substituto de açúcar em confeitos, gomas, bebidas, dentre outros, não são cariogênicos, e possuem baixo valor calórico, podendo ser consumidos por diabéticos. Além disso, vários estudos tem demonstrado que os fruto-oligossacarídeos atuam na redução de

fosfolípidos, triglicerídeos e níveis de colesterol, ajudam também na absorção de cálcio e magnésio no intestino (MUSSATTO; MANCILHA, 2007). O aumento da absorção de cálcio produz um verdadeiro equilíbrio na alimentação, e com o consumo dos FOSs podem melhorar a calcificação óssea (MOROHASHI et al., 1998).

Desta forma, os FOSs possuem grande demanda no mercado global de alimentos, pois são reconhecidos como seguros (GRAS) de acordo com o FDA (Food and Drug Administration, EUA) (GANAI: LATEEF; GUPTA, 2014).

3.5 APLICAÇÕES DOS FOSS EM FILMES E REVESTIMENTOS COMESTÍVEIS

Filmes e revestimentos comestíveis são definidos como uma fina camada de material que proporciona uma barreira à umidade, oxigênio e ao movimento de solutos para o alimento (GUILBERT, 1986), são utilizados na proteção de alimentos a fim de aumentar a sua vida útil.

De acordo com a Diretiva Europeia (ED, 1995, 1998) e normas dos EUA (FDA, 2006), filmes e revestimentos comestíveis podem ser classificados como produtos alimentícios, ingredientes ou aditivos alimentares, substâncias ou materiais de revestimento em contato com alimentos. Os materiais formadores de filmes não devem ser tóxicos e todas as instalações do processo devem atender altos padrões de higiene (HAN, 2002; NUSSINOVITCH, 2003). Os regulamentos governamentais mais importantes em relação aos aditivos na alimentação são a Food and Drug Administration (FDA), a Comissão Europeia, e as normas da União e do Codex Alimentarius, que constitui a FAO/órgão regulador em conjunto com a OMS (RAJU; BAWA, 2006).

Os revestimentos comestíveis têm ganhado bastante atenção por ter elevado potencial para transportar ingredientes ativos, tais como agentes de antiescurecimento, corantes, aromas, nutrientes, compostos antimicrobianos e antioxidantes (PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005). Os componentes utilizados para a preparação dos filmes podem ser classificados em três categorias: hidrocolóides (tais como proteínas, polissacarídeos e alginato), lípidos (tais como ácidos graxos, ceras, acilglicerol) e compósitos (DONHOWE; FENNEMA, 1993).

Entre os hidrocolóides, incluem-se os polissacarídeos que englobam a celulose, amidos, derivados de pectina, extratos de algas, gomas de fermentação microbiana e quitosana (KROCHTA; MULDER-JOHNSON, 1997). O amido possui capacidade de formar filmes, e vem sendo utilizado na área de revestimento de alimentos.

Quimicamente, o amido nativo é constituído de dois principais componentes macromoleculares: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero de glicose linear, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e possui excelente capacidade de formar filmes (CAMPOS et al., 2011). Enquanto que a amilopectina é um polímero altamente ramificado, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e ramificações ligadas por ($\alpha 1 \rightarrow 6$) pontos estes que ocorrem a cada 25-30 unidades de glicose (DURRANI; DONALD 1995; LIU, 2005).

Filmes comestíveis ou biodegradáveis de amido podem ser obtidos por duas técnicas principais: *casting* com subsequente secagem (via úmida) ou por processamento termoplástico (via seca) (PAES et al., 2008). Sob altas temperaturas (65 e 100 °C), e dependendo do tipo de amido, ocorre um processo irreversível de gelatinização (desestruturação dos grânulos nativos) (ZHONG et al., 2009). A gelatinização do amido é um processo no qual os grânulos incham, dependendo da quantidade de água disponível, provocando a quebra das ligações de hidrogênio que ocorrem entre as cadeias de amilose e amilopectina (CARVALHO, 2008). Após o processo de gelatinização aditivos podem ser incluídos na mistura ou serem preparados de forma independente.

Podem ser adicionados ingredientes que contenham agentes antimicrobianos e antioxidantes a fim de melhorar em geral a proteção que o filme já fornece (JIMENÉS et al., 2012). Também é possível aprimorar as propriedades sensoriais dos alimentos revestidos desde que, contenham vários componentes como aromatizantes, corantes, edulcorantes (BOURTOOM, 2008), e melhora-los pela adição de ingredientes funcionais como, por exemplo, prebióticos e/ou probióticos, pois trazem benefícios a saúde.

Segundo Scholz-Ahrens et al (2007) e Roberfroid (2000) os prebióticos são de fundamental importância, pois são ingredientes alimentares não digeríveis que trazem benefícios por atingir o hospedeiro, ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou mais bactérias (probióticas) no trato

gastrointestinal e assim, exercem um efeito de promoção da saúde, além de possuir outros atributos importantes.

Dentre os prebióticos destacam-se os oligossacarídeos, que são solúveis em água, tais como fruto-oligossacarídeos (FOSs), galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS), oligossacarídeos de quitosana (COS), oligossacarídeos de soja (SOS), e inulina (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012).

Os fruto-oligossacarídeos podem melhorar a taxa de dissolução de água no amido no preparo dos filmes, afetar as propriedades mecânicas dos mesmos, e podem agregar atividade prebiótica, utilizando temperaturas baixas (40-60 °C) (NAGPAL et al., 2012).

Filmes foram preparados por adição de prebióticos (FOSs e inulina) com matriz de amido de milho. Os autores encontraram que o tempo de solubilidade em água diminuiu nitidamente. Isto pode ser atribuído ao rompimento da interação entre o amido e o prebiótico que é solúvel em água. Além disso, a alongação na ruptura das películas aumentou de 15 a 46 %, aparentemente devido ao efeito plastificante dos prebióticos. Além disso, os resultados mostraram atividade prebiótica *in vitro* presente nos filmes, indicando não ser afetada pelo processo de preparação (*casting*) (TANG et al., 2015).

Romano et al. (2014) estudaram viabilidade de bactérias lácticas em filmes com matriz de metilcelulose, adicionada de fruto-oligossacarídeos de origem comercial, com intuito de melhorar suas propriedades, e aumentar a sobrevivência bacteriana após a desidratação e armazenamento dos filmes. Os autores relataram que com ausência dos FOSs houve desidratação dos filmes, fato este que reduziu significativamente as células viáveis, no entanto utilizando a concentração de 3% dos FOSs comprovaram que este prebiótico tem ação protetora em filmes de metilcelulose.

Outros oligômeros de carboidrato com ação prebiótica foram testados por Soukoulis et al. (2014), dentre eles inulina, polidextrose, oligossacáridos e dextrina de trigo. Foram avaliados pela primeira vez em filmes comestíveis com matriz de gelatina bovina e probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* GG). Os prebióticos proporcionaram redução na transparência quando comparado ao controle, não havendo diferenças nas espessuras dos filmes, resultando em uma estrutura

compacta e uniforme, além disso, a adição de gluco-oligossacarídeos e polidextrose proporcionaram maior proteção fazendo com que os números iniciais de células *Lactobacillus rhamnosus* GG se mantivesse viáveis devido suas melhores propriedades de adesão. A inulina foi a fibra mais eficaz em diferentes temperaturas de armazenamento (4 e 25 °C por 25 dias).

Filmes com matriz de Eudragit® FS 30D e adição de levana (exopolissacarídeo) produzida por *B. subtilis* natto, foram desenvolvidos por Santos et al. (2012), com intuito de criar um revestimento para excipientes na área farmacêutica, os filmes foram então caracterizados, e os resultados utilizando a levana foram satisfatórios, aumentando a permeabilidade ao vapor de água, porém não houve influência no índice de intumescimento das formulações testadas.

Röble et al. (2011) aplicou o revestimento comestível com matriz de alginato em maçãs minimamente processadas, contendo inulina e oligofrutose como prebióticos. Os impactos do revestimento sobre a qualidade e valor nutricional das maçãs foram ligeiramente afetados em relação à qualidade e ao aspecto sensorial, também resultaram vários efeitos benéficos tais como vida de prateleira, com retenção de compostos bioativos e voláteis.

As indústrias de alimentos buscam por filmes e revestimentos comestíveis que possam ser utilizados em áreas voltadas ao consumidor, com intuito de agregar valor aos seus produtos, enquanto aumentam o tempo de prateleira. Também, há vários estudos atualmente relacionados a filmes comestíveis para tentar solucionar problemas ligados a poluição por resíduos plásticos, com intenção de substituí-los por materiais biodegradáveis (JIMENÉZ et al., 2012).

Desta maneira pesquisa extensiva é necessária para desenvolver novos materiais, com métodos para formação dos filmes e métodos para melhorar as suas propriedades e aplicações.

Atualmente vários filmes com base de amido são comercializados. Por exemplo, Novamont, uma empresa italiana, comercializa MaterBi®, um material a base de amido, disponível na forma granular que pode ser processado como material termoplástico, formando filmes ou sacos. Outros produtos disponíveis são Bio-P-TM®, comercializado por Bioenvelope (Japão) e BIOPAR® (Biop Biopolymer Technologies AG, Alemanha), é um material com base em amido de batata e inteiramente biodegradável (JIMENÉS et al., 2012).

Portanto o amido é amplamente utilizado, pois trata-se de uma matéria prima de baixo custo e com elevada disponibilidade. Sendo um dos polissacarídeos mais estudados no momento e não representa nenhum risco a saúde humana, pois está associado à alimentação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – PR e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia - Campinas SP.

4.2. MEIO DE PRESERVAÇÃO

O *Bacillus subtilis* natto foi crescido em meio contendo (gL^{-1}): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20 a 37 °C, por 48 h e mantido a 4 °C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada quarenta e cinco dias.

4.3 INÓCULO E QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

O meio de inóculo foi em (gL^{-1}): sacarose comercial 100; extrato de levedura 2; KH_2PO_4 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 0,5 (CALAZANS et al., 2000) e o inóculo foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 25 mL de meio e incubados em shaker orbital a 150 rpm, 24 h a 37 °C. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação ($9000 \times g$, 15 min a 4 °C) e as células foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9 %). A concentração de células foi determinada por turbidimetria a $\lambda = 400$ nm. Os valores obtidos foram correlacionados com a curva de biomassa em gL^{-1} . O inóculo foi padronizado em $0,2 \text{ gL}^{-1}$ para a produção da levanasacarase.

A curva de biomassa utilizando *Bacillus subtilis* natto foi realizada por um cultivo em sacarose. A biomassa obtida após a centrifugação foi lavada com água destilada e ressuspensa em solução salina NaCl 0,9 %. Uma alíquota de 1 mL foi submetida a diluições seriadas para obter 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

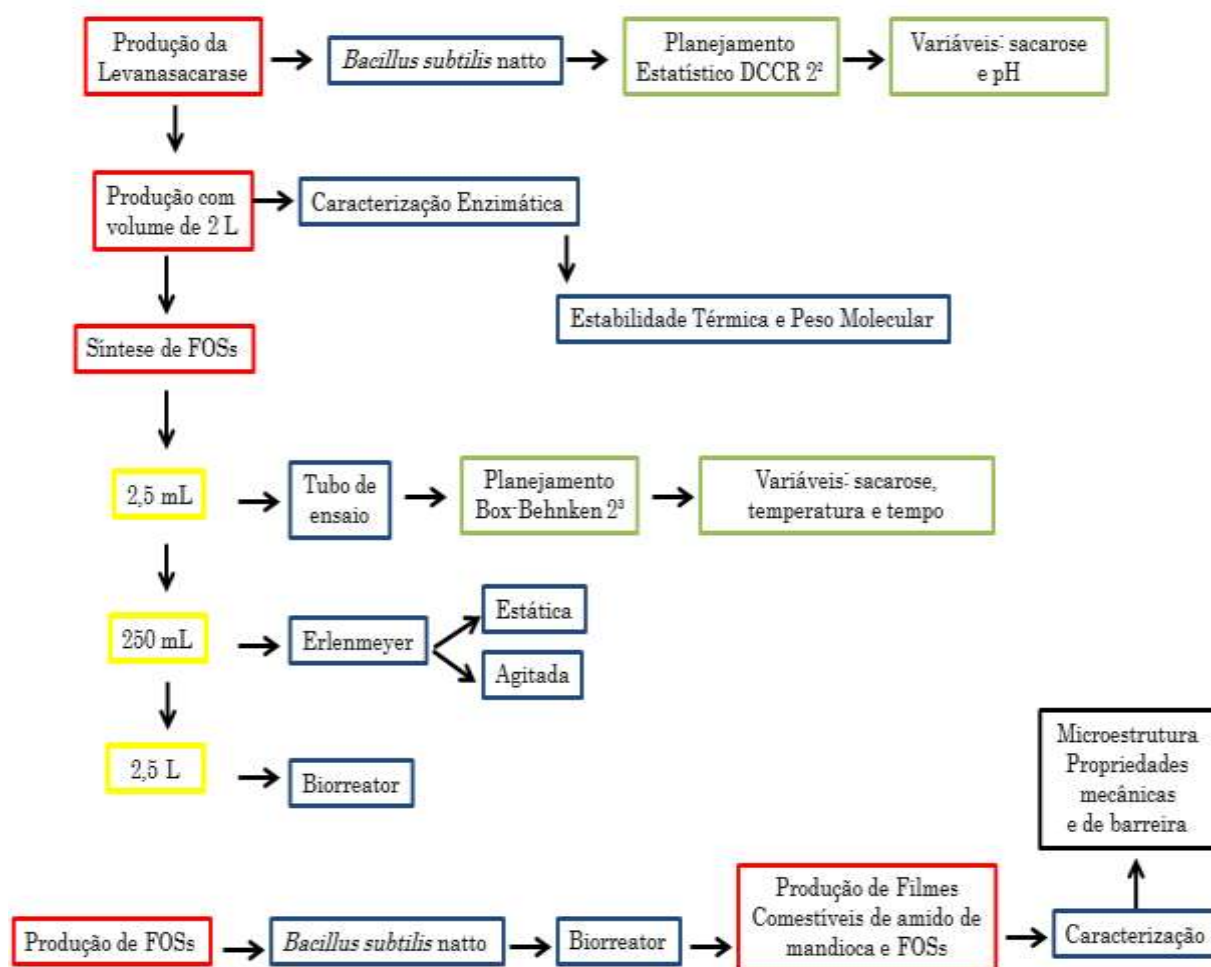
seguida, os dados foram plotados relacionando absorvância (abs) X peso seco (gL^{-1}).

4.4 MEIO DE FERMENTAÇÃO

O meio continha em (gL^{-1}): sacarose em diferentes concentrações, extrato de levedura 2, KH_2PO_4 , 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$, 0,6, MnSO_4 , 0,2; citrato de amônio, 0,25 (EUZENAT; GUILBERT; COMBES, 1997).

A Figura 4 esquematiza a produção da levanasacarase, síntese dos FOSs e aplicação nos filmes comestíveis.

Figura 4- Fluxograma da produção da levanasacarase e síntese dos FOSs variando os volumes de reação e a produção dos FOSs por *Bacillus subtilis* para incorporação em filmes de amido de mandioca.



4.5 PRODUÇÃO DA LEVANASACARASE

Foram realizados ensaios preliminares variando a concentração de sacarose (250, 300 e 350 gL⁻¹), pH (5,0, 6,0 e 7,0) e agitação (100, 150 e 200 rpm) para produção da levanasacarase por *B. subtilis* natto, a partir dos resultados obtidos, foi fixada a agitação em 150 rpm, por não ser significativa e foi indicado que as variáveis sacarose e pH deveriam ser aumentadas (resultados não apresentados). Assim foi desenvolvido um delineamento composto central rotacional 2² (DCCR), variando a sacarose e o pH inicial (Tabela 2). As variáveis foram: (X₁) sacarose (300, 350 e 400 gL⁻¹) e (X₂) pH inicial (6,0, 7,0 e 8,0). A resposta (Y₁) foi atividade da levanasacarase (item 4.8.2).

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de fermentação (item 4.4) por 24 h (BERTÉ et al., 2013), a 37 °C e com agitação de 150 rpm.

Tabela 2. Delineamento composto central rotacional (2²) para avaliar as concentrações de sacarose e pH na produção da levanasacarase por *Bacillus subtilis* natto, 24 h de cultivo a 37 °C, 150 rpm

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Decodificadas	
	X ₁	X ₂	Sacarose (gL ⁻¹)	pH
1	-1	-1	300	6,0
2	-1	1	300	8,0
3	1	-1	400	6,0
4	1	1	400	8,0
5	-1.414	0	279,5	7,0
6	1.414	0	420,7	7,0
7	0	-1.414	350	5,6
8	0	1.414	350	8,4
9	0	0	350	7,0
10	0	0	350	7,0
11	0	0	350	7,0

Os cultivos foram interrompidos por centrifugação (9000 x g, 15 min a 4 °C) e no sobrenadante (Extrato Bruto- EB) foi determinada a atividade da levanasacarase, consumo de açúcares e a produção de levana.

A condição otimizada para produção da levanasacarase foi validada por 3 repetições do ponto ótimo e os resultados obtidos foram comparados com o valor esperado em nível de 5 % de significância, utilizando o programa Statistica 7.0.

Também foi realizada a produção da levanasacarase em Erlenmeyer com volume total de 2 L na condição otimizada definida por delineamento composto central rotacional (DCCR) 2². A atividade enzimática (EB) atingiu 18,7 U/mL. A enzima foi parcialmente caracterizada e utilizada na síntese de fruto-oligossacarídeos com diferentes volumes de reação.

4.5.1 Caracterização Parcial da Levanasacarase

4.5.1.1 Estabilidade térmica da levanasacarase

Foi determinada a estabilidade térmica da levanasacarase incubando 3 mL do EB em banho-Maria, durante 2 h, pH 5,0 com diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90 °C). O experimento foi realizado em triplicata, onde alíquotas de 0,25 mL foram retiradas a cada 15 min para determinar a atividade de invertase da levanasacarase (item 4.8.2).

4.5.1.2 Determinação da massa molecular da levanasacarase

A massa molecular da levanasacarase foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecilsulfato de sódio (SDS) e β -mercaptoetanol (LAEMMLI, 1970), em gel de empilhamento 4 % e gel separador 12,5 %, utilizando tampão de corrida Tris-HCl 1,5 M com SDS pH 8,3, em sistema vertical com 170 mV e temperatura ambiente.

As amostras foram preparadas em tampão de amostra (1: 0,5 v/v; amostra: tampão) contendo Tris-HCl 125 mM pH 6,8 com glicerol a 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, SDS a 2 % e 0,001 % de azul de bromofenol como marcador

de corrida, em seguida as amostras foram fervidas por 10 min e aplicadas no gel. Os padrões utilizados foram fosforilase B (97,4 kDa), soro albumina bovina (BSA, 66,2 kDa), aldolase (40,0 kDa), triose fosfato isomerase (26,6 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa) (J450 Amresco).

As bandas proteicas foram fixadas com solução de 0,2 % de Coomassie brilliant blue R-250 em metanol, ácido acético e água, durante 1 h. Assim que apareceram as bandas, o gel foi descorado em solução de ácido acético 5 %.

4.6 SÍNTESE DOS FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PELA LEVANASACARASE

A enzima produzida foi utilizada em três reações para a síntese dos FOSs com: 2,5 mL de volume de reação (tubo de ensaio), 250 mL em frascos Erlenmeyer e 2,5 L em biorreator Bio-tec (Tecnal 4,5 L), as concentrações dos FOSs presentes no EB utilizado como fonte de enzima foi subtraído em todos os experimentos.

4.6.1 Síntese dos Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Tubo de Ensaio

Para otimizar a síntese dos FOSs pela levanasacarase em tubo de ensaio foi utilizado o delineamento experimental Box-Behnken 2³, com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Tabela 3). As variáveis foram: concentração de sacarose (X_1 : 50, 200 e 350 gL⁻¹), temperatura (X_2 : 30, 40 e 50°C) e tempo (X_3 : 12, 24, 36 h). A resposta: (Y_1) foi síntese dos FOSs. O pH foi fixo em 6,0 (SILVA, BORSATO; CELLIGOI, 2014a). A concentração de enzima foi de 18,7 U/mL.

Os ensaios foram realizados em tubos contendo 1,5 mL de das concentrações de sacarose, 0,5 mL de tampão de citrato (0,1 M) pH 6,0 e 0,5 mL de extrato bruto (EB) (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2004). As reações foram interrompidas por aquecimento a 100 °C durante 15 min. Os açúcares e a produção dos FOSs foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Tabela 3. Delineamento experimental Box-Behnken 2^3 para testar o efeito da concentração de sacarose, temperatura e tempo na produção dos FOSs pela levanasacarase

Níveis codificados				Níveis decodificados		
Ensaio	X_1	X_2	X_3	Sacarose	Temperatura	Tempo
				(gL^{-1})	($^{\circ}C$)	(h)
1	+	+	0	350	50	24
2	+	-	0	350	30	24
3	-	+	0	50	50	24
4	-	-	0	50	30	24
5	+	0	+	350	40	36
6	+	0	-	350	40	12
7	-	0	+	50	40	36
8	-	0	-	50	40	12
9	0	+	+	200	50	36
10	0	+	-	200	50	12
11	0	-	+	200	30	36
12	0	-	-	200	30	12
13	0	0	0	200	40	24
14	0	0	0	200	40	24
15	0	0	0	200	40	24

A condição otimizada foi validada, por 3 repetições do ponto ótimo e os resultados obtidos foram comparados com o valor esperado, em nível de 5 % de significância, realizado no programa Statística 7.0.

4.6.2 Síntese dos Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Frascos de Erlenmeyers

A síntese dos FOSs pela levanasacarase foi avaliada sob duas condições: C1= agitado (shaker orbital a 50 rpm) e C2= estático (banho-maria), ambos a 35 $^{\circ}C$ durante 36 h condição otimizada no item 4.6.1. A síntese ocorreu em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo: 200 mL de solução sacarose em tampão citrato (0,1M), pH 6,0 definido por Silva; Borsato; Celligoi, (2014a) e 50 mL do EB

(esterilizado em Uv/2 h). A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min e os FOSs sintetizados foram analisados por CLAE.

4.6.3 Síntese de Fruto-oligossacarídeos pela Levanasacarase em Biorreator

A síntese dos FOSs também foi avaliada em biorreator Bio-tec (Tecnal 4,5L) com volume operacional de 2,5 L (2 L de solução de sacarose em tampão citrato (0,1M) e 500 mL de EB (esterilizado em Uv/2 h)). O pH foi controlado em 6,0 por 36 h, 35 °C com 50 rpm de agitação para homogeneização da reação de síntese. Foram retiradas amostras a cada 2 h para acompanhar a produção dos FOSs pela levanasacarase e sua atividade. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min, os FOSs e produção de açúcares foram analisados por CLAE.

4.7 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DOS FOSS DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO EM BIORREATOR PARA APLICAÇÃO EM FILMES.

Uma fermentação foi conduzida em biorreator Bio-tec (Tecnal 4,5L) com volume operacional 3 L de meio de fermentação (item 4.4) contendo 400 gL⁻¹ de sacarose, pH controlado em 7,7, aeração de 0,2 vvm, 44 h, 35 °C e 50 rpm. Quando necessário foi utilizado óleo de girassol, como antiespumante. A fermentação foi interrompida por centrifugação a 9000 x g, 15 min a 4 °C. As amostras foram retiradas a cada 2 h para determinar a produção dos FOSs por CLAE e a biomassa foi acompanhada.

Para purificação dos FOSs o sobrenadante da fermentação foi submetido à ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa (Milipore Ultracel PL). Assim foram removidos os polissacarídeos (levana com massa molecular superior a 3 kDa) e concentrando os fruto-oligossacarídeos. O filtrado (FOSs) foi precipitado com etanol absoluto na proporção 3:1 (0,9 mL de etanol: 0,3 mL dos FOSs). O precipitado foi dialisado em água destilada, durante 48 h e liofilizado para ser utilizado na produção dos filmes comestíveis.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.8.1 Determinação dos Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)

Os açúcares redutores (AR) do final das fermentações foram dosados pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944) após hidrólise, e as absorvâncias foram medidas a $\lambda = 540$ nm. Os açúcares totais (AT) das fermentações foram dosados pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e as absorvâncias medidas a $\lambda = 490$ nm.

Para a confecção das curvas padrões, foram utilizados padrões de frutose e glicose variando as concentrações entre 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.8.2 Determinação da Atividade da Levanasacarase

A atividade de invertase da levanasacarase foi estimada por meio dos açúcares redutores (AR) liberados durante a hidrólise da sacarose. A mistura de reação continha 250 μL EB e 250 μL de sacarose (1 M) e 500 μL de tampão de acetato (pH 5,0) foi incubada a 30 °C durante 30 min (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999). Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Onde, uma unidade de atividade (U) foi expressa pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μg de açúcares redutores em 1 min.

4.8.3 Quantificação da Levana

A levana produzida pelo *B. subtilis* natto foi precipitada a partir do EB com etanol absoluto na proporção de 3:1 (0,9 mL de etanol: 0,3 mL do EB) durante 12 h, 4 °C e foi posteriormente centrifugada (9000 x g, 15 min, 4 °C), o precipitado obtido foi hidrolisado com HCl (0,1 M) por 1 h a 100 °C (VIIKARI; GISLER, 1986). A reação foi neutralizada com NaOH (2 M) e as determinações foram realizadas através dos açúcares redutores de acordo com Somogyi (1945) e Nelson (1944) utilizando a frutose como padrão.

4.8.4 Determinação dos Fruto-oligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras foram filtradas em membrana 0.45 μm Millipore, a quantificação dos FOSs foi por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu RID-10A) acoplada a um detector de índice de refração, utilizando a coluna de carboidratos Aminex HPX-87C (300 x 7,8 milímetros, Biorad). A fase móvel foi água Milli-Q a uma taxa de fluxo de 0,6 mL min^{-1} . A temperatura da coluna foi mantida constante a 80 °C. O sobrenadante (20 μl) foi eluído com 0,6 mL de água Milli-Q. Os padrões utilizados foram sacarose, frutose, glicose, 1-nistose e 1-cestose padrões analíticos da Sigma-Aldrich. A produção total dos FOSs por *B. subtilis* foi a soma de 1-cestose (504,44 Da) e 1-nistose (666,58 Da), porém a síntese pela enzima apresentou apenas 1-nistose (666,58 Da).

4.9 PRODUÇÃO DOS FILMES COMESTÍVEIS

Os filmes foram preparados a partir se solução aquosa com adição de amido de mandioca (Yoki[®] Paranaíba-PR), FOSs parcialmente purificados (Tabela 4) e glicerol utilizando-se o método de *casting* (SIPOS et al., 2008; TARANTILI; KOUMOULOS, 2008). Foram preparadas quatro formulações variando-se as concentrações dos FOSs na solução filmogênica, e empregou-se 3 % (m/v) de sólidos, e em todas as formulações 20 g de glicerol/100g de sólidos foi adicionado como plastificante.

Tabela 4. Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de fruto-oligossacarídeos.

Formulação	Amido (g)	FOSs (g)	Glicerol (g)	Água (g)
AM-PURO	12,00	-	2,40	385,6
AM-FOSs (1 %)	11,88	0,12	2,40	385,6
AM-FOSs (5 %)	11,40	0,60	2,40	385,6
AM-FOSs (10 %)	10,80	1,20	2,40	385,6

AM: amido de mandioca (yoki[®]); FOSs: fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto.

O amido, o glicerol e a água (Tabela 4) foram aquecidos a 90 °C com agitação constante (7 a 8 min) até a obtenção de uma solução homogênea, em seguida foram adicionadas as quantidades estabelecidas dos FOSs para cada formulação. Após a completa homogeneização as soluções foram colocadas em sonicador (Unique USC-1800) durante 10 min para completa eliminação das bolhas formadas no processo. Em seguida, foram colocadas 30 g de cada formulação em placa de Petri de acrílico para secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C, por aproximadamente 20 h, até a formação dos filmes. Os filmes selecionados foram acondicionados em BOD com 58 % de umidade relativa (UR) e 25 °C até o momento da realização das análises de caracterização.

4.9.1. Caracterização dos Filmes

4.9.1.1 Microestrutura

A análise de microestrutura foi realizada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (modelo FEI Quanta 200). Para verificar a estrutura dos filmes, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e submetidas a um congelamento rápido, depois foram fraturadas com auxílio de uma pinça e secas em estufas por cinco dias a 50 °C. Após estes procedimentos as amostras secas foram revestidas de ouro por um *Sputter Coater* (BAL-TEC SCD 050) e avaliadas com voltagem de aceleração de 30.0 kV. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (LMEM) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

4.9.1.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)

Foi utilizado o método de leitura da amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr). O experimento foi conduzido em aparelho Shimadzu FTIR-8300 com resolução de 4 cm⁻¹, utilizou-se uma escala de 4000 a 500 cm⁻¹. As amostras foram incorporadas ao KBr e submetidas à alta pressão para a produção das pastilhas. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR. A

análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

4.9.1.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para as análises de DSC, cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidos a programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados no equipamento Netzsch (modelo DSC-204), em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0-300 °C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

4.9.1.4 Espessura

A determinação das espessuras dos filmes foi realizada utilizando um Micrômetro (Mitutoyo[®]), a partir de três pontos escolhidos aleatoriamente na superfície de cada filme.

4.9.1.5 Solubilidade em água

As análises foram realizadas de acordo com o método de Gontard; Guilbert; Cuq, (1992). Os testes foram realizados em triplicata, as amostras foram cortadas em corpos de prova com 3x3 cm, e secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) a 60 °C por 24 h. Em seguida as amostras foram pesadas (peso seco inicial) e mergulhadas em Erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, estes frascos foram vedados e agitados a 50 rpm, 25 °C por 24 h em incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420). Após este período, as amostras foram removidas cuidadosamente e secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 60 °C, para determinar a massa do material não solubilizado (peso final).

A solubilidade foi expressa por porcentagem de material seco solubilizado conforme a equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = ((m_i - m_f) / m_i) * 100$$

Onde, m_f é a massa final da amostra e m_i é a massa inicial da amostra, ambos em base seca.

4.9.1.6 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente de acordo com as normas da American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95 1996) com modificações. Cada amostra (triplicata) foi colocada em uma cápsula de permeabilidade, e seu interior foi parcialmente preenchido com CaCl_2 anidro, de modo a se obter 0% de UR no interior destas cápsulas, que foram seladas para garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto (cápsula + filme) foi pesado em tempo zero e armazenado em dessecador a temperatura ambiente, contendo em seu interior uma solução saturada de NaCl que proporcionou um ambiente com 75% de UR. Após um período de equilíbrio de 2 h as células foram pesadas em intervalos regulares durante 24 h. A mudança de massa da cápsula de permeação foi registrada, e o ganho de massa (g) foi graficado em função do tempo (t). Da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA):

$$\text{TVA} = \frac{g}{t.A}$$

Onde, g/t é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e A é a área de permeação (m^2) da cápsula. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$PVA = \frac{TVA \cdot m}{\Delta P}$$

Onde, m é a espessura média do filme (m^2), ΔP é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo $CaCl_2$ anidro (0% de UR) e solução saturada de NaCl (75% de UR).

4.9.1.7 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando um texturômetro (Stable Micro Systems modelo TA.TX2 Inglaterra) de acordo com as Normas da ASTM (D882-91, 1996).

Os filmes foram cortados (24,4 x 100 mm) e ajustados entre as garras pneumáticas do equipamento. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas as seguintes propriedades de tração: resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%), calculadas pelas equações a seguir:

$$\text{Resistência máxima à tração} = \frac{F_{\max}}{A_{\min}}$$

Onde, F_{\max} é a força máxima (N) registrada no equipamento e A_{\min} é a área mínima inicial da amostra (m^2).

$$\text{Alongação na ruptura} = \frac{A_T}{DG} \times 100$$

Onde, A_T é a alongação total da amostra até a ruptura (m) e o DG é a distância inicial entre as garras (m).

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica 7.0 (2004) e valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Para PVA e propriedades mecânicas dos filmes foi realizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigos científicos.

O artigo intitulado “Síntese de fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 com potencial aplicação na indústria alimentícia” está apresentado no Anexo A, e será submetido de acordo com as normas do periódico Food Chemistry (Anexo C).

O artigo intitulado “Filmes comestíveis de amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto CCT 7712” está apresentado no Anexo B, e será submetido de acordo com as normas do periódico Carbohydrate Polymers (Anexo D).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. F.; MAHMOUD, D. A. R.; ESAWY, M. A. T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzyme synthesis of levan and Fructo-oligosaccharides. **Current Microbiology**, v. 51, p. 402–407, 2005.
- AHMED, S. A. Optimization of production and extraction parameters of *Bacillus megaterium* levansucrase using solid-state fermentation. **Journal of Applied Sciences Research**, v.10, p.1199-1204, 2008.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBARA, T.; ITO, K.; IIZUKA, M.; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, p. 291-297, 1999.
- ANTOSOVA, M.; ILLEOVÁ, V.; VANDÁKOVÁ, M.; DRUZKOVSKÁ, A.; POLAKOVIC, M. Chromatographic separation and kinetic properties of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Journal of Biotechnology**. V. 135, p. 58–63, 2008.
- ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. **Annual Book of ASTM**, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1996.
- ASTM. Standard test methods for water vapor transmission of material, E96 95. **Annual book of ASTM**. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 1996.
- BABÉ, L. M.; SCHMIDT, B. Purification and biochemical analysis of WprA, a 52-kDa serine protease secreted by *B. subtilis* as an active complex with its 23-kDa propeptide. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 13386, p. 211-219, 1998.
- BALASUBRAMANIAM, A. K.; NAGARAJAN, K. V.; PARAMASAMY, G. Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1241–1247, 2001.
- BELGHITH, K. S.; DAHECH, I.; BELGHITH, H.; MEJDOUB, H. Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, p. 451–458, 2012.
- BERTÉ, S.; BORSATO, D.; SILVA, P. B.; VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, p.898–904, 2013.

BORNET, F. R. J.; BROUNS, F.; TASHIRO, Y.; DUVILLIER, V. Nutritional aspects of short-chain fructo-oligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. **Digestive Liver Disease**, v. 34, p. 111-120, 2002.

BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; PAINEAU, D.; BORNET, F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. **Nutrition Journal**, v. 5, n.8, 2006.

BOURTOOM, T. Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties, **International Food Research Journal**, v.15, p.237–248, 2008.

CALAZANS, G.M.T.; LIMA, R. C.; FRANÇA, F. P.; LOPES, C. A. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245–247, 2000.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 849–875, 2011.

CANTAREL, B.L.; COUTINHO, P.M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The Carbohydrate-Active Enzymes database (cazy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 233-238, 2009.

CAPUTI, L.; NEPOGODIEV, S. A.; MALNOY, M.; REJZEK, M.; FIELD, R. A.; BENINI, S. Biomolecular characterization of the levansucrase of *Erwinia amylovora*, a promising biocatalyst for the synthesis of fructooligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12265–12273, 2013.

CARVALHO, A. J. F. Starch: major sources, properties and applications as thermoplastic materials. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Eds.), Monomers, polymers and composites from renewable resources. p. 321–342, 2008.

CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 43-47, 1999.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion Biotechnology**, v. 23, p. 187–191, 2012.

CHEN, W.C.; LIU, C.H. Production of β -fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p. 153-160, 1996.

CRITTENDEN R.G; DOELLE H.W. Structural identification of oligosaccharides produced by *Zymomonas mobilis* levansucrase. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 1055 – 1060, 1993.

DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Enzymes of Complex Saccharide Synthesis**, v. 86, p. 500-505, 1966.

DOMINGUEZ, J. R.; FERNÁNDEZ, A.; RODRÍGUEZ, M. E.; MOLINA, A. M.; ESCALANTE, A.; CERVANTES, R. G.; LÓPEZ, A. M. Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 783–790, 2014.

DONHOWE, I. G.; AND FENNEMA, O. R. The effects of plasticizers on crystallinity, permeability, and mechanical properties of methylcellulose films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 17, p. 247-257, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DURRANI, C. M.; DONALD, A. M. Physical characterization of amylopectin gels. **Polymer Gels and Networks**, v. 3, p. 1–27, 1995.

ED-European Parliament and Council Directive N_ 95/2/EC. On food additive other than colors and sweeteners. 1995.

ED-European Parliament and Council Directive N_ 98/72/EC. On food additive other than colors and sweeteners. 1998.

ELISASHVILI V I. Purification and properties of levansucrase of *Gluconobacter oxydans* L-1. **Biochemistry**, v. 45, p. 20–27, 1980.

ESAWY, M. A.; ABDEL-FATTAH, A. M.; ALI, M. M., HELMY, W. A.; SALAMA, B. M.; TAIE, H. A A.; AWAD, G. E. A. Levansucrase optimization using solid state fermentation and levansucrase biological activities studies. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 332–41, 2013.

EUZENAT, O.; GUILBERT A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, v. 32, p. 237-243, 1997.

FDA. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption 21CFR172, subpart C. **Coatings, films and related substances**, 2006.

FANARO, S.; BOEHM, G.; GARSSSEN, J.; KNOL, J.; MOSCA, F.; STAHL, B.; VIGI, V. Galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides as prebiotics in infant formulas: A review. **Acta Paediatrica**, v. 94, p. 22-26, 2005.

FOUET, A.; ARNAUD, M.; KLIER, A.; RAPOPORT, G. Characterization of the precursor form of the exocellular levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 119, p. 795-800, 1984.

GANAIE, M. A.; LATEEF, A.; GUPTA, U. S. Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2143–59, 2014.

GANAIÉ M. A.; GUPTA U. S.; KANGO N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 12-17, 2013.

GANAIÉ, M. A.; DEHARIYA, K.; GUPTA, U. S. Optimization of process parameters of biocatalyst for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **American Journal of Pharm Research**, v. 3, p. 4138– 4148, 2013.

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

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**. v.125, p. 1401-1412, 1995.

GONÇALVES, B. C. M; MANTOVAN, J.; LÚCIA, M.; RIBEIRO, L.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**. V. 1, p. 001-008, 2013.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 206-211, 1992.

GORREC, K.; CONNES, C.; GUIBERT, A.; URIBELARREA, J. L.; COMBES, D. Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in *Bacillus subtilis* NCIMB 11871 and 11872 supernatant. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 44-52, 2002.

GROSS M. M.; GEIER G.; GEIDER, RUDOLPH, K. Levan and levansucrase from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. In Proceed-ing of the 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. **Academia Kiado, Budapest**, p. 81- 84, 1990.

GUIO, F.; RUGELES, L. D.; ROJAS, S. E.; PALOMINO, M. P.; CAMARGO, M. C.; SÁNCHEZ, O. F. Kinetic modeling of fructooligosaccharides production using *Aspergillus oryzae* N74. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, p. 142– 163, 2012.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In MATHLOUTHI, M. (Ed.), **Food packaging and preservation**, p. 371–394, 1986.

HAN, J. Protein-based edible films and coatings carrying antimicrobial agents. In A. GENNADIOS (Ed.), **Protein-based films and coatings**, p. 485-498, 2002.

HERNANDEZ L, BANGUELA A. Fructans from natural sources to transgenic plants. **Applicate Biotechnology**, v. 23, p. 202-210, 2006.

HERNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; SELMAN, G.; PETIT-GLATRON, M-F.; CHAMBERTTT, R. Isolation and enzyme properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 , a bacterium associated with sugar cane. **Biochemical Journal**, v. 118, p. 113–118, 1995.

HOMANN, A.; BIEDENDIECK, R.; GOTZE, S.; JAHN, D.; SEIBEL, J. Insights into polymer versus oligosaccharide synthesis: mutagenesis and mechanistic studies of a novel levansucrase from *Bacillus megaterium*. **Journal of Biochemistry**, v. 407, p. 189–198, 2007.

INTHANAVONG, L.; TIAN, F.; KHODADADI, M.; KARBOUNE, S. Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. **Biotechnology Progress**, v. 29, p. 1405–15, 2013.

INTHANAVONG, L. Production and characterization of the fructosyltransferase (Levansucrase) from *Geobacillus stearothermophilus* and its Application for the Synthesis of Novel Fructooligosaccharides, 2011.

KEITH, I.; WILEY, B.; BALL, D.; ARCIDIACONO, S.; ZORFASS, D.; MAYER, J. Continuous culture system for production of bio- polymer levan using *Erwinia herbicola*. **Bioengineering and Biotechnology**, v. 38, p. 557–560, 1991.

KROCHTA, J. M.; MULDER-JOHNSTON, C. D. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, p. 61-74, 1997.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEBRUN, E.; VAN RAPENBUSCH, R. The structure of *Bacillus subtilis* levansucrase at 3.8 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 25, p.12034–12036, 1980.

LIU, Z. Edible films and coatings from starch. In: HAN, J. H. (Ed.), **Innovations in food packaging**, p. 318–332, 2005.

LOITSYANSKAYA, M. S.; TKACHENKO, A. A.; ELISASHVILI, T. A. Levansucrase of *Acetobacter*. **Microbiology**, v. 40, p. 439–442, 1971.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 549-554, 1980.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Ethanol production from cane juice by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 257-260, 1981.

LYNESS, E.; DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 345-350, 1983.

MANTSALA, P.; PUNTALA M. Comparison of levansucrase from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 13, p. 395–399, 1982.

MARDO, K.; VISNAPUU, T.; GROMKOVA, M.; AASAMETS, A.; VIIGAND, K.; VIJA, H.; ALAMÄE, T. High-throughput assay of levansucrase variants in search of feasible catalysts for the synthesis of fructooligosaccharides and levan. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v.19, p. 8434–55, 2014(a).

MARDO, K.; VISNAPUU, T.; VIJA, H.; ELMI, T.; ALAMÄE, T. Mutational analysis of conserved regions harboring catalytic triad residues of the levansucrase protein encoded by the *lsc-3* gene (*lsc3*) of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 61, p. 11–22, 2014(b).

MARTINEZ-FLEITEZ, CARLOS; ORTIZ-LOMBARDÍA, MIGUEL; PONS, TIRSO; TARBOURIECH, NICOLAS; TAYLOR, EDWARD J., G. ARRIETA; HERNÁNDES, LÁZARO; DAVIES, GIDEON J. Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconocetobacter diazotrophicus*. **Biochemical Journal**, v. 390, p. 19- 27, 2005.

MENG, G. Y.; FÜTTERER, K. Structural framework of fructosyl transfer in *Bacillus subtilis* levansucrase. **Nature Structural Biology**, v. 10, p. 935-941, 2003.

MOROHASHI, T.; SANO, T.; OHTA, A.; YAMADA, S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. **Journal Nutrition**. v. 128, p. 1815–1818, 1998.

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

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P. V. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, p. 1–15, 2012.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-80, 1944.

NUSSINOVITCH, A. Water soluble polymer applications in foods. Oxford: **Blackwell Science**, 2003.

NGUYEN, Q. D. J. M. R.; SZABO, M. K.; BHAT, A. P.; HOSCHKE. Purification and Some Properties of β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2461-2466, 2005.

OHTSUKU, K.; HINO, S.; FUKUSHIMA, T.; OZAWA, O.; KANEMATSU, T.; UCHIDA, T. Characterization of levansucrase from *Rahnella aquatilis* JMC-1683. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 1373–1377, 1992.

OLIVEIRA, M. R.; DA SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177–183, 2007.

OZIMEK, L. K.; KRALJ, S.; VAN, D. E. R.; MAAREL, M.; DIJKHUIZEN, L. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze

processive and non-processive transglycosylation reactions. **Microbiology**, v. 152, p. 1187–1196, 2006.

PAES, S. S.; YAKIMETS, I.; MITCHELL, J. R. Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 788–797, 2008.

PARRACHO, H.; McCARTNEY, A.L.; GIBSON, G.R. Probiotics and prebiotics in infant nutrition. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 66, p. 405-411, 2007.

PERRIN, S.; FOUGNIES, C.; GRILL, JP.; JACOBS, H.; SCHNEIDER, F. Fermentation of chicory fructo-oligosaccharides in mixtures of different degrees of polymerization by three strains of bifidobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 259-763, 2002.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V.; RAKSHIT, K. S. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**, v. 38, p. 267-272, 2005.

PIÑEIRO, M.; ASP, N. G.; REID, G.; MACFARLANE, S.; MORELLI, L.; BRUNSER, O. FAO Technical meeting on prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. 156–S159, 2008.

RAIRAKHWADA, D.; SEO, J.; SEO, M.; KWON, O.; RHEE, S.; KIM, C. H. Gene cloning, characterization, and heterologous expression of levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 195–204, 2010.

RAJU, P. S.; BAWA, A. S. Food additives in fruit processing. In Y. H. Hui (Ed.), **Handbook of fruits and fruit processing**. p. 145-170, 2006.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics and probiotics: Are they functional foods. **American Journal of clinical Nutrition**, v. 71, p.1682–1687, 2000.

RÖBLE, C.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; WOUTERS, R.; BUTLER, F. Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, v. 76, p.19–29, 2011.

ROMANO, N.; TAVERA-QUIROZ, M. J.; BERTOLA, N.; MOBILI, P.; PINOTTI, A.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 560–566, 2014.

SANCHEZ, B.; URDACI, M. C.; MARGOLLES, A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. **Microbiology**. v. 156, p. 3232–3242, 2010.

SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N; PRAPULLA, S. G. Production of fructo-oligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus aryzae* CRF 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. **Process Biochemistry**, v. 39 p. 753-758, 2004.

- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyl transferase and fructooligosaccharides. **Sciences des aliments**, v. 22, p. 277–287, 2002.
- SANTOS, L.; PINEDA, E. A. G.; PINEDA, G.; MELO, F. C. B. C.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAVALCANTI, O. A. Levan in the developing of new colon-specific polymer material : evaluation of the permeability , moisture and thermal analyses in free films of Eudragit ® FS 30 D. **Acta Scientiarum**, p.185–191, 2012.
- SATO, S.; KOGA, T.; INOUE, M. Isolation and some properties of extracellular D-glucosyltransferases and D-fructosyltransferases from Strepto- coccus mutans serotypes c, e, and f. **Carbohydrate Research**, v. 134, p. 293–304, 1984.
- SCHOLZ-AHRENS, E.; ADE, P.; MARTEN, B.; WEBER, P.; TIMM, W.; YAHYA, A. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. **Journal of Nutrition**, v.137, p.838–846, 2007.
- SEIBEL, J.; BEINE, R.; MORARU, R.; BEHRINGER, C.; BUCHHOLZ, K. A new pathway for the synthesis of oligosaccharides by the use of non-Leloir glycosyltransferases. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 24, p. 157-165, 2006 (a).
- SEIBEL, J.; MOMARU, R.; GÖTZE, S.; BUCHHOLZ, K.; NA'AMMIEH, S.; PAWLOWSKI, A.; HECHT, H. J. Synthesis of sucrose analogues and mechanism of action os *Bacillus subtilis* fructosyltransferase (levansucrase). **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2335-2349, 2006 (b).
- SILBIR, S.; DAGBAGLI, S.; YEGIN, S.; BAYSAL, T.; GOKSUNGUR, Y. Levan production by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous fermentation systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 454–461, 2014.
- SILVA, P. B.; GARCIA, S.; BALDO, C.; CELLIGOI, M. A. P. C. Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science**, <http://doi.org/10.1556/066.2016.0004>, 2016.
- SILVA, P. B.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, p. 2734–2740, 2014 (a).
- SILVA, P. B.; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization of High Production of fructooligosaccharides by sucrose fermentation of *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **American Journal of Food Technology**, v. 9, p. 144-150, 2014 (b).
- SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 565–572, 2016.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. D. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in prebiotic edible films. **Food Chemistry**, v.159, p.302–308, 2014.

SOMOGYI, M. A New Reagent for Determination of Sugars. **A new Sugar Reagent**, v. 160, p. 61- 68, 1945.

Statistica for Windows Software, 7.0, Tulsa, O.K., USA, 2004.

TANG, Y.; XIE, F.; ZHANG, D.; ZHU, M.; LIU, L.; LIU, P.; GU, C. Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. **Starch - Stärke**, v. 67, p.124–131, 2015.

TAMBARA, Y.; HORMAZA, J. V.; PEREZ, C. LEON, A. ARRIETA, J. HERNANDEZ, L. Structural analysis and optimized production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from acetobacter diazotrophicus SRT4, **Biotechnology Letters**, v. 21, p. 117–121, 1999.

TAKAHAMA, A.; KUZE, J.; OKANO, S.; AKIYAMA, K.; NAKANE, T.; TAKAHASHI, H.; KOBAYASHI, T. Production of lactosucrose by *Bacillus subtilis* natto levansucrase and some properties of the enzyme. **Food Science and Technology**, v. 38 p. 789–796, 1991.

TIAN, F.; KARBOUNE, S. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus amyloliquefaciens*: specificity, kinetics, and product characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 71–79, 2012.

VAN HIJUM, S. A. F. T.; KRALJ, S.; OZIMEK, L. K.; DIJKHUIZEN, L.; VAN GEELSCHUTTEN, I. G. H. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, p. 157-176, 2006.

VIIKARI, L., GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 23, p. 240–244, 1986.

VOLL, F.; KRÜGER, R. L.; CASTILHOS, F; FILHO, L. C.; CABRAL, V.; NINOW, J.; CORAZZA, M. L. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 107–115, 2011.

WANG, C.-H.; LAI, P.; CHEN, M.-E.; CHEN, H.-L. Antioxidative capacity produced by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* mediated fermentations of konjac glucomannan and glucomannan oligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1294–1300, 2008.

WANG, L. M.; ZHOU, H. M. Isolation and Identification of a Novel *Aspergillus japonicus* JN19 producing β -Fructofuranosidase and Characterization of the Enzyme. **Journal of Food Biochemistry's**, v. 30, p. 641-658, 2006.

WANG, X. D.; RAKSHIT. S. K. Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of Isooligosaccharides.

Biotechnology and Bioprocess Engineering 20: 429-434, 1999.

WILLIAMS, M.; JONES, J. H.; WATTING, K. J. Biochemical characterization of the enantiomers of the novel ergoline dopamine agonist 6-ethyl-9-oxaergoline (EOE).

Drug Development Research, v. 3, p. 573-579, 1976.

YOUSSEF, G. A.; YOUSSEF, A. S.; TALHA, S.; EL-AASSAR S. A. Increased Fructosyltransferase (levansucrase) production by optimizing culture condition from *pediococcus acidilactici* strain in shaking batch cultures. **Life Science Journal**, v.11, p. 33–47, 2014.

YUN, J. W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application.

Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 107-117, 1996.

ZHANG, T.; LI, R.; QIAN, H.; MU, W.; MIAO, M.; JIANG, B. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydrate Polymers**,

v. 101, p. 975–81, 2014.

ZHONG, F.; LI, Y.; IBANZ, A. M.; OH, M. H.; MCKENZIE, K. S.; SHOEMAKER, C. The effect of rice variety and starch isolation method on the pasting and rheological properties of rice starch pastes. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 406–414, 2009.

ANEXO

ANEXO A**SÍNTESE DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PELA
LEVANSACARASE DE *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA****FRUCTOOLIGOSACCHARIDES SYNTHESIS BY *Bacillus subtilis* natto
LEVANSUCRASE CCT 7712 WITH POTENTIAL APPLICATION IN
THE FOOD INDUSTRY**

**Gabrielly Terassi Bersaneti, Janaina Mantovan, Dionísio Borsato, Cristiani Baldo,
Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi**

Síntese de fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto CCT 7712 com potencial aplicação na indústria alimentícia

Gabrielly Terassi Bersaneti^a, Janaina Mantovan^a, Dionísio Borsato^b, Cristiani Baldo^a, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{a*}

Resumo

A biossíntese da levanasacarase (LS) por *Bacillus subtilis* natto foi otimizada atingindo uma atividade de 23,9 U/mL em meio com 420,7 gL⁻¹ de sacarose em pH 7.0. A enzima foi parcialmente caracterizada e aplicada para a síntese de fruto-oligossacarídeos (FOSs), atingindo 69,8 gL⁻¹ em 2,5 mL de volume de reação na condição de 350 gL⁻¹, 40 °C por 36 h. A síntese dos FOSs também foram realizadas em volumes de 250 mL e 2,5 L, atingindo 63,7 gL⁻¹ e 38,7 gL⁻¹ respectivamente. Com o aumento dos volumes de reação ocorreu redução na produção dos FOSs em 9 % e 45 % respectivamente. O FOS produzido foi predominante nistose, um prebiótico que pode ser empregado como ingrediente alimentar de alto valor nutricional.

Palavras-chave: Levana, fruto-oligossacarídeos, fermentação batelada, sacarose, prebiótico.

Highlights:

A biossíntese de levanasacarase por *Bacillus subtilis* natto foi otimizada.

Levanasacarase de *B. subtilis* foi aplicada para a síntese de fruto-oligossacarídeos.

Altas concentrações de sacarose favoreceram a produção da enzima.

Levanasacarase de *B. subtilis* apresentou alta estabilidade térmica.

A nistose foi o fruto-oligossacarídeo predominante.

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 43 33714270 E-mail address: macelligoi@uel.br

1. Introdução

Os fruto-oligossacarídeos dos microrganismos são oligômeros de frutose constituído de uma unidade de glicose (G) ligada com unidades frutose (F) na posição β -(2 \rightarrow 1) de uma sacarose (GF), sendo que os principais são 1-kestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1- β -frutofuranosil nistose (GF₄) (Guio, Rugeles, Rojas, Palomino, Camargo, & Sánchez, 2012).

Desde 1980, oligossacarídeos têm sido cada vez mais utilizados pela indústria de alimentos principalmente em bebidas e doces, para modificar a viscosidade, devido a sua capacidade de emulsificação, formação de geis, alteração do ponto de congelamento e cor dos alimentos. Estes oligômeros apresentam propriedades relevantes à saúde e nutrição, como doçura moderada (30 e 60 % do valor da sacarose) e baixo índice glicêmico (Saad, Delattre, Urdaci, Schmitter, & Bressollier, 2013).

Constituem uma das classes de prebióticos com potencial benéfico à saúde, podendo ser utilizados como ingredientes alimentares devido às suas propriedades, que levam a não digestibilidade, resultando em alterações na atividade da microflora gastrointestinal e melhora na saúde e bem-estar do indivíduo (Roberfroid, 2007; Saad et al., 2013). Podem reduzir os níveis de fosfolípidos, triglicerídeos e colesterol, e aumentar a absorção intestinal de cálcio e de magnésio entre outros minerais (Mussatto & Mancilha, 2007). Devido às suas características físico-químicas e propriedades funcionais apresentam potencial para aplicação na indústria alimentícia (Mussatto, Aguiar, Marinha, Jorge, & Ferreira, 2015).

Do ponto de vista industrial, a obtenção dos FOSs a partir de plantas ou por glicosilação química não é economicamente viável, devido ao alto custo e baixos rendimentos (Singh, Singh, & Kennedy, 2016). A síntese enzimática dos FOSs fornece uma alternativa conveniente e rentável, pois as enzimas são naturais, não tóxicas e com alta especificidade, de fácil obtenção e com possibilidade de separação do produto, assim sua utilização elimina as dificuldades do metabolismo microbiano, durante a produção industrial.

A produção de FOSs pela levanasacarase microbiana tem sido relatada por alguns autores, destacando *B. Amyloliquefaciens* (Li, Seo, & Karboune 2015), *Bacillus subtilis natto* (Silva, Borsato, & Celligoi, 2014b), *B. circulans* (El-Refai, Abdel-Fattah, & Mostafa, 2009); *B. subtilis* NRC 33a (Abdel-Fattah, Mahmoud, & Esawy 2005); *Zymomonas mobilis* (Bekers et al., 2002) entre outros. Os autores relatam que parâmetros como concentração de sacarose, temperatura, pH entre outros definem a produção e o tipo de oligofrutose produzida.

Considerando as propriedades dos FOSs e seus benefícios para a saúde, bem como a preocupação atual da população em melhoria na qualidade de vida, a busca por alimentos

funcionais tem tido uma crescente demanda. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi otimizar a produção de levanasacarase, caracterizar parcialmente e utiliza-la como uma alternativa na síntese de fruto-oligosacarídeos em diferentes volumes da reação visando uma aplicação industrial.

2. Material e métodos

2.1 *Microrganismo e inóculo*

Bacillus subtilis natto CCT 7712 foi isolado de soja fermentada, um alimento japonês chamado "natto" no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (Brasil) e identificado pela Fundação André Tosello (Campinas- Brasil). A estirpe foi cultivada durante 48 horas a 37 °C em meio contendo (gL^{-1}): peptona 50, extrato de carne 30 e ágar 20 e armazenada a 4 °C. O inóculo foi preparado por fermentação em meio de cultura contendo (gL^{-1}): sacarose comercial 100; extrato de levedura a 2; KH_2PO_4 2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ 0,5 (Calazans, Lima, França, & Lopes 2000), e padronizado em $0,2 \text{ gL}^{-1}$ para produção da levanasacarase. A concentração de células foi determinada por turbidimetria a 400 nm.

2.2 *Otimização da produção de levanasacarase*

O delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 foi aplicado para otimizar a produção de levanasacarase. As variáveis estudadas foram concentração de sacarose (300 a 400 gL^{-1}) e o pH (6.0 a 8.0) (Tabela 1). As fermentações foram realizadas em meio de cultura contendo (gL^{-1}): extrato de levedura 2, KH_2PO_4 , 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3; $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$, 0,6, MnSO_4 , 0,2; citrato de amônio, 0,25 (Euzenat, Guilbert, & Combes, 1997) em frascos Erlenmeyer 250 mL contendo 25 mL de meio de cultura, autoclavado a 1 atm durante 15 min. As culturas foram interrompidas por centrifugação a $9000 \times g$ durante 15 min a 4 °C, após 24 h. A levanasacarase foi determinada e caracterizada. O sobrenadante foi definido como extrato de enzima (EB). A atividade levansucrase (Y_1) foi analisada utilizando software Statistica 7.0.

2.2.1 Produção de levanasacarase

A produção de levanasacarase foi realizada em frascos Erlenmeyer com volume total de 2 L na condição otimizada definida pelo (DCCR) 2². A atividade enzimática (EB) atingiu 18,7 U/mL. A enzima foi parcialmente caracterizada e utilizada na síntese de fruto-oligossacarídeos, com diferentes volumes de reação.

2.3 Ensaio de atividade da levanasacarase

A atividade de invertase da levanasacarase foi estimada por meio dos açúcares redutores liberados durante a hidrólise da sacarose. A mistura de reação continha: 250 µL EB e 250 µL sacarose (1 M) em tampão de acetato (pH 5.0), foi incubada a 30 °C durante 30 min (Ananthalakshmy & Gunasekaran, 1999). Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Uma unidade de atividade (U) de sacarose hidrolizada, foi expressa pela quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µg de açúcares redutores em 1 min.

2.4 Caracterização enzimática

A levanasacarase produzida foi parcialmente caracterizada em relação à estabilidade térmica e massa molecular por SDS-PAGE.

2.4.1 Estabilidade térmica

A enzima foi incubada em diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90 °C) e pH 5.0 durante 2 h. O experimento foi realizado em triplicata, onde alíquotas de 0,25 mL foram retiradas a cada 15 min para determinar a atividade de invertase da levanasacarase.

2.4.2 Eletroforese e determinação da massa molecular

A massa molecular da levanasacarase foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecilsulfato de sódio (SDS) e β-mercaptoetanol, foi utilizando

o sistema tampão de Tris-HCl (1,5 M), pH 8.3, gel de separação 12,5% e gel de empilhamento 4% (Laemmli, 1970). O gel foi corado com 0,2% azul de Coomassie Brilliant (CBB) R-250. Os padrões utilizados foram fosforilase B (97,4 kDa), soro albumina bovina (BSA, 66,2 kDa), aldolase (40,0 kDa), triose fosfato isomerase (26,6 kDa), inibidor de tripsina (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa) (J450 Amresco).

2.5 Quantificação de Levana

Levana foi precipitada com etanol absoluto (3:1 v/v com 0,9 mL de etanol: 0,3 mL do EB) a 4°C durante 12 h, centrifugou-se a 9000 x g, a 4 °C durante 15 min, em seguida foi realizada a hidrólise com HCl 0,1 M a 100 °C durante 1 h (Viikari & Gisler, 1986), a reação foi neutralizada com NaOH 2 M e as determinações foram realizadas através dos açúcares redutores de acordo com método de Somogyi (1945) e Nelson (1944) utilizando a frutose como padrão (Sigma-Aldrich).

2.6 Síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase de *B. subtilis*

A enzima produzida foi caracterizada e utilizada em diferentes volumes de reação para a síntese dos FOSs, assim, foram realizadas três reações com: 2,5 mL de volume de reação (tubo de ensaio), 250 mL em frascos Erlenmeyer e 2,5 L em biorreator Bio-tec (Tecnal 4,5 L). As concentrações dos FOSs presentes no EB utilizado como fonte de enzima foi subtraído em todos os experimentos.

2.6.1 Síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase em tubo de ensaio

Para otimizar a síntese dos FOSs pela levanasacarase em tubo de ensaio foi utilizado o delineamento experimental Box Behnken 2³, as variáveis utilizadas foram: sacarose (X_1 : 50 a 350 gL⁻¹), temperatura (X_2 : 30 a 50 °C) e tempo (X_3 : 12 a 36 h) (Tabela 2). Os ensaios foram realizados com: 1,5 mL de sacarose, 0,5 mL de tampão de citrato (0,1 M), pH 6.0 e 0,5 mL de extrato enzimático (EB) (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2004). As reações foram interrompidas por aquecimento a 100 °C durante 15 min. As produções dos FOSs foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.6.2 Síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase em frascos de Erlenmeyers

A síntese dos FOSs pela levanasacarase foi avaliada sob duas condições: C1= agitado (shaker orbital a 50 rpm) e C2= estático (banho-maria), ambos a 35 °C durante 36 h condição otimizada no item 2.6.1. A síntese ocorreu em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo: 200 mL de solução de sacarose em tampão de citrato (0,1 M) pH 6.0 (Silva, Borsato, & Celligoi, 2014a) e 50 mL de EB (esterilizado UV/2 h). A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min e os FOSs foram analisados por CLAE.

2.6.3 Síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase em biorreator

A síntese dos FOSs foi realizada em bioreator (Biotec-Tecnal 4,5 L) com um volume operacional de 2,5 L (2 L de solução de sacarose em tampão citrato (0,1 M) e 0,5 L EB (esterilizado em UV/2 h), a reação foi conduzida a 50 rpm, 36 h, 35 °C e pH 6.0. A reação foi interrompida por aquecimento a 100 °C durante 15 min, os FOSs e a produção dos açúcares foram analisadas por CLAE.

2.7 Determinação dos fruto-oligossacarídeos

As produções dos FOSs foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para isso foi utilizado o equipamento Shimadzu com detector de índice de refração Shimadzu RID-10A. A coluna utilizada foi AMINEX Carboidratos HPX-87C (300 mm x 7,8 milímetros Biorad), a temperatura da coluna foi de 80 °C. As amostras (20 ul) foram eluídas com 0,6 mL min⁻¹ com água Milli-Q e os padrões dos FOSs utilizados foram 1-cestose (GF₂-504.44 Da) e 1- nistose (GF₃-666.58 Da) da Sigma-Aldrich.

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica 7.0 (2004) e valores foram considerados significativos em $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Produção da levanasacarase

A otimização da produção de levanasacarase foi realizada com as variáveis sacarose e pH e fixadas as variáveis agitação em 150 rpm, temperatura de 37 °C e tempo de 24 h. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

As melhores produções foram 25,1 U/mL (400 gL⁻¹, pH 8.0), 23,9 (420.7 gL⁻¹, pH 7.0) e 23,6 (400 gL⁻¹, pH 6.0). Com a redução da sacarose a produção atingiu 15,2 U/mL (279.2 gL⁻¹, pH 7.0), confirmando que altas concentrações sacarose aumenta a produção (Tabela 1).

A produção da levanasacarase foi estudada por Abdel-Fattah, Farid, Kamel, and Elsayed (2015) utilizando *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 5605 e reportaram que o aumento da concentração de sacarose de 400 para 600 gL⁻¹, atingiu 105,4 U/mL a 200 rpm, pH 6.5 por 96 h.

Abdel-Fattah et al. (2005) estudaram a levanasacarase de *Bacillus subtilis* FTFNRC33a e alcançaram 14,5 U/mL de atividade com 200 gL⁻¹ de sacarose. Em nosso estudo o valor de 15,2 U/mL de atividade foi encontrado utilizando 279,5 gL⁻¹ de sacarose (Tabela 1), porém aumentando a concentração de sacarose foram obtidos valores maiores.

(Tabela 1)

O aumento da concentração de sacarose de 50 gL⁻¹ a 400 gL⁻¹ em cultivos com *Bacillus* sp. termofílico, levou a inibição da produção de levana, e que este fato está associado com o aumento formação de oligossacarídeos, que pode aumentar a viscosidade do meio e também o aumento da concentração de glicose o que pode inibir a produção da levanasacarase. Os autores relatam que estes resultados podem variar de acordo com a espécie de microrganismo utilizada (Belghith, Dahech, Belghith, & Mejdoub, 2012). No nosso estudo, com *B. subtilis* natto foi possível verificar que o aumento da concentração de sacarose nos ensaios (4 e 6) elevou a atividade da levanasacarase e a produção de levana (Tabela 1), considerando que a sacarose é a fonte indutora de produção de levanasacarase (Inthanavong, Tian, Khodadadi, & Karboune 2013; Belghith et al., 2012).

Os resultados obtidos pela análise de variância (Tabela 2) indicaram que a concentração de sacarose (X_1) foi significativa ($p < 0.05$) e este modelo pode ser utilizado para fins preditivos, pois a falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,433$).

(Tabela 2)

O modelo matemático obtido da produção de levansacarase possibilitou a confecção da equação de segunda ordem (Eq. 1), a partir dos coeficientes sendo os termos com asteriscos em nível de 5 %.

$$Y_1 = 21,80^* + 3,38x_1^* - 0,92x_1^2 + 0,44x_2 - 0,62x_2^2 + 0,33x_1x_2 \quad (\text{Eq.1})$$

Na equação 1, Y_1 corresponde a atividade da levansacarase (U/mL) e x_1 , x_2 são as variáveis concentração de sacarose (gL^{-1}) e pH. É possível observar que a variável x_1 apresentou efeito positivo sobre a atividade da levansacarase, a variável x_2 e a interação entre x_1x_2 apresentou pouca influência sob a atividade enzimática mais com efeito positivo sob a produção.

A produção da levansacarase otimizada está apresentada na Fig. 1, que relaciona sacarose e pH. O valor previsto no modelo otimizado foi 25,06 U/mL em 420,7 gL^{-1} de sacarose e pH 8,0, valor próximo ao obtido sendo de 23,9 U/mL. A variabilidade das respostas são explicadas em pelo menos 97 %, indicando que o modelo está adequado.

(Fig. 1)

3.2 Caracterização enzimática

3.2.1 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica das enzimas em temperaturas elevadas é um fator relevante principalmente quando se trata de processos industriais, onde enzimas são utilizadas para síntese de produtos. A levansacarase foi testada durante 2 h em diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90 °C) e os resultados apresentados na Fig. 2 mostram que enzima permaneceu estável em todas as temperaturas testadas, sendo uma enzima termoativa e termoestável. A

atividade média no início e no fim da reação variou de 20,4 U/mL a 19,6 U/mL, respectivamente. Em trabalhos anteriores, a estabilidade térmica da levanasacarase de *B. subtilis* natto foi testada, e durante 10 dias de incubação permaneceu parcialmente ativa em 30 e 50 °C, e com grande estabilidade a 30 °C, apresentando uma queda a 50 °C. (Gonçalves, Mantovan, Ribeiro, Borsato, & Celligoi, 2013).

A estabilidade térmica da levanasacarase produzida por *B. methylotrophicus* SK 21.002 foi estudada e a enzima permaneceu estável por 1 h de incubação a 45 °C (Li, Zhang, Jiang, Um, & Miao, 2015).

Levanasacarase de *Bacillus* sp. apresentou alta estabilidade, mantendo 100 % de sua atividade a 50 °C por mais de 1 h, e meia-vida a 90 °C por 1 h (Belghith et al., 2012). Resultados semelhantes foram encontrados por Ammar et al. (2002) que utilizaram a levanasacarase de *Bacillus* sp. TH4-2 apresentando estabilidade por 1 h a 50 °C. Esses dados confirmam que a levanasacarase é uma enzima promissora, por ser termicamente estável, se torna vantajosa para aplicações biotecnológicas, em temperaturas elevadas reduz riscos de contaminação microbiana, diminui a viscosidade e melhora a solubilidade dos substratos.

(Fig. 2)

3.2.2 Determinação da massa molecular

A massa molecular da levansucrase de *B. subtilis* natto foi de 56 kDa, e o resultado em gel SDS-PAGE está apresentado na Fig. 3. A levanasacarase de *B. methylotrophicus* SK 21.002 foi estudada por Li et al. (2015) e os autores descreveram a massa molecular de 60 kDa. Youssef, Youssef, Talha, and El-Aassar (2014) analisaram levanasacarase de *Pediococcus acidilactici* por SDS-PAGE e revelaram o aparecimento de uma banda, com massa molecular de 50 kDa. A levanasacarase de *B. subtilis* BB04 e *Bacillus* sp. TH4-2 apresentaram massa molecular de 52 kDa e 56 kDa respectivamente (Vaidya & Prasad 2012; Ammar et al., 2002).

(Fig. 3)

3.5 Síntese dos fruto-oligossacarídeos pela levanasacarase em tubo de ensaio

A influência da concentração de sacarose, temperatura e tempo na síntese dos FOSs foi estudada pela levanasacarase de *B. subtilis* natto. O pH foi mantido em 6.0, condição estabelecida em estudo anterior (Silva et al., 2014a). Os resultados estão apresentados na Tabela 3, onde as maiores produções foram 69,8 gL⁻¹ no ensaio 5 (350 gL⁻¹ de sacarose, 40 °C, 36 h) e 66,0 gL⁻¹ no ensaio 11 (200 gL⁻¹ de sacarose, 30 °C, 36 h). Silva et al. (2014b) otimizaram a produção dos FOSs pela levanasacarase de *B. subtilis* natto CCT7712 e concluíram que a melhor condição foi em pH 6.0, 45,8 °C e com 334 gL⁻¹ de sacarose atingindo uma produção de 54,86 gL⁻¹ dos FOSs. No presente estudo a melhor produção dos FOSs foi 69,8 gL⁻¹ em pH 6.0, 35 °C, 350 gL⁻¹ de sacarose durante 36 h, correspondendo a um aumento aproximado de 20 %. Essa elevação deve estar relacionada ao aumento do tempo de síntese.

(Tabela 3)

Utilizando a frutossiltransferase de *A. saculeatus* (Novozymes) na produção dos FOSs, com delineamento composto central (DCC) com as variáveis pH (5.6 - 6.4), tempo (4-72 h), temperatura (40-60 °C), concentração da enzima (50-150 U/mL) concentração de sacarose (200-600 gL⁻¹). A máxima produção de nistose foi de 103 gL⁻¹ em 16 h de incubação, com 150 U/mL da enzima, 600 gL⁻¹ de sacarose, 60 °C, pH 5.6 (Mutanda, Wilhelmi & Whiteley, 2015).

A síntese dos FOSs foi realizada utilizando a enzima inulosacarase de *L. gasseri* DSM 20604 com as variáveis concentração de enzima, pH, temperatura e tempo em sacarose a 300 gL⁻¹. O maior rendimento dos FOSs foram de 45 % com 1,6 U/mL de enzima, pH 5.2, 55 °C por 24 h de reação (Díez-Municio, Rivas, Jimeno, Muñoz, Moreno & Herrero, 2013). No nosso estudo as concentrações de sacarose foram 50, 200 e 350 gL⁻¹ alcançando máximo rendimento de 95,9 % dos FOSs com 50 gL⁻¹ de sacarose, 40 °C durante 12 h.

Nemukula, Mutanda, Wilhelmi, and Whiteley. (2009) estudaram por metodologia estatística a síntese dos FOSs pela frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus*, e concluíram que sacarose a 400 gL⁻¹, temperatura de 60 °C e pH de 5.6 favoreceram a síntese de nistose (GF₃) e frutossilnistose (GF₄). No presente trabalho a concentração de sacarose e pH utilizados

foram semelhantes ao dos autores, porém a cepa estudada foi outra, o que reflete um perfil de produção dos FOSs um pouco diferente, sendo predominante aqui a nistose (GF₃).

A enzima β -frutofuranosidase de *A. pullulans* foi utilizada para síntese dos FOSs, com 400 gL⁻¹ de sacarose, pH 5.0 e 10 U/mL de enzima do extrato bruto, a 30 °C, alcançando 62 % de rendimento (Yoshikawa, Amachi, Shinoyama, & Fujii, 2008).

Com *B. subtilis* natto a máxima produção de FOS (nistose) foi de 69,8 gL⁻¹ alcançando 30,7 % de rendimento com 350 gL⁻¹ de sacarose, porém em concentrações baixas de sacarose (50 gL⁻¹) foi possível alcançar rendimentos de até 95,9 % com 31,1 gL⁻¹ de FOSs (ensaio 8, Tabela 3).

Os resultados obtidos pela análise de variância (Tabela 4) indicaram que as variáveis estudadas (X_1 : concentração de sacarose, X_2 : temperatura e X_3 : tempo) e a interação entre concentração de sacarose e tempo (X_1X_3) foram significativas ($p < 0.05$).

(Tabela 4)

O modelo matemático obtido da síntese dos FOSs pela levansacarase possibilitou a confecção da equação polinomial de segunda ordem (Eq. 2), a partir dos coeficientes sendo os termos com asteriscos em nível de 5 %.

$$Y_1 = 56,23^* + 10,22x_1^* - 12,56x_1^2 - 6,93x_2 - 10,54x_2^2 + 7,41x_3^* - 2,19x_3^2 + 1,72x_1x_2 + 8,97x_1x_3^* - 3,90x_2x_3 \quad (\text{Eq.2})$$

Onde: Y_1 corresponde a síntese dos FOSs (gL⁻¹) pela levansacarase e x_1, x_2, x_3 são as variáveis codificadas da concentração de sacarose (gL⁻¹), temperatura (°C) e tempo (h).

A equação 2 demonstra que a variável x_1 apresentou maior efeito positivo em relação as variáveis x_2 e x_3 na síntese dos FOSs, dentre as interações as variáveis significativas foram x_1x_3 , demonstrando que a concentração de sacarose está relacionada com o tempo para maior produção dos FOSs.

A otimização resultou no gráfico de superfície apresentado na Fig. 4, que relacionou sacarose e temperatura, mantendo fixo o tempo ($X_3=1$). Comparando o valor obtido dos FOSs (69,8 gL⁻¹) e o valor previsto pelo modelo (70,0 gL⁻¹) em 350 gL⁻¹, 35 °C, 36 h, a variabilidade das respostas são explicadas em 94 %, indicando que modelo é adequado para fins preditivos, sendo a falta de ajuste não significativa ($p=0,172$) o que é uma boa indicação

de que o modelo se ajusta em relação dos parâmetros reais dentro dos níveis selecionados (Vega & Zúniga-Hansen, 2011).

(Fig. 4)

3.6 Síntese dos fruto-oligosacarídeos pela levanasacarase em frascos de Erlenmeyer

A partir da condição otimizada (350 gL⁻¹ de sacarose, 35 °C por 36 h) (Fig. 4) foi realizada uma nova síntese dos FOSs pela levanasacarase, com volume de 250 mL em duas condições: C₁= agitado a 50 rpm e C₂= estático em banho-maria. A produção dos FOSs foram de 63,7 gL⁻¹ na condição estática (C₂) e 53,0 gL⁻¹ na condição agitada (C₁), indicando que a agitação apresentou efeito negativo na produção, e que a síntese em condição estática e em maior volume diferiu apenas em 8 % da condição estudada em tubos (2,5 mL) com produção de 69,8 gL⁻¹ (item 3.5).

A síntese dos FOSs foi realizada pela levanasacarase de *B. licheniformis* parcialmente purificada na condição estática com 400 gL⁻¹ de sacarose, pH 5.6 a 40 °C por 5 h. Os autores relataram que oligossacarídeos com grau de polimerização menor (cestose e nistose) foram formados no início da reação (Dahech, Belghith, Belghith, & Mejdoub, 2012), neste estudo, também ocorreu a síntese de nistose (GF₃), porem com maior tempo de reação (36 h).

A síntese de FOS (nistose) foi de 35 gL⁻¹ utilizando frutossiltransferase (Viscozyme L) na concentração de 200 gL⁻¹ de sacarose, pH 5.5, 50 °C, 100 rpm durante 6 h (Romano, Santos, Mobili, Veja, & Gómez-Zavaglia, 2016). No presente estudo com agitação de 50 rpm, 350 gL⁻¹ de sacarose a produção atingiu 53,0 gL⁻¹ de FOSs em 36 h, a síntese foi realizada pela levanasacarase produzida por *B. subtilis* que mostrou mais eficiente que a enzima de origem comercial testada pelos autores.

A temperatura é outro fator importante na síntese dos FOSs, quando os autores aumentaram de 4 °C para 40 °C com agitação de 50 rpm e sacarose de 600 gL⁻¹, pH 5.4 levou um aumento na produção dos FOSs pela levanasacarase de *Zymomonas mobilis*, alcançando um rendimento máximo de 15 % dos FOSs (Santos-Moriano, Fernandez-Arrojoa, Poveda, Jimenez-Barbero, Ballesteros, & Plou, 2015). Neste estudo o rendimento foi maior (23,3 %) com concentração mais baixa de sacarose (350 gL⁻¹) a 35 °C e agitação de 50 rpm.

3.7 Síntese dos fruto-oligosacarídeos pela levanasacarase em biorreator

A condição otimizada: 350 gL⁻¹ de sacarose, 35 °C por 36 h (Fig. 4) foi reproduzida em biorreator com volume operacional de 2,5 L. O resultado alcançado foi 38,7 gL⁻¹ dos FOSs, com uma redução de 40 % quando comparado aos resultados obtidos em frascos de Erlenmeyer na condição estática e de aproximadamente 27 % na condição agitada. Estudos relatam que a redução na produção de metabólitos já é esperada com a mudança de volume, ainda assim é economicamente viável a produção em biorreator, pela redução de tempo, considerando que pode-se fazer a síntese com um volume maior de reação ao mesmo tempo, reduzindo portanto os custos. Para alcançar a mesma produção do biorreator (2,5 L) seria necessário realizar seis reações de síntese em Erlenmeyer (250 mL).

A Fig. 5 (a) descreve a síntese dos FOSs e o aumento da atividade da LS durante a produção em biorreator, observa-se que a atividade de LS acompanha a síntese dos FOSs até 36 h, (b) demonstra o perfil dos açúcares durante a síntese enzimática dos FOSs, onde a concentração de sacarose diminui e os açúcares glicose e frutose aumentam com o tempo, demonstrando a reação de hidrólise da LS sob a sacarose, liberando frutose que será utilizada na síntese dos FOSs.

Utilizando inulinase de *K.marxianus* NRRL Y-7571 foi realizada a síntese dos FOSs em reator com agitação de 150 rpm, 40 °C, pH 5.0 e 550 gL⁻¹ de sacarose durante 8 h, a reação ocorreu em sistema aquoso composto com tampão de acetato de sódio (0,1M), e o máximo rendimento foi de 12,8 % dos FOSs (Risso, Mazutti, Treichel, Costa, Maugeri, & Rodrigues, 2012). Utilizando a levanasacarase de *B. subtilis*, foi possível alcançar um rendimento de 17,05 % dos FOSs em biorreator com 350 gL⁻¹ de sacarose.

Sheu, Lio, Chen, Lin, and Duan (2001) utilizaram um sistema com duas enzimas associadas, β-frutofuranosidase (obtida a partir de *A. japonicus*) e glicose oxidase comercial para síntese enzimática dos FOSs em sacarose a 300 gL⁻¹, a reação ocorreu em reator com agitação em 500 rpm, 37 °C, pH 5.5 durante 12 h, apresentando 90 gL⁻¹ dos FOSs.

(Fig. 5)

4. Conclusão

A produção dos FOSs por síntese enzimática utilizando sacarose como substrato apresenta uma alternativa inovadora e rentável para a indústria, ao mesmo tempo satisfaz as necessidades crescentes da população por alimentos saudáveis com compostos bioativos.

A maior produção dos FOSs por síntese enzimática em tubo de ensaios foi de 69,7 gL⁻¹ (350 gL⁻¹ de sacarose, 35 °C por 36 h), em Erlenmeyer e biorreator com volume de 250 mL e 2,5 L as produções foram de 63,7 gL⁻¹ e 38,7 gL⁻¹ respectivamente. Os resultados sugerem uma melhor adequação do método proposto para produção sustentável e escalável dos FOSs. Tendo em vista o mercado dos alimentos funcionais, a abordagem desenvolvida neste trabalho representa uma ferramenta útil tanto na pesquisa acadêmica quanto na indústria alimentícia.

A levansacarase permaneceu estável em temperaturas elevadas, apontando que a enzima produzida por *B. subtilis* natto CCT 7712 é termoestável, característica relevante em processos industriais.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Referências

- Abdel-fattah, A. F., Mahmoud, D. A. R., & Esawy, M. A. T. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructoligosaccharides. *Current Microbiology*, 51, 402–407.
- Abdel-Fattah, M., Farid, M., Kamel, Z., Elsayed, E. A., & El-Deen, A. M. N. (2015). Optimization of medium composition and cultivation parameters for fructosyltransferase production by *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 5605. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 58, 209–218.
- Ammar, Y. B., Matsubara, T., Ito, K., Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., & Minamiura, N. (2002). Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 99, 111-119.

- Ananthalakshmy, V. K., & Gunasekaran, P. (1999). Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives Biology and Technology*, 42, 291–297.
- Bekers, M. Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vigants, A., Viesturs, U., Pankova, L., Danilevics, A. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*. 38, 701-706.
- Belghith, K. S., Dahech, I., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Microbial production of levansucrase for synthesis of fructooligosaccharides and levan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50, 451–458.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., & Lopes, C. A. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 245–247.
- Dahech, I., Belghith, K. S., Belghith, H., & Mejdoub, H. (2012). Partial purification of a *Bacillus licheniformis* levansucrase producing Levan with antitumor activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 329–335.
- Díez-Municio, M., Rivas, B. L., Jimeno, M. L., Muñoz, R., Moreno, F. J., & Herrero, M. (2013). Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from *Lactobacillus gasseri* DSM 20604. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 4129–4140.
- 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 Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 821–827.
- Euzenat, O., Guilbert, A., & Combes, D. (1997). Production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32, 237–243.
- Gonçalves, B. C. M., Mantovan, J., Lúcia, M., Ribeiro, L., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2013). Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1, 001–008.
- Guio, F., Rugeles, L.D., Rojas, S. E., Palomino, M. P., Camargo, M. C., & Sánchez, O. F. (2012). Kinetic modeling of fructooligosaccharide production using *Aspergillus oryzae* N74. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 142–163.
- Inthanavong, L., Tian, F., Khodadadi, M., & Karboune, S. (2013). Properties of *Geobacillus stearothermophilus* levansucrase as potential biocatalyst for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Biotechnology Progress*, 29, 1405–1415.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Li, M., Seo, S., & Karboune, S. (2015). *Bacillus amyloliquefaciens* levansucrase catalyzed the synthesis of fructooligosaccharides, oligolevan and levan in maple syrup-based reaction systems. *Carbohydrate Polymers*, 133, 203–212.

- Li, R., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., & Miao, M. (2015). Purification and characterization of an intracellular levansucrase derived from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 62, 815–822.
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, 587–597.
- Mussatto, S.I., Aguiar, L. M., Marinha, M. I., Jorge, R. C., & Ferreira, E. C. (2015). Bioresource technology economic analysis and environmental impact assessment of three different fermentation processes for fructooligosaccharides production. *Bioresourse Technology*, 198, 673–681.
- Mutanda, T., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G. (2015). Biocatalytic conversion of inulin and sucrose into short chain oligosaccharides for potential pharmaceutical applications. *African Journal of Science, Technology, Innovation and Development*, 7, 371–380.
- Nelson, A. N. (1944). Fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 153, 375–80.
- 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*. *Bioresourse Technology*, 100, 2040–2045.
- Risso, F. V. A., Mazutti, M. A., Treichel, H., Costa, F., Maugeri, F., & Rodrigues, M. I. (2012). Comparison between systems for synthesis of fructooligosaccharides from sucrose using free inulinase from *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 331–337.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal Nutrition*, 137, 830–837.
- Romano, N., Santos, M., Mobili, P., Vega, R., & Gómez-zavaglia, A. (2016). Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructooligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 202, 467–475.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT – Food Science and Technology*, 50, 1–16.
- Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2004). Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus aryzae* CRF 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochemistry*, 39, 753–758.
- Santos-Moriano, P., Fernandez-Arrojo, L., Poveda, A., Jimenez-Barbero, J., Ballesteros, A. O., & Plou, F. J. (2015). Levan versus fructooligosaccharide synthesis using the levansucrase from *Zymomonas mobilis*: Effect of reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 119, 18–25.

- Sheu, D. C., Lio, P. J., Chen, S. T., Lin, C. T., & Duan, K. J. (2001). Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of β -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*, 23, 1499–1503.
- Silva, P. B., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2014a). High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *African Journal of Biotechnology*, 13, 2734–2740.
- Silva, P. B., Borsato, D., & Celligoi, M. A. P. C. (2014b). Optimization of high production of fructooligosaccharides by sucrose fermentation of *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. *American Journal Food Technology*, 9, 144–150.
- Singh, R. S., Singh, R. P., & Kennedy, J. F. (2016). Recent insights in enzymatic synthesis of fructooligosaccharides from inulin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 565–572.
- Somogy, M. (1945). A New Reagent for Determination of Sugars. A new Sugar Reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 160, 61–68.
- Statistica for Windows Software, 7.0, Tulsa, O.K., USA, 2004.
- Vaidya, V., & Prasad, D. T. (2012). Thermostable levansucrase from *Bacillus subtilis* BB04, an isolate of banana peel. *Journal of Biochemical Technology*, 3, 322–327.
- Vega, R., & Zúniga-Hansen, M. E. (2011). Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 102, 10180–10186.
- Viikari, L., & Gisler, R. (1986). By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiol Biotechnology*, 23, 240–244.
- Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H., & Fujii, T. (2008). Production of fructooligosaccharides by crude enzyme preparations of β -fructofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters*, 30, 535–539.
- Youssef, G. A., Youssef, A. S., Talha, S., & El-Aassar, S. A. (2014). Increased fructosyltransferase (levansucrase) production by optimizing culture condition from *pediococcus acidilactici* strain in shaking batch cultures. *Life Science-Journal*, 11, 33–47.

Lista de Figuras e Tabelas

Tabela 3

Atividade da levansacarase e produção de levana por *Bacillus subtilis* natto a 37 °C durante 24 h utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2².

Ensaio	Variáveis		Respostas	
	X ₁ (gL ⁻¹)	X ₂ (pH)	Levansacarase (U/mL)	Levana (gL ⁻¹)
1	-1 (300)	-1 (6.0)	16,9	104,7
2	-1 (300)	1 (8.0)	17,1	95,20
3	1 (400)	-1 (6.0)	23,6	140,5
4	1 (400)	1 (8.0)	25,1	149,2
5	-1.414 (279.5)	0 (7.0)	15,2	92,00
6	1.414 (420.7)	0 (7.0)	23,9	154,7
7	0 (350)	-1.414(5.6)	19,5	121,9
8	0 (350)	1.414 (8.4)	20,8	119,9
9	0 (350)	0 (7.0)	21,4	131,5
10	0 (350)	0 (7.0)	22,6	128,9
11	0 (350)	0 (7.0)	21,4	142,8

X₁: concentração de sacarose e X₂: pH.

Tabela 2

Análise de variância (ANOVA) da produção de levansacarase de *B. subtilis* natto.

Parâmetros	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	F-valor	p
X ₁	91,149	1	91,149	189,895	0,005*
X ₂	1,565	1	1,565	3,260	0,212
X ₁ X ₂	0,422	1	0,422	0,880	0,447
Falta de Ajuste	2,081	3	0,693	1,445	0,433
Erro puro	0,960	2	0,480		
Total	101,696	8			

X₁: concentração de sacarose, X₂: pH.

R²= 0.97009, R² (aj)= 0.94019

* Significância (p<0.05).

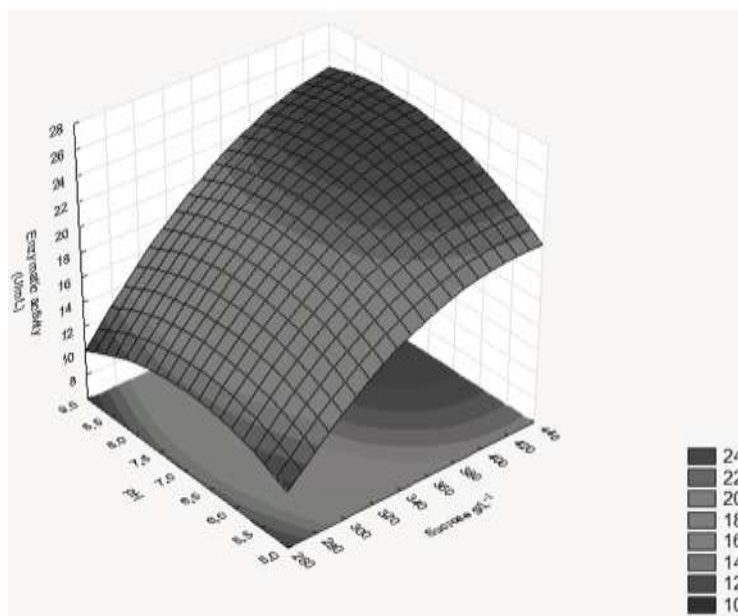


Fig. 1. Superfície de resposta na produção de levansacarase produzida por *Bacillus subtilis* natto variando sacarose e pH.

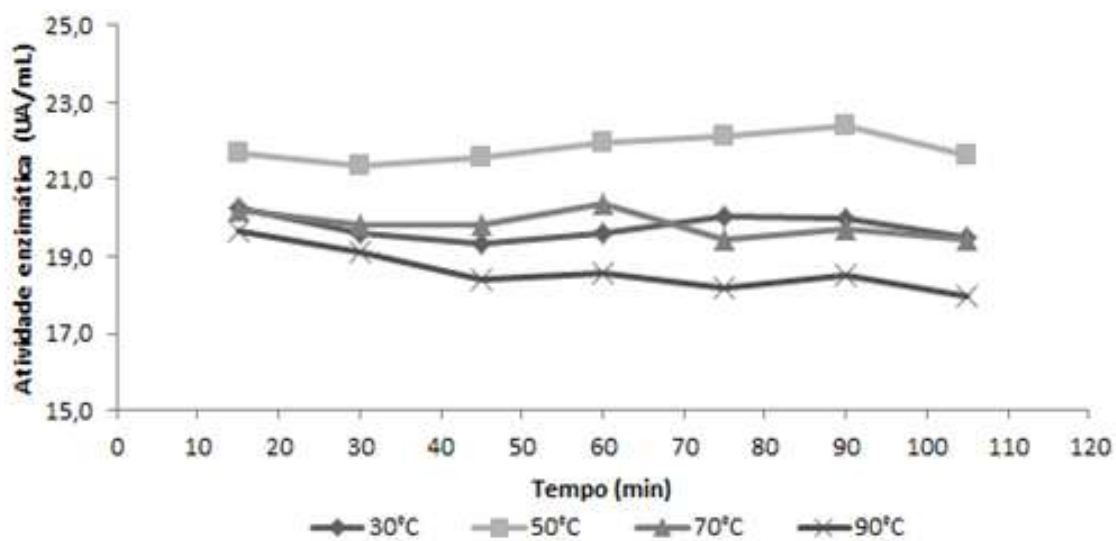


Fig. 2. Estabilidade térmica da levansacarase de *B. subtilis* natto em pH 5.0

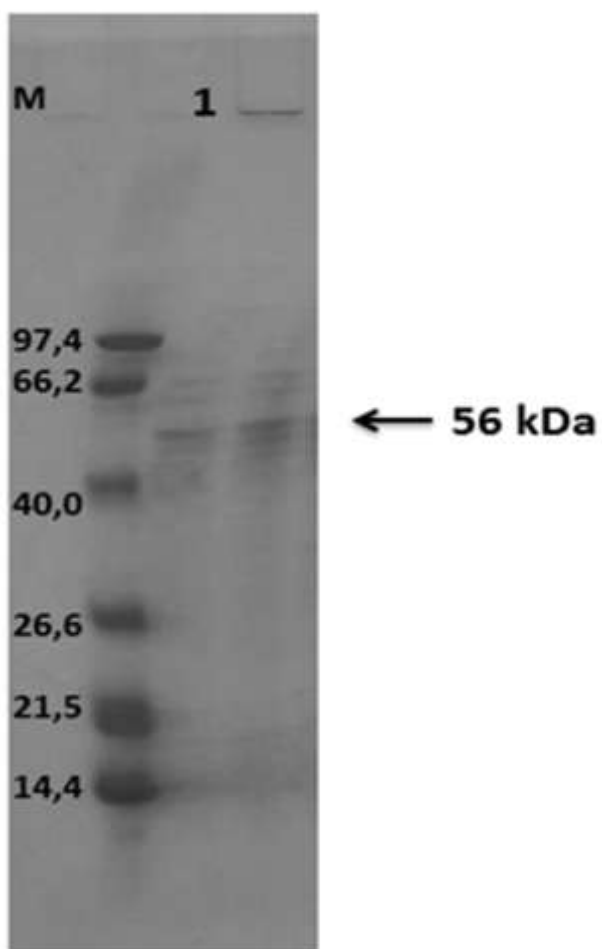


Fig. 3. Gel SDS-PAGE com (M) marcador de massa molecular (1) extrato bruto enzimático.

Tabela 3

Síntese enzimática dos FOSs (gL^{-1}) e rendimento (%) pela levanasacarase de *B. subtilis* natto, variando a sacarose, temperatura e tempo por Delineamento Box e Behnken 2³.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X ₁ (gL^{-1})	X ₂ (°C)	X ₃ (h)	FOSs (gL^{-1})	(%)
1	1 (350)	1 (50)	0 (24)	39,0	17,2
2	1 (350)	-1 (30)	0 (24)	42,6	18,8
3	-1 (50)	1 (50)	0 (24)	20,2	62,3
4	-1 (50)	-1 (30)	0 (24)	30,7	94,7
5	1 (350)	0 (40)	1 (36)	69,8	30,7
6	1 (350)	0 (40)	-1 (12)	38,7	17,0
7	-1 (50)	0 (40)	1 (36)	26,3	81,1
8	-1 (50)	0 (40)	-1 (12)	31,1	95,9
9	0 (200)	1 (50)	1 (36)	37,5	28,9
10	0 (200)	1 (50)	-1 (12)	28,8	22,2
11	0 (200)	-1 (30)	1 (36)	66,0	50,9
12	0 (200)	-1 (30)	-1 (12)	41,7	32,1
13	0 (200)	0 (40)	0 (24)	52,7	40,6
14	0 (200)	0 (40)	0 (24)	57,1	44,0
15	0 (200)	0 (40)	0 (24)	58,9	45,4

X₁: Concentração de sacarose, X₂: temperatura e X₃: tempo

Tabela 4

Análise de variância (ANOVA) demonstrando os efeitos da concentração de sacarose, temperatura e tempo na síntese dos FOSs pela levanasacarase de *B. subtilis* natto.

Parâmetros	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos Quadrados	F-valor	p
X ₁	836,405	1	836,405	82,215	0,012*
X ₂	385,031	1	385,031	37,847	0,025*
X ₃	439,561	1	439,561	43,207	0,022*
X ₁ X ₃	322,202	1	322,202	31,671	0,030*
Falta de Ajuste	150,793	3	50,264	4,940	0,172
Erro puro	20,347	2	10,173		
Total	3151,796	9			

X₁: concentração de sacarose, X₂: temperatura, X₃: tempo.

R²= 0.9457, R² (aj)= 0.84796

* Significância (p<0.05).

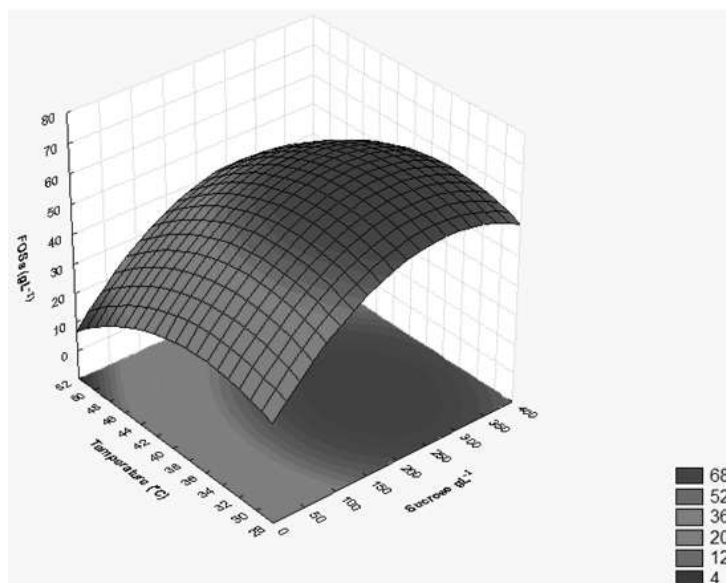


Fig. 4. Superfície de resposta na síntese dos FOSs pela levanasacarase de *B. subtilis* natto, variando sacarose, temperatura e tempo.

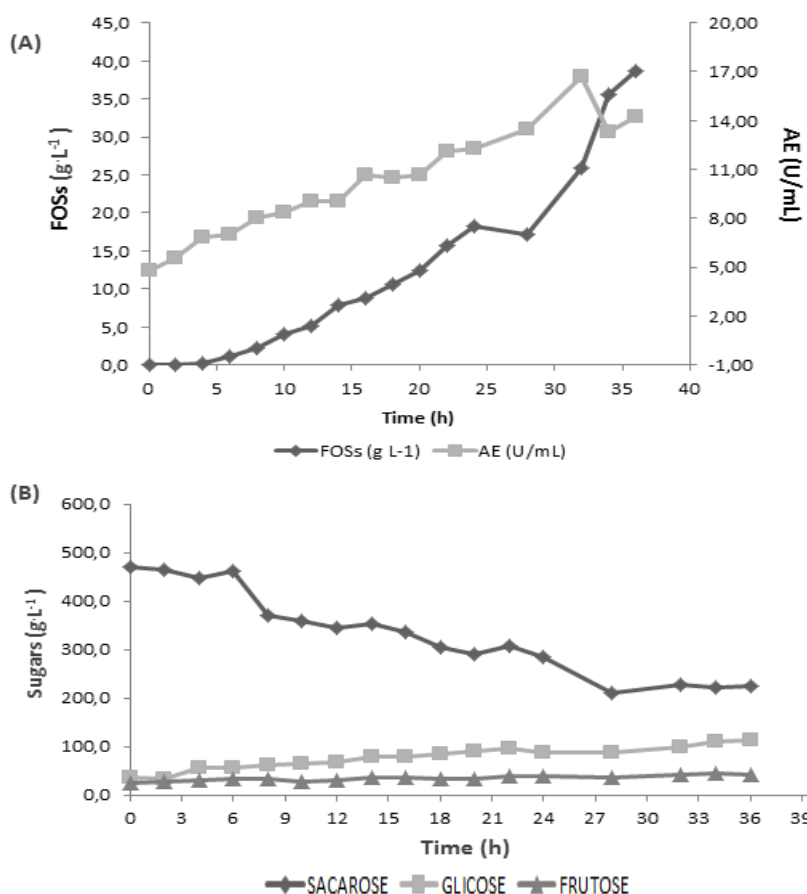


Fig. 5. (a) Síntese dos FOSs pela levanasacarase de *B. subtilis* natto e atividade enzimática em biorreator por 36 h e (b) perfil dos açúcares (sacarose, glicose e frutose) durante a síntese enzimática dos FOSs.

ANEXO B

**FILMES COMESTÍVEIS DE AMIDO DE MANDIOCA E FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS DE *Bacillus subtilis* natto CCT 7712**

**EDIBLE FILMS CASSAVA STARCH AND *Bacillus subtilis* natto
FRUCTO-OLIGOSACCHARIDES CCT 7712**

**Gabrielly Terassi Bersaneti, Janaína Mantovan, Agnes Magri, Suzana Mali, Maria
Antonia Pedrine Colabone Celligoi***

Filmes comestíveis de amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto CCT 7712

Gabrielly Terassi Bersaneti, Janaína Mantovan, Agnes Magri, Suzana Mali, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi*

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes comestíveis a base de amido de mandioca e adicionar fruto-oligossacarídeos (FOSs) produzidos por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, assim como avaliar a microestrutura, propriedades de barreira e mecânicas destes filmes. Os FOSs foram adicionados em diferentes concentrações (0, 1, 5 e 10 g/ 100 g sólidos) aos filmes, que foram produzidos pela técnica de *casting*. Todos os filmes obtidos se apresentaram com boa aparência, sem poros ou bolhas e foram facilmente manuseados. Através dos resultados de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) pode-se observar fortes indícios de interação entre o amido e os FOSs. A adição dos FOSs levou ao aumento da solubilidade e da alongação, e ao decréscimo da permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos, mostrando ser um ingrediente promissor e compatível com as matrizes poliméricas de amido.

Palavras-chave: Prebiótico, propriedades mecânicas, permeabilidade, solubilidade.

Highlights

Incorporação dos FOSs produzidos por *B. subtilis* em filmes comestíveis.

Caracterização da microestrutura, propriedades de barreira e mecânicas dos filmes.

Análise de FTIR mostrou possível interação entre o amido e os FOSs.

Filmes com alta solubilidade associada à presença dos FOSs.

Filmes com menor permeabilidade e maior alongação com adição dos FOSs.

1. Introdução

Filmes e revestimentos comestíveis são definidos como uma fina camada de material sob a superfície de um produto que proporciona uma barreira eficaz contra vapor de água, gases ou temperatura (Tavassoli-Kafrani, Shekarchizadeh, Masoudpour-Behabadi, 2016), e são utilizados na proteção de alimentos a fim de aumentar a sua vida útil. Em adição a isso, há vários estudos atualmente relacionados ao preparo e aplicação destes materiais, que além de comestíveis são biodegradáveis, para tentar solucionar problemas ligados à poluição causada pelo uso dos plásticos convencionais, muito utilizados em embalagens de alimentos, e que não são biodegradáveis, se acumulam no ambiente (Jiménez, Fabra, Talens, & Chiralt, 2012).

Os filmes podem ser preparados com diversas matrizes poliméricas, dentre elas o amido, polissacarídeo de origem vegetal constituído de dois polímeros de glicose: amilose e amilopectina. A amilose é um polímero de glicose linear, com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e possui excelente capacidade de formar filmes, e a amilopectina, com cadeias lineares similares à amilose e pontos de ramificação formados a partir de ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 6$) (Campos, Gerschenson, & Flores, 2011). O amido é amplamente utilizado, pois trata-se de uma matéria prima de baixo custo, de elevada disponibilidade, um dos polissacarídeos mais estudados no momento e não representa nenhum risco a saúde humana, pois está associado à alimentação.

Os revestimentos comestíveis têm ganhado bastante atenção por ter elevado potencial para transportar ingredientes ativos, tais como agentes de antiescurecimento, corantes, aromas, nutrientes, compostos antimicrobianos e antioxidantes (Pranoto, Salokhe, & Rakshit, 2005). Também é possível aprimorar as propriedades sensoriais dos alimentos revestidos desde que, contenham vários componentes como aromatizantes, corantes, edulcorantes (Bourtoom, 2008), e também melhora-los pela adição de ingredientes funcionais como, por exemplo, prebióticos e/ou probióticos, pois trazem benefícios a saúde.

Segundo Scholz-Ahrens et al. (2007) e Roberfroid (2000) os prebióticos são de fundamental importância, pois são ingredientes alimentares não digeríveis que trazem benefícios por afetar o hospedeiro, ao estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de uma ou mais bactérias (probióticas) no trato gastrointestinal e assim, exercem um efeito de promoção da saúde. Dentre alguns prebióticos estudados, pode se relatar a importância dos fruto-oligosacarídeos (FOSs), que são hidratos de carbono com baixo peso molecular que contêm resíduos de frutose com um grau de polimerização de 3 a 9, onde as unidades frutose são ligadas na posição β -(2 \rightarrow 1) da sacarose. Os FOSs são compostos principalmente de 1-

cestose (GF₂), nistose (GF₃) e 1-β-frutofuranosil nistose (GF₄) (Yun, 1996). Além disso, os fruto-oligossacarídeos atuam na redução de fosfolípidos, triglicerídeos e níveis de colesterol, ajudam também na absorção de cálcio e magnésio no intestino (Mussatto & Mancilha, 2007).

Bacillus subtilis natto possui grande potencial para produção dos FOSs por fermentação. Vários autores relataram a produção dos FOSs utilizando este microrganismo (Gonçalves, Mantovan, Ribeiro, Borsato & Celligoi, 2013; Silva, Borsato & Celligoi, 2014a; 2014b). Além disso, Silva, Garcia, Baldo, & Celligoi (2016) realizaram estudo onde avaliou-se a capacidade do *Lactobacillus* ssp. utilizar os FOSs produzidos pelo *Bacillus subtilis* natto como única fonte de energia, atestando a sua ação prebiótica. Os resultados mostraram que os FOSs foram igualmente eficientes quando comparados à glicose para fornecer energia a este microrganismo, e as análises confirmaram a sua atividade prebiótica e sugeriram que as combinações específicas de probióticos (*L. plantarum* ATCC14917 e *L. casei* (LC-1)) e do prebiótico (FOSs) podem ser utilizadas como simbióticos em produtos lácteos e outros alimentos (Silva et al., 2016).

A adição de prebióticos (FOSs e inulina) em filmes com matriz de amido de milho foi relatada por Tang et al. (2015), que observaram que a solubilidade em água dos filmes aumentou, e isto foi atribuído à elevada solubilidade do prebiótico. Além disso, a elongação na ruptura dos filmes aumentou, aparentemente devido ao efeito plastificante dos prebióticos. E os resultados também mostraram a atividade prebiótica *in vitro* presente nos filmes, indicando não ser afetada pelo processo de preparação (*casting*) (Tang et al., 2015).

Desta maneira, a pesquisa e o desenvolvimento de novos materiais para produção de filmes comestíveis, dos seus métodos de produção, e das suas propriedades e aplicações tem se tornado cada vez mais o alvo de vários estudos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi de desenvolver filmes comestíveis a base de amido de mandioca e adicionar fruto-oligossacarídeos produzidos por *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, assim como avaliar a microestrutura, propriedades de barreira e mecânicas destes filmes.

2. Material e métodos

2.1 Material

O microrganismo utilizado foi *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (Brasil) e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia - Campinas SP. O meio de

fermentação para obtenção do inóculo foi preparado de acordo com Calazans, Lima, França, & Lopes (2000). Foram empregados para a produção dos filmes amido de mandioca (Yoki[®] Paranaíba-PR) e glicerol (98-99 % de pureza) da Merck (Alemanha).

2.2. Produção dos fruto-oligosacarídeos por *B. subtilis* natto

A produção e purificação dos FOSs foram realizadas com base em resultados descritos anteriormente por Silva et al. (2014a). A produção foi conduzida em biorreator (Bio-tec Tecnal 4,5L e volume operacional de 3 L com meio de fermentação contendo (g L^{-1}): sacarose 400; extrato de levedura 2,0; KH_2PO_4 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$ 0,6, MnSO_4 0,2 e citrato de amônio 0,25, o pH foi ajustado para 7,7 aeração de 0,2 vvm, 44 h, 35 °C e 50 rpm. Após 44 h a fermentação foi interrompida por centrifugação a 9000 x g a 4 °C por 15 min, a produção e a pureza dos FOSs foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu RID-10A) acoplada a um detector de índice de refração, utilizando a coluna de carboidratos Aminex HPX-87C (300 x 7,8 milímetros, Biorad). A fase móvel foi água Milli-Q a uma taxa de fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura da coluna foi mantida constante a 80 °C. O sobrenadante (20 μl) foi eluído com 0,6 mL de água Milli-Q. A produção total dos FOSs foi calculada com a soma de 1-cestose (504,44 Da) e 1-nistose (666,58 Da), que foi estimada utilizando 1-nistose e 1-cestose padrões analíticos da Sigma-Aldrich. A análise mostrou uma remoção completa de monossacarídeos e dissacarídeos, assim como polímeros de frutose com um peso molecular superior a 3 kDa.

Os FOSs foram submetidos à ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa (Milipore Ultracel PL), o filtrado (FOSs) foi precipitado com três volumes de etanol absoluto gelado. O precipitado foi dialisado em água destilada durante 48 h e liofilizado para ser utilizado na produção dos filmes comestíveis. A ação prebiótica dos FOSs produzidos foi confirmada em trabalho anterior (Silva et al. 2016).

2.3. Produção dos filmes comestíveis

Os filmes foram preparados a partir de solução aquosa com adição de amido de mandioca (Yoki[®] Paranaíba-PR), FOSs parcialmente purificado (Tabela 1) e glicerol utilizando-se o método de *casting* (Sipos, Szűcs, Szabó, Erős, & Szabó-Révész, 2008; Tarantili, & Koumoulos, 2008). Foram preparadas quatro formulações variando-se a concentração dos

FOSs na solução filmogênica, e empregou-se 3 % (m/v) de sólidos, e em todas as formulações 20 g de glicerol/100g de sólidos foi adicionado como plastificante.

(Tabela 1)

O amido, o glicerol e a água (Tabela 1) foram aquecidos a 90 °C com agitação constante (7 a 8 min) até a obtenção de uma solução homogênea, em seguida foram adicionadas as quantidades estabelecidas dos FOSs para cada formulação. Após a completa homogeneização as soluções foram colocadas em sonificador (Unique USC-1800) durante 10 min para completa eliminação das bolhas formadas no processo. Em seguida, foram colocadas 30 g de cada formulação em placa de Petri de acrílico para secagem em estufa de circulação de ar a 30 °C, por aproximadamente 20 h, até a formação dos filmes. Os filmes selecionados foram acondicionados em BOD com 58 % de umidade relativa (UR) e 25 °C até o momento da realização das análises de caracterização.

2.4. Caracterização dos filmes

2.4.1. Microestrutura

A análise de microestrutura foi realizada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (modelo FEI Quanta 200). Para verificar a estrutura dos filmes, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e submetidas a um congelamento rápido, depois foram fraturadas com auxílio de uma pinça e secas em estufas por cinco dias a 50 °C. Após estes procedimentos as amostras secas foram revestidas de ouro por um Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050) e avaliadas com voltagem de aceleração de 30 kV. A análise foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (LMEM) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

2.4.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada no Fourier (FTIR)

Foi utilizado o método de leitura da amostra em pastilha de brometo de potássio (KBr). O experimento foi conduzido em aparelho Shimadzu FTIR-8300 com resolução de 4 cm⁻¹,

utilizou-se uma escala de 4000 a 500 cm^{-1} . As amostras foram incorporadas ao KBr e submetidas à alta pressão para a produção das pastilhas. Os resultados foram integrados pelo programa Shimadzu Hyper IR. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

2.4.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Para as análises de DSC, cerca de 10 mg de cada amostra foram colocados em cadinho de alumínio com tampa furada e submetidos a programa de aquecimento controlado. Os ensaios foram realizados no equipamento Netzsch (modelo DSC-204), em uma atmosfera com fluxo de nitrogênio gasoso de 10 mL/min. A faixa de temperatura foi de 0-300 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. A análise foi realizada no Laboratório de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuário de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina.

2.4.4. Espessura

A determinação da espessura dos filmes foi realizada utilizando-se um Micrômetro (Mitutoyo[®]), a partir de três pontos escolhidos aleatoriamente na superfície de cada amostra de filme.

2.4.5. Solubilidade em água

As análises foram realizadas de acordo com o método de Gontard, Guilbert, & Cuq, (1992). Os testes foram realizados em triplicata, as amostras foram cortadas em corpos de prova com 3x3 cm, e secas em estufa com circulação de ar (Marconi, Brasil) a 60 °C por 24 h. Em seguida as amostras foram pesadas (peso seco inicial) e mergulhadas em Erlenmeyer de 250 mL contendo 80 mL de água destilada, estes frascos foram vedados e agitados a 50 rpm, 25 °C por 24 h em incubadora orbital (Shaker Marconi MA 420). Após este período, as amostras foram removidas cuidadosamente e secas em estufa com circulação de ar por 24 h a 60 °C, para determinar a massa do material não solubilizado (peso final).

A solubilidade foi expressa por porcentagem de material seco solubilizado conforme a equação:

$$\text{Solubilidade (\%)} = ((m_i - m_f) / m_i) * 100$$

Onde, m_f é a massa final da amostra e m_i é a massa inicial da amostra, ambos em base seca.

2.4.6. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A PVA foi determinada gravimetricamente de acordo com as normas da American Society for Testing and Materials (ASTM E96-95 1996) com modificações. Cada amostra (triplicata) foi colocada em uma cápsula de permeabilidade, e seu interior foi parcialmente preenchido com CaCl_2 anidro, de modo a se obter 0 % de UR no interior destas cápsulas, que foram seladas para garantir que a transferência de vapor de água ocorresse exclusivamente através do filme. O conjunto (cápsula + filme) foi pesado em tempo zero e armazenado em dessecador a temperatura ambiente, contendo em seu interior uma solução saturada de NaCl que proporcionou um ambiente com 75 % de UR. Após um período de equilíbrio de 2 h as cápsulas foram pesadas em intervalos regulares durante 24 h. A mudança de massa da cápsula de permeação foi registrada, e o ganho de massa (g) foi graficado em função do tempo (t). Da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água (TVA):

$$\text{TVA} = \frac{g}{t.A}$$

Onde, g/t é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e A é a área de permeação (m^2) da cápsula. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água (PVA) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{PVA} = \frac{\text{TVA}.m}{\Delta P}$$

Onde, m é a espessura média do filme (m^2), ΔP é a diferença de pressão de vapor de água do ambiente contendo $CaCl_2$ anidro (0 % de UR) e solução saturada de $NaCl$ (75 % de UR).

2.4.7. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando-se um texturômetro (Stable Micro Systems modelo TA.TX2-Inglaterra) de acordo com as Normas da ASTM (D882-91, 1996).

Os filmes foram cortados (25,4 x 100 mm) e ajustados entre as garras pneumáticas do equipamento. A distância entre as garras foi de 50 mm e a velocidade de tração de 500 mm/min. Foram determinadas as seguintes propriedades de tração: resistência máxima à tração (MPa) e alongação na ruptura (%), calculadas pelas equações a seguir:

$$\text{Resistência máxima à tração} = \frac{F_{\max}}{A_{\min}}$$

Onde, F_{\max} é a força máxima (N) registrada no equipamento e A_{\min} é a área mínima inicial da amostra (m^2).

$$\text{Alongação na ruptura} = \frac{A_T}{DG} \times 100$$

Onde, A_T é a alongação total da amostra até a ruptura (m) e o DG é a distância inicial entre as garras (m).

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização de filmes comestíveis

3.1.1. Microestrutura

A microscopia eletrônica contribui para caracterização dos filmes, pois permite visualizar as estruturas da superfície, possibilitando assim a investigação de possíveis imperfeições. As

imagens do MEV mostram as quatro formulações dos filmes produzidos (Fig. 1), onde é possível visualizar que as amostras ficaram homogêneas, sem a presença de poros, com poucas rachaduras e rugosidade. Estes fenômenos podem ter corridos devido à temperatura de secagem ou o vácuo utilizado no equipamento durante a análise.

Segundo as imagens do MEV das superfícies de crio-fratura com diferentes filmes, foi possível observar que todos formaram uma estrutura compacta, não apresentam poros, estas características também foram nitidamente visualizadas em filmes preparados com o amido de mandioca (Gutiérrez, Tapia, Pérez, & Famá, 2015). Saavedra, & Algecira (2010) relataram estruturas similares também em filmes de amido de mandioca, mas com adição de proteínas isoladas da soja. Estes autores comprovam os resultados que foram obtidos neste estudo, em relação à microestrutura de filmes de amido de mandioca e FOSs de *B. subtilis*.

(Fig. 1)

3.1.2. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Utilizando a técnica de FT-IR é possível atribuir absorções a grupos funcionais específicos, portanto a espectroscopia de IR é muito útil na elucidação estrutural de um composto (Kacuráková, & Wilson, 2001). Os espectros FT-IR do amido de mandioca, FOSs e filmes produzidos com amido e FOSs estão apresentados na Fig. 2 e são típicos de polissacarídeos (Romano, Santos, Mobili, Vega, & Gómez-Zavaglia, 2016; Santos, Araujo-Andrade, Tymczyszyn, & Gómez-Zavaglia, 2014). Em todas as amostras, foi observada uma forte banda próxima a 3470 cm^{-1} , que pode ser relacionada com o estiramento vibracional dos grupamentos OH de todos os compostos que possuem estes grupamentos (amido, glicerol e FOSs).

As bandas próximas foram observadas 2900 cm^{-1} em todas as amostras e podem ser atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico dos grupamentos $-\text{CH}_2$ (Fig. 2), esta banda foi mais intensa nas matérias-primas (FOSs e amido de mandioca) do que nos filmes. A banda a 1650 cm^{-1} foi atribuída às moléculas de água incorporadas na matriz polimérica de amido, e a banda de perto a 1400 cm^{-1} foi relacionada com a deformação simétrica dos grupos CH (Fig. 2) (Santos et al. 2014; Sekkal, Dincq, Legrand, & Huvenne, 1995).

(Fig. 2)

As bandas que ocorreram na região de $1200-900\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 2) foram atribuídas às ligações glicosídicas C-O-C que ocorrem nas moléculas de amido e FOSs (Romano et al., 2016; Santos et al., 2014). Observou-se que as bandas aparecem nesta região com maior intensidade no FOSs, seguido por amido. Em todas as amostras de filmes essas bandas quase desapareceram.

Neste estudo foi possível visualizar o desaparecimento de algumas bandas, devido a interações que podem ter ocorrido entre o amido e os FOSs. É importante compreender as mudanças de bandas associadas com grupos OH, sugerem um aumento de oscilações que podem ser atribuídas a novas interações por ligações de hidrogênio (Garcia, Ribba, Dufresne, Aranguren, & Goyanes, 2009).

3.1.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura é uma técnica utilizada para detectar, dentre outros fenômenos, a temperatura de fusão (T_m) dos polímeros. A temperatura de fusão é relativa a um movimento significativo das cadeias moleculares devido ao rompimento dos cristais quando a temperatura aumenta (Luchese, Frick, Patzer, Spada, & Tessaro, 2015).

Os termogramas de DCS das amostras estão apresentados na Fig. 3. Nos termogramas dos FOSs puros observou-se dois picos endotérmicos a 220 e 226 °C , que estão possivelmente relacionadas com a degradação térmica dos FOSs, onde os dois picos observados podem ser associados com a mistura de dois oligossacarídeos na amostra de FOSs (1-cestose e nistose). Zhang, Du, & Bi. (2012) observaram um pico endotérmico a $214,4\text{ °C}$ quando analisaram FOSs com baixo peso molecular isolados de alho. Leone, Colman, Schnitzler, Ellendersen, & Masson (2014) relataram que picos próximos a $220 - 240\text{ °C}$ podem ser atribuídos ao processo de caramelização destes carboidratos.

Em filmes de amido que são submetidos a temperaturas elevadas pode haver ocorrência de um pico endotérmico acentuado acima de 270 °C , devido à degradação da amostra (Rueda, Secall, & Bayer, 1999), como observado neste trabalho para as amostras de filmes com $5\text{ g FOSs}/100\text{ g sólidos}$ e filmes de amido puro (AM-FOS5 e AM) (Fig. 3).

(Fig. 3)

Mali, Grossmann, Garcia, Martino, & Zaritzky (2002) fizeram análises térmicas em filmes de amido de inhame armazenados em 20 °C, 65 % UR por 90 dias. Os filmes não demonstraram nenhum pico em análise de DSC na gama de temperaturas testadas (- 40 a 120 °C).

3.1.4. Espessura, Solubilidade em água e Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

O controle da espessura dos filmes é importante para avaliação da sua uniformidade, para assegurar a reprodutibilidade e a validade de comparações entre os filmes desenvolvidos. Além disso, o valor da espessura é empregado no cálculo da resistência mecânica, bem como, da permeabilidade ao vapor de água e de gases. Portanto, a espessura é fortemente influenciada pelas matérias-primas, tipos e quantidades de plastificantes e pela técnica utilizada para a preparação dos filmes (Luchese et al., 2015). Os resultados de espessura estão apresentados na Tabela 2, e as amostras não apresentaram diferenças significativas entre si de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$), o que é um resultado positivo, uma vez que todos os filmes foram preparados com a mesma quantidade de sólidos.

Os filmes de amido com a adição dos FOSs foram significativamente mais solúveis quando comparados aos filmes de amido puro (Tabela 2), isso ocorre devido à alta solubilidade destes oligossacarídeos em água. Estes resultados estão de acordo com Tang et al. (2015), que produziram filmes de amido de milho adicionados de prebióticos (FOSs e inulina de origem comercial), e observaram que a solubilidade dos filmes aumentou. Isto pode ser explicado pela solubilidade dos prebióticos em contato com a água. As moléculas de água podem penetrar através destes "prebióticos" de forma rápida e acelerar a solubilidade dos filmes.

Belibi et al. (2014) estudaram a solubilidade em água de filmes de amido, e observaram que com diferentes concentrações de glicerol (30 e 45 %) a solubilidade variou de 23,0 a 32,1 %. Portanto o aumento do glicerol nas formulações promoveu maior solubilidade dos filmes. Estes resultados confirmam que com concentração de glicerol mais baixa (20 %) como a utilizada neste estudo à solubilidade do filme de amido foi menor (16,16 %). O glicerol tem uma grande influência sobre a solubilidade em filmes de amido, devido a seu caráter hidrofílico, interagindo com a matriz do filme, aumentando o espaço entre as cadeias poliméricas, facilitando a migração da água no filme e, conseqüentemente, aumentando a sua solubilidade (Matta, Sarmiento, Sarant-Opoulos, & Zocchi, 2011).

De acordo com os resultados (Tabela 2), a PVA foi maior em filmes preparados com amido de mandioca puro em relação aos filmes que foram adicionados FOSs. De acordo com Bertuzzi, Vidaurre, Armada & Gottifredi (2007), a permeabilidade ao vapor de água depende da solubilidade e do coeficiente de difusão do vapor de água através do filme, e pode-se perceber que embora a solubilidade tenha sido maior nos filmes com adição dos FOSs, a permeabilidade foi menor, e isto é um indicativo de que possivelmente o coeficiente de difusão do vapor de água seja menor nos filmes com a adição dos FOSs.

O decréscimo da PVA é um resultado interessante, indicando que os filmes produzidos neste estudo possuem potencial para serem utilizados como revestimentos comestíveis, já que a função principal das embalagens de alimentos é muitas vezes evitar ou pelo menos diminuir a transferência de umidade entre o produto e a atmosfera circundante (Gontard, Guilbert, & Cuq, 1992).

Romano et al. (2014) estudaram e caracterizaram filmes com matriz de metilcelulose adicionando FOSs de origem comercial. Os resultados demonstraram alta permeabilidade ao vapor de água quando comparados a este estudo, variando de 3,5 a $6,1 \times 10^{-11}$ g/msPa durante 8 h a 20 °C com gradiente de umidade relativa (UR) de 75 %. A estratégia de utilizar FOSs foi positiva segundo os autores, pois são altamente sensíveis à desidratação e armazenamento. Porém com a PVA maior ocorrem mais transferências de umidade entre o produto e o ambiente.

Belibi et al. (2014) produziram filmes de amido de mandioca e relataram que a sua permeabilidade ao vapor de água variou de 3,28 a $4,47 \times 10^{-10}$ g/msPa, com o aumento do teor de glicerol (30-45 %) a PVA dos filmes foi maior. O glicerol é uma molécula pequena e hidrofílica, que pode ser inserida entre as cadeias poliméricas, facilitando a migração das moléculas de vapor de água. Devido a isso a permeabilidade foi maior nestes filmes, em relação aos filmes produzidos neste estudo com 20 % de glicerol nas formulações.

(Tabela 2)

3.1.5. Propriedades mecânicas

Os resultados das propriedades mecânicas dos filmes de amido de mandioca com adição dos FOSs estão apresentados na Tabela 3. A resistência máxima á tração foi igual para todas as formulações não havendo diferenças significativas entre os filmes de acordo com teste de

Tukey ($p \leq 0,05$). Entretanto, a alongação na ruptura dos filmes com adição dos FOSs aumentou, e o filme com 5g FOSs/100 g sólidos (AM-FOSs5) apresentou o maior valor de alongação em relação aos outros, com 51,24 % de alongação, o resultado mais elevado, indicando o efeito plastificante dos FOSs, que também foi observado por Romano et al., 2014. Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Tang et al. (2015) utilizando FOSs nas formulações, observaram um decréscimo da resistência máxima à tração de filmes com matriz de amido, e aumento da alongação na ruptura dos mesmos.

(Tabela 3)

4. Conclusões

Foram observadas evidências da interação entre o amido e os FOSs e estas interações podem ter ocorrido entre as cadeias de amido e dos FOSs por ligações de hidrogênio, resultando no aumento da solubilidade (com o aumento da concentração dos FOSs), na alongação e na redução da PVA nos filmes preparados com este prebiótico, quando comparado aos filmes com amido de mandioca. É importante ressaltar que os poucos trabalhos publicados com a incorporação dos FOSs em filmes comestíveis relatam o emprego dos FOSs de origem comercial, na sua maioria extraídos de plantas, e que neste trabalho empregou FOSs produzidos por microrganismo em processo fermentativo.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (LMEM) e de Espectroscopia (ESPEC) da central multiusuária de laboratórios de pesquisa da Universidade Estadual de Londrina-UEL.

Referências

- ASTM.(1996). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-91. Annual Book of ASTM, Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM.(1996). Standard test methods for water vapor transmission of material, E96 95. Annual book of ASTM. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.

- Belibi, P. C., Daou, T. J., Ndjaka, J. M. B., Nsom, B., Michelin, L., & Durand, B. (2014). A Comparative study of some properties of cassava and three cassava starch films. *Physics Procedia*, 55, 220–226.
- Bourtoom, T. (2008). Review article edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15, 237–248.
- Calazans, G. M. T., Lima, R. C., França, F. P., & Lopes, C. A. (2000). Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27, 245–247.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 849–875.
- Garcia, N. L., Ribba, L., Dufresne, A., Aranguren, M. I., & Goyanes, S. (2009). Physico-mechanical properties of biodegradable starch nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, 294, 169–177.
- Gonçalves, B. C. M., Mantovan, J., Ribeiro, M. L. L., Borsato, D., Celligoi, M. A. P. C. (2013). Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 1, 1–8.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J.L. (1992). Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 57, 190–195.
- Gutiérrez, T. J., Tapia, M. S., Pérez, E., & Famá, L. (2015). Structural and mechanical properties of edible films made from native and modified cush-cush yam and cassava starch. *Food Hydrocolloids*, 45, 211–217.
- Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Edible and biodegradable starch films: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2058–2076.
- Kacuráková, M., & Wilson, R. H. (2001). Developments in mid-infrared FTIR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44, 291–303.
- Leone, R. D. S., Colman, T. A. D., Schnitzler, E., Ellendersen, L. N., & Masson, M. L. (2014). Evolved gas analysis (coupled TG–DSC–FTIR) applied to the thermal behaviour of inulin. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 108, 323–326.
- Luchese, C. L., Frick, J. M., Patzer, V. L., Spada, J. C., & Tessaro, I. C. (2015). Synthesis and characterization of biofilms using native and modified pinhão starch. *Food Hydrocolloids*, 45, 203–210.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., & Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50, 379–386.

- Matta Jr, M. D., Sarmiento, S. B. S., Sarantópoulos, C. I. G. L., & Zocchi, S. S. (2011). Barrier properties of films of pea starch associated with xanthan gum and glycerol. *Polymers*, 21, 67–72.
- Mussatto, S. I., & Mancilha, I. M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, 587–597.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M., & Rakshit, S. K. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*, 38, 267–272.
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: Are they functional foods. *American Journal of clinical Nutrition*, 71, 1682–1687.
- Romano, N., Santos, M., Mobili, P., Vega, R., & Gómez-zavaglia, A. (2016). Effect of sucrose concentration on the composition of enzymatically synthesized short-chain fructooligosaccharides as determined by FTIR and multivariate analysis. *Food Chemistry*, 202, 467–475.
- Romano, N., Tavera-Quiroz, M. J., Bertola, N., Mobili, P., Pinotti, A., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Edible methylcellulose-based films containing fructooligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 560–566.
- Rueda, D. R., Secall, T., & Bayer, R. K. (1999). Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 40, 49–56.
- Saavedra, N., & Algecira, N. A. (2010). Evaluación de películas comestibles de almidón de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. *Publicación científica em Ciencias Biomédicas*, 8, 171–182.
- Santos, M. I., Araujo-Andrade, C., Tymczyszyn, E. E., & Gómez-Zavaglia, A. (2014). Determination of amorphous/rubbery states in freeze-dried prebiotic sugars using a combined approach of near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Food Research International*, 64, 514–519.
- Scholz-Ahrens, K. E., Ade, P., Marten, B., Weber, P., Timm, W., Açil, Y., & Schrezenmeir, J. (2007). Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. *The Journal of Nutrition*, 137, 838–846.
- Silva, P. B., Garcia, S., Baldo, C., & Celligoi, M. A. P. C. (2016). Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science*, <http://doi.org/10.1556/066.2016.0004>.
- Silva, P.B., Borsato, D. & Celligoi, M. A. P. C. (2014a). Optimization of high production of fructooligosaccharides by sucrose fermentation of *Bacillus subtilis* natto CCT7712. *American Journal of Food Technology*, 9, 144-150.

- Silva, P. B., Borsato, D., & Celligoi M. A. P. C. (2014b). High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *African Journal of Biotechnology*, 13, 2734–2740.
- Sekkal, M., Dincq, V., Legrand, P., & Huvenne, J. P. (1995). Investigation of the glycosidic linkages in several oligosaccharides using FT-IR and FT Raman spectroscopies. *Journal of Molecular Structure*, 349, 349–352.
- Sipos, P., Szűcs, M., Szabó, A., Erős, I., & Szabó-Révész, P. (2008). An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonio methacrylate copolymer using thermal analysis and raman spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 288–294.
- Tang, Y., Xie, F., Zhang, D., Zhu, M., Liu, L., Liu, P., & Gu, C. (2015). Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. *Starch/ Stärke*, 67, 124–131.
- Tarantili, P. A., & Koumoulos, H. (2008). Sustained release of guaifenesin and ipriflavone from biodegradable coatings. *European Polymer Journal*, 44, 444–452.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360–374.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 107-11.
- Zhang, M., Du, W., & Bi, H. (2012). Physicochemical characterization of a low-molecular-weight fructooligosaccharide from chinese cangshan garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9462–9467.

Lista de Figuras e Tabelas

Tabela 1

Formulações utilizadas para o desenvolvimento dos filmes comestíveis a base de amido de mandioca com adição de fruto-oligossacarídeos.

Formulação	Amido (g)	FOSs (g)	Glicerol (g)	Água (g)
AM-PURO	12,00	-	2,40	385,6
AM-FOSs (1 %)	11,88	0,12	2,40	385,6
AM-FOSs (5 %)	11,40	0,60	2,40	385,6
AM-FOSs (10 %)	10,80	1,20	2,40	385,6

AM: amido de mandioca (yoki®); FOSs: fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto.

Fig. 1. Imagens da superfície dos filmes com aumento de 800x. Onde: (A) Amido, (B) AM-FOSs1%, (C) AM-FOSs5% e (D) AM-FOSs10%, todas as formulações com 20 % de glicerol.

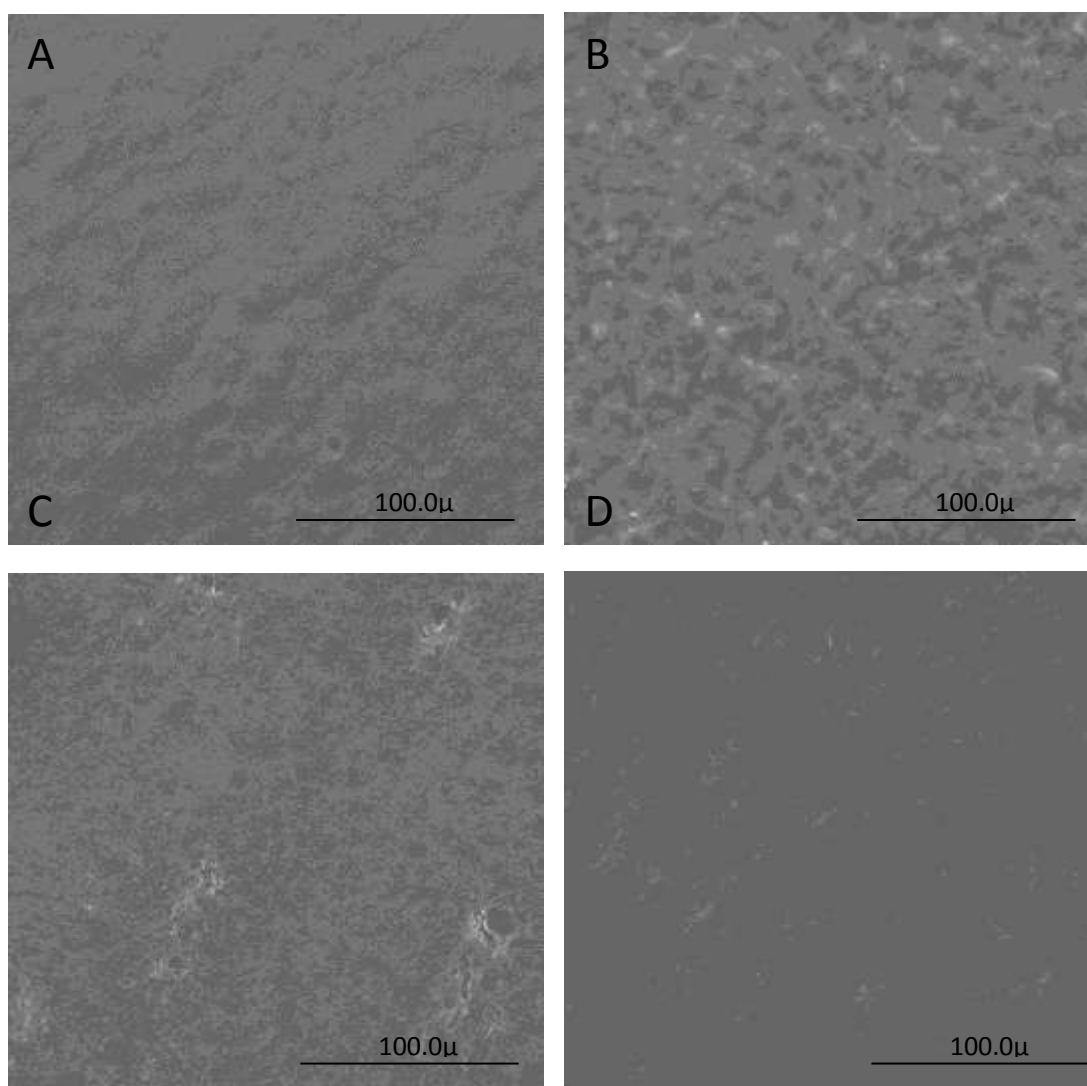


Fig. 2. Espectroscopia de infravermelho com transformada no Fourier (FTIR) de filmes comestíveis a base de amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos.

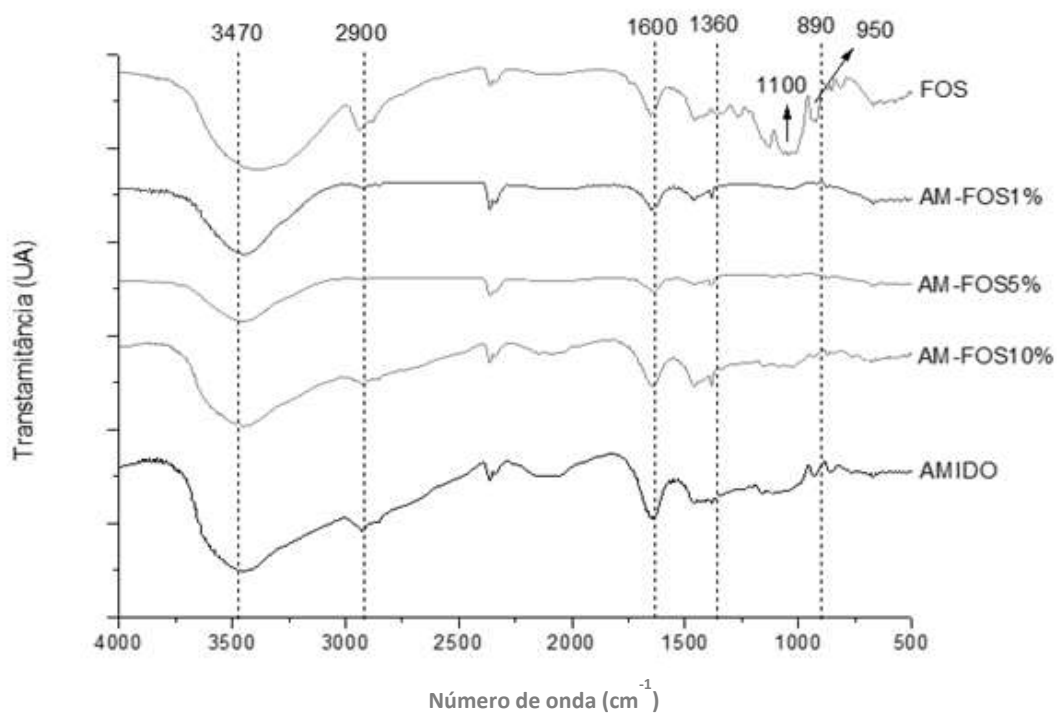


Fig. 3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC) em filmes com amido e fruto-oligossacarídeos.

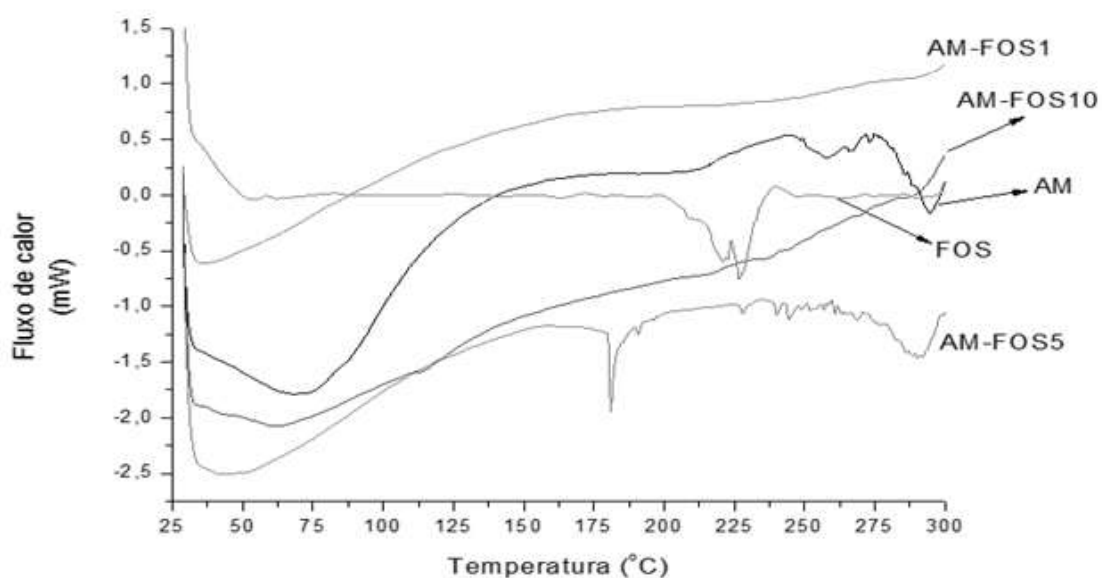


Tabela 2

Solubilidade em água e permeabilidade ao vapor de água de filmes com amido de mandioca e fruto-oligossacarídeos.

Amostras	Espessura (μm)	Solubilidade (%)	Permeabilidade ao vapor de água $\times 10^{11}$ (g/msPa)
AM	220 ± 16^a	$16,16 \pm 0,90^d$	$4,10 \pm 0,24^a$
AM-FOSs (1 %)	216 ± 31^a	$18,35 \pm 0,32^c$	$2,86 \pm 0,55^b$
AM-FOSs (5 %)	186 ± 27^a	$23,20 \pm 1,03^b$	$2,71 \pm 0,00^b$
AM-FOSs (10 %)	172 ± 21^a	$25,61 \pm 0,55^a$	$2,71 \pm 0,00^b$

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 3

Propriedades mecânicas dos filmes de amido de mandioca com adição dos FOSs nas formulações e 20% de glicerol como plastificante.

Amostras	Resistência Máxima à Tração (MPa)	Elongação na Ruptura (%)
AM	$13,30 \pm 3,94^a$	$13,69 \pm 3,94^c$
AM-FOSs 1 %	$11,52 \pm 3,96^a$	$23,13 \pm 5,80^b$
AM-FOSs 5 %	$10,98 \pm 0,69^a$	$51,24 \pm 13,01^a$
AM-FOSs 10 %	$10,74 \pm 1,79^a$	$26,60 \pm 6,37^b$

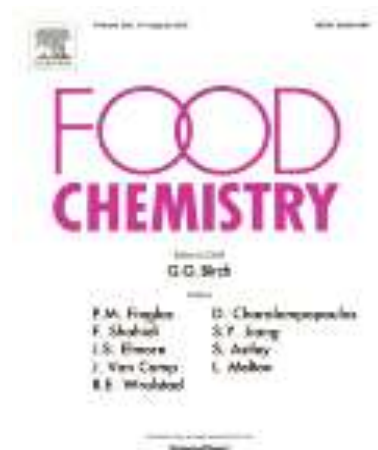
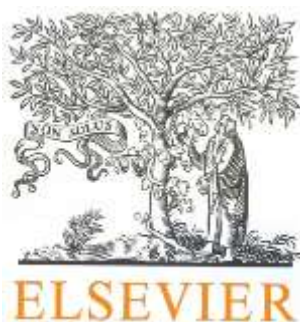
Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

CONCLUSÃO

- A melhor condição de produção de levanasacarase pelo *B. subtilis* natto foi 420,7 gL⁻¹ de sacarose e pH 7,0, atingindo atividade de 23,9 U/mL e produção de levana de 154,7 gL⁻¹, demonstrando que altas concentrações de sacarose favoreceram a produção da levanasacarase e levana.
- A levanasacarase permaneceu estável em temperaturas elevadas, apontando que a enzima produzida por *B. subtilis* natto é termoestável, característica relevante em processos industriais. A massa molecular da enzima foi de 56 kDa em gel SDS-PAGE.
- A maior síntese de FOS pela levanasacarase foi de 69,8 gL⁻¹ no volume de 2,5 mL em tubo de ensaio (com 350 gL⁻¹ de sacarose, 40 °C por 36 h). Nos volumes maiores de 250 mL em Erlenmeyer e 2,5 L em biorreator os FOSs atingiram 63,7 gL⁻¹ e 38,7 gL⁻¹ respectivamente
- A produção dos FOSs por *B. subtilis* natto em biorreator atingiu 37,6 gL⁻¹ (400 gL⁻¹ de sacarose, pH 7,7, aeração de 0,2 vvm, 44 h, 35 °C e 50 rpm).
- Os filmes produzidos apresentaram boa aparência, sem poros ou bolhas e fortes indícios de interação entre o amido e os FOSs. A adição dos FOSs levou ao aumento da solubilidade e da alongação, e ao decréscimo da permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos.

ANEXO C

Normas para submissão do artigo para o periódico Food Chemistry



Food Chemistry

Editor-in-Chief: G.G. Birch

ISSN: 0308-8146

Impact Factor: 3.391

INTRODUCTION

The manuscript fits the Aims and Scope of the journal (<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry>) Manuscript is in accordance with ARTICLE TYPE – GUIDELINES (<http://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors#14000>) The text is written in good English. Authors who feel their manuscript may require editing to conform to correct scientific English may wish to use an English Language Editing service such as the one available from Elsevier's Web Shop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>). Manuscript text is divided into numbered sections; line and page numbers are added and text is double spaced An ethical statement is required for experiments involving humans or animals Conflict of interest statement is included at the end of the manuscript The number of figures and tables combined does not exceed a total of 6; additional tables and figures can be submitted as supplementary material. All relevant references should be provided in the Reference list. Cover letter is prepared,

introducing your article and explaining the novelty of the research Highlights are prepared (a birds' eye view of your article in 3-5 points, 85 characters each).

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including no more than 6 tables - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.

PREPARATION

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body.

Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL

http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate

journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003).
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

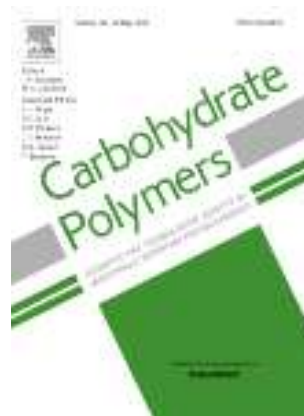
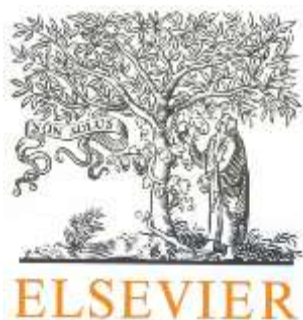
Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

ANEXO D

Normas para submissão do artigo para o periódico Carbohydrate Polymers



Carbohydrate Polymers

Editors-in-chief: J.F. Kennedy, M.A. Coimbra

ISSN: 0144-8617

Impact Factor: 4.074

INTRODUCTION

Carbohydrate Polymers covers the study and exploitation of polymers of monosaccharides which have current or potential application in areas such as bioenergy, bioplastics, biomaterials, nanotechnology, biorefining, drug delivery, food, chemistry, packaging, paper, pharmaceuticals, medicine, oil recovery, textiles and wood.

The role of the well-characterized carbohydrate polymer must be the major proportion of the work reported, not peripheral. At least one named carbohydrate polymer must be cited and be the main focus of the title of the paper, and of the paper itself. Research must be innovative and advance scientific knowledge.

Where a polysaccharide is obtained from a supplier, essential structural information which will affect its behavior in the subsequent work should be given. For example, molecular size/viscosity information, mannuronate/guluronate ratio for alginates, degree of esterification for pectin, degree of deacetylation for chitosan. Editors are unlikely to send papers for formal review with a statement such as "sodium alginate was purchased from xxx Inc." unless additional information is supplied. To be acceptable, the paper must include

some characterization of the polysaccharide (if not already known) in addition to the application studied. Purity and monosaccharide composition are essential; some molecular size and linkage information is highly desirable.

Topics include:

- structure and property relationships
- analytical methods
- chemical, enzymatic and physical modifications
- biosynthesis
- natural functions
- interactions with other materials

Examples of papers which are not appropriate for *Carbohydrate Polymers* include:

- papers which major in biological, physiological and pharmacological aspects of non-carbohydrate molecules attached to, or mixed with, carbohydrate polymers;
- papers on the materials science of biocomposites where there is no mention of any specific carbohydrate polymer, or the role of the carbohydrate polymer is not the major proportion of the study.
- papers majoring on polyalkanoates, polylactic acid or lignin.
- routine studies of extraction yields without characterisation of the extracted polysaccharide
- routine studies of complexation of a drug with a single cyclodextrin
- applications of new polysaccharides where the structure of the polysaccharide is unknown.
- papers on the production and isolation of enzymes which act on polysaccharides (studies on the mode of action of an enzyme on a polysaccharide are within the journal scope)
- papers where the degree of polymerization of the saccharide chain is less than four

ARTICLE STRUCTURE

(The abstract is not included in section numbering; see specific instructions below.)

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2,...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results. Do not anticipate your results, or provide a chronicle of the works done.

Material and methods (or experimental)

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section. The Conclusion should not be a summary, but should illustrate the advances and claims of innovative aspects of the research work done.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and

equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

ESSENTIAL TITLE PAGE INFORMATION

- **Title.** Concise, attractive and informative. The title must not normally exceed 120 characters excluding spaces. Because titles are often used in information-retrieval systems, avoid abbreviations and formulae where possible, avoid general terms when specific ones are available, avoid strings of names. Check for syntax and spelling. If your paper is a review paper, please include the word "review" somewhere in the title.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and **the e-mail address of each author**. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department. Institutional email addresses, rather than personal email addresses such as gmail, are strongly preferred for all authors who are affiliated to an institution; this is particularly important for the corresponding author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used

for such footnotes.

ABSTRACT

A concise and factual abstract is required, and should be a maximum of 150 words in length. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Numerical values for the most important findings should be reported. An abstract is often presented separately from the article in databases, so it must be able to stand alone. For this reason, vague terms and references should be avoided. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

HIGHLIGHTS

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

KEYWORDS

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

CHEMICAL COMPOUNDS

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem

Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article: Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865). More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

ABBREVIATIONS

Define abbreviations that are not standard in this field or approved by learned societies in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Abbreviations, except for very common terms (e.g. DNA, NMR), should not be used in the title of the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing Language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

UNITS

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

DATABASE LINKING

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

MATH FORMULAE

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

FOOTNOTES

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

ARTWORK

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black& white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Do not exceed a total of 8 figures in

your research paper. Carbohydrate Polymers requires authors to include tables and figures in the body of the article at the appropriate position, not at the end of the article.

REFERENCES

Citation in text

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication (Smith, 2003);
2. Two authors: both authors' names and the year of publication (Smith & Jones, 2004);
3. Three, four or five authors: all authors names and year of publication (Smith, Jones, & Brown, 2005). For all subsequent citations of this work use et al. (Smith et al., 2005).
4. Six or more authors: first author's name followed by et al. and the year of publication (Black et al., 2007).

Citations may be made directly or parenthetically. Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, b, 1999; Allan & Jones, 1995; Allen et al., 1994). Kramer et al. (2000) have recently shown..."

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51-59.

Reference to a book: Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281-304). New York: E-Publishing Inc.

VIDEO DATA

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AUDIOSLIDES

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

SUPPLEMENTARY DATA

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting

applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

SUBMISSION CHECKLIST

The following List will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail addresses for all authors
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.