



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

AGNES MAGRI

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Bacillus subtilis*
natto NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA**

AGNES MAGRI

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE FRUTO-
OLIGOSSACARÍDEOS OBTIDOS DE *Bacillus subtilis*
natto NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Daniele Sartori.

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M212p Magri, Agnes.

Produção e aplicação de fruto-oligossacarídeos obtidos de *Bacillus subtilis* natto na proliferação celular e resposta inflamatória / Agnes Magri. – Londrina, 2015.
124 f.: il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

Coorientador: Daniele Sartori.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia – Teses. 2. Inflamação – Aspectos imunológicos – Teses.
3. Frutooligossacarídeos – Teses. 4. *Bacillus subtilis* – Teses. 5. Células – Interação – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Sartori, Daniele. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

AGNES MAGRI

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS
OBTIDOS DE *Bacillus subtilis* natto NA PROLIFERAÇÃO CELULAR
E RESPOSTA INFLAMATÓRIA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Antonia Pedrine
Colabone Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Marcia Luciana Cazetta
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -
UFRB

Prof^a Dr Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 02 de abril de 2015.

*Dedico este trabalho à minha família,
Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me conduzido até aqui e me concedido uma família e colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

À orientadora Maria Antonia P. C. Celligoi, pela qual sou imensamente grata pela oportunidade de crescer cientificamente dentro do grupo, além da confiança e orientação durante todos esses anos, mas sobretudo pelos ensinamentos e pela amizade.

À co-orientadora Daniele Sartori, pelo direcionamento, sugestões e colaboração durante a realização do trabalho.

Ao professor Mário Sérgio Mantovani, por ter cedido o laboratório, material e uma equipe qualificada que me acompanhou em todos os experimentos, tornando possível a realização do trabalho, além da disposição em me ajudar e por todas as contribuições.

Aos professores Cristiane Baldo Rocha, Marcelo Rodrigues de Melo, Cesar Augusto Tischer, pelas colaborações e sugestões para melhoria do trabalho.

À Marcia Luciana Cazetta, pelas correções e contribuições.

À Nicole Caldas Pan e Tamires Minucelli, pelo apoio, companheirismo e incentivo durante todos os momentos dessa etapa que vivemos juntas.

Ao Marcos Roberto de Oliveira, pelas sugestões, conselhos e ajuda incondicional.

Aos colegas do programa de Biotecnologia, Glauber, Jaqueline, Melissa e Dieyssi, pelos conselhos, ajuda e convivência, tornando esse período mais fácil.

À equipe do Laboratório de Genética Toxicológica da UEL, Thalita, Bruna, Gláucia, Andressa, Lilian, Ingrid, Simone, Adrivânio, Marcelo e Eliane, que me acolheram e me ajudaram durante toda a realização do trabalho, sempre muito atenciosos.

Às estagiárias Isadora e Jéssica, por me acompanharem e ajudarem nas análises.

Ao Nelson Janeiro, pela disponibilidade e disposição em ajudar sempre.

Aos demais técnicos Yasmin, Cristina, João e aos funcionários do departamento, Sandra, Edivaldo e Elda, pela atenção.

A todos os professores do Programa, que contribuíram com minha formação.

Aos meus pais, Clóvis e Lígia, pelo carinho, incentivo e por acreditarem em mim, e aos meus irmãos Renan e Victória, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus amigos, que sempre me ajudaram e apoiaram.

Aos laboratórios de pesquisa multiusuários da UEL, ESPEC, LAMM e LAPA pelo fornecimento dos equipamentos utilizados.

À CAPES, pelo fornecimento da bolsa e financiamento do projeto.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho”.

Dalai Lama

MAGRI, Agnes. **Produção e Aplicação de Fruto-oligossacarídeo obtido de *Bacillus subtilis* natto na Proliferação Celular e Resposta Inflamatória.** 2015. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros lineares de frutose com baixo grau de polimerização, formados por ligações do tipo β (2 \rightarrow 1) e sintetizados pela enzima levanasacarase. O *Bacillus subtilis* natto é uma cepa com grande potencial produtor em meio rico em sacarose. Os FOS possuem várias propriedades fisiológicas, destacando-se como imunomoduladores. O presente trabalho teve por objetivo produzir, caracterizar e aplicar FOS de *Bacillus subtilis* natto quanto aos seus efeitos *in vitro* sobre a proliferação celular e resposta inflamatória em células humanas de carcinoma ovariano (OVCAR-3) e carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A). A melhor produção de FOS foi de 173,60 g/L em biorreator de 4,5 L, com 400 g de sacarose, aeração de 0,2 vvm e sem controle de pH. Os FOS foram isolados e caracterizados por RMN, FT-IR e ESI-MS como oligômeros de grau de polimerização variando de 3 a 7, predominando a nistose. A interação dos FOS com células OVCAR-3 foi testada nas concentrações de 5 a 100mg/mL e promoveu redução da viabilidade em 75 e 100 mg_{FOS}/mL) e proliferação celular em 50-100 mg_{FOS}/mL. A avaliação da resposta inflamatória, utilizando o IC₅₀ (21mg/mL), mostrou redução da proliferação e aumento da resposta proinflamatória pela indução da expressão dos transcritos IL-8 (46,7 vezes), TNF- α (12,4 vezes) e repressão de ER- β (1,58 vezes). Pelo perfil metabólico diferencial, ocorreu aumento de creatina enquanto lactato, glicina e alanina diminuíram. Esses dados estão associados à redução da proliferação. Nas culturas de células HepG2/C3A os FOS não foram citotóxicos e não apresentaram alterações na proliferação celular. Ocorreu indução da expressão dos transcritos IL-8 (5,9 e 101,2 vezes) e TNF- α (1,81 e 30,5 vezes) quando as células foram expostas a 5 e 25 mg/mL de FOS, respectivamente. Pelo perfil metabólico diferencial, verificou-se redução de fosfocolina, acetato, lactato, alanina, succinato e creatina, enquanto a glicina aumentou. Estes resultados demonstram queda da homeostase celular, levando a alterações do metabolismo energético destas células. Os resultados apontam o FOS como potencial candidato para métodos terapêuticos, no entanto sua ação é dependente do tipo celular alvo.

Palavras-chave: Fruto-oligossacarídeo. *Bacillus subtilis* natto. Biorreator. Resposta inflamatória. OVCAR-3. HepG2/C3A.

MAGRI, Agnes. **Production and Application of Fructooligosaccharides from *Bacillus subtilis* natto in cell proliferation and inflammatory response.** 2015. 124 p. Dissertation (Master's in Biotechnology) – State University of Londrina, 2015.

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are linear fructose oligomers linked by β (2 \rightarrow 1) glycosidic bonds with a low degree of polymerization and synthesized by levansucrase. *Bacillus subtilis* natto is a strain with high production potential in sucrose-rich medium. FOS show many physiological effects such as immunomodulation. The present work aimed to produce, characterize and apply FOS from *Bacillus subtilis* natto to demonstrate its effects *in vitro* on cell proliferation and inflammatory response in human ovarian carcinoma (OVCAR-3) and hepatocellular carcinoma (HepG2/C3A) cell lines. The best production of FOS was 173.60g/L using a 4.5L-bioreactor, with 400g of sucrose, aeration at 0.2 vvm and no pH control. FOS were isolated and characterized by RMN, FT-IR, ESI-MS as oligomers with polymerization degrees from 3 to 7 with predomination of nystose. The interaction between FOS and OVCAR-3 cells was tested under different concentrations of FOS ranging from 5 to 100mg/mL. Reduction of cell viability and proliferation were observed at 75 and 100 mg_{FOS}/mL and 50-100 mg_{FOS}/mL, respectively. The inflammatory response was evaluated using IC₅₀ (21mg/mL). FOS treatment reduced cell proliferation and increased proinflammatory response by inducing the transcripts expression of IL-8 (46.7 fold change), TNF- α (12.4 fold change) and repression of ER- β (1.58 fold change). The differential metabolic profile showed increased levels of creatine and decreased levels of lactate, glycine and alanine were associated with decreased cell proliferation. In HepG2/C3A cell cultures, FOS were not shown to be cytotoxic and no changes in cell proliferation were detected. Transcripts induction of IL-8 (5.9 and 101.2 fold change) and TNF- α (1.81 and 30.5 fold change) were observed when cells were treated with 5 and 25 mg_{FOS}/mL, respectively. The differential metabolic profile showed reduction of phosphocoline, acetate, lactate, alanine, succinate and creatin, while glycine increased. These results are associated with loss of cellular homeostasis leading to changes in the energy metabolism of these cells. The results indicate that FOS as a potential therapeutic method and show their effects are cell line-dependent.

keywords: Fructooligosaccharides. *Bacillus subtilis* natto. Bioreactor. Inflammatory response. OVCAR-3. HepG2/C3A.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Porcentagem de FOS em alimentos que possuem frutanas como carboidrato de reserva	19
Tabela 2 -	Micro-organismos produtores de FOS	28
Tabela 3 -	Produção de FOS variando o micro-organismo e o processo de obtenção	31
Tabela 4 -	Meio de preservação.....	41
Tabela 5 -	Meio de inóculo	41
Tabela 6 -	Meio de fermentação	42
Tabela 7 -	Parâmetros avaliados na fermentação de <i>B. subtilis natto</i> para produção de FOS.....	43
Tabela 8 -	Sequência de primers utilizados na reação de RT-qPCR em tempo real	47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diferenças estruturais entre frutanas de alto grau de polimerização de ocorrência vegetal e microbiana	20
Figura 2 -	Estruturas das moléculas de FOS mais comuns: 1-cestose, 1-nistose e 1F-frutofuranosilnistose	21
Figura 3 -	Variações presentes nas moléculas de FOS devido às diferentes ligações efetuadas pelas enzimas de síntese, de acordo com sua fonte e atividade	22
Figura 4 -	Reação de síntese de FOS por levanasacarase de <i>B. subtilis</i> a partir da sacarose mostrando a formação dos principais FOS produzidos por esse micro-organismo.....	26
Figura 5 -	Fotomicrografia das linhagens celulares humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) e carcinoma ovariano (OVCAR-3).....	41
Figura 6 -	Porcentagem de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A obtida conforme avaliação de citotoxicidade após 24 horas de tratamento com FOS.....	83
Figura 7 -	Cinética de proliferação celular em tempo real da linhagem HepG2/C3A após tratamentos com FOS durante 72h.....	84
Figura 8 -	Expressão relativa dos genes IL-8 e TNF- α após 24 h de tratamento com FOS nas concentrações de 5 e 25 mg/mL em células HepG2-C3A	85
Figura 9 -	Perfil metabólico diferencial de células HepG2/C3A expostas aos FOS de <i>Bacillus subtilis</i> natto em comparação ao controle.	86
Figura 10 -	Produção de FOS por <i>Bacillus subtilis</i> natto por conversão da sacarose e acompanhamento dos açúcares (EPSt, glicose e frutose) e biomassa	88
Figura 11 -	Produção de FOS por <i>Bacillus subtilis</i> natto por conversão da sacarose e acompanhamento dos açúcares (EPSt, glicose e frutose), biomassa e levanasacarase	89
Figura 12 -	Microscopia de linhagem celular HepG2/C3A exposta aos tratamentos de FOS por 24 horas.....	91

Figura 13 -	Microscopia de linhagem celular OVCAR-3 exposta aos tratamentos de FOS por 24 horas.....	91
Figura 14 -	Curva padrão para determinação de cestose por CLAE.....	92
Figura 15 -	Curva padrão para determinação de nistose por CLAE.....	92
Figura 16 -	Curva padrão para determinação de sacarose por CLAE.....	92
Figura 17 -	Curva padrão para determinação de glicose por CLAE	93
Figura 18 -	Curva padrão para determinação de frutose por CLAE	94
Figura 19 -	Cromatograma do padrão de cestose na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$	94
Figura 20 -	Cromatograma do padrão de nistose na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$	95

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer 135°
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DXR	Doxorrubicina
EPS _t	Exopolissacarídeos Totais
ERβ	Receptor de Estrógeno Beta
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
Fru _f	Frutofuranose
g	Força g ou Força Centrífuga Relativa
Glc _p	Glucopiranose
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HepG2-C3A	Linhagem de carcinoma hepatocelular humano
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IC	Índice Celular
IC ₅₀	Concentração na qual a droga alcança 50% da inibição máxima
IL-8	Interleucina 8
IUB-IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LPS	Lipopolissacarídeo
MS	Mass spectroscopy
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OVCAR-3	Linhagem celular de carcinoma ovariano humano
PBS	Tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline)
PID	Proportional-Integral-Derivative Controller
ppm	Parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotações por minuto

RTCA	Real Time Cell Analyzer
RT-qPCR	Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
vvm	Volume de gás por unidade de volume de líquido por minuto

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	GERAL.....	18
2.2	ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS).....	19
3.2	ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE FOS.....	23
3.3	PRODUÇÃO DE FOS	27
3.3.1	Micro-Organismos Produtores	27
3.3.1.1	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus subtilis</i> natto.....	28
3.3.2	Métodos de Obtenção de FOS	29
3.3.3	Produção de FOS e Exopolissacarídeos Via Processos Fermentativos	31
3.4	INTERAÇÕES DE OLIGOSSACARÍDEOS COM CÉLULAS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	MATERIAL	40
4.1.1	Micro-Organismo	40
4.1.2	Linhagens Celulares	40
4.1.3	Meios de Cultura.....	41
4.1.3.1	Meio de preservação para <i>Bacillus subtilis</i> natto	41
4.1.3.2	Meio de inóculo para <i>Bacillus subtilis</i> natto.....	41
4.1.3.3	Meio de fermentação para <i>Bacillus subtilis</i> natto	42
4.2	MÉTODOS	42
4.2.1	Preservação do Micro-Organismo	42
4.2.2	Preparo do Inóculo.....	42
4.2.3	Avaliação de Parâmetros para Produção de FOS	43
4.2.4	Separação e Purificação de FOS.....	44
4.2.4	Colorações de Cultura de Células <i>in vitro</i>	44

4.2.5	Avaliação dos Efeitos Citotóxicos dos FOS	45
4.2.6	Análise de Proliferação Celular em Tempo Real (RTCA)	45
4.2.7	PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	46
4.2.8	Perfil Metabólico	48
4.2.8.1	Extração dos metabólitos.....	48
4.2.8.2	Espectroscopia de ¹ H-NMR	49
4.2.9	Determinações Analíticas	49
4.2.9.1	Determinação de FOS e açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	49
4.2.9.2	Curva de biomassa de <i>Bacillus subtilis</i> natto	49
4.2.9.3	Quantificação da biomassa.....	50
4.2.9.4	Quantificação de exopolissacarídeos totais (EPS _t).....	50
4.2.9.5	Atividade da levanasacarase	50
4.2.9.6	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹ H e ¹³ C (RMN)	51
4.2.9.7	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	51
4.2.9.8	Espectroscopia de massas (MS)	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	ARTIGO - PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FRUTO- OLIGOSSACARÍDEOS DE <i>BACILLUS SUBTILIS</i> NATTO: PROPRIEDADES ANTIPROLIFERATIVA E PRÓ-INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS DE CARCINOMA OVARIANO	52
5.2	RESULTADOS COMPLEMENTARES	83
5.2.1	Avaliação das Interações do FOS com Células de Carcinoma Hepatocelular Humano (HepG2/C3A)	83
5.2.2	Avaliação dos Parâmetros para Produção de FOS em Biorreator	87
5.2.2.1	Efeito da agitação	87
5.2.2.2	Efeito do tamanho do inóculo.....	88
5.2.3	Microscopia das Linhagens Celulares.....	90
5.2.4	Curvas Padrões para Determinação de Açúcares por CLAE.....	92
5.2.5	Cromatogramas dos Padrões de FOS	94

6	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXO	111
ANEXO A -	Normas do Periódico Carbohydrate Polymers	112

1 INTRODUÇÃO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são polímeros lineares de frutose de ocorrência natural, com graus de polimerização entre 3 e 10 unidades de monossacarídeos. São produzidos pela reação de transfrutossilacção da sacarose, através da clivagem da ligação glicosídica β (2 \rightarrow 1) e a transferência do resíduo frutossil para um aceptor que pode ser a água, sacarose ou um fruto-oligossacarídeo. Dentre as enzimas utilizadas para síntese de FOS, a mais comum é a levanasacarase (EC 2.4.1.10).

Os principais FOS utilizados industrialmente são a 1-cestose, nistose e 1^F-frutofuranosilnistose e esses podem ser obtidos por processos fermentativos, que otimizando as condições de fermentação em larga escala, com o uso de biorreatores, podem reduzir os custos de aplicação desse produto no mercado. Para isso se faz necessários estudos das condições, como agitação e aeração para viabilizar a ampliação de escala.

Dentre os micro-organismos produtores destaca-se o *Bacillus subtilis* natto, que tem se demonstrado um bom produtor de FOS em processos fermentativos.

Esses oligômeros apresentam ampla variedade de propriedades fisiológicas, destacando-se como alimentos funcionais, por serem uma fibra alimentar não digerível e prebióticos, e proporcionarem aumento da absorção mineral, propriedades anticancerígenas, antidiabéticas, hipolepidêmicas e ação sobre o sistema imune com propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias. No entanto, pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação sob células.

Os oligossacarídeos são descritos *in vitro*, como moléculas sinalizadoras de processos relacionados à inflamação. A avaliação da resposta inflamatória celular tem demonstrado que a alteração da produção de citocinas é dependente da estrutura dos oligossacarídeos e das linhagens celulares utilizadas.

Considerando as diversas aplicações do FOS e o grande potencial do *Bacillus subtilis* natto, esse trabalho teve por objetivo estudar a os parâmetros fermentativos da produção do FOS em biorreator e verificar sua interação celular quanto à proliferação e resposta inflamatória em culturas de células humanas de carcinoma ovariano (OVCAR-3) e carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve por objetivo produzir fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto e verificar seus efeitos sobre a proliferação celular e resposta inflamatória em linhagens celulares humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) e carcinoma ovariano (OVCAR-3).

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir fruto-oligossacarídeos (FOS) por *Bacillus subtilis* natto em fermentação batelada, sob diferentes condições de pH e aeração;
- Quantificar e purificar os FOS da melhor condição obtida e caracterizar quanto à composição e grau de polimerização;
- Avaliar o possível efeito citotóxico dos FOS, em linhagens celulares humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) e carcinoma ovariano (OVCAR-3);
- Verificar a cinética da proliferação de células HepG2/C3A e OVCAR-3 expostas aos FOS;
- Avaliar a propriedade dos FOS sobre a proliferação celular e resposta inflamatória em células HepG2/C3A e OVCAR-3, com análise da expressão dos genes interleucina 8 (*IL8*), fator de necrose tumoral α (*TNF- α*) e receptor de estrógeno β (*ER β*);
- Verificar expressão diferencial de metabólitos intracelulares produzidos em culturas HepG2/C3A e OVCAR-3 antes e após tratamento com os FOS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Oligossacarídeos são carboidratos de ocorrência natural com baixo grau de polimerização (GP) variando entre 3 e 10 unidades de monossacarídeos (IUB-IUPAC). Destacam-se entre eles, os compostos por unidades de frutose, fruto-oligossacarídeos (FOS), principalmente os produzidos através da fermentação da sacarose. Estes tem atraído a atenção devido às suas propriedades fisiológicas, facilidade de produção em larga escala e seu sabor doce, muito similar ao da sacarose (YUN, 1996). Esses fatores conferem aos FOS inúmeras aplicações em diversas áreas industriais. Muitos termos como glicofrutosanas, oligofrutosídeos, oligofrutoses e oligossacarídeos tipo inulina (YUN, 1996; COUSSEMENT, 1999; DELZENNE; NEYRINCK; CANI, 2013) tem sido usados para se referir aos FOS.

Durante o processo de polimerização da frutose em plantas e micro-organismos, são produzidas cadeias de tamanhos variáveis, indo desde os FOS (oligossacarídeos de baixo GP) até as levanas e inulinas (polímeros com alto GP) (VIIKARI; GISLER, 1986; CALAZANS et al., 1997). Todos estes recebem o nome de frutanas, por serem constituídos predominantemente de frutose.

Em vegetais, as frutanas agem como carboidrato de reserva e proteção contra o déficit de água (HENDRY, WALLACE, 1993; VIJN; SMEEKENS, 1999) e são encontradas em diversos alimentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de FOS em alimentos que possuem frutanas como carboidrato de reserva

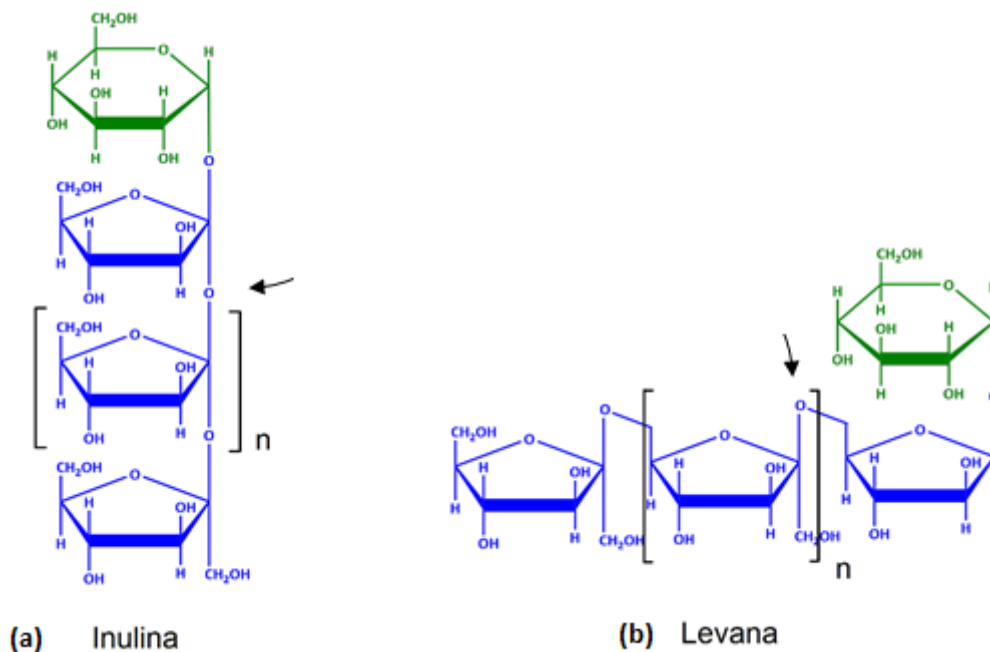
Alimentos	FOS (%)
Banana	0,30
Cevada	0,15
Alho	0,60
Mel	0,75
Cebola	0,23
Centeio	0,50
Açúcar mascavo	0,30
Tomate	0,15

Fonte: Sangeetha (2003) adaptado.

Em micro-organismos, as frutanas podem estar envolvidas em vários processos fisiológicos, como a sobrevivência de bactérias no solo, fitopatogenicidade e simbiose (COTE; AHLGREN, 1993). Também funcionam como reserva de carboidratos, além de eliminar a frutose livre, que em grandes concentrações implica no retardo do crescimento microbiano e aumento da pressão osmótica do meio (YUN, 1996).

As frutanas são formadas por resíduos β -D-frutofuranosil ligados a um resíduo terminal D-glicosil (MARTÍNEZ-FLEITES et al., 2005). De acordo com a fonte e as condições de obtenção, existem diferenças estruturais entre elas (VIJN; SMEEKENS, 1999; BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; JALAN et al., 2013). Assim, a inulina caracteriza-se por ligações glicosídicas β (2 \rightarrow 1), e possui uma molécula de glicose na porção inicial da cadeia (POOL-ZOBEL et al., 2002) (Figura 1a), a mesma ligação presente nos FOS (JUNG et al., 1989). Já as levanas são caracterizadas por ligações do tipo β (2 \rightarrow 6), podendo conter ramificações do tipo β (2 \rightarrow 1) (POOL-ZOBEL et al., 2002) (Figura 1b).

Figura 1 - Diferenças estruturais entre frutanas de alto grau de polimerização de ocorrência vegetal e microbiana

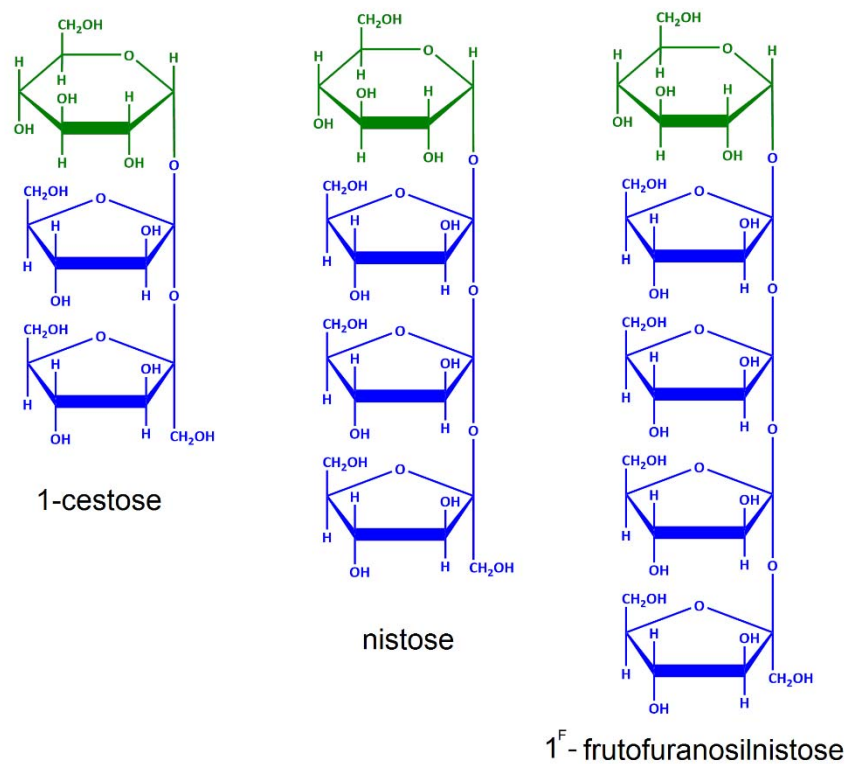


(a): Inulina caracterizada por ligações glicosídicas do tipo β (2 \rightarrow 1), indicada pela seta. **(b):** Levana caracterizada por ligações glicosídicas do tipo β (2 \rightarrow 6), indicada pela seta, podendo conter ramificações β (2 \rightarrow 1).

Fonte: o próprio autor

A estrutura dos FOS podem conter 3 diferentes tipos de ligações, 1^F , 6^F ou 6^G , de acordo com a fonte e atividade da enzima empregada (YUN, 1996; SANGEETHA, RAMESH, PRAPULLA, 2005c). O primeiro tipo possui unidades frutose unidas por ligações do tipo β ($2 \rightarrow 1$) e são os mais comuns e utilizados, sendo eles a 1-cestose (GF_2), a 1-nistose (GF_3) e a 1^F -frutofuranosilnistose (GF_4) (VEGA-PAULINO; ZÚNIGA-HANSEN, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Estruturas das moléculas de FOS mais comuns: 1-cestose, 1-nistose e 1^F -frutofuranosilnistose



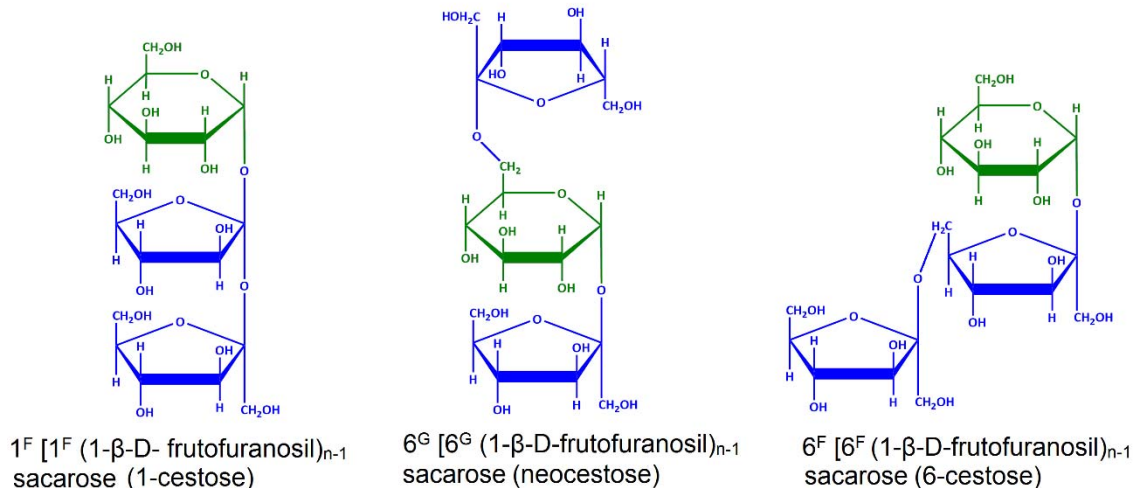
As estruturas em verde representam as moléculas de glicose ligadas aos resíduos frutose por ligações glicosídicas do tipo α ($2 \rightarrow 1$); e as estruturas em azul, os resíduos frutose unidas por ligações glicosídicas do tipo β ($2 \rightarrow 1$).

Fonte: o próprio autor

Os FOS do tipo 6^F possuem ligações do tipo β ($2 \rightarrow 6$) entre as unidades de frutose, conhecidos como 6-cestose (GF_2), 6-nistose (GF_3) e 6-frutofuranosilnistose (GF_4) (STRAATHOF; KIEBOOM; BEKKUM, 1986; YUN; SONG, 1999). Por fim, os 6^G , chamados neofruooligossacarídeos (NeoFOS), possuem ligações do tipo β ($2 \rightarrow 6$) entre as unidades de frutose e glicose, sendo a neocestose

(GF2), neonistose (GF3) e neofrutofuranosilnistose (GF4). Alguns exemplos das diferentes estruturas dos FOS estão apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Variações presentes nas moléculas de FOS devido às diferentes ligações efetuadas pelas enzimas de síntese, de acordo com sua fonte e atividade.



As estruturas em verde descrevem as moléculas de glicose; e em azul, os resíduos frutoseil.

Fonte: o próprio autor

As diferentes ligações presentes na molécula de FOS proporcionam o acesso da enzima responsável pela polimerização, vindo a formar polímeros de frutose (levana e inulinas) ou FOS de cadeia longa. Um exemplo é a 6-cestose, que devido às ligações β (2→6) entre as unidades de frutose, é polimerizada para formar a levana pela ação da levanasacarase (E.C. 2.4.1.10), uma enzima de origem bacteriana (MARTÍNEZ-FLEITES et al., 2005).

Os FOS apresentam ampla variedade de propriedades fisiológicas, destacando-se como alimentos funcionais, sendo considerados fibras alimentares, uma vez que não são digeríveis; e prebióticos, por estimularem o crescimento de bactérias benéficas da flora intestinal (SZWENGIEL et al., 2004; JALAN et al., 2013).

Além disso, são caracterizados pela metade da doçura da sacarose (VIJN; SMEEKENS, 1999; JALAN et al., 2013), se tornando adequados para uso em doces, alimentos de baixa caloria e para o consumo por pessoas com diabetes. Também são usados como açúcares substitutos em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas por apresentar baixa cariogenicidade, uma vez que este açúcar não é consumido pela microbiota bucal (OKU, 1994; CRITTENDEN; PLAYNE, 1996). Podem ser incorporados na formulação de alimentos, contribuindo para prolongar a

vida de prateleira e o perfil do sabor de vários produtos alimentícios como barras nutritivas, bem como conferir efeitos benéficos à saúde (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005c).

Por possuir uma série de propriedades fisiológicas reconhecidas mundialmente, no Brasil, segundo a Lista de Alegações de Propriedades Funcionais Aprovadas (2008), os fruto-oligossacarídeos (FOS) foram liberados perante a alegação de que contribuem para o equilíbrio da flora intestinal, e seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. Esta alegação pode ser utilizada desde que a porção do produto pronto para consumo forneça no mínimo 3 g de FOS se o alimento for sólido ou 1,5 g se o alimento for líquido. O uso do ingrediente não deve ultrapassar 30 g na recomendação diária do produto pronto para consumo, e deve conter indicação pelo fabricante. O consumo deste produto deve preferencialmente ser acompanhado da ingestão de líquidos (ANVISA, 2008).

Dentro da faixa de ingestão diária recomendada pela ANVISA (3 a 30 mg/mL), a quantidade ideal de FOS que deve ser ingerida para proporcionar seus efeitos benéficos ao organismo é relatada como sendo 5 mg/mL (NINESS, 1999; SHAH, 2000; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004). No entanto, valores maiores de oligossacarídeos são empregados em alguns estudos (ZENHOM et al., 2011; XIAO et al., 2011).

3.2 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE FOS

As enzimas responsáveis pelas reações de síntese do FOS são classificadas como hidrolases (glicosidases: EC 3.2) ou transferases (glicosil-transferases: EC 2.4.), e realizam a transferência de resíduos frutossil para uma molécula aceptora (MONSAN; PAUL, 1995). Em plantas e alguns micro-organismos, uma série de enzimas agem em conjunto, enquanto que na maioria dos micro-organismos ocorre a ação de uma única enzima (YUN, 1996).

A diferença entre as duas classes de enzimas está nas reações de transferência, que nas hidrolases só ocorre na presença de concentrações de substrato muito altas, através da reação de reversão da hidrólise (condensação); e nas transferases independe desse fator (MONSAN; PAUL, 1995; YUN, 1996; HERNALSTEENS, 2006; MURATA; USUI, 2006; SILVA, 2014).

Além disso, a regioseletividade das hidrolases é rara e sua produção muito baixa, sendo utilizadas industrialmente por serem de menor custo (MURATA; USUI, 2006). As transferases mesmo em soluções diluídas são capazes de catalisar reações de transferência, obtendo a energia necessária da quebra da ligação glicosídica e armazenando-a na forma de um intermediário, enzima-substrato covalente, o que torna sua utilização vantajosa quando comparada às hidrolases (MONSAN, PAUL, 1995).

Assim, as transferases, mais especificamente as frutossiltransferases (FTases), são a classe de enzimas mais utilizadas para síntese de FOS e glicoconjugados (MURATA; USUI, 2006), sendo utilizadas para obtenção os gêneros *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., entre outros (BRENDA, 2015).

As transferases podem catalisar duas reações distintas dependendo do acceptor que utilizam, resultando em: (I) reação de transfrutossililação quando o acceptor é uma cadeia de frutanas (polimerização) ou mono e oligossacarídeos (síntese de oligossacarídeos) e (II) reação de hidrólise, quando a água é usada como acceptor do resíduo frutossil (OZIMEK et al., 2006).

Dentre as FTases bacterianas as mais conhecidas são a inulosacarases (EC.2.4.1.9) que produzem frutanas com ligações β (2 \rightarrow 1) do tipo inulina e a levanasacarase (EC 2.4.1.10), que produz frutanas tendo os resíduos frutossil ligados por ligações do tipo β (2 \rightarrow 6) e ramificações β (2 \rightarrow 1) (levanas). Além da formação desse polímero, a levanasacarase catalisa a formação de FOS, com ligações do tipo β (2 \rightarrow 1) (ABDEL-FATTAH; MAHMOUD; ESAWY, 2005), sendo estas as mais estudadas na obtenção desse oligômero (OZIMEK et al., 2006).

A levanasacarase (EC 2.4.1.10) é portanto, uma frutossiltransferase que sintetiza o FOS catalisando a transferência de resíduos de frutossil da sacarose (clivagem da ligação glicosídica β (2 \rightarrow 1)), a uma variedade de aceptores, incluindo a água (hidrólise da sacarose), glicose (reação de troca), sacarose, mono e oligossacarídeos (síntese FOS) e levanas (reação de polimerização) (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974; VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014).

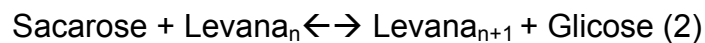
A enzima pode atuar sob a sacarose através do O¹ para formar 1-cestose que é a base das ligações β (2 \rightarrow 1) dos FOS, ou através de O⁶ para formar a ligação β (2 \rightarrow 6) da 6-cestose (MARTÍNEZ-FLEITES et al., 2005), base para formação da levana. O sistema de ação da levanasacarase não é um sistema

comum de dois substratos. Nestas reações, a levana e os FOS são simultaneamente substrato e produto nos dois sentidos (mecanismo ping-pong), que envolve a participação de um intermediário, frutossil-enzima (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974; VEGA-PAULINO; ZUNIGA-HANSEN, 2014).

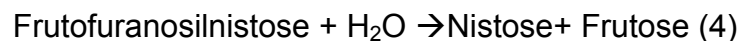
A glicose obtida na hidrólise da sacarose é prioritariamente consumida como fonte de carbono e energia pelo micro-organismo, sendo a frutose polimerizada. A levanasacarase de *B. subtilis* catalisa principalmente a seguinte reação (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974):



Na presença de levanas e FOS, a reação (1) é reversível, como demonstrada a seguir:

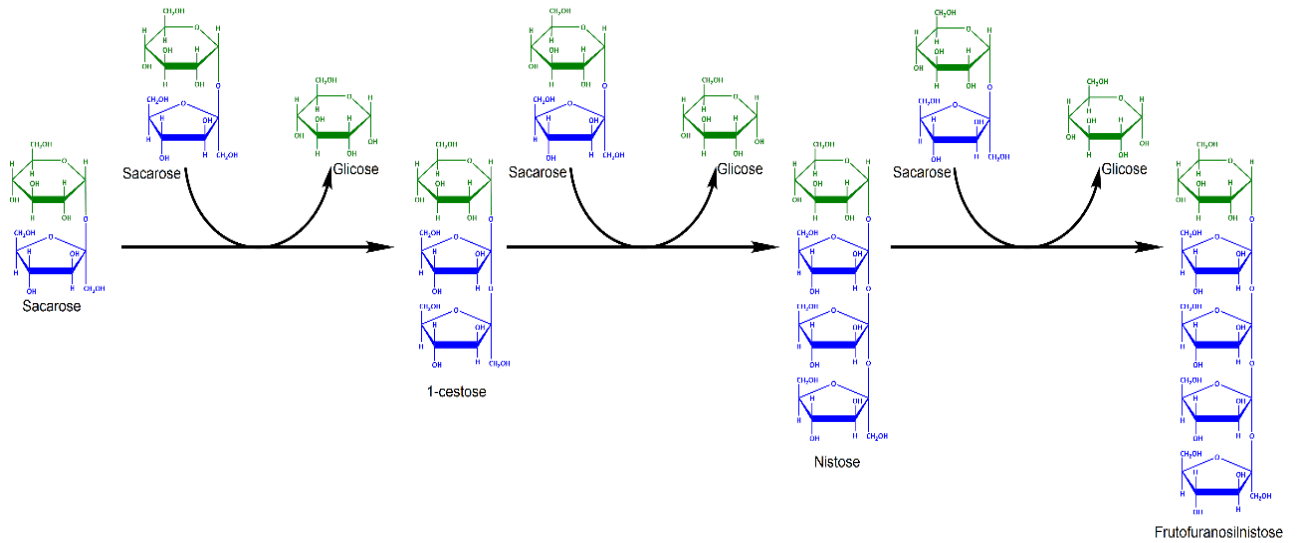


A levanasacarase também apresenta atividade hidrolítica para pequenas levanas e FOS como mostram as equações 3, 4, 5 e 6 (VEGA; ZÚNIGA-HANSEN, 2014):



Sob condições experimentais, a levanasacarase não distingue entre levanas de graus de polimerização diferente como n e $n+1$ (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974). A Figura 4 traz a reação de formação dos principais FOS.

Figura 4 - Reação de síntese de FOS por levanasacarase de *B. subtilis* a partir da sacarose mostrando a formação dos principais FOS produzidos por esse micro-organismo



As estruturas em verde descrevem as moléculas de glicose; e em azul, os resíduos frutossil.

Fonte: o próprio autor

Levanas de baixo peso molecular aceleram a taxa de transfrutossilacção a partir da sacarose e aumentam a proporção de levanas de alto peso molecular formando frutose livre. Para isso, a produção de FOS ou levanas depende inicialmente da concentração de sacarose, uma vez que, em baixas concentrações (abaixo de 12 mM), a produção de levanas é próxima a 0. Isso significa que a levanasacarase só apresenta atividade hidrolítica sob certas essas condições (CHAMBERT; TREBOUL; DEDONDER, 1974).

Primeiramente, foi demonstrado não haver inibição da atividade enzimática pela hidrólise da nistose ou pela glicose (nesse caso, quando o substrato fosse cestose ou nistose) (JUNG et al., 1989; DUAN; CHEN; SHEU, 1994).

No entanto, o mecanismo enzimático foi recentemente melhor elucidado mostrando que a levanasacarase é inibida competitivamente pela glicose. Além disso, a enzima exibe diferentes eficiências catalíticas para cestose e nistose dependendo da composição do substrato. A nistose e a cestose são doadoras e receptoras de resíduos frutossil, porém a nistose não funciona como doadora na presença de sacarose ou cestose, sugerindo que ocorre preferencialmente formação de nistose a partir da cestose, e a nistose formada se acumula no meio (VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014).

Além disso, a eficiência catalítica da enzima diminui significativamente com o crescente grau de polimerização das frutanas (FOS e levana), mostrando que a sacarose é mais eficientemente consumida, sendo o substrato que mais frequentemente fornece os resíduos frutossil à enzima. Desse modo, o rendimento e a produtividade da síntese de FOS são favorecidos pela alta concentração de sacarose (NISHIZAWA; NAKAJIMA; NABETANI, 2001; VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014).

Os parâmetros cinéticos da atividade dessa enzima não são dependentes de sua concentração. Portanto, esse modelo enzimático pode ser usado como ferramenta para a otimização da produção de FOS (NISHIZAWA; NAKAJIMA; NABETANI, 2001; VEGA; ZUNIGA-HANSEN, 2014).

3.3 PRODUÇÃO DE FOS

3.3.1 Micro-Organismos Produtores

Tendo em vista que para a produção do FOS é extremamente importante a utilização de altas concentrações de sacarose, há grande interesse voltado para os micro-organismos osmofílicos, capazes de sobreviver em ambientes hostis contendo alta pressão osmótica, alta concentração de sais ou açúcares e baixa atividade de água (BROWN, 1976; ESAWY et al., 2011; KUNČIČ et al., 2013). Grande variedade de micro-organismos são relatados como produtores, os mais importantes e promissores são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de FOS

Micro-organismos produtores de FOS	Autores
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Lorenzoni et al., 2014
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aachary et al., 2009 Mabel et al., 2008 Sangeetha et al., 2005 a Sangeetha et al., 2005 b
<i>Aspergillus japonicus</i>	Lin; Lee, 2008
<i>Aspergillus niger</i>	Lin; Lee, 2008 Ganaie; Gupta; Kango, 2013 Tian; Karboune; Hill, 2014
<i>Aspergillus flavus</i>	Ganaie; Gupta; Kango, 2013
<i>Aspergillus terreus</i>	Ganaie; Gupta; Kango, 2013
<i>Bacillus sp.</i>	Belghith et al., 2012
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tian; Karboune; Hill, 2014
<i>Bacillus circulans</i>	El-Refai; Abdel-Fattah; Mostafa, 2009
<i>Bacillus subtilis natto</i>	Esawy et al., 2011 Euzenat; Guibert; Combes, 1997 Shih; Chen; Wu, 2010. Wu; Chou; Shih, 2013
<i>Fusarium solani</i>	Ganaie; Gupta; Kango, 2013
<i>Glucanacetobacter diazotrophicus</i>	Trujillo et al., 2001
<i>Penicillium islandicum</i>	Ganaie; Gupta; Kango, 2013
<i>Rhodotorula sp.</i>	Alvarado; Maugeri, 2007
<i>Zymomonas mobilis</i>	Bekers et al., 2002

Fonte: o próprio autor

3.3.1.1 *Bacillus subtilis* e *Bacillus subtilis natto*

Bacillus subtilis são bastonetes, gram-positivos, aeróbios facultativos, não patogênicos, formadores de esporos e é o membro mais bem caracterizado do gênero. A capacidade de secretar um grande número de enzimas e formar esporos permitiu uma enorme vantagem competitiva ao gênero, podendo se adaptar a grandes variações ambientais, tais como a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, e sobreviver longos períodos sob condições ambientais adversas (AL-SHARIDAH, et al., 2000). Estas características levaram os *Bacillus* a colonizar uma grande variedade de ambientes (diversos tipos de solo, isolados ou associados a plantas, rios, águas estuarinas e trato gastrintestinal de animais) (WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

Uma subespécie muito conhecida no oriente é o *Bacillus subtilis* natto, isolada do natto, alimento tradicional japonês feito a partir de soja fermentada (KUNST et al., 1997). Existem vários estudos relacionados à produção de FOS e levana utilizando esta subespécie (SHIH et al., 2005; SHIH, CHEN, WU, 2010; WU, CHOU, SHIH, 2013; SILVA, BORSATO, CELLIGOI, 2014b).

Os *Bacillus* apresentam ampla capacidade metabólica possibilitando a eles utilizar diferentes fontes de carbono e gerar uma ampla gama de produtos de interesse, como enzimas de importância industrial (KUNST et al., 1997). Esta bactéria também foi considerada adequada à produção de levanasacarases termoestáveis (BELGHITH et al., 2012; GONÇALVES et al., 2013), importantes para os processos enzimáticos industriais.

Por ser um micro-organismo geralmente reconhecido como seguro (GRAS) e com a capacidade de secretar diversas enzimas extracelulares, como a levanasacarase (EC 2.4.1.10), e possuir grande diversidade metabólica, o *B. subtilis* tem sido objeto de inúmeros estudos para a produção de diversas enzimas, antibióticos e também produtos alimentícios, conferindo-lhe um grande potencial comercial (KUNST et al., 1997; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

3.3.2 Métodos de Obtenção de FOS

Os FOS podem ser obtidos pela extração de origem vegetal, hidrólise da inulina, síntese enzimática utilizando a enzima isolada ou processos fermentativos.

A produção por extração vegetal está sujeita a intempéries climáticas, grandes oscilações do preço de mercado dos produtos agrícolas e produção sazonal, além da baixa produtividade. O processo de síntese ou hidrólise da inulina utilizando enzimas originárias de plantas apresenta baixo rendimento, e a sua produção em massa é limitada pelas condições citadas anteriormente. Portanto, a indústria depende principalmente de enzimas microbianas (YUN, 1996; SANGEETHA, 2003). Porém, para o processo de síntese se faz necessária além da etapa de produção, as etapas de extração e purificação que encarecem o produto (SILVA, 2014).

A purificação e/ou imobilização da enzima aumentam a manipulação que pode vir a alterar características físico-químicas das enzimas, como relatado por Jang et al. (2001) onde a imobilização e a extração de levanasacarase de *Z. mobilis* utilizando solventes diminuiu bruscamente a produção de levanas, favorecendo a produção de frutanas com baixo peso molecular, devido às alterações na estrutura da enzima, levando a fraca interação com moléculas grandes (levanas).

Desse modo, destaca-se a obtenção de FOS por processos fermentativos, o mais vantajoso dentre as alternativas, uma vez que o produto é obtido diretamente no meio de fermentação, não se fazendo necessária nenhuma etapa anterior, eliminando custos durante o processo (SILVA, 2014). Além disso, ressalta-se maior produtividade e possibilidade de alterar o tipo de FOS obtido pela modificação das condições de cultivo (VITOLLO, 2001).

Poucos são os trabalhos que trazem o processo de produção de FOS por processo fermentativo (biotransformação da sacarose) utilizando apenas uma etapa, ou seja, obtendo-se o micro-organismo e o bioprodutos na mesma fase (DOMINGUEZ et al., 2012). Na maioria das vezes obtêm-se a enzima de síntese via fermentação e, posteriormente, após extração, purificação ou imobilização da enzima, a qual é utilizada na síntese de FOS, encarecendo o produto e aumentando o tempo do processo. No entanto, esse método ainda é utilizado devido aos altos rendimentos obtidos.

Os estudos de processos fermentativos para produção de FOS visando aplicação industrial são realizados em biorreatores, inicialmente pequenos, para avaliar a adaptação das condições otimizadas em bancada. É importante ressaltar que as mudanças nas proporções dos fermentadores utilizados, sejam eles frascos ou biorreatores, podem alterar a produção do FOS e de outros bioprodutos sendo necessário novos estudos (VITOLLO, 2001).

As alterações na produção com o aumento de escala ocorrem devido a três fatores: fenômeno termodinâmico, cinético e de transporte. O primeiro diz respeito à solubilidade do oxigênio no meio, por exemplo; o segundo, ao crescimento e formação de metabólitos pelo micro-organismo em função das condições locais; e o terceiro à concentração real de oxigênio presente no meio e ao comportamento cinético no micro-organismo no biorreator. Apesar dos dois primeiros

fenômenos serem independentes da escala de produção utilizada, o terceiro é extremamente dependente desta (PRATA, 2010).

Assim, o fenômeno de transporte é regido pelos mecanismos de convecção e condução, que envolvem, principalmente, a mistura e as transferências de massa e calor. Desse modo, os problemas relacionados à ampliação do volume de produção advêm do fato que o tempo necessário para que esses dois mecanismos ocorram, aumenta satisfatoriamente com o aumento da escala (THIRY; CINGOLANI, 2002; PRATA, 2010).

3.3.3 Produção de FOS e Exopolissacarídeos Via Processos Fermentativos

Diversos trabalhos enfatizam a seleção e o melhoramento genético de linhagens produtoras de FOS, além de desenvolverem estratégias de otimização das condições do processo a fim de obter maior produtividade (SANGEETHA, RAMESH; PRAPULLA, 2005b). Alguns desses estudos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Produção de FOS variando o micro-organismo e o processo de obtenção

Micro-organismo	Processo	Rend. /Prod.	Referência
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Fermentação submersa	238 g/L	Ning et al., 2012
<i>Gliocladium virens</i>	Fermentação submersa	3 g/L	Fialho et al., 2013
<i>Sporotrichum thermophile</i>	Fermentação submersa	12,5 g/L	Katapodis et.al., 2004
<i>Bacillus subtilis</i> natto CCT 7712	Fermentação submersa	98,86 g/L	Silva; Borsato; Celligoi, 2014a
<i>Bacillus subtilis</i> natto CCT 7712	Fermentação submersa	54,86 g/L	Silva; Borsato; Celligoi, 2014b
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fermentação submersa	64,6%(m/m)	Dominguez et al., 2012
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Fermentação submersa (neoFOS).	227,72 g/L	Ning et al., 2014
<i>Aspergillus sp.</i> N74	Fermentação submersa biorreator	69%	Sánchez et al., 2008
<i>Aspergillus japonicus</i>	Fermentação submersa biorreator (micélio imobilizado),	200g/L; 90% (m/m)	Lin; Lee, 2008

<i>eAspergillus niger</i>	retirada de glicose		
<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 5154	Fermentação submersa utilizando subproduto industrial	50,63 - 57,86 %	Aachary et al., 2009
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fermentação submersa biorreator	273,2 g/L	Silva, 2014
<i>A. japonicus</i> CCRC 93007, <i>A. pullulans</i> ATCC 9348, <i>G. oxydans</i> ATCC 23771	Fermentação contínua mista das culturas e sistema de separação dos FOS.	80%	Sheu et al., 2002
<i>Penicillium citrinum</i>	Células imobilizadas (enzima intracelular) (neoFos)	49 g/L; 55%	Park et al., 2005; Hayashi et al., 2000
<i>Aspergillus japonicus</i>	Células imobilizadas (enzima intracelular) processo contínuo	60%, 173g/h.L	Chien; Lee; Lin, 2001
<i>Pseudomonas aurantiaca e Zymomonas mobilis</i>	Enzima	24-26%	Byun et al., 2007
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Enzima bruta	62%(m/m)	Yoshikawa et al., 2008
<i>Penicillium rugulosum</i>	Enzima bruta	80%	Barthomeuf; Pourrat, 2004
<i>Rhodotorula sp</i>	Enzima extracelular	52-63%	Maugeri; Hernalsteens, 2007
<i>Gluconoacetobacter diazotrophicus SRT4</i>	Enzima extracelular	50%	Trujillo et al., 2001
<i>Aspergillus oryzae</i> CFR202	Enzima extracelular	53% (m/m)	Sangeetha; Ramesh; Prapulla, 2005b
<i>Zymomonas mobilis</i>	Enzima extracelular (FOS e levana)	30%	Bekers et al., 2002
<i>Bacillus subtilis</i> C4	Enzima extracelular (FOS e levana)		Euzenat; Guibert; Combes , 1997
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Enzima extracelular livre e imobilizada	50 g/L	Maugeri; Santos, 2007
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	Enzima extracelular.Produção seletiva de GF4 (42%), GF5 e GF6	32,3%	Park; Oh; Yun, 2001
<i>Xanthophyllomyces dendrohous</i>	Enzima intracel (neoFOS)	73,9 g/L	Chen et al, 2011
<i>A.japonicus e A.niger</i>	Enzima intracelular bruta	60%	Dorta et al., 2006
<i>Aspergillus japonicus</i>	Enzima obtida de meio sólido	128,3 g/L	Mussato; Teixeira, 2010

<i>Aspergillus aculeatus</i>	Enzima purificada	60%	Ghazi et al., 2007
<i>FTases industriais fúngicas</i>	Enzimas	58%-62%	Vega-Paulino; Zúniga-Hansen, 2012
<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC 5154	Enzimas extracelular	52±2%	Mabel et al., 2008
<i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202 e <i>Aureobasidium pullulans</i> CFR 77	Mistura de enzima extracelulares	50-54 %	Sangeeta; Ramesh; Prapulla, 2004

Fonte: Silva (2014) adaptado. **Rend. /Prod.** – Rendimento/Produção.

De acordo com as condições dos processos fermentativos, diferentes proporções de levana e FOS podem ser obtidos no cultivo utilizando-se as levanasacarases. Hernandez et al. (1995) relataram que a levanasacarase de *Bacillus subtilis* catalisava a formação de levana de alto peso molecular sem acúmulo transitório de FOS. No entanto diversos estudos mostram a produção concomitante dos dois produtos (BEKERS et al., 2002; EL-REFAI; ABDEL-FATTAH; MOSTAFA, 2009; BELGHITH et al., 2012; MARDO et al., 2014).

Em geral, observa-se consumo de pequena quantidade de FOS (cestose), produzido no começo do processo fermentativo, e posterior queda gradual como resultado da conversão em nistose (ATIYE; DUVNJAK, 2001; LIN; LEE, 2008).

A glicose redutora, subproduto da formação dos FOS age como inibidora da reação de transfrutoseilação (YUN, 1996). Assim, para obter rendimentos maiores, vários autores realizam a remoção contínua de glicose residual do meio por meio de glicose oxidase, formando ácido glucônico (YUN; SONG, 1999; LIN; LEE, 2008; SHEU et al., 2013) ou biorreatores equipados com membranas de microfiltração (SHEU et al., 2002). No entanto, a utilização desses procedimentos aumenta os custos de produção, além do que, a utilização da glicose oxidase acidifica ainda mais o meio de cultivo.

A aplicação de enzimas em processos industriais só ocorre se as condições do processo fermentativo forem favoráveis à produção da enzima em larga escala, mantendo os mesmos níveis de atividade e produtividade, obtidas em escala de bancada (TONG; INLOES, 1990). Assim, ampliação da escala do processo fermentativo deverá manter as condições do processo uniformes para qualquer volume de operação (TACIRO, 1992).

Assim, para viabilizar a ampliação de escala é indispensável partir de condições otimizadas de meio de cultivo e micro-organismo, além de condições de agitação e aeração mais adequadas ao processo (TONG; INLOES, 1990).

A agitação e aeração através da dispersão de bolhas de ar no meio de cultivo, além de suprir o oxigênio aos micro-organismos, mantêm as células em suspensão e aumenta a transferência de calor e massa no meio (AIBA; OKABE; OKADA, 1973; WANG et al., 1979).

De nada adianta a utilização de altas concentrações de substratos sem fornecer a aeração necessária, uma vez que para oxidação do substrato ao bioproduto de interesse, torna-se totalmente necessário o suprimento adequado de oxigênio. Tendo em vista a limitada capacidade de dissolução de O_2 , se faz necessário o suprimento deste durante todo o processo fermentativo. Assim, pode-se afirmar que a obtenção de altos rendimentos de bioprodutos de interesse depende totalmente da capacidade de se transferir oxigênio para fase líquida (NEVES, 2003).

Devido à baixa concentração celular no início do processo, a demanda por oxigênio é baixa nesse período e tende a aumentar com o passar do tempo, tornando-se obrigatório seu suprimento contínuo.

Acima de pressões parciais de 1 bar, o O_2 passa a apresentar efeitos tóxicos nos micro-organismos aeróbios. Essa toxicidade se deve a redução univalente do O_2 , conduzindo as enzimas, ácidos nucleicos e lipídios a danos. Dessa forma, o suprimento de O_2 além do necessário, causa efeitos adversos em células microbianas (NEVES, 2003).

A concentração de sacarose é outro ponto muito importante para atividade de transfrutoseilação realizada pela levanasacarase, pois influencia no tipo de aceptor do resíduo frutossil que será utilizado. Em baixas concentrações, a reação predominante é a hidrólise da sacarose, já em altas concentrações, observa-se que a produção de oligossacarídeos é a maior reação catalisada (CRITTENDEN; DOELLE, 1994), o que é observado ao fim dos cultivos, onde a concentração de sacarose passa a ser baixa, a produção de FOS fica estabilizada e a frutose e a glicose continuam a aumentar no meio. Confirmando o verificado por Crittenden e Doelle (1994), Vigants et al. (1998) demonstraram que a maior concentração de substrato (sacarose) não favoreceu apenas o aumento da biomassa, como também a formação de levana. No entanto, Park et al. (2003) afirmaram que a formação de

levana aumentava com a diminuição do substrato (sacarose). Também observou que em baixas concentrações de sacarose, a atividade hidrolítica da levanasacarase se destacou em relação a transfrutoseilação (VIGANTS et al., 1998; PARK et al., 2003). Vandakova et al. (2004) demonstraram que a sacarose não influenciava a produção de levanasacarase de *A. pullulans*, no entanto, a maior concentração de sacarose aumentava sua atividade específica.

Durante a produção de FOS, a taxa de crescimento do micro-organismo diminui à medida que a concentração do substrato aumenta (ATIYE; DUVNJAK, 2001) e é negativamente afetada pela produção de FOS (NING et al., 2012). No entanto, a alta concentração do substrato (sacarose) é um fator significativo para alta produção de FOS (SILVA; BORSATO; CELLIGOI, 2014a), sendo a concentração do substrato inversamente proporcional ao GP das frutanas produzidas no meio (FOS e levanas) (ESAWY et al., 2011).

3.4 INTERAÇÕES DE OLIGOSSACARÍDEOS COM CÉLULAS

Vários estudos têm identificando diversas propriedades fisiológicas *in vitro* e *in vivo* dos FOS. Estudos relataram seus efeitos benéficos sob a produção de estrógenos (TOUSEN et al., 2013), a absorção mineral (LOPEZ et al., 2000; FERNÁNDEZ et al., 2013), além de propriedades anticancerígenas (ZHENG et al., 2006; ALLSOPP et al., 2013; SERBAN, 2013), antidiabéticas (BHARTI et al., 2013), hipolipidêmicas (GIACCO et al., 2004; MALAGUARNERA et al., 2012), imunomoduladoras (WATZL; GIRRBACH; ROLLER, 2005; THAKUR et al., 2012), antioxidante (HSIA et al., 2012) e anti-inflamatórias (ZENHOM et al., 2011).

A maioria dos estudos se refere a sua capacidade prebiótica, ou seja, por não serem digeríveis, devido à incapacidade das enzimas digestivas em hidrolisar ligações β (2 \rightarrow 1) presentes no FOS, acabam por estimular seletivamente o crescimento de bactérias presentes no cólon. Assim, são fermentados pelas bifidobactérias, estimulando seu crescimento e produzindo metabólitos de efeito benéfico ao seu hospedeiro (SCHNEEMAN, 1999; DELZENNE, 2003). Em relação à utilização do FOS pelos micro-organismos, 40% são convertidos em biomassa bacteriana, 5% em CO₂, 40% em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e 15% em lactato. Desta produção, 90% dos ácidos orgânicos são absorvidos no sangue. Assim, o metabolismo destes compostos no fígado produz 14 mols de ATP, o que

corresponde a 35% do conteúdo calórico da frutose livre, o que demonstra que os FOS são açúcares de baixa caloria. Dessa forma, o valor calórico dos FOS é de 1,4 Kcal/g (ROBERFROID; DELZENNE, 1998).

Estudos *in vitro* demonstraram a capacidade de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, comum na microflora intestinal, em utilizar o FOS como fonte de carbono (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; SZWENGIEL et al., 2004; JALAN et al., 2013). Estas bactérias presentes no cólon intestinal realizam a fermentação dos FOS e geram os produtos acima citados. Entre eles, os AGCC são rapidamente absorvidos no intestino onde são metabolizados por tecidos como o epitélio do cólon intestinal, produzindo butirato; no fígado, produzindo propionato e acetato; ou ainda nos músculos, também produzindo acetato (BLAUT et al., 2002), trazendo uma série de efeitos benéficos.

O acetato, propionato e butirato, influenciam o metabolismo de carboidratos e lipídeos (ROBERFROID; DELZENNE, 1998; SALMINEN et al., 1998; BRANDT, 2001). O propionato reduz a gliconeogênese hepática e inibe a formação de uréia no fígado (DELZENNE et al., 1995; ROBERFROID; DELZENNE, 1998). Já o acetato por ser um ácido forte, reduz o pH, eliminando bactérias patogênicas cujos metabólitos podem agir como pré-carcinógenos (BRANDT, 2001; MUSSATTO; MANCILHA, 2006; SAAD et al., 2013), enquanto que, o butirato é uma importante fonte de energia, podendo também atuar como regulador do crescimento e diferenciação de células da mucosa intestinal (BRANDT, 2001).

É conhecido que a administração diária de alguns oligossacarídeos reduz significativamente os danos associados a patologias intestinais (RUMI et al. 2004; LINDSAY et al. 2006; WINKLER et al. 2006). Além disso, o funcionamento do sistema imune também é beneficiado pela suplementação alimentar adequada (BAKKER-ZIERIKZEE, et al. 2006) e recentemente o consumo de FOS tem sido associado com os efeitos benéficos da modulação do sistema imune (WATZL; GIRRBACH; ROLLER, 2005; THAKUR et al., 2012; KUMAR; PRASHANTH; VENKATESH, 2015; VOGT et al., 2015).

Assim, grande parte destes estudos relata a atuação indireta dos FOS sobre o sistema imune do hospedeiro, uma vez que ao estimular o crescimento de bactérias benéficas, estas produzem substâncias (lipopolissacarídeos, peptideoglicanas, ácidos orgânicos) que vão estimular o sistema imune e as células do epitélio intestinal a produzir citocinas, promover a proliferação de células

mononucleares, induzir a síntese de imunoglobulinas (Igs), tornando os agentes patogênicos vulneráveis (SANTOS, 2010; GOURBEYRE; DENERY; BODINIER, 2011; VOGT et al., 2015). Outros efeitos benéficos indiretos proporcionados ao sistema imune incluem principalmente a imunorregulação da secreção de imunoglobulina A e interferon, o aumento da expressão de receptores poliméricos de imunoglobulinas no epitélio intestinal e o desenvolvimento de tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (ROBERFROID; DELZENNE, 1998; BOEHM et al., 2004; SEIFERT; WATZL, 2007).

Por um grande período, os benefícios dos FOS foram associados somente aos seus efeitos indiretos. No entanto, há relatos que os FOS provocam efeitos diretos adicionais na imunomodulação por meio de interação direta com células, sendo descritos *in vitro*, como moléculas sinalizadoras de processos relacionados à inflamação (ROLLER et al. 2004). Eiwegger et al. (2004) demonstraram que oligossacarídeos derivados de plantas e do leite humano afetam a produção de citocinas *in vitro*, proporcionando ações anti-inflamatórias. Porém, os mecanismos de ação e interação de oligossacarídeos diretamente sobre células ainda é pouco compreendido.

Alguns relatos da interação direta entre oligossacarídeos e células *in vitro* pode ser observado pelo estudo de Zenhom et al. (2011). Os autores demonstraram que os FOS exerceram ação anti-inflamatória diretamente sobre células Caco-2, via ativação de receptores ativados da proliferação dos peroxissomos (PPARs) isotipo γ que induz a expressão do receptor da proteína de reconhecimento do peptidoglicano 3 (PGlyRP3), que por sua vez se ligam a fatores de transcrição nucleares, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Em outro estudo, Eiwegger et al. (2010) demonstraram que oligossacarídeos, entre eles os FOS, são capazes de atravessar além da monocamada formada por células Caco-2 *in vitro*, a membrana celular destas, chegando à uma taxa de transferência de 4 a 14%, de acordo com a estrutura e tamanho da molécula. As moléculas menores obtiveram maior eficiência de transferência. Essas evidências comprovaram a possibilidade dos oligossacarídeos exercerem efeitos sistêmicos por interação direta com o sistema imunológico e/ou diretamente com as células intestinais. Thakur et al. (2012) demonstraram a ativação de células NK *in vitro* por meio da exposição destas diretamente aos FOS extraído de *Asparagus racemosus* Linn., com GP de 7 e 8 unidades de frutose.

Outros estudos demonstram oligossacarídeos como indutores de citocinas próinflamatórias e inibidores de proliferação celular. Homann, Timm, Seibel (2012) verificaram que diversos oligossacarídeos puros, entre eles a 1-cestose e nistose, são capazes de estimular a expressão de citocinas proinflamatórias como IL-8 e CCL2 em células endoteliais Caco-2 *in vitro*, verificando ainda que o tipo e a quantidade de citocinas secretadas são dependentes do tipo de oligossacarídeo exposto à célula. Este estudo demonstrou que a 1-nistose estimulou a secreção de CCL2, enquanto que a 1-cestose suprimiu a expressão da mesma, no entanto, tanto a 1-nistose quanto a 1-cestose estimularam a expressão de IL8.

Xiao et al. (2011) verificaram o efeito pré-clínico e mecanismo molecular *in vitro* e *in vivo* relacionados à exposição ao isomalto-oligossacarídeo sulfatado (IMOS). Os autores inicialmente verificaram *in vitro*, inibição da proliferação celular e indução de apoptose em células HCCLM3, HepG2 e Bel-7402 expostas a IMOS (16mg/mL, 32 mg/mL e 64 mg/mL). Ainda *in vitro* (células HepG2 e Hep3B), os autores observaram inibição das vias ERK e JNK independentes de p53, quando as células foram expostas a 16mg/mL de IMOS. Os efeitos inibitórios da proliferação celular e inibição das vias sinalizadoras ERK e JNK independentes de p53 foram obtidos *in vivo* (carcinoma hepatocelular – HCC) utilizando doses entre 60 e 90 mg/Kg/d de IMOS. Verificou-se ainda que o tipo celular exerceu influencia quanto à intensidade da resposta frente ao oligossacarídeo utilizado.

Essas alterações metabólicas causadas pela exposição de células aos oligossacarídeos podem ser úteis para elucidar mecanismos de toxicidade e inflamação. Para isso, a comparação entre o perfil metabólico diferencial de células expostas e não expostas aos oligos é muito importante. Muitos estudos de mecanismo de ação de droga são avaliados por este perfil metabólico (FENG et al., 2013; TYAGI et al., 2013; BO et al., 2014; WU et al., 2015).

O perfil metabólico celular pode dizer muito a respeito dos mecanismos de ação de certas substâncias. Alterações nesse perfil podem ser utilizadas para avaliação de vias moleculares que são perturbadas, permitindo a elucidação do mecanismo de doenças ou toxicidade induzida por drogas ou outros agentes sob um determinado conjunto de condições. Em adição, a capacidade de ligação dos metabólitos e vias usando diferentes técnicas analíticas aumenta a confiança e a identificação de potenciais biomarcadores (BEGER et al., 2013). Além

disso, fornece informações que complementam o perfil genômico e proteômico do alvo estudado (WANT et al., 2012).

Para isso, são empregados estudos de metabolômica, que é uma sensível tecnologia capaz de detectar mudanças metabólicas em células devido ao ambiente ou estímulos fisiológicos que podem ocorrer durante processos patológicos ou exposição destas às drogas. Esse tipo de análise pode ser feito a partir de amostras de biofluidos, tecidos, ou culturas de células gerando o perfil metabólico observado, que pode ser usado em diagnóstico de doenças (WANG et al., 2013; LANZA et al., 2010), screening de biomarcadores (WANG et al., 2005; NGUYEN et al., 2010), avaliação de segurança de drogas (SHI et al., 2007; WEI et al., 2008). Entre os biomarcadores, os mais relatados tem sido os de inflamação, uma vez que este mecanismo encontra-se diretamente ligado ao câncer, como o lactato (NGUYEN et al., 2010; HOQUE et al., 2014), glicina (GUNDERSEN et al., 2005); glutamina (WANG et al., 2013), entre outros.

Três técnicas comumente aplicadas para este tipo de análise são cromatografia gasosa (CG) e líquida (CL) acopladas a espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) (WANG et al., 2013). RMN vem sendo usado desde os anos 70, e apresenta como vantagens sobre MS a análise não destrutiva das amostras, a relativa simplicidade de preparação destas, potencial para identificar uma ampla gama de compostos e a capacidade de fornecer informações estruturais de compostos desconhecidos (WARD; BAKER; BEALE, 2007; KRISHNAN; KRUGER; RATCLIFFE, 2005). Ainda hoje, muitos estudos de resposta à ação de drogas utilizam-se dessa técnica (WU et al., 2015; BO et al., 2014; FENG et al., 2013; TYAGI et al., 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Micro-Organismo

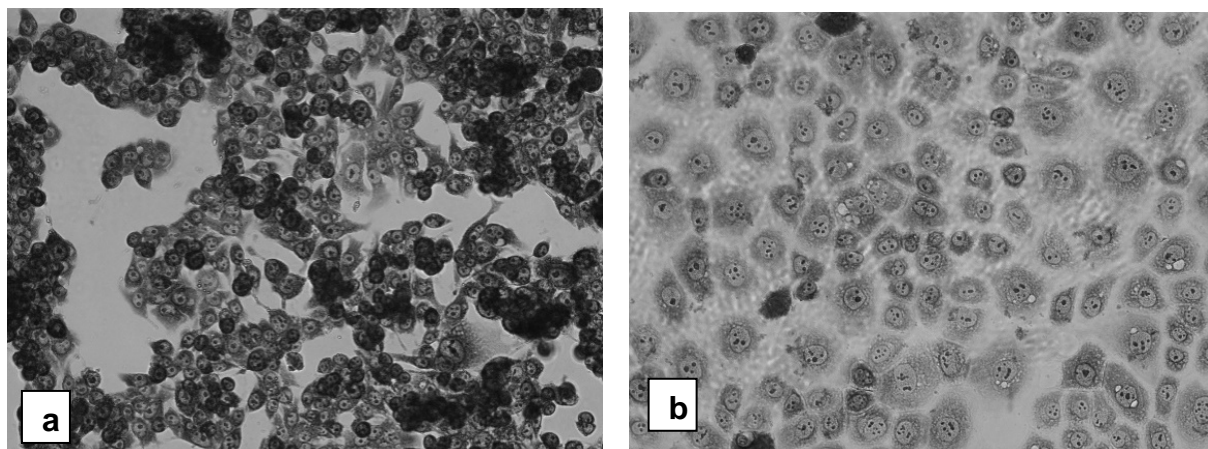
O micro-organismo *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, utilizado no presente estudo, foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia – Campinas, SP. A cepa foi mantida a 4°C, em meio inclinado de preservação (item.4.1.3.1).

4.1.2 Linhagens Celulares

Para o estudo foram escolhidas duas linhagens células, uma metabolizadora, carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A), empregada em modelos in vitro para estudo de toxicidade (LIEBEL et al., 2015); e outra linhagem não metabolizadora, carcinoma ovariano (OVCAR-3), produtora de hormônios (TOUTIRAIS, 2007).

As linhagens celulares humanas HepG2/C3A e OVCAR-3 utilizadas, ambas livres de micoplasma, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Figura 5). Foram cultivadas em frascos de 25 cm² contendo meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Life Technologies) suplementado com solução antibiótica-antimicótica (Gibco®, Life Technologies) e 10% de soro bovino fetal – SBF (FBS; Gibco®, Life Technologies) e incubadas em estufa BOD a 5% CO₂, 37°C (UV UltraSafe HF 212). Para todos os testes, a cultura celular foi mantida sob as condições citadas por 24 h para estabilização.

Figura 5 - Fotomicrografia das linhagens celulares humanas de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A) e carcinoma ovariano (OVCAR-3)



a. Linhagem celular de carcinoma hepatocelular HepG2/C3A. **b.** Linhagem celular de carcinoma ovariano (OVCAR-3). Aumento real de 460x. **Fonte:** o próprio autor

4.1.3 Meios de Cultura

4.1.3.1 Meio de preservação para *Bacillus subtilis* natto

Tabela 4 - Meio de preservação

Componentes	Concentração (g/L)
Peptona	50
Extrato de Carne	30
Ágar	20

4.1.3.2 Meio de inóculo para *Bacillus subtilis* natto

Tabela 5 - Meio de inóculo

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	100
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,5

Fonte: Calazans et al. (2000)

4.1.3.3 Meio de fermentação para *Bacillus subtilis* natto

Tabela 6 - Meio de fermentação

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	400
Extrato de levedura	2
KH ₂ PO ₄	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	3
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,6
MnSO ₄	0,2
Amônio citrato	0,25

Fonte: Euzenat, Guibert e Combes (1997) modificado

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preservação do Micro-Organismo

A preservação do micro-organismo *Bacillus subtilis* natto foi realizada em meio de preservação (item 4.1.3.1) a 37°C por 48 h, e após o crescimento, mantido em câmara refrigerada a 4°C. O repique das células foi realizado a cada 30 dias. A verificação da pureza da cultura foi observada pela técnica de coloração de Gram.

4.2.2 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado pela transferência da cultura do meio de preservação (item 4.1.3.1) para frascos Erlenmeyer (1L) com 200 mL de meio de inóculo (item 4.1.3.2) com pH final ajustado para 7,0 (CALAZANS et al., 2000). Após incubação por 24 h, 150 rpm a 37°C, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9050 x g, 15 min, 4°C para obtenção das células. O pellet celular foi solubilizado em solução salina (NaCl 0,9% (m/v)) e a concentração determinada por turbidimetria a $\lambda = 400$ nm e correlacionada a uma curva de calibração de biomassa (g/L). O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L para todas as fermentações.

4.2.3 Avaliação de Parâmetros para Produção de FOS

As fermentações de *B. subtilis* natto para estudo da produção de FOS foram conduzidas em frascos Erlenmeyer e em biorreator para posterior comparação.

Na Fermentação 1 foram usados frascos de 2L contendo 400 mL de meio de fermentação (item 4.1.3.3) com pH ajustado para 7,7 com NaOH 2N. Os cultivos foram incubados por 48 h, 240 rpm (SILVA; BORSATO; CELLIGOI, 2014b) a 35°C.

Para produção em biorreator, utilizou-se o equipamento Bio-tec (Tecnal) com capacidade de 4,5 L, equipado com sensor de pH (Mettler Toledo) e temperatura (Pt-100 classe A, Mettler Toledo). O volume operacional foi de 3L do meio de fermentação (item 4.1.3.3). Foram realizadas três fermentações no biorreator, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros avaliados na fermentação de *B. subtilis* natto para produção de FOS

Fermentações	Rotação (rpm)	Aeração (vvm)	pH
Fermentação 1	240	*	Sem controle
Fermentação 2	150	0,2	Controlado
Fermentação 3	150	0,2	Sem controle
Fermentação 4	150	1,0	Sem controle

* Fermentação realizada em Erlenmeyer sem aeração.

As aerações utilizadas foram fornecidas por bomba compressora de ar ambiente conectada a um controlador PID. Como antiespumante foi utilizado óleo de girassol (LEE; KIM, 2004). A agitação foi fornecida por 2 padrões de 6 lâminas impulsoras. A mudança de pH durante o cultivo foi monitorada em tempo real pelo sensor de pH e controlada pela adição de NaOH 2N e HCl 2N (WU, CHOU, SHIH, 2013).

A temperatura de fermentação utilizada em biorreator também foi de 35°C e mantida por sistema de recirculação de água (20°C) por serpentinas internas ao biorreator e manta siliconada de aquecimento externo.

O acompanhamento das fermentações ocorreu a cada 4 horas nos frascos e a cada 2 horas no biorreator. Além da produção de FOS (cestose e nistose), foram analisados os parâmetros: crescimento celular, produção de exopolissacarídeos totais (EPS_t), levanasacarase e dos carboidratos: glicose, frutose, sacarose. Todos foram avaliados após a interrupção dos cultivos, por centrifugação a $9050 \times g$, 15 min, $4^\circ C$.

4.2.4 Separação e Purificação de FOS

Após a centrifugação e retirada da biomassa, os FOS foram separados nas diferentes fermentações por membrana de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado, com limite de peso molecular nominal de 3kDa (Millipore). O filtrado obtido foi precipitado com etanol absoluto na proporção de 1:3 (v/v), por 12 h a $4^\circ C$. Após centrifugação ($12000 \times g$ 15 min, $4^\circ C$), o sobrenadante foi descartado, e os FOS solubilizados em água destilada e precipitados novamente nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi dialisado por 24 h, com 2 trocas da água destilada, e liofilizado. Para a avaliação dos efeitos em células, os FOS foram diluídos em meio DMEM e filtrados em membrana de $0,22 \mu m$ (Millipore).

4.2.4 Colorações de Cultura de Células *in vitro*

Para avaliar possíveis mudanças morfológicas proporcionadas pela exposição das linhagens celulares aos FOS, as células HepG2/C3A e OVCAR-3 foram cultivadas em placas de 6 poços com a presença de lamínulas. Foram adicionados solução de suspensão celular contendo $5 \cdot 10^5$ células/poço para HepG2/C3A e 10^5 células/poço para OVCAR-3. Após 24 horas de estabilização e aderência das células à lamínula, foram adicionados os tratamentos de FOS, nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100g/L, selecionadas de acordo com estudos anteriores utilizando oligossacarídeos (NINESS, 1999; SHAH, 2000; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004; XIAO et al., 2011). Como controle foi utilizado o meio de cultura DMEM. Após 24 horas, os poços foram lavados com tampão PBS. Em seguida, adicionou-se a mistura de metanol e tampão PBS (1:1) por 15 minutos, e após retirá-la, foi adicionado o azul de metileno (0,25 %) por 10 minutos.

4.2.5 Avaliação dos Efeitos Citotóxicos dos FOS

A investigação dos efeitos citotóxicos *in vitro* do FOS foi baseada no protocolo descrito por Mosmann (1983). Placas de cultura de 96 poços, contendo $2,5 \cdot 10^3$ células/poço para HepG2/C3A e $5 \cdot 10^3$ células/poço para OVCAR-3, foram incubadas em BOD a 5% CO₂, 37°C por 24 h para estabilização do ciclo celular. Após esse período, as linhagens foram expostas às concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 mg/mL de FOS, selecionadas de acordo com estudos anteriores utilizando oligossacarídeos (NINESS, 1999; SHAH, 2000; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004; XIAO et al., 2011), e incubadas nas mesmas condições por 24 h. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas são testes, e essas concentrações de exposição às células não são atingidas quando ingeridas pelo indivíduo.

Em seguida, as células foram incubadas no escuro em solução de 0,167 mg/mL de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) dissolvido em meio DMEM sem SBF, a 37°C por 4 h. Após o período, a solução de MTT foi retirada e as células contendo o precipitado formado (cristais de formazan) foram dissolvidas em 100 µL de dimetil sulfóxido 0,05 M (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals) para leitura da absorvância a $\lambda = 540$ nm em espectrofotômetro (Uniscience). Como controle foi utilizado o meio de cultura DMEM, e como indutor de citotoxicidade foi utilizado 3 µM de Doxorrubicina (DXR, Adriblastina®, Pharmacia). Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada de acordo com Huang et al. (2005). Os dados foram analisados pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$) usando o software GraphPad Prism® versão 5.0 (GraphPad Software).

4.2.6 Análise de Proliferação Celular em Tempo Real (RTCA)

A cinética de crescimento em tempo real foi avaliada com o sistema Real Time Cell Analyzer (RTCA) em aparelho xCELLigence (Roche, Diagnostics). O sistema utiliza E-placas (Roche, Diagnostics) com microeletrodos interdigitados na face inferior, para detectar alterações iônicas locais, como as geradas pela proliferação celular, utilizando a impedância como medida. Os valores são mostrados pelo Índice Celular (IC) gerado pelo software.

Assim, em E-placas de 96 poços foram colocados 100 μ L/poço de meio DMEM contendo suspensão celular ($2,5 \cdot 10^3$ células/poço para HepG2/C3A e $5 \cdot 10^3$ células/poço para OVCAR-3). Após 24 h de estabilização as células foram expostas a 5, 10, 25, 50, 75 e 100mg/mL de FOS, concentrações definidas com base em estudos anteriores utilizando oligossacarídeos (NINESS, 1999; SHAH, 2000; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004; XIAO et al., 2011), e continuamente monitoradas a cada 30 minutos até 48 h. Como controle positivo as células foram expostas a 3 μ M de Doxorubicina (Adriplastina®, Pharmacia).

O IC em cada ponto foi definido como $(R_n - R_b)/15$, onde R_n é a impedância do eletrodo do poço contendo células, e R_b é a impedância do eletrodo do poço contendo apenas o meio de cultura isolado. As curvas de crescimento foram normalizadas com o IC do último ponto medido antes da adição dos tratamentos de FOS.

O experimento foi realizado com três repetições independentes e quadruplicatas técnicas. Os dados foram analisados utilizando o software do sistema xCELLigence, através da curva obtida a partir dos pontos experimentais e do cálculo do logaritmo da metade da máxima concentração de efeito inibitório ($\log [IC_{50}]$). Este valor foi convertido em IC_{50} (mg/mL). A análise estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos foi realizada utilizando o teste de Dunnet.

4.2.7 PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

Para avaliar a expressão gênica, as células foram pré-incubadas ($2,5 \cdot 10^3$ células/poço para HepG2/C3A e $5 \cdot 10^3$ células/poço para OVCAR-3) durante 24 h em frascos de 25 cm^2 . Foram utilizadas para comparação células controle e expostas ao FOS, nas concentrações tóxicas que levaram a redução de 50 % da viabilidade celular ou IC_{50} , e nos tempos selecionados com base nos dados das análises de citotoxicidade, proliferação celular e estudos prévios utilizando oligossacarídeos (NINESS, 1999; SHAH, 2000; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004; XIAO et al., 2011). Todas as reações de RT-qPCR foram conduzidas de acordo com Bustin et al. (2009).

Assim, após incubação, as células foram tripsinizadas e o RNA total extraído utilizando lise por Trizol LS (Invitrogen, Life Technology) seguido de extração por RNeasy® Mini Kit Qiagen (Cat. Nº 74106). A integridade do RNA foi

verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a quantidade e pureza verificada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000 UV-Vis, Thermo Scientific) pela razão das absorvâncias $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, 0,5 mM de dNTPs (Invitrogen, Life Technologies) e 10 pM de Oligo-dT (Invitrogen, Life Technologies). As amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos e após esse período, mantidas em gelo, seguindo-se a adição de 4 U de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Life Technologies), 100 U M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen, Life Technologies), completando o volume final da reação para 20 µL. As amostras foram incubadas a 37°C por 50 min, seguida por inativação da enzima a 70°C por 15 min.

As reações de RT-qPCR foram conduzidas em termociclador CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad C1000 Touch™) com 5 µL de cDNA (50 ng/µL), e 0,375 µM de cada *primer forward* e *reverse*, o qual amplificaram regiões parciais dos genes *IL-8* (Interleucina 8), *TNF-α* (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e *ERβ* (Receptor de Estrógeno Beta) (Tabela 8) em um volume final de reação de 12 µL. Os fragmentos amplificados foram detectados pela fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green (5µL) contido no kit Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG kit (Invitrogen, Life Technologies).

Tabela 8 - Sequência de *primers* utilizados na reação de RT-qPCR em tempo real

Gene	Primers
<i>ACTB</i>	F: 5' TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA 3' R: 5' ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT 3'
<i>IL-8</i>	F: 5' GTTTTTGAAGAGGGCTGAG 3' R: 5' TTTGCTTGAAGTTTCACTGG 3'
<i>TNF-α</i>	F: 5' AGGCAGTCAGATCATCTTC 3' R: 5' TTATCTCTCAGCTCCACG 3'
<i>ERβ</i>	F: 5' AAATCTTTGACATGCTCCTG 3' R: 5' AGGGTACATACTGGAATTGAG 3'

Fonte: Sigma-Aldrich.

As condições de amplificação foram: primeira etapa de desnaturação inicial de 50°C por 2 min; 95°C por 3 min; 39 ciclos de 95°C por 20 seg, 60°C por 30

seg para *IL-8* e *TNF- α* e 58°C por 30 seg para *ER β* ; 72°C por 20 seg; e uma etapa final a 95°C por 10 seg e 40°C por 1 min. A curva de *melting* foi confeccionada no final da reação pelo aumento gradual da temperatura de 50°C para 95°C em intervalos de 0,5°C a cada 5 seg. As reações foram realizadas em duas repetições biológicas e três replicatas técnicas. Nesse estudo, os dados foram normalizados com a amplificação parcial do gene *β -actina* (ACTB) (Tabela 8). A expressão relativa dos genes foi determinada pelo método de Pfaffl (2001) e a análise estatística pelo software REST-384 (PFAFFL et al., 2002).

4.2.8 Perfil Metabólico

4.2.8.1 Extração dos metabólitos

O cultivo celular para avaliação dos metabólitos foi feito em frascos de 75cm² com 15 mL de meio de cultura de células contendo 14,25.10⁶ células/frasco para a linhagem OVCAR-3 e 6,9.10⁶ células/frasco, valores esses obtidos após crescimento e confluência de aproximadamente 50% do frasco. Após 24 horas de estabilização celular, foram adicionados os tratamentos selecionados de acordo com os valores obtidos no ensaio de citotoxicidade e proliferação (item 4.2.5 e 4.2.6), que se mostraram tóxicos levando a redução de 50 % do IC ou viabilidade, e mantidos durante 24 horas a 37°C. O experimento foi conduzido em triplicata.

Após o tempo de tratamento, o meio de cultura foi descartado e para extração dos metabólitos foram adicionados metanol e clorofórmio na proporção de 2:1 (v/v, 250 μ L/pellet celular) ao pellet celular a -20°C. A mistura celular pellet-solvente foi homogeneizada em vórtex (durante 10 min, com intervalos de 1 min). Posteriormente foi adicionado clorofórmio e água ultrapura na proporção de 1:1 (250 μ L/pellet celular) para a formação de emulsão e agitadas em vórtex. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 min, 4°C.

O sobrenadante (metanol e água) foi separado da fase inferior orgânica (clorofórmio) e apenas o sobrenadante foi seco por centrifugação sob vácuo, a temperatura ambiente. Os pellets foram solubilizados em 0,625 mM de trimetililpropionato de sódio (TMSP) em 500 μ L de D₂O para avaliação dos metabólitos.

4.2.8.2 Espectroscopia de $^1\text{H-NMR}$

Os espectros referentes ao perfil metabólico de cada condição celular foram adquiridos de acordo com o item 4.2.9.6.

4.2.9 Determinações Analíticas

4.2.9.1 Determinação de FOS e açúcares por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As quantificações de FOS (cestose e nistose), sacarose, glicose e frutose foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Jung et al. (1989), em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10^a e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel foi utilizada água desmineralizada (ultrapura) e degaseificada a 80°C sob fluxo de 0,6 mL/min. Como padrões foram utilizados 1-cestose, nistose (Sigma Aldrich), sacarose, glicose e frutose. As amostras submetidas à análise foram previamente filtradas com membrana 0,45 µm Millipore.

4.2.9.2 Curva de biomassa de *Bacillus subtilis* natto

Para confeccionar a curva de biomassa, um cultivo foi realizado em meio de crescimento (item 3.3.1) e a biomassa obtida após a interrupção do cultivo (centrifugação 9050 x g, 15 min, 4°C), foi lavada e suspendida em solução salina (NaCl 0,9 %(m/v)). Uma alíquota de 1 mL foi diluída em série para a obtenção de leituras de absorvância entre 0,2 a 0,8 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, foi plotado o gráfico relacionando absorvância e peso seco (g/L).

4.2.9.3 Quantificação da biomassa

Ao final das fermentações, os meios de cultivo foram centrifugados (9050 x g, 15 min, 4°C) e do sedimento celular suspenso em solução salina (NaCl 0,9% (m/v)) foi determinada a absorvância a $\lambda = 400$ nm. Os valores obtidos foram relacionados à curva de biomassa, obtendo os valores em g/L de células.

4.2.9.4 Quantificação de exopolissacarídeos totais (EPS_t)

Para determinar a produção de exopolissacarídeos totais (EPS_t) nas fermentações, o sobrenadante foi precipitado em etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol : sobrenadante) por 12 h a 4°C. Após este tempo, a solução foi centrifugada (9050 x g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi lavado em 3 volumes de etanol absoluto gelado e centrifugado novamente. Os pellets foram hidrolisados com 1 mL de HCl 0,1N, incubados a 100°C por 1h e neutralizados com 0,1 mL de NaOH 2N. Posteriormente a quantificação dos EPS_t foi realizada pelos açúcares redutores segundo Somogy e Nelson (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945). A curva padrão foi de frutose nas concentrações de 0 a 100 µg/mL. As leituras das absorvâncias foram feitas em $\lambda = 540$ nm.

4.2.9.5 Atividade da levanasacarase

A atividade da levanasacarase foi determinada no sobrenadante, imediatamente após interrupção do cultivo pela medida de formação de exopolissacarídeos totais. Foi utilizado 0,25 mL do sobrenadante (fonte de enzima) para reagir com 0,25 mL de uma solução de sacarose 1M em 0,5 mL de tampão acetato pH 5,0, incubada por 2 horas a 30°C conforme Ananthalakshmy, Gunasekaran (1999). A reação foi interrompida em banho fervente por 10 min.

Após o resfriamento, os exopolissacarídeos totais formados foram determinados conforme o item 4.2.9.4. A atividade foi estimada pela formação de polissacarídeos totais de frutose expressa em 1 µMol de frutose formada em mL por minuto nas condições experimentais (µmol de açúcar redutor/min).

4.2.9.6 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN)

Os espectros de RMN (^1H , ^{13}C , HSQC e DEPT 135) foram obtidos em solução de D_2O a 25°C , utilizando espectrômetro 400MHz NMR Bruker Avance III (100,6 MHz para ^{13}C e 400 MHz para ^1H) equipado com sonda inversa (BBI) de 5mm. Para aquisição dos espectros foram utilizados 128 scans, supressão do solvente, e como referência foi utilizado 0,625 mM de TMS. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm. A identificação dos compostos foi baseada em dados previamente publicados e banco de dados NMR metabolomics (LUNDBERG et al., 2005). Os sinais foram normalizados e a diferença entre os tratamentos foi calculada de acordo com a intensidade dos sinais no programa CHENOMIX e ACD/NMR Processor Academic.

4.2.9.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

O espectro de FT-IR da amostra de FOS purificada foi obtido em espectrômetro IRPrestige-21 (Shimadzu®, Kyoto, Japão). As leituras foram realizadas em transmitância, 50 scans por amostra, resolução de 1cm^{-1} na faixa de 4000 a 400cm^{-1} . A amostra foi mantida em estufa à 50°C por 24 h e em dessecador com sílica gel (12 h) antes da análise.

4.2.9.8 Espectroscopia de massas (MS)

A espectrometria de massas foi utilizada para identificar os FOS cujos padrões cromatográficos não estavam disponíveis. O microequipamento utilizado foi do tipo Compact triple-quadrupole ESI-OTOF II (Bruker®, Cologne, Alemanha) equipado com fonte de ionização eletrospray (ESI). Os parâmetros de ionização de dos analitos foram obtidos por injeção direta em suas soluções padrões individuais na concentração de 1 M. O processamento de dados foi conduzido através do software Bruker DataAnalysis 4.2. As condições da análise foram: ionização eletrospray (ESI) em modo positivo de 4500 V, temperatura do capilar de 200°C , fluxo de gás no cone de 0,6L/h e pressão do nebulizador de 2 bar.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados em forma de artigo científico e resultados complementares:

5.1 ARTIGO : “PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO: PROPRIEDADES ANTIPROLIFERATIVA E PRÓ-INFLAMATÓRIA EM CÉLULAS DE CARCINOMA OVARIANO”, APRESENTADO DE ACORDO COM AS NORMAS DO PERIÓDICO CARBOHYDRATE POLYMERS (ANEXO A)

5.2 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.1 ARTIGO 1

**PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE *Bacillus subtilis* natto E
SUAS PROPRIEDADES ANTIPROLIFERATIVA E PRÓ-INFLAMATÓRIA**

**PRODUCTION OF FRUCTO-OLIGOSACCHARIDE FROM *Bacillus subtilis* natto
AND ITS ANTI-PROLIFERATIVE AND PROINFLAMMATORY PROPERTIES**

Agnes Magri, Marcos Roberto de Oliveira, Cesar Augusto Tischer, Daniele Sartori,
Mário Sérgio Mantovani, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Production of fructo-oligosaccharide from *Bacillus subtilis* natto and its anti-proliferative and proinflammatory properties

Agnes Magri¹, Marcos Roberto de Oliveira², Cesar Augusto Tischer¹, Daniele Sartori³, Mário Sergio Mantovani³, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^{1*}

Abstract

Fructo-oligosaccharides (FOS) from *B. subtilis* natto were produced, characterized and evaluated for their antiproliferative and proinflammatory effects in OVCAR-3 cells. The best production was 173.6 g/L in 3L-bioreactor, sucrose medium, aeration of 0.2 vvm and uncontrolled pH. FOS were isolated and characterized by RMN, FTIR and ESI-MS spectroscopy showing molecules composed to β (2 \rightarrow 1) link with degree of polymerization ranging from GF₂ to GF₆, mainly GF₃ (nystose). FOS decrease viability and proliferation of OVCAR-3 cells. These effects were associated with an increased proinflammatory response by inducing the expression of genes *IL-8*, *TNF- α* and repression of *ER- β* . The differential metabolic profile showed that creatine increased while lactate, glycine, and alanine decreased, confirming a decrease in cellular proliferation, being the FOS of *B. subtilis* natto a candidate target for therapeutic methods.

Keywords: Fructo-oligosaccharide, bioreactor, OVCAR-3, antiproliferation.

Highlights:

High production of FOS by *Bacillus subtilis* natto in bioreactor.

FOS exhibit antiproliferative and proinflammatory properties in OVCAR 3 cells.

FOS induces the genes expression of *IL-8*, *TNF- α* and repression of *ER- β* .

FOS of *B. subtilis* natto candidato à aplicação em therapeutic methods.

¹Department of Biochemistry and Biotechnology, Center of Exact Science, State University of Londrina, Brazil.

²Department of Food Science and Technology, Federal Technological University of Londrina, Brazil.

³Department of General Biology, Center of Biological Science, State University of Londrina, Brazil.

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

1 Introduction

Fructo-oligosaccharides (FOS) are fructose oligomers with low degree of polymerization (DP) ranging from 3 to 10 monomer residues. The main known FOS are 1-kestose (GF2), nystose (GF3) and fructofuranosyl nystose (GF4) and they present fructosyl residues linked to sucrose (GF) by β (2 \rightarrow 1) linkages, which distinguish them from other oligomers (Yun, 1996, Patel & Goyal, 2011, Jalan et al., 2013, Visnapuu, Mardo, & Alamäe, 2015).

The microbiological production of FOS by fermentative processes involves levansucrase (E.C. 2.4.1.10), a fructosyltransferase that catalyzes the synthesis of levan from sucrose leading to simultaneous production of fructo-oligosaccharides (Park et al., 2003, Abdel-Fattah, Mahmoud, & Esawy, 2005, Vega & Zuniga-Hansen, 2014). There are many microbial sources of levansucrase such as *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus subtilis* natto (Wu, Chou, & Shih, 2013, Tian, Karboune, & Hill, 2014, Santos-Moriano et al., 2015). *Bacillus subtilis* natto is a good producer of levan reaching 30 to 50 g/L of levan during discontinuous fermentation (Shih, Chen, & Wu, 2010) and up to 98.86 g/L of fructo-oligosaccharides (Silva, Borsato, & Celligoi, 2014b).

The factors influencing fermentation such as medium composition, agitation, pH and temperature affect the production of many metabolites (Silva, Fai, Campos, Basso, & Pastore, 2011, Dominguez et al., 2012). Aeration by dispersion of air bubbles in the culture medium supplies oxygen and maintains cells in suspension. In addition, it enhances heat and mass transfer in the medium, improving FOS production (Aiba, Okabe, & Okada, 1973, Wang et al., 1979). The medium pH strongly influences the transfructosylation activity of levansucrase and its optimal range varies from 6 to 6.5 for *Bacillus* sp. (Tian, Inthanagov, & Karboune, 2011, Belghith et al., 2012).

FOS show many biological properties such as interaction with the gut microbiota (Thakur et al., 2012, Mussatto & Mancilha, 2006, Saad et al., 2013), improvement of mineral adsorption (Lopez, Coudray, Feillet-Coudray, & Demigne, 2000; Fernández et al., 2013), anticancer properties (Zheng et al., 2006; Allsopp et al., 2013; Serban, 2013), immunomodulation (Watzl, Girrbach, & Roller, 2005, Thakur et al., 2012, Kumar, Prashanth, & Venkatesh, 2015, Vogt et al., 2015), production of cytokines (Eiwegger et al., 2004, Zenhom, Hyder, Vrese, Heller, & Roeder, 2011) and signaling of inflammatory events (Homann, Timm, & Seibel, 2012).

However, the interactive mechanism between cells and oligosaccharides are poorly understood. There are some reports of direct interaction between oligosaccharides and cell *in vitro*. Zenhom et al. (2011) demonstrated direct activation of immunity in Caco-2 cells exposed to FOS, by reducing the expression of proinflammatory cytokines. Eiwegger et al. (2010) showed possible systemic effects of FOS by direct interaction with the immune system and with the intestinal cells, and Roller et al. (2004) described oligosaccharides as signaling molecules of inflammation-related processes.

In contrast to these studies, there are reports of direct interaction between oligosaccharides and cell *in vitro* which beneficial effects on the cells were not observed, favoring their use in anti-tumor therapies. Homann et al. (2012) found that pure oligosaccharides are capable of stimulating response to proinflammatory cytokines such as IL-8 and CCL2 *in vitro*, although checking cytokine secretion is dependent on the oligosaccharide and cell type. Xiao et al. (2011) reported *in vitro* inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis in cells HCCLM3, Bel-7402 and HepG2 cells exposed to isomalto-oligosaccharide sulfated.

The metabolic changes caused by cells exposed to oligosaccharides can be very useful to elucidate the mechanisms involved in toxicity and inflammation by comparing treated to untreated cells. In fact many studies on mechanisms of action of drugs are performed based on metabolic profiles (Wu, Cao, Li, Lian, & Zhao, 2015, Bo, Jin, Liu, Yu, & Kang, 2014, Feng, Li, Wu, & Cheng, 2013, Tyagi et al., 2013). Among the metabolites most often evaluated, lactate, glycine and glutamine are important biomarkers of inflammation (Gundersen, Vaagenes, Breivik, Fonnum, & Opstad, 2005, Nguyen et al, 2010, Weiner et al., 2012, Hoque, Farooq, Ghani, Gorelick, & Mehal, 2014).

In this study, fructo-oligosaccharides (FOS) from *Bacillus subtilis* natto were produced, characterized and evaluated for their antiproliferative and proinflammatory effects in OVCAR-3 cells. After the purification and structural identification, the FOS-cell interaction was evaluated developing cytotoxicity and cellular proliferation analysis, expression of genes involved in the inflammatory response and differential metabolite production.

2 Material and Methods

2.1 Microorganism and culture conditions

Bacillus subtilis natto CCT 7712 was isolated from soybeans fermented, a Japanese food called “natto”, at the Department of Biochemistry and Biotechnology, State University of Londrina (Brazil) and identified by André Tosello Institution Foundation (Campinas – Brazil). Microorganism was maintained at 4°C on medium with 50 g/L peptone, 30 g/L meat extract, 20 g/L agar (Silva et al., 2014b).

The inoculum was prepared from the stock cultures which was transferred to Erlenmeyer flask (1L) containing 200 mL medium: 100 g/L sucrose, 2 g/L yeast extract, 2g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$. The medium was sterilized by autoclaving a 115°C for 15 min. The initial pH was adjusted to 7.0. The cultures were incubated at 150 rpm, for 48 h at 37°C. Fermentation medium was inoculated with 0.2 g/L cells for all cultivations.

The fermentation medium was composed of 400 g/L sucrose, 2 g/L yeast extract, 1 g/L KH_2PO_4 , 3 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.6 g/L $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0.2 g/L MnSO_4 , 0.25 g/L ammonium citrate.

2.2 FOS production

To investigate the FOS production were carried fermentations in shake flasks (2L) and in a 4.5-L bioreactor (Bio-Tec, Tecnal, Brazil). The FOS production in 2L shake flasks contained 400 mL of fermentation medium. The incubation was carried out in 234 rpm, 35°C, pH 7.7 for 48 h. Aliquots of cultivation were taken out every 4 hours, centrifuged (9050 x g, 4°C, 15 min) for later assays.

Batch fermentation in bioreactor with working volume of 3L was carried out ranging aeration of 0.2 and 1.0 volumes of air per volume of liquid per minute (vvm) and the pH. Were investigated the effects of control or uncontrolled of pH in bioreactor on FOS production by *B. subtilis*, maintaining the aeration rate fixed at 0.2 (vvm). After was tested increase of aeration at 1.0 vvm with uncontrolled pH. The pH was automatically maintained at 7.7 with acid/base peristaltic pumps with 2 M HCl or 2 M NaOH. The bioreactor was agitated at 150 rpm. Foam was suppressed by sunflower oil addition (Lee & Kim, 2004). Aliquots of fermentations were taken out every 2 hours, centrifuged (9050 x g, 4°C, 15 min) and assayed.

2.3 Determination of carbohydrates and fructo-oligosaccharides

FOS, sucrose, glucose and fructose in the fermentation broth was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu) with a Shimadzu RID-10^a refractive index detector and the column AMINEX Carbohydrate HPX-87C, 300x7.8 mm (Biorad). As eluant in the mobile phase used was water deionized, ultrapure and degassed at 80°C under flow of 0.6 mL/min. The samples injected (20 µL) was filtrated with a 0.45µm membrane (Millipore). The FOS standards 1-kestose (GF₂-504.44 Da) and 1-nystose (GF₃-666.58 Da) were from Sigma-Aldrich. The total FOS production was calculated as the sum of 1-kestose and 1-nystose expressed in g/L.

2.4 Levansucrase assay

Levansucrase activity was assayed by estimating reducing sugar release during the exopolysaccharides (EPS) hydrolysis. The reaction mixture containing 0.25 mL enzyme extract and 0.25 mL 1M sucrose in 0.5 mL 0.2 M acetate buffer at pH 5.0 was incubated at 30°C for 2 h. After 2 h the EPS was precipitated by adding chilled ethanol. The precipitate was hydrolyzed in 1 mL 1 M HCl at 100°C for 1 h, the solution was then neutralized by adding NaOH 2M and the reducing sugars were determined by the Somogyi (1945) and Nelson (1944) methods. The activity was expressed in unit of activity (U/mL) which was defined as the amount of enzyme that released 1 µMol reducing sugar per mL per minute under the experimental conditions.

2.5 Determination of total exopolysaccharides

Total exopolysaccharides (EPS_t) were precipitated from culture sobrenatant with 3 vol of absolute ethanol at 4°C for 12 h, centrifuged at 18.060xg at 4°C for 20 min and hydrolyzed with 0.1 M HCl at 100°C for 1 h (Viikari & Gisler, 1986), neutralized with NaOH 2M and determined by reducing sugars according to Somogyi (1945) and Nelson (1944) methods with fructose as standard.

2.6 Mass spectroscopy

The molecular mass of individual FOS pools was determined by positive electrospray ionization with the following operational conditions: capillary voltage of 4.5 kV, capillary temperature at 200°C, gas flow rate in cone of 0.6L/h and nebulizer pressure of 2 bars. The procedures were performed in a Compact triple-quadrupole ESI-OTOF II instrument (Bruker®, Cologne, Germany). The parameters of ionization of the analytes were obtained by direct injection of their individual 1M standard solutions. Processing of ESI-MS data was performed using Bruker DataAnalysis 4.2 software (Bruker®, Cologne, Germany) and ACD/NMR Processor Academic (ACD/Labs, Toronto, Canada).

2.7 ¹H and ¹³C NMR spectroscopy

NMR spectra (¹H, ¹³C, HSQC e DEPT 135) were recorded on NMR Bruker Mod. Avance III (¹H at 400MHz and ¹³C at 100.6 MHz) in D₂O solution at 25°C equipped with inverse probe (BBI) de 5mm, employing standard Bruker NMR software. NMR experiments were performed using 128 scans and samples were referenced to 0.3125 mM of TMSP (3-(trimethylsilyl)-tetra deuterio-sodium propionate). The residual water peak was suppressed using a presaturation pulse. Coupling constants are reported in Hz and chemical shifts (δ) in ppm. All NMR spectra were phased, baselinecorrected, and calibrated (TMSP at 0.0 ppm) manually using ACD/NMR Processor Academic. The Chenomx NMR Suite Profiler (Evaluation Version, Chenomx Inc., Canada) was used to identify metabolites from the provide NMR spectral library, and confirmation was assigned using previously published data and NMR metabolomics (Lundberg et al., 2005).

2.8 FTIR spectroscopy

FTIR spectra from purified FOS samples were recorded with IRPrestige-21 spectra (Shimadzu®, Kyoto, Japão), and were collected from 400 to 4000 cm⁻¹ wavenumbers with 50 scans per sample. All samples used for infrared measurements were stored in a drying oven for three days at 50°C and in a desiccator overnight over silica gel before measurement.

2.9 Purification

The FOS produced in the best condition was isolated from de crude extract by ultrafiltration using 3kDa regenerated cellulose acetate ultrafiltration membrane (Millipore) under nitrogen pressure. FOS was precipitated from filtrated with 3 vol of absolute ethanol at 4°C for 12 h and centrifuged at 9050 x g, 4°C, 15 min. FOS was dialysed for 24 h with two changes of distilled water. The frozen dialysed was lyophilized for use in the following experiments which was diluted in cell culture medium (DMEM) and filtrated in Millipore 0.22 µM (Millipore).

2.10 Cell culture

Human Ovarian Carcinoma (NIH: OVCAR-3) cell line were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro, Brazil and grown in 25 cm² culture flasks containing Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with antibiotic-antimycotic solution (Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and incubated at 5% CO₂ at 37°C (UV UltraSafe HF 212). For all assays, the cellular culture was maintained under conditions cited for 24 h of stabilization.

2.11 Cytotoxicity assay

The *in vitro* cytotoxicity screening was based on the protocol described by Mosmann (1983). Culture plates of 96 wells (5.10³ cells/well) were incubated at 5% CO₂ and 37°C for 24 h. After this period, OVCAR-3 cells were exposed to 5 - 100 mg/mL of FOS and incubated for 24 h. The absorbance was measured at 540 nm in spectrophotometer (Uniscience, São Paulo, SP, Brazil). Three independent experiments were performed in quadruplicate. The percentage of OVCAR-3 viability cells was calculated according to Huang, Shang, & Zhen (2005). The date of citotoxicity assay was performed with Dunnett's test (p<0.05) using GraphPad Prism® version 5.00 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

2.12 Real Time Cellular Proliferation Analysis

The real time growth kinetics of OVCAR-3 cells was evaluated impedance-based with the Real-Time Cell Analysis (RTCA) system (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). The system used E-plate (96 well) with inter-digitated micro-electrodes on the bottom of the plate for to detect local ionic changes as cells proliferate as a consequence of the impedance. OVCAR cells were placed in E-plate (96 well) with 5.10³ OVCAR-3 cell/well and after 24 h, cells were exposed to 5 – 100 mg/mL of FOS and continuously monitored every 30 min for up to 72 h. OVCAR-3 cells exposed to 3 µM of doxorubicin (DXR) was used a negative control (Adriblastin®, Pharmacia, Italy).

Cell sensor impedance was expressed as an arbitrary unit called the Cell Index (CI). Growth curves were normalized to the CI at the last measured time point

before compound addition for each well. The experiment was done in independent triplicate. Data analyses were using the RTCA software of the xCELLigence system, and calculated the concentration was promoted 50% reduction of CI value relative to control CI value, the CI_{50} (mg/mL).

2.13 Reverse transcriptase - Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

To evaluate the gene expression, OVCAR-3 cells (10^6) were grown for 24 h and were treated with 21 mg/mL of FOS for 24 h. Treatment concentration was based on the analysis of cytotoxicity and kinetic proliferation. RT-qPCR procedures were conducted to according Bustin et al. (2009). Total RNAs were extracted isolated using Trizol LS (Invitrogen, Life Technologies, USA) and RNAase Mini kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Single-stranded complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μ g of total RNA with reverse transcriptase (RT M-MLV, Invitrogen). The RT-qPCR was performed on a PTC 200 DNA Engine Cycler thermocycler using the Chromo 4 detection system (MJ Research BIO-RAD) with 5 μ L of cDNA template and 0.375 μ M of each *forward* and *reverse primer*, which amplified partial regions of the *IL8* (*forward* GTTTTTGAAGAGGGCTGAG, *reverse* TTTGCTTGAAGTTTCACTGG), *TNF- α* (*forward* AGGCAGTCAGATCATCTTC, *reverse* TTATCTCTCAGCTCCACG) and *ER β* (*forward* AAATCTTTGACATGCTCCTG, *reverse* AGGGTACATACTGGAATTGAG) genes. Fragment amplification was detected by the fluorescence emitted by the SYBR Green fluorophore (5 μ L) contained in the SYBR Green qPCR Supermix-UDG kit (Invitrogen, Life Technologies).

The PCR conditions were conducted an initial denaturation step at 50°C for 2 min; 95°C for 3 min; 39 cycles of 95°C for 20 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 20 sec, and a final step consisting of 95°C for 10 sec and 40°C for 1 min. The melting curve analysis was performed at the end of the reaction by increasing the temperature from 50°C to 95°C at 0.5°C intervals every 5 sec. The reactions were performed in two biological replicates and three mechanical replicate. In this study, data were normalized to the *beta-actin* gene (*forward* TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA, *reverse* ACTCCTGCTTGCTGATCCACATCT). The genes relative expression were determined by method of Pfaffl (2001) with the statistical analysis performed using REST-384 software Pfaffl, Horgan, & Dempfle (2002).

2.14 Metabolic Differential Profile

The cell culture for evaluation of metabolites was carried out in 75cm² flasks containing $14.25 \cdot 10^6$ OVCAR-3 cell line. After 24 h cell stabilization were added treatments selected according to the values obtained in cytotoxicity and proliferation assay and compared to cell control (5 and 25 mg/mL of FOS). The experiment was conducted in duplicate. Cellular metabolites was extracted by reagent-grade methanol and chloroform (4°C) in a ratio of 2:1 (v/v, 250 mL/cell pellet) were added on the frozen cell pellets. The cell pellet–solvent was mixture. After approximately 10

min of contact with the first solvents, chloroform and distilled water were added to the cold samples in a ratio of 1:1 (250 mL/cell pellet) to form an emulsion. The samples were centrifuged at 13.000 rpm for 20 min at 4°C. The upper phase (methanol and water) was separated from the lower organic phase and the upper fraction was dried at room temperature by centrifugation under high vacuum. The solvent freeze extracts were suspended D₂O. The metabolic profile spectra were acquired using a RMN Bruker Mod. Avance III spectrometer following item 2.7.

3 Results and Discussion

3.1 Cell growth, kinetics of FOS and levansucrase production

Bacillus subtilis natto was cultivated in shake flask to study FOS, levansucrase and exopolysaccharides production in small scale batch culture, using following fermentative parameters: 240rpm, without aeration and uncontrolled pH. The others three fermentations was carried out in bioreactor utilizing the same conditions as experiment with shake flasks aiming study the influence of controlled pH (Fermentation 2), uncontrolled pH (Fermentation 3) and increase aeration (Fermentation 4) on FOS production, and results were shown in Fig 1.

(Figure 1)

In Fermentation 1 (240 rpm, without aeration and uncontrolled pH), cells grew exponentially after short lag phase (4 h) with 0.16 g/l/h higher growth rate (12 h), reached 2.17 g/l cell mass in 44 h (Fig.1 a1). Then, cells entered stationary phase until the end fermentation. During the active growth phase, the pH decreased gradually reaching about 4.86 after 4 h and kept constant thereafter. However, the nystose was produced in culture in very low rate during early 4 h followed by high production rate in 8 h (15.26 g/l/h) reaching about 146.79 g/l in 24 h and kept stable in culture medium during the cultivation time (Fig.1 a2). In these conditions had no production kestose. The greatest efficiency of production is 76.53% in 8 h. The levansucrase production reached 6,80 U/mL in 32 h, followed by EPS_t production which was present same profile production that enzyme, with high production (207,21 g/L) in 44 h.

In this way, the Fermentation 2 (150 rpm, 0.2 vvm, under controlled pH) pH was kept constant at 7.7 using computerized pH control system. Under this conditions, the largest bacterial biomass (1.44 g/L) was obtained with 44 h of culture, with a decrease from 12 to 26 h (Fig. 1b1), probably due to foam production that was outlined with adding 5 mL of sunflower oil. During the active growth phase, levansucrase and EPS_t were produced in high levels, increased from 22h, reaching 1.54 U/mL (48 h) and 75.45 g/L (44 h) respectively. In parallel to cell growth and enzyme production, FOS was low produced in first 24 h reached only 7.7 g/L (5.72 g/L of nystose and 1.99 of kestose), very low values when compared with Fermentation 1 (146.79) in same period. The production increase after this time with

the higher production of FOS of 55.38 g/L (40.93 g/L of nystose and 14.45 g/L of kestose) in 44 h (Fig. 1b2). This condition showed 26.32% of efficiency in 40 h.

In Fermentation 3 (150rpm, 0.2 vvm, uncontrolled pH) cells grew with significant lag phase (16 h) and maximal cell growth to 0.84 g/L in 48 h. Following the cell growth, levansucrase production was increased only after 18 h Fig. 1c1. The enzyme concentration increased gradually, reached 8.70 U/mL, maximal value in 48 h. The EPS_t production achieved 192.41 g/L in 46 h. After 16 h incubation FOS concentration increased significantly in culture coming the higher rate in 24 h (5.71 g/l/rate) and reached 173.69 g/L maximal concentration in 42 h, with higher efficiency of 76.91% in this time (Fig. 1c2). During the first 16 h, pH kept constant, followed to pH medium dropped from 7.7 to 5.99 kept constant. How shown in Fig. 1c2, glucose concentration reached maximal value of 199.91 g/l in the endpoint, and the high levels of glucose did not inhibit levansucrase.

Previous fermentations were compared and condition without pH control in bioreactor was the best for production of FOS (Fermentation 3). Then, for evaluate the aeration effect on production of FOS, the Fermentation 4 was carried out under the same condition of Fermentation 3 (150 rpm, uncontrolled pH) while aeration rate was increase for 1 vvm. The results were shown at Fig. 1d1 e 1d2. Cells reached active growth phase in 10 h increased at 20 h with maximal values 0.06 g/l/h rate (16 h) and 1.18 g/L (20 h). Then, cell concentration decreased gradually and reached about 0.5 g/l after 48 h. During the exponential growth phase, the pH decreased gradually from 8 h reaching about 5 after 16 h and kept constant thereafter. Like cell growth, levansucrase production increased after 18 h and increased until the endpoint with higher values and 5.56 U/mL (48 h) (Fig. 1d1). FOS and EPS_t production also following this profile behavior, achieved 135.94 g/L (48 h) e 3.03 g/l/h (42 h) ratio of nystose production and 192.41 g/L (48 h) of EPS_t (Fig. 1d2). The efficiency of this condition was 70.91% in 44 h.

In evaluated fermentations in this study, the higher FOS production was observed in Fermentation 3 (0.2 vvm, uncontrolled pH), that reached 173.60 g/L nystose in 42 h, corresponding to 4.13g/L.h⁻¹ of efficiency. In Fermentation 1 (without aeration and uncontrolled pH) in only 8 h FOS productivity reached 15.26 g/L/h. Reports describe productions between 125 and 412 g/L of FOS, however used isolated enzymes (Barthomeuf & Pourrat, 1995) with addition of glucose oxidase (Sheu, Lio, Chen, Lin, & Duan, 2001) or inoculum increase reaching at 200g/L of cells (Ning et al., 2010).

Scale-up production can lead to changes in productivity due to the reactor proportions which affect mass and heat transfer in the medium since a large volume is used. Other additional factors should be considered such as aeration and pH control (Vitolo, 2001).

Despite the nystose yield being similar in flasks (Fermentation 1) and in reactors (Fermentation 3), the culture volume in flasks is a limiting factor for production under these conditions. In addition to that, bioreactors are superior to shaken flasks regarding management of agitation, pH and temperature allowing a higher production (Samson, Manikkandan, & Dhanasekar, 2014).

Therefore, the 76.91% efficiency obtained in Fermentation 3, besides being very similar to the 76.53% efficiency from Fermentation 1, provided a larger quantity of product enabling the biotransformation of sucrose on a large scale. Since industrial scale production in flasks is impractical, the production optimization in stand reactors is very promising because they simulate an industrial process obliterating the limitations associated with scale-up production while keeping it in the laboratory environment (Vitolo, 2001).

The production of many metabolites is significantly affected by fermentation conditions such as agitation, pH and aeration as well as the composition of the culture medium and the microorganism used (Silva-Santisteban & Filho, 2005, Lim, Lee, & Kim, 2006, Vega & Zuniga-Hansen, 2014, Silva, Borsato, & Celligoi, 2014a). These parameters are adjusted according to the microorganism. For fructan synthesis from *Bacillus subtilis* the aeration rates vary from 0.5 to 3 vvm which is not a determining factor for levan production as it was sustained between 59 and 61 g/L under these conditions (Wu et al., 2013, Esawy et al., 2013).

In this study, the aeration rate of 0.2 vvm led to lower biomass quantity and lower pH decrease; nonetheless, under this condition the production of FOS was higher when compared to the fermentation carried out at 1 vvm. In contrast, Wu et al. (2013) obtained higher biomass production values and high molecular weight levan from *Bacillus subtilis* natto at 3 vvm aeration rate in comparison to lower oxygenation conditions. Even though higher oxygenation (1 vvm) slightly increases the production at the beginning of the fermentation, this effect was not sustained throughout the fermentative process. Under both aeration conditions tested, the EPS_t produced was of 192.41 g/L. However, the yield of FOS was higher at 0.2 vvm aeration rate suggesting that the increase in the aeration rate favors the frutans production with higher molecular weight than FOS.

The fermentation medium pH significantly influences the transfructosylation activity of levansucrase and its optimum enzymatic activity is from 6.0 to 6.5 according to the literature. For *B. Amyloliquefaciens* the optimum pH levels reported also varies from 6.0 to 6.5 (Tian et al., 2011) and for *Bacillus* sp. it was reported to be 6.5 (Belghith et al., 2012). Silva et al. (2014b) reported the initial pH of 7.7 as optimum for the biosynthesis of FOS from sucrose by *Bacillus subtilis* natto. Nonetheless when the purified enzyme is used, the ideal pH for FOS synthesis was of 6.0 (Silva et al., 2014a). In Fermentation 2, the pH was maintained at 7.7 preventing medium acidification which is required for optimal enzymatic activity. Such condition may have contributed to decreased levansucrase activity which could explain the higher activity and production of FOS observed in the fermentation where the pH was not controlled (Fermentation 3).

The pH control was reported to be efficient in the production of high molecular weight frutans from *Bacillus subtilis* natto and it was associated with increased biomass and levansucrase production (Esawy et al., 2013). In this study, the slightly alkaline pH (7.7) sustained throughout the cultivation favored the generation of biomass (1.44 g/L in 44h). Nonetheless it impaired FOS production nearly three times when compared to the culture with uncontrolled pH, which reached 154.94 g/L; 5.71

g/L/h in 38h. Under controlled pH, FOS production was of 55.38 g/L; 1.39 g/L/h in 38h.

The pH control had also negatively impacted EPS_t and enzyme production. High levels of free glucose were detected in the medium during all cultivations. The increase in glucose levels is a result of the hydrolytic activity of levansucrase in the medium and it precedes the beginning of FOS formation in all fermentative processes, pointing out the diversion of fructose into FOS and EPS_t synthesis.

From all previous results, it was concluded that the aeration rate of 0.2 vvm and uncontrolled pH favored FOS production. In fact, in Fermentation 3 (150 rpm, 0.2 vvm, uncontrolled pH) such conditions provided nystose production of 173.60 g/L (42h) with 76.91% efficiency.

3.2 FOS characterization

The FOS was first analyzed by HPLC which demonstrated peak with smaller retention time than the nystose standard, what indicates that bigger degree of polymerization (DP) molecules. So, mass spectrometry was realized for identified FOS which chromatographic standards were not available. MS analysis showed presence of FOS molecules until 7 units of monosaccharides (Fig.2). Probably, the only one peak visible in HPLC spectrogram may be due to the drag of small by big molecules.

Mass spectrum of FOS exhibited presence of GF_2 , GF_3 , GF_4 , GF_5 , GF_6 and GF_7 , and the exact mass for each one observed considering the anhydrous fructose terminal with loss of water and Na^+ adductor, as observed by Matias et al. (2011) ($\text{Hexose MW (180)} * \text{DP} - (\text{H}_2\text{O MW (18)} * \text{DP}) + \text{Na MW (23)}$): 509.1568, 671.2120, 833.2654, 995.3169 and 1157.3784. Production of different FOS chain lengths (3 to 15 units of fructose) are reported in other studies, obtaining values close to those found masses (Suzuki et al., 2013; Ronkart et al., 2007). The hexose ion with mass of 203.0558 m/z observed corresponds to the cleavage of oligosaccharides, and free neither glucose or fructose monosaccharides was observed at NMR spectra to contradict this hypothesis (Fig. 2).

(Figure 2)

FOS was well described but the chemical shifts can vary with the length of the oligosaccharide chain, proportion of the Glc_p terminal and reference compound. The fraction FOS described was calibrated internally with TMSP. NMR shown that absence of intense signals between 4.3 and 5.5 ppm (Fig.3c) was an indicative of fructose compound confirmed by presence of an intense signal at 104.3 ppm that disappears on DEPT135 experiment indicating that corresponds to a quaternary carbon, and have not correlations on ^1H - ^{13}C HSQC (Fig. 3d); and presence of two CH_2 signals that appears clearly on DEPT135 at 59.8 and 63.2 ppm.

(Figure 3)

The spectrum of ^1H - ^{13}C HSQC (Fig.3d) show correlations of signals for C1 at 3.74 (duplet of 3.67-3.77) coupled with 59.8 ppm, C3 at 4.21 with 76.1, C4 with 4.09 and 75.1 ppm, C5 at 3.97 and 80.2, and at C6 3.93-3.58 coupled with 63.2 ppm. The fructose could be linked between C1, C2 or C6 and two linear chains are possible, 1)- β -D-Fruf-(2 or 1)- β -D-Fruf-(6. The HMBC (Fig 3.b) show the correlation between the signal 104.3 and the H2 and H2' centered at 3.74 ppm, and no coupling to H6, H6', indicating that the linkage is probably of the type 1)- β -D-Fruf-(2.

The ^1H -NMR (Fig.3 a) shows two small duplets on anomeric region, at 5.42 and 5.4 ppm both with $J = 3.67$, coupled with the signal 92.1 on ^1H - ^{13}C HSQC (Fig. 3d) corresponding to the H1 and C1 of the non reducing end glucopyranose. The linkage of the Glcp could be attributed through ^1H - ^{13}C HMBC spectra, on which could be observed a coupling signal centered at 103.5 ppm with 5.42 ppm corresponding to Fruf-C2 linked to Glcp-C1; no signal corresponding to CH2 expected to ~ 65 ppm was observed on HMBC, as related by Cérantola et al. (2004). For these reasons the probable structure of suggested FOS corresponds to a non reducing end of 1)- β -D-Fruf-(2 \rightarrow 1)-Glcp. The ratio between 5.42 and 4.21 ppm represents the number of monosaccharide units; the proportion of Glcp/Fruf is 0.02:1, incompatible with an expected molecular size bigger than 2k Da, and can be attributed to the 1)- β -D -Fruf non substituted ends.

(Figure 4)

FT-IR spectra of FOS characteristic peaks was observed with intense absorption band in the region of carbohydrates: 1080, 1170 and 1030 cm^{-1} . A comparison with the standard spectrum with other sugars (fructose and glucose), showed the presence of fructose characteristic bands (780, 975, 1050, 1080, 1150, 1330) and glucose (995, 1020, 1050 and 1145) (Fig.4).

3.3 Effects of FOS on cytotoxicity and cell proliferation

To verify FOS–cell interactions, FOS were tested in terms anti-proliferative and proinflammatory properties on OVCAR-3 cell line. The OVCAR-3 cell line is fully characterized and has been indicated to use of investigating mechanisms of cytotoxic drug resistance (Hamilton et al., 1983).

Initially cells OVCAR-3 exposed to the different concentrations of FOS (5-100 mg/mL) had been submitted the cytotoxicity evaluation. FOS reduced significantly cell viability only when OVCAR-3 had been exposed to 75 and 100 mg/mL (Fig. 5). After 24 h of exposition to the FOS, OVCAR-3 cells exposed to 75 and 100 mg/mL of FOS had 25.94% and 28.59% of cellular viability decrease, respectively (Fig.5).

(Figure 5)

In order to confirm the reduction in the cellular proliferation supplied indirectly for the cytotoxicity analysis by MTT, it was investigated real time cell growth kinetics

of OVCAR-3 cells exposed to the FOS. In accordance with the cytotoxicity analysis, in the evaluated period (72 h), all FOS concentrations were reduced cellular proliferation when compared with control. As Fig. 6, quickly after the exposure to 50, 75 and 100 mg/mL of FOS there was a marked decrease of the CI remaining constant up to 72h.

(Figure 6)

The OVCAR-3 cells exposed to 5 mg/mL of FOS had shown highest CI when compared with the others concentrations of FOS utilized, however when compared to control cells the CI was lower. With the data of the cell proliferation kinetics, it was determined the concentration necessary to inhibit 50% of the CI (IC₅₀), which was 21 mg/mL of FOS. So, this concentration was selected for gene expression and differential metabolites analysis.

3.4 Expression of genes involved in proinflammatory response

The developed RT-qPCR showed that 46.7 and 12.4 fold change corresponding to IL8 and TNF- α mRNA of OVCAR-3 respectively, exposed to 21 mg/mL of FOS when compared to OVCAR-3 control cells (Fig. 7). Interestingly, in contrast, in the same conditions, the ER- β mRNA was 0.63 fold change reduced.

(Figure 7)

In this study there was decrease in the OVCAR-3 cells viability exposed to FOS dose dependent manner after then confirmed by RTCA, the decline in cell proliferation. This fact is to according to Lee, Chang, Wu, & Sheu (2015), that the evaluation colorectal cancer cell line Caco-2 exposed to fructooligosaccharide neokestose and verifying the dose-dependent loss of viability. So, it was selected the IC₅₀ for developed the RT-qPCR and differential metabolite analysis.

IL-8, also known as CXCL8, is a powerful inflammation cytokine and has been considering a potent inflammation marker (Rollins, 1997 Castells et al., 2012; Zhou et al., 2014). The differential secretion of CXCL8 was observed in upon oligosaccharide co-cultivation with colorectal epithelial Caco-2 cells (Rollins, 1997). However, the factor responsible for induction of CXCL8 secretion seems to be the presence of the oligosaccharide, as described in some studies that report the length of oligosaccharide backbone as low molecular weight oligosaccharides influencing the release of CXCL8 (Homann et al. 2012).

The signaling of CXCL8 is also known to be induced by other inflammatory signal as TNF- α that promoting the environment inflammatory (Yeh et al., 2001; Zenhom et al., 2011; Chiu; Lin; Ou, 2013). In contrast, the reduced ER- β expressed can be also involve to inflammation process. ER- β reduced expressed or ER- β -negative is link to IL8 and TNF- α inducing expression (Freund et al., 2003). In addition, *in vitro* studies show evidence that ER- β negatively regulate cellular

proliferation and apoptosis, thus may have a protective tumor in breast and prostate (Lazennec, Bresson, Lucas, Chauveau, & Vignon, 2001, Cheng, Lee, Madison, & Lazennec, 2004).

Moreover, the relation between induced CXCL8–*TNF- α* shows a high invasion potential and aggressiveness cellular (Toutirais et al., 2007; Johnson-Henry et al., 2014), which was not observe in this study. This relation led to many studies to use the CXCL8 as marker of poor prognosis increased risk of cancer including ovarian cancer (Ness & Cottreau, 1999). It known that inflammatory conditions are associated with an increased risk of cancer including ovarian cancer (Ness & Cottreau, 1999).

In contrast, this study demonstrated a reduction in cell proliferation (citotoxicity and real-time cell growth kinetics) in OVCAR-3 cells exposed to FOS. Although the study has been *in vivo*, similar results were observed by Lee et al. (2000) that showed CXCL8 production by ovarian tumor cells play a role in reducing the rate of tumor growth mediated by the increased targeting of neutrophil and other mononuclear cells. However, the absence of other cell types that could be recruited leads us to confirm that FOS is the element responsible for triggering the decrease in cell proliferation.

3.5 Differential metabolic profile

Simultaneously with the decrease of cell proliferation and proinflammatory environment, analysis of metabolites profiles have identified a few differences metabolites between OVCAR-3 cells control and exposed to FOS. The metabolites lactate (Lac), acetate (Ac), creatina (Cr), alanine (Ala) and glycine (Gly) had been the ones that had presented distinguishing expression in comparison with the treated cells, being that the treatment of 21 mg/mL of FOS provided in the intracellular environment the reduction of Gly (0.2130 mM – 0.1641 mM), Ac (0,1833 – 0,1724), Lac (0.7296 mM – 0.6730 mM) and Ala (0.1037 mM – 0.0815 mM); and Cr increase (0.0783 mM - 0.605 mM) (Fig.8).

(Figure 8)

Although the difference between amounts of metabolites was subtle in accordance to slight change with the cell proliferation when OVCAR-3 cell were exposed to 21mg/mL FOS. The creatine (Cr) was the only differential metabolite identified increased in this condition. Nevertheless, analysis of metabolites in tumor cells has proven controversy regarding the increase or decrease of creatine (Yanokura & Tsukada, 1982, Yanokura, Sawai, & Tsuruda, 1984, Kinoshita & Yokota, 1997, Patra et al., 2008). Patra et al. (2008) demonstrated relationship between decrease creatine with increase of proliferation of tumor cells. Oppositely, we have identified the increase creatine/pró-inflammation with consequent decreased cell proliferation in OVCAR-3 cell exposed to the FOS.

Metabolites decreased were lactate, glycine and alanine (Lac, Gly, Ala). In contrast to this study, some reports in the literature have demonstrated increases of these three metabolites in tumor cells in the advanced stage of the disease (Koh et al. 1999; Lai et al. 2005; Onda et al., 2006; Hirayama et al., 2009; Jain et al. 2012; Chenette, Rosenthal, & Zaromytidou, 2012; Wang et al. 2013).

Larger amounts of lactate for example, was detected in advanced stages of stomach, oral and rectal cancer (Onda et al., 2006; Hirayama et al., 2009; Wang et al. 2013). It is known that tumor cells prefer metabolize glucose through glycolysis to generate ATP instead of oxidative phosphorylation even in the presence of oxygen (Warburg effect) (Warburg, 1956) and as a consequence an accumulation of lactate, that is able to make the cellular pH acidic environment which would stimulate tumor cell invasion *in vitro*.

They are also reported antioxidant properties (Groussard et al., 2000) and anti-inflammatory properties of lactate (Hoque et al., 2014). Anti-cancer therapies, such as ionizing radiation and quimioterapias induce oxidative stress in target cells. The increased production of reactive oxygen species leads to damage to DNA, RNA and genomic instability. However, the accumulation of antioxidants, such as lactate, can induce resistance to the treatments, generating chemoresistance, and resistance to radiation treatment (Sattler & Muller-Klieser, 2009). Thus, this metabolite can be used as a marker for predicting therapeutic response efficiency (Hirschhaeuser, Sattler, & Mueller-Klieser, 2011), so that the decrease in lactate intracellular environment provides evidence that the treatment is being effective.

Moreover, lactate induces significant reduction of IL-1, an important pro-inflammatory cytokine. It has been demonstrated that pre and post treatment hepatocytes strongly suppressed inflammation, which demonstrated great potential as therapeutic (Hoque et al., 2014). In cells treated with FOS reduction of lactate levels indicates the treatment efficiency in reducing cell proliferation by not suppressing the local inflammation.

As for glicyne, some reports show the increase of glycine is related to higher proliferation rate and poor prognosis of cancer, representing an attractive target for developing anti-cancer therapies (Koh et al., 1999, Jain et al., 2012, Chenette et al., 2012).

In inflammatory conditions, it was observed that increasing glycine causes the decrease of TNF- α and other inflammatory mediators, reducing inflammatory conditions in hepatocytes (Qu et al., 2002). The absence or reduction of this metabolite therefore has the opposite effect. Thus, the decrease in OVCAR glycine cells treated with FOS shows the correlation of the reduction of this metabolite with increased inflammatory response mediated by TNF- α and the decrease of proliferation.

The acetate has anti-inflammatory action through inhibition of TNF- α , representing a cell protection factor to injury (Tedelind et al., 2007). The OVCAR-3 cell exposure to FOS afforded the acetate reduction and subsequent increase in TNF- α expression.

Some amino acids such as valine, leucine, glutamine, serine, lysine and alanine are found in greater amounts in tumor cells when compared to non-tumor cells (Lai et al. 2005; Hirayama et al. 2009; Wang et al. 2013).

Alanine is one of the essential metabolites to the cells and is involved in a series of reactions of primary metabolism. The alanine increase is related to the occurrence of cancer, such as prostate, and is related to increased glycolysis and biosynthesis of the membrane. Increased alanine is a product of lipogenesis since this support transamination with glutamate oxidation, which provides the carbon necessary for lipogenesis generating lactate to pyruvate oxidation, or used directly for protein synthesis. Therefore, the reduction of this metabolite may indicate a decrease of the primary cell metabolism (Albers et al., 2015).

So, in this study the fall of homeostasis in OVCAR-3 cells exposed to FOS detected by the pro-inflammatory response associated with differential metabolites led to loss of cell proliferation, being the FOS a strong target for future studies related to therapeutic processes.

5 Conclusion

The best FOS production was 173.6 g/L in 3L-bioreactor, sucrose medium, aeration of 0.2 vvm and uncontrolled pH. The largest levansucrase activity was 8,70 $\mu\text{mol/mL/min}$, showing that the low aeration and pH control does not positively influence the production of FOS. Purification and characterization of FOS obtained confirmed the presence of the type β glycosidic linkages (2 \rightarrow 1) with degree of polymerization ranging from GF₂ to GF₆, mainly GF₃ (nystose). The FOS-OVCAR-3 cell interactions, provided alteration in gene expression (*IL-8*, *TNF- α* and *ER- β*) involved in pro-inflammatory response and change in the amount of some metabolites (Cr, Lac, Gly, Ala). Both factors contributed fall of cellular homeostasis and consequent decline in cell proliferation. The FOS obtained of *Bacillus subtilis natto* is a good target for therapeutic studies.

Acknowledgement

This research was financial supported by CAPES (Brazil).

References

- Abdel-Fattah, A.F., Mahmoud, D.A.R., & Esawy, M.A.T. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymatic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, 51, 402-407.
- Aiba, S., Okabe, M., & Okada, M. (1973). Modified complex method as applied to optimization of aeration and agitation in fermentation. *Journal Fermentation Technology*, 51(8), 594-605.
- Albers, R.B., Chen, P.A., & Charles H. (2008). Cunningham et al. Hyperpolarized ¹³C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading mark. *Cancer Research*, 68 (20), 8607-8615.
- Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Oyarzábal, I.S., Gill, C., & Rowland, I. (2013). An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, 22, 38-44.
- Barthomeuf, C., & Pourrat, H. (1995). Production of high-content fructooligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. *Biotechnology Letters*, 17, 57-64.
- 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(2), 451-8.
- Bo, Y., Jin, C., Liu, Y., Yu, W., & Kang, H. (2014). Metabolomic analysis on the toxicological effects of TiO₂ nanoparticles in mouse fibroblast cells: from the perspective of perturbations in amino acid metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24(7), 461-469.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Hugget, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- Castells, M., Thibault, B., Mery, E., Golzio, M., Pasquet, M., Hennebelle, I., Bourin, P., Mirshahi, M., Delord, J. P., Querleu, D., & Couderc, B. (2012). Ovarian ascites-derived hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer letters*, 326(1), 59-68.
- Cérantola, S., Kervarec, N., Pichon, R., Magné, C., Bessieres, M. A., & Deslandes, E. (2004). NMR characterisation of inulin-type fructooligosaccharides as the major water-soluble carbohydrates from *Matricaria maritima* (L.). *Carbohydrate Research*, 339(14), 2445-2449.
- Chenette, E. J., Rosenthal, C. K., Bot, N. L., & Zaromytidou, A.-I. (2012). Glycine fuels cancer cells. *Nature Cell Biology*, 14(7), 658, 2012.
- Cheng, J., Lee, E.J., Madison, L.D., & Lazennec, G. (2004). Expression of estrogen receptor beta in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Letters*, 566(1-3), 169-172.
- Dominguez, A., Nobre, C., Rodrigues, L. R., Peres, A. M., Torres, D., Rocha, I., Lima, N., & Teixeira, J. (2012). New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate polymers*, 89(4), 1174-9.
- Eiwegger, T., Stahl, B., Schmidt, J., Boehm, G., Gerstmayr, M., Pichler, J., Dehlink, E., Loibichler, C., Urbanek, R., & Szépfalusi, Z. (2004). Human milk-derived

oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric Research*, 56, 536-540.

Eiwegger, T., Stahl, B., Haidl, P., Schmitt, J., Boehm, G., Dehlink, E., Urbanek, R., & Szépfalusi, Z. (2010). Prebiotic oligosaccharides : In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology*, 21, 1179–1188.

Esawy, M. A., Amer, H., Gamal-Eldeen, A. M., El Enshasy, H. A., Helmy, W. A., Abo-Zeid, M. A., Malek, R., Ahmed, E. F., & Awar, G. E. (2013). Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 578–87.

Euzenat, O., Guibert, A., & Combes, D. (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochemistry*, 32(3), 237–243.

Feng, J., Li, J., Wu, H., & Chen, Z. (2013). Metabolic responses of HeLa cells to silica nanoparticles by NMR based metabolomic analyses. *Metabolomics*, 9, 874- 886.

Fernández, E. C., Rajchl, A., Lachman, J., Čížková, H., Kvasnička, F., Kotíková, Z., Milella, L., & Voldřich, M. (2013). Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short- and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 80–86.

Freund, A., Chauveau, C., Brouillet, J., Lucas, A., Lacroix, M., Licznar, A., Vignon, F., & Lazennec, G. (2003). IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor negative status of breast cancer cells. *Oncogene*, 22, 256-265.

Groussard, C, Morel, I, Chevanne, M, Monnier, M, Cillard, J, & Delamarche, A. (2000). Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *Journal of Applied Physiology*, 89, 169–75.

Gundersen, R. Y., Vaagenes, P., Breivik, T., Fonnum, F., & Opstad, P. K. (2005). Glycine — an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand*, 49, 1108–1116.

Hamilton, T.C., Young, R.C., Mckoy, W.M., Groezinger, K.R., Greem, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R., & Ozols, R.F. (1983). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research*, 43, 5379–5389.

Hirayama A., Kami K., Sugimoto M., Sugawara M., Toki N., Onozuka H., Kinoshita T., Saito N., Ochiai A., & Tomita M. (2009). Quantitative metabolome profiling of colon and stomach câncer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Research*, 69, 4918-4925.

Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate : a metabolic key player in cancer. *Cancer research*, 71(22), 6921–6925.

Homann, A., Timm, M., & Seibel, J. (2012). Chemo-enzymatic synthesis and *in vitro* cytokine profiling of tailor-made oligofructosides. *BMC Biotechnology*, 12(90), 1-7.

Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F., & Mehal, W. Z. (2014). Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-Like. *Gastroenterology*, 146(7), 1763–1774.

- Huang, Y.H., Shang, B.Y., & Zhen, Y.S. (2005). Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. *World Journal of Gastroenterology*, 11(26), 3980-3984.
- Jain V., Nilsson R., Sharma S., Madhusudhan N., Kitami T., Souza A.L., Kafri R., Kirschner M.W., Clish C.B., & Mootha V.K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, 336, 1040-1044.
- Jalan, N., Varshney, L., Misra, N., Paul, J., Mitra, D., Rairakhwada, D.D., Bhatena, Z., & Kumar, V. (2013). Studies on production of fructo-oligosaccharides (FOS) by gamma radiation processing of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 365–70.
- Johnson-Henry, K. C., Pinnell, L. J., Waskow, A. M., Irrazabal, T., Martin, A., Hausner, M., & Sherman, P. M. (2014). Short-chain fructo-oligosaccharide and inulin modulate inflammatory responses and microbial communities in Caco2-bbe cells and in a mouse model of intestinal injury. *The Journal of Nutrition*, 144, 1725–1733.
- Kinoshita, Y., & Yokota, A. (1997). Absolute concentrations of metabolites in human brain tumors using in vitro proton magnetic resonance spectroscopy. *RMN in Biomedicine*, 10, 2–12.
- Koh T.J., Dockray G.J., Varro A., Cahill R.J., Dangler C.A., Fox J.G., & Wang T.C. (1999). Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 1119-1126.
- Kumar, V.P., Prashanth, K.V.H., & Venkatesh, Y.P. (2015). Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (*Allium cepa*). *Carbohydrate polymers*, 117, 115–122.
- Lai H.S., Lee J.C., Lee P.H., Wang S.T., & Chen W.J. (2005). Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Seminars in Cancer Biology*, 15, 267-276.
- Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C., & Vignon, F. (2001). ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*, 142, 4120–4130.
- Lee S-M., Chang J-Y., Wu J-S., & Sheu D-C. (2015). Antineoplastic effect of a novel chemopreventive agent, neokestose, on the Caco-2 cell line via inhibition of expression of nuclear factor-kB and cyclooxygenase-2. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1114-1118, 2015.
- Lee, B., & Kim, E. (2004). Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 639-647.
- Lee, L., Hellendall, R.P., Wang, Y., Haskill, J.S., Mukaida, N., Matsushima, K., & Ting, J.P.Y. (2000). IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *The Journal of Immunology*, 164, 2769-2775.
- Lim, J. S., Lee, J. H., Kim, J. M., Park, S. W., & Kim, S. W. (2006) Effects of Morphology and Rheology on neo-fructosyltransferase production by *Penicillium citrinum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(2), 100–104.
- Lopez, H. W., Coudray, C., Feillet-Coudray, C., Demigne, C., & Re, C. (2000). Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 2863, 500–508.

- Lundberg, P., Vogel, T., Malusek, A., Lundquist P.-O., Cohen, L., & Dahlqvist, O. (2005). MDL - The Magnetic Resonance Metabolomics Database (mdl.imv.liu.se), ESMRMB, Basel, Switzerland.
- Matías, J., González, J., Royano, L., & Barrena, R. A. (2011). Analysis of sugars by liquid chromatography-mass spectrometry in Jerusalem artichoke tubers for bioethanol production optimization. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 2006–2012, 2011.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, 65, 55-63.
- Mussatto, S.I., & Mancilha, I. M. (2007). Nondigestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, 68, 587-597.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, 84, 375-380.
- Ness, R.B., & Cottreau, C. (1999). Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 1459-1467.
- Nguyen, H.B., Loomba, M., Yang, J.J., Jacobsen, G., Shah, K., Otero, R.M., Suarez, A., Parekh, H., Jaehne, A., & Rivers, E.P. (2010). Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Journal of Inflammation*, 7(6), 1–11.
- Ning, Y., Wang, J., Chen, J., Yang, N., Jin, Z., & Xu, X. (2010). Production of neo-fructooligosaccharides using free-whole-cell biotransformation by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource technology*, 101(19), 7472–7478.
- Onda T., Uzawa K., Endo Y., Bukawa H., Yokoe H., Shibahara T., & Tanzawa H. (2006). Ubiquitous mitochondrial creatine kinase down regulated in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 94, 698-709.
- Park, H.E., Park, N.H., Kim, M.J., Lee, T.H., Yang, J.Y., & Cha, J. (2003). Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATC 15953. *Enzyme Microbial Technology*, 32, 820-827.
- Patel, S., & Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1119–1128.
- Patra, S., Bera, S., Sinharoy, S., Ghoshal, S., Ray, S., Basu, A., Schlattner, U., Wallimann, T., & Ray, M. (2008). Progressive decrease of phosphocreatine, creatine and creatine kinase in skeletal muscle upon transformation to sarcoma. *The FEBS Journal*, 275(12), 3236–47.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 2002-2007.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30, 9-36.
- Qu, W, Ikejima, K, Zhong, Z, Waalkes, M.P., & Thurman, R.G. (2002). Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic

parenchymal cells. *The American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283, 6, 1249-1256.

Roller, M., Rechkemmer, G., & Watzl, B. (2004). Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *Journal of Nutrition*, 134, 153–156.

Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood*, 90, 909-928.

Ronkart, S. N., Blecker, C. S., Fourmanoir, H., Fougnyes, C., Deroanne, C., Van Herck, J.-C., & Paquot, M. (2007). Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis. *Analytica Chimica Acta*, 604(1), 81–7.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., & Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, 50(1), 1–16.

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*, In press, 1–29.

Sattler, U. G., & Mueller-Klieser, W. (2009). The anti-oxidant capacity of tumour glycolysis. *International Journal of Radiation Biology*, 85, 963–71.

Serban, D. E. (2013). Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, 345(2), 258-270.

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.

Shih, I., Chen, L., & Wu, J. (2010). Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 111–117.

Silva, J. B., Fai, A. E. C., Santos, R., Basso, L. C., & Pastore, G. M. (2011). Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. *Procedia Food Science*, 1, 1547–1552.

Silva, J. B. Síntese de fructooligosacarídeos pela biotransformação da sacarose por micro-organismos osmofílicos. 2014. 166 fls. Doutorado (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 2014.

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(27), 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 of Food Technology*, 9(3), 144–150.

Silva-Santisteban, B. O. Y. & Filho, F. M. (2005). Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 717–724.

Somogy, M.A. (1945). A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, 160, 61-68.

- Suzuki, T., Maeda, T., Grant, S., Grant, G., & Sporns, P. (2013). Confirmation of Fructans biosynthesized in vitro from [1-13C]glucose in asparagus tissues using MALDI-TOF MS and ESI-MS. *Journal of Plant Physiology*, 170(8), 715–22.
- Tedelind, S., Westberg, F., Kjerrulf, M., & Vidal, A. (2007). Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate : A study with relevance to inflammatory bowel disease. *Clinical Research*, 13(20), 2826-2832.
- Thakur, M., Connellan, P., Deseo, M.A., Morris, C., Praznik, W., Loeppert, R., & Dixit, V.K. (2012). Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd. *International journal of biological macromolecules*, 50(1), 77–81.
- Tian, F., Inthanavong, L., & Karnoune, S. (2011). Purification and characterization of levansucrases from *Bacillus amyloliquefaciens* in intra- and extracellular forms useful for the synthesis of levan and fructooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 75(10), 1929-1938.
- Tian, F., Karboune, S., & Hill, A. (2014). Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 121, 1–9.
- Tyagi, R., Rana, P., Gupta, M., Khan, A.R., Bhatnagar, D., Bhalla, P.J.S., Chaturvedi, S., Tripathi, R.P., & Khushu, S. (2013). Differential biochemical response of rat kidney towards low and high doses of NiCl₂ as revealed by NMR spectroscopy. *Journal of Applied Toxicology*, 33(2), 134–141.
- Vega, R., & Zuniga-Hansen, M. E. (2014). A new mechanism and kinetic model for the enzymatic synthesis of short-chain fructooligosaccharides from sucrose. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 158–165.
- Viikari L, & Gisler R. (1986) By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, 23, 240-244.
- Visnapuu, T., Mardo, K., & Alamäe, T. (2015). Levansucrases of a *Pseudomonas syringae* pathovar as catalysts for the synthesis of potentially prebiotic oligo- and polysaccharides. *New Biotechnology*, In press.
- Vitolo, M. (2001). Reatores com enzimas imobilizadas. In E. Aquarone, W. Borzani, W. Schmidell, & U. A. Lima (1st ed.), *Biotechnologia Industrial*. (pp. 373-396). São Paulo: Edgard Blucher Ltda.
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faasa, M., Smelt, M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H.A., & De Vos, P. (2015). Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 414–36.
- Wang, H., Wang, L., Zhang, H., Deng, P., Chen, J., Zhou, B., Hu, J., Zou, J., Lu, W., Xiang, P., Wu, T., Shao, X., Li, Y., Zhou, Z., & Zhao, Y-L. (2013). 1H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue. *Molecular Cancer*, 12(122), 1-12.
- Wang, D. I. C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A. E., Lilly, M. D. (1979). *Fermentation and Enzyme Technology*. (1st ed.) New York: John Wiley & Sons, (pp. 374).
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-314.
- Watzl, B., Girrbach, S., & Roller, M. (2005). Inulin, oligofructose and immune-modulation . *British Journal of Nutrition*, 93(1), 49–55.

- Weiner, J., Parida, S. K., Maertzdorf, J., Black, G. F., Repsilber, D., Telaar, A., Mohny, R. P., Arndt-Sullivan, C., Ganoza, C. A., Faé, K. C., Walzl, G., & Kaufmann, S. H. E. (2012). Biomarkers of inflammation, immunosuppression and stress with active disease are revealed by metabolomic profiling of tuberculosis patients. *PLoS One*, 7(12).
- Wu, F.-C., Chou, S.-Z., & Shih, I.-L. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis natto* in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 846–853.
- Wu, H., Cao, L., Li, F., Lian, P., & Zhao, J. (2015). Multiple biomarkers of the cytotoxicity induced by BDE-47 in human embryonic kidney cells. *Chemosphere*, 126, 32-39.
- Xiao, C., Tao, Z., Guo, L., Li, W., Wang, J., Sun, H., Wang, L., Tang, Z., Fan, J., & Wu, W. (2011). Isomalto oligosaccharide sulfate inhibits tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice. *BMC cancer*, 11(150), 1-11.
- Yanokura, M., Sawai, Y., & Tsukada, K. (1984). The uptake of creatine by various tissues from a mouse bearing tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 797, 94–98.
- Yanokura, M., & Tsukada, K. (1982). Decrease activities of glycine and guanidinoacetate methyltransferases and increased levels of creatine in tumor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 104(4), 1464–1469.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(2), 107–117.
- Zenhom, M., Hyder, A., Vrese, M., Heller, K. J., & Roeder, T. (2011). Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPAR γ and Peptidoglycan Recognition Protein 3¹⁻³. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 971–977.
- Zheng, S., Steenhout, P., Kuiran, D., Qihong, W., Weiping, W., Hager, C., Haschke, F., & Clemens, R.A. (2006). Nutritional support of pediatric patients with cancer consuming an enteral formula with fructooligosaccharides. *Nutrition Research*, 26(4), 154–162.
- Zhou, F., Wang, W., Xing, Y., Wang, T., Xu, X., & Wang, J. (2014). NF- κ B target microRNAs and their target genes in TNF α -stimulated HeLa cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(4), 344–54.

List of Figure Captions

Figure 1 - Kinetics of cell growth, FOS, levansucrase production during cultivation of *Bacillus subtilis* natto in different cultivations conditions. **(a)** Fermentation 1: shake flasks, 7.7 pH; **(b)** Fermentation 2: reactor, controlled pH, 0,2 vvm ; **(c)** Fermentation 3: reactor, uncontrolled pH, 0,2 vvm; **(d)** Fermentation 4: reactor, uncontrolled pH, 1,0 vvm. **(1)** Kinetics of cell growth, levansucrase and EPS_t production. **(2)** FOS and others carbohydrates production and consume of sucrose.

Figure 2 - Mass spectra of FOS from *Bacillus subtilis* natto.

Figure 3 - RMN spectra: **(a)** ¹H-RMN, **(b)** HMBC, **(c)** ¹³C-RMN, **(d)** ¹H-¹³C HSQC.

Figure 4 - FT-IR spectra obtained of FOS from *Bacillus subtilis* natto.

Figure 5 - Percent cell viability of OVCAR-3 strain obtained according to the evaluation of cytotoxicity after 24 hours treatment with FOS. The percentage of cell viability was calculated from the absorbance values obtained in cytotoxicity assay. The inducing agent was damage doxorubicin (DXR, Adriblastin, Pharmacia). Control: OVCAR -3 cells without exposure to the FOS. The bars represent the standard deviations obtained from three independent experiments. Statistical differences: * p < 0.05 compared to control OVCAR -3 cells by Dunnett's test.

Figure 6 – Cell proliferation kinetics in real time of OVCAR-3 cells after FOS treatment for 72 h.

Figure 7 - Relative expression of genes *IL-8*, *TNF-α* e *ERβ* after 24 h of FOS treatment (21 mg/mL) in OVCAR-3 cells. Data were normalized with *β-actin* gene. Control: OVCAR-3 cell + DMEM culture medium. Statistically significant difference was performed as REST-384 software parameters (Pfaffl et al., 2002).

Figure 8 - Differential metabolic profile of OVCAR-3 cells exposed to FOS compared to the control. **(a)** Profile of overall metabolic control OVCAR-3 cells and exposed to FOS (21 mg/mL). The main metabolites have been identified by differential expression: lactate (Lac), acetate (Ac), alanine (Ala), creatine (Cr) and glycine (Gly). The remaining graphs represent differential expression of these metabolites: **(b)** acetate; **(c1 and c2)** lactate; **(d)** glycine; **(e)** alanine; **(f1 and f2)** creatine.

Figures

Figure 1

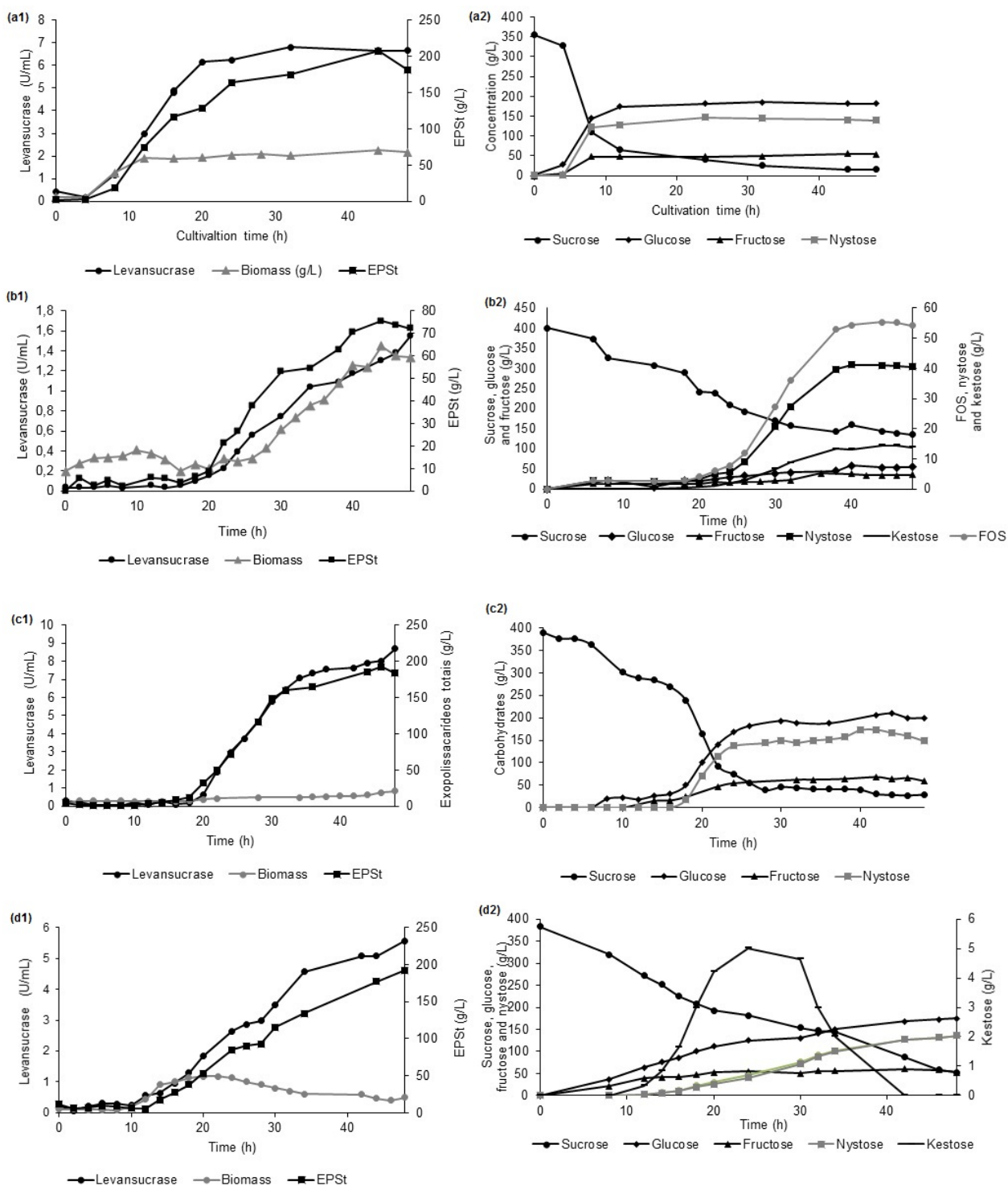


Figure 2

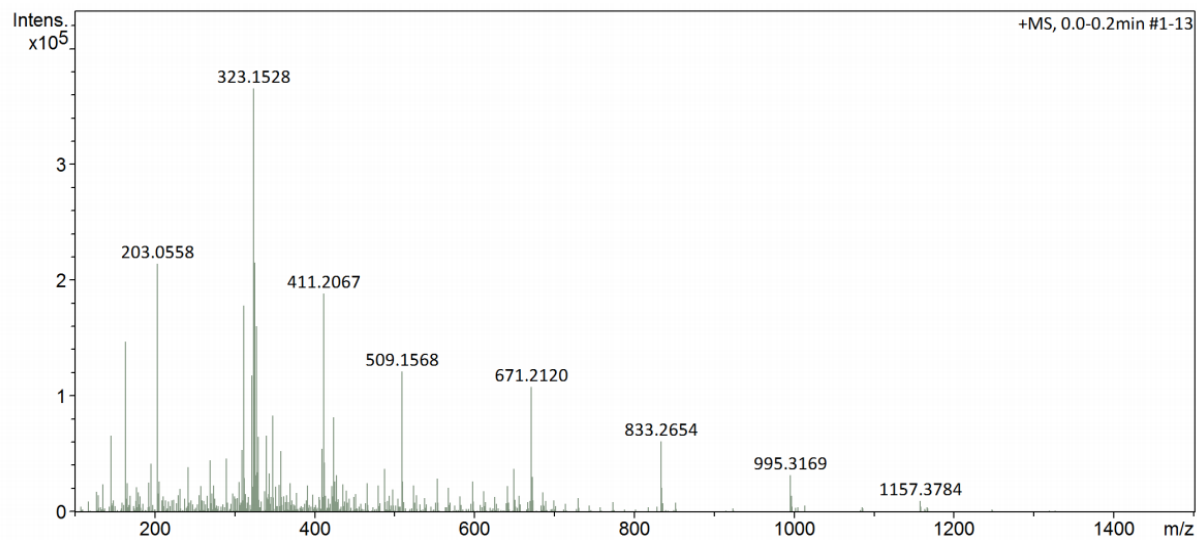


Figure 3

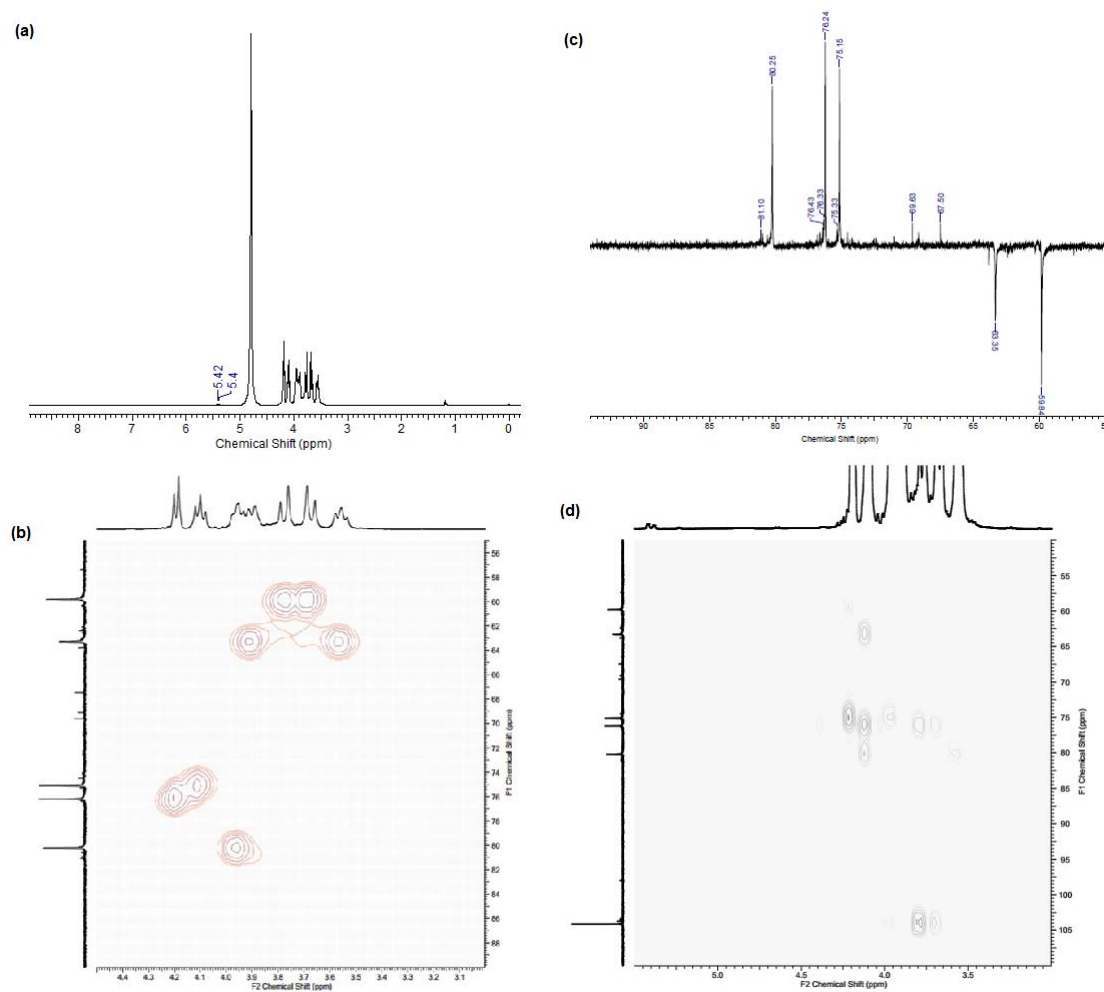


Figure 4

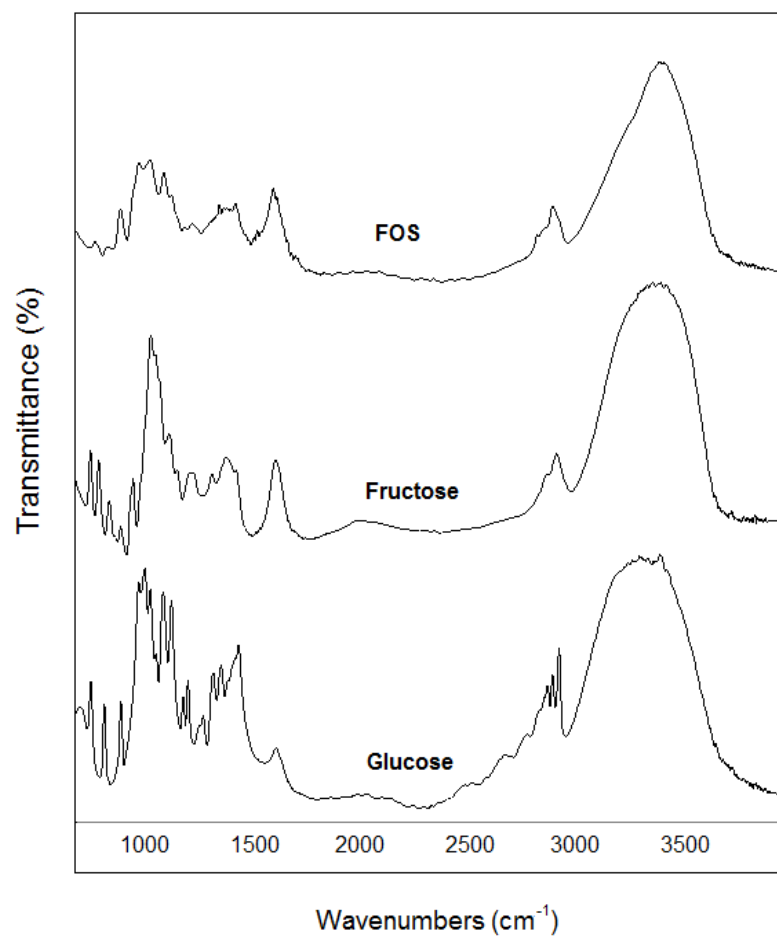


Figure 5

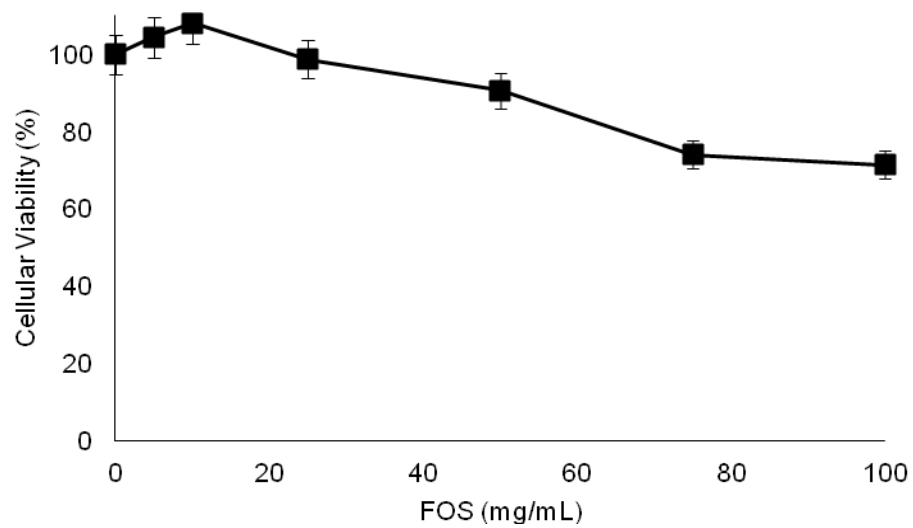


Figure 6

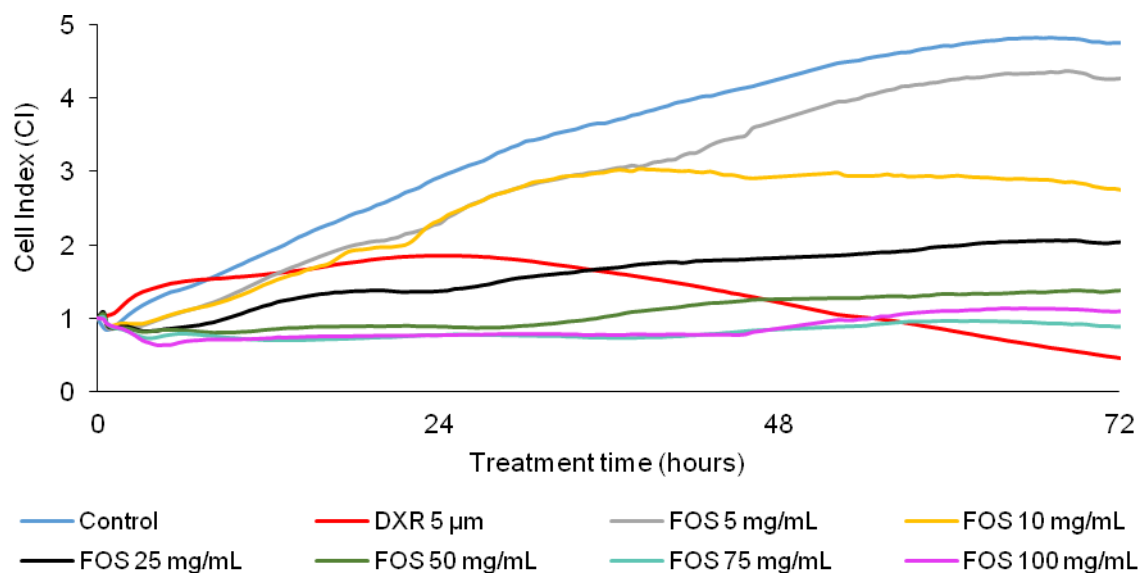


Figure 7

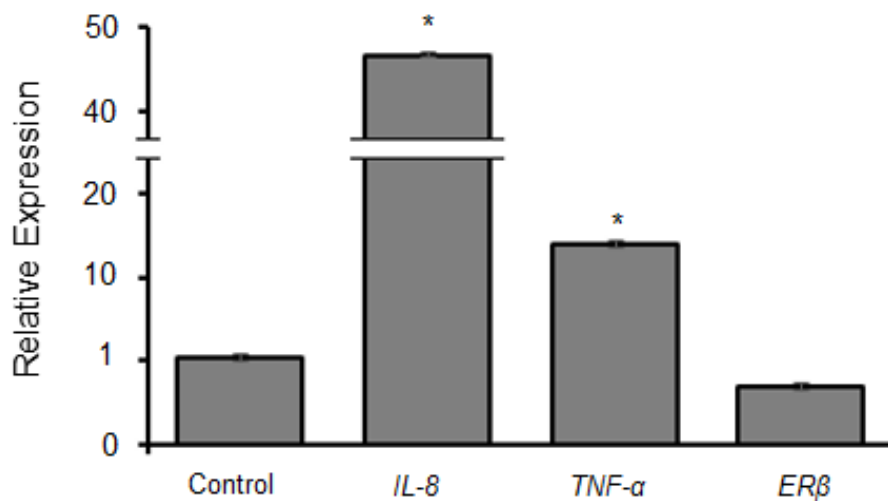
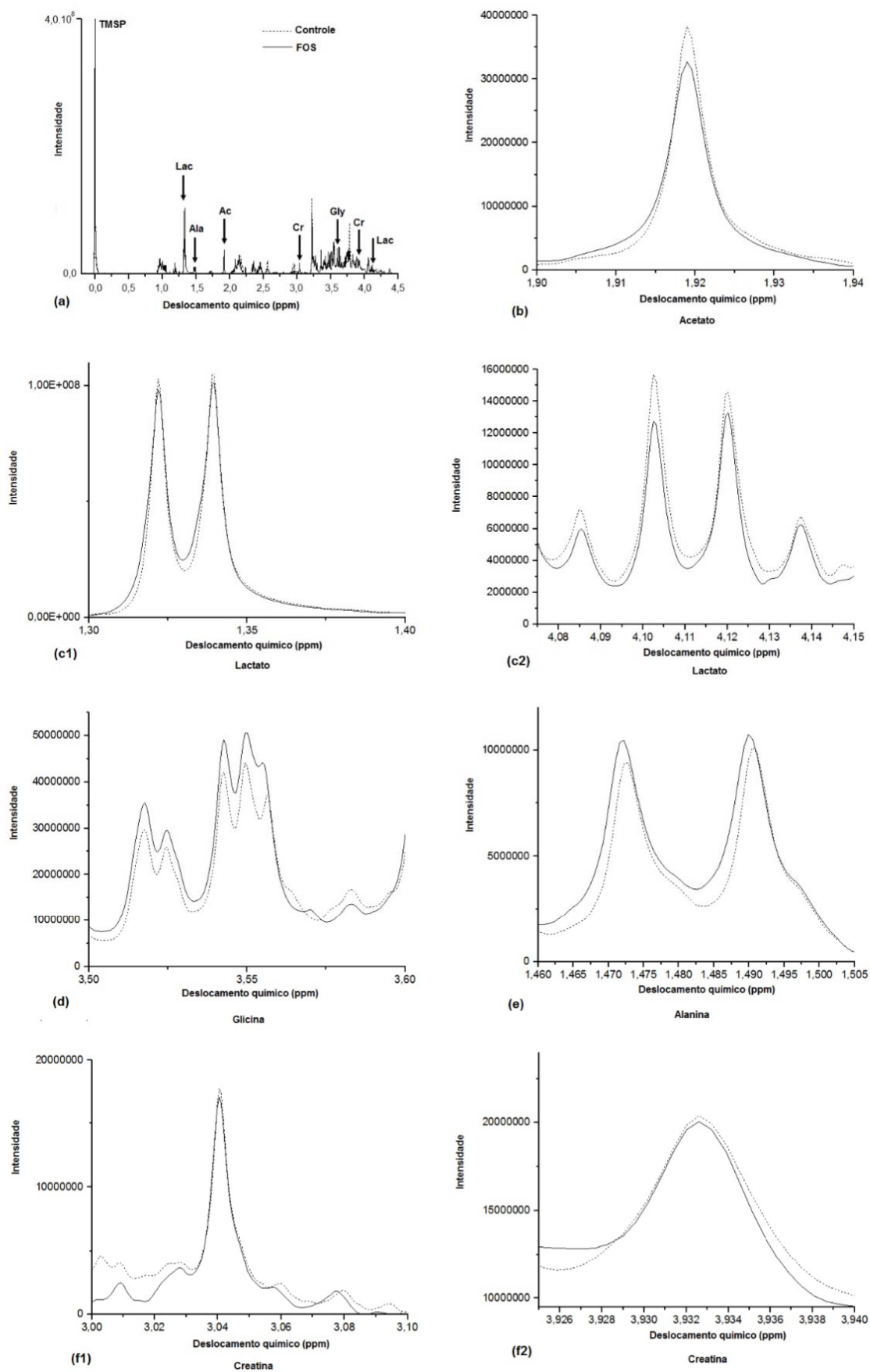


Figure 8



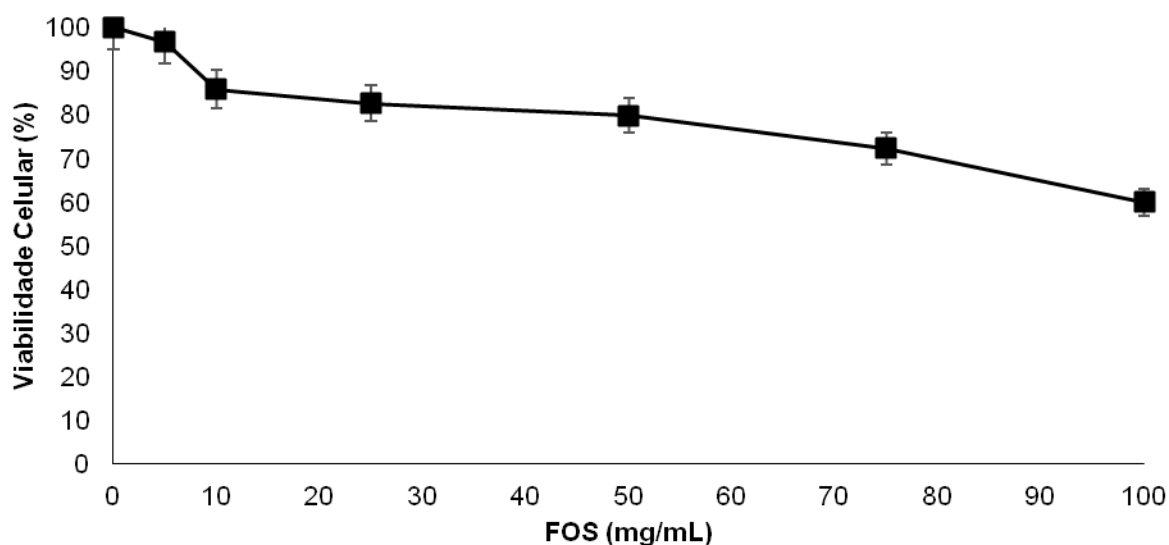
5.2 RESULTADOS COMPLEMENTARES

5.2.1 Avaliação das Interações do FOS com Células de Carcinoma Hepatocelular Humano (HepG2/C3A)

Após o estabelecimento dos parâmetros visando à melhor produção de FOS, foram avaliados os efeitos sinalizadores desencadeados por células de carcinoma hepatocelular expostas ao FOS. As células HepG2/C3A, são células metabolizadoras e portanto, resistentes a muitos compostos.

Numa primeira análise as células HepG2/C3A expostas às diferentes concentrações de FOS foram submetidas a avaliação de citotoxicidade. Nenhuma alteração significativa foi observada após 24 horas de exposição ao FOS (Figura 6).

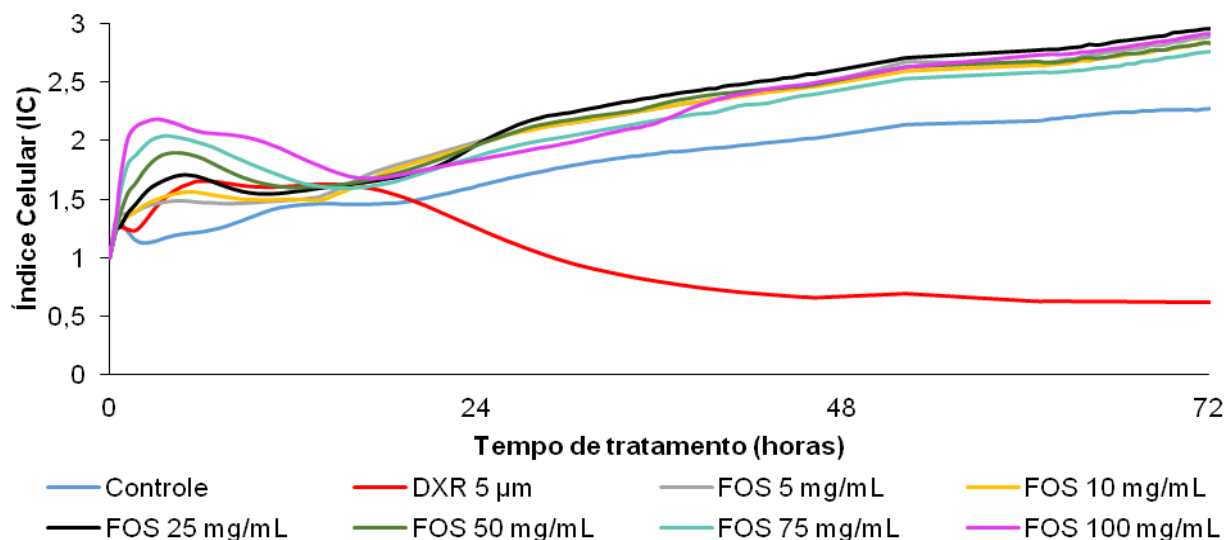
Figura 6 - Porcentagem de viabilidade celular da linhagem HepG2/C3A obtida conforme avaliação de citotoxicidade após 24 horas de tratamento com FOS



A porcentagem de viabilidade celular foi calculada a partir dos valores de absorvância obtidos da análise de citotoxicidade. O agente indutor de danos foi a doxorubicina (DXR Adriblastin, Pharmacia). **Controle:** células HepG2/C3A sem exposição ao FOS. As barras representam os desvios padrão obtido de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas: * $p < 0.05$ comparado com células HepG2-C3A controle, pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

De acordo com dados de citotoxicidade e viabilidade celular, a cinética de crescimento celular em tempo real (RTCA) de células HepG2/C3A expostas às diferentes concentrações de FOS por 24 horas, também não resultou em alterações significativas (Figura 7).

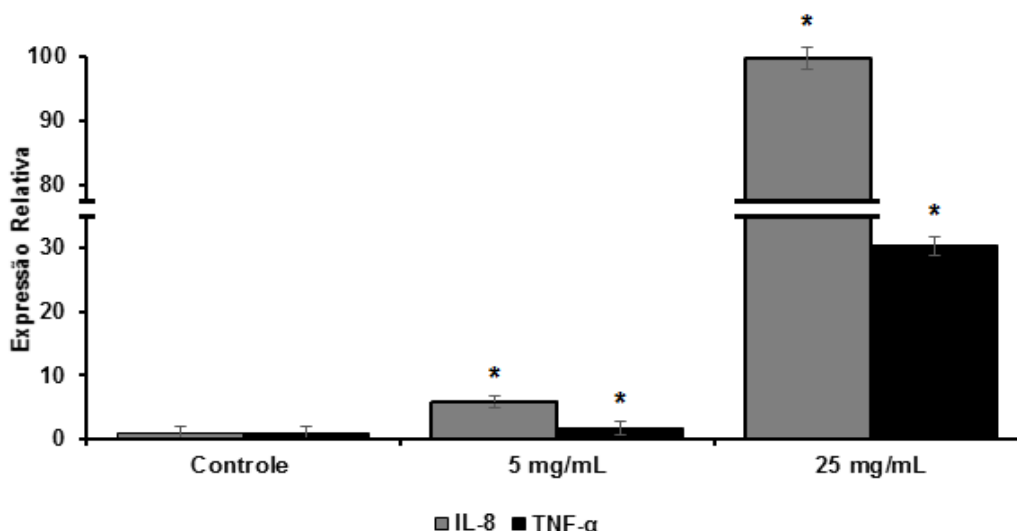
Figura 7 - Cinética de proliferação celular em tempo real da linhagem HepG2/C3A após tratamentos com FOS durante 72h



No entanto, a verificação de possíveis alterações da expressão de genes envolvidos na resposta pró-inflamatória foi realizada a partir de 5 mg/mL e 25 mg/mL de FOS. Devido à ausência de alterações significativas relativas à citotoxicidade e cinética de proliferação celular em tempo real, ambas as concentrações foram selecionadas a partir dos valores limitados pela ANVISA quanto à ingestão de oligossacarídeos e com base em estudos, como Xiao et al. (2011) que observaram *in vitro* (incluindo células HepG2) inibição da proliferação celular causado por exposição a oligossacarídeo sulfatado.

Conforme os critérios selecionados quanto às concentrações de FOS, foi desenvolvido a RT-qPCR a fim de verificar indicativos de possíveis alterações relacionadas ao efeito pró-inflamatório. Neste sentido, observou-se que células HepG2/C3A expostas a 5 mg/mL e 25 mg/mL de FOS por 24 h, tiveram alteração da expressão gênica correspondente ao RNA mensageiro de *IL-8* e *TNF-α* quando comparas às células HepG2/C3A controle. A expressão relativa do transcrito *IL-8* foi 5,9 e 101,2 vezes maior quando as células HepG2/C3A foram expostas a 5 mg/mL e 25 mg/mL de FOS, respectivamente (Figura 19). Quanto ao transcrito *TNF-α* a alteração da expressão foi de 1,81 e 30,5 vezes maior com a exposição a 5 mg/mL e 25 mg/mL de FOS, respectivamente (Figura 8).

Figura 8 - Expressão relativa dos genes IL-8 e TNF- α após 24 h de tratamento com FOS nas concentrações de 5 e 25 mg/mL em células HepG2-C3A



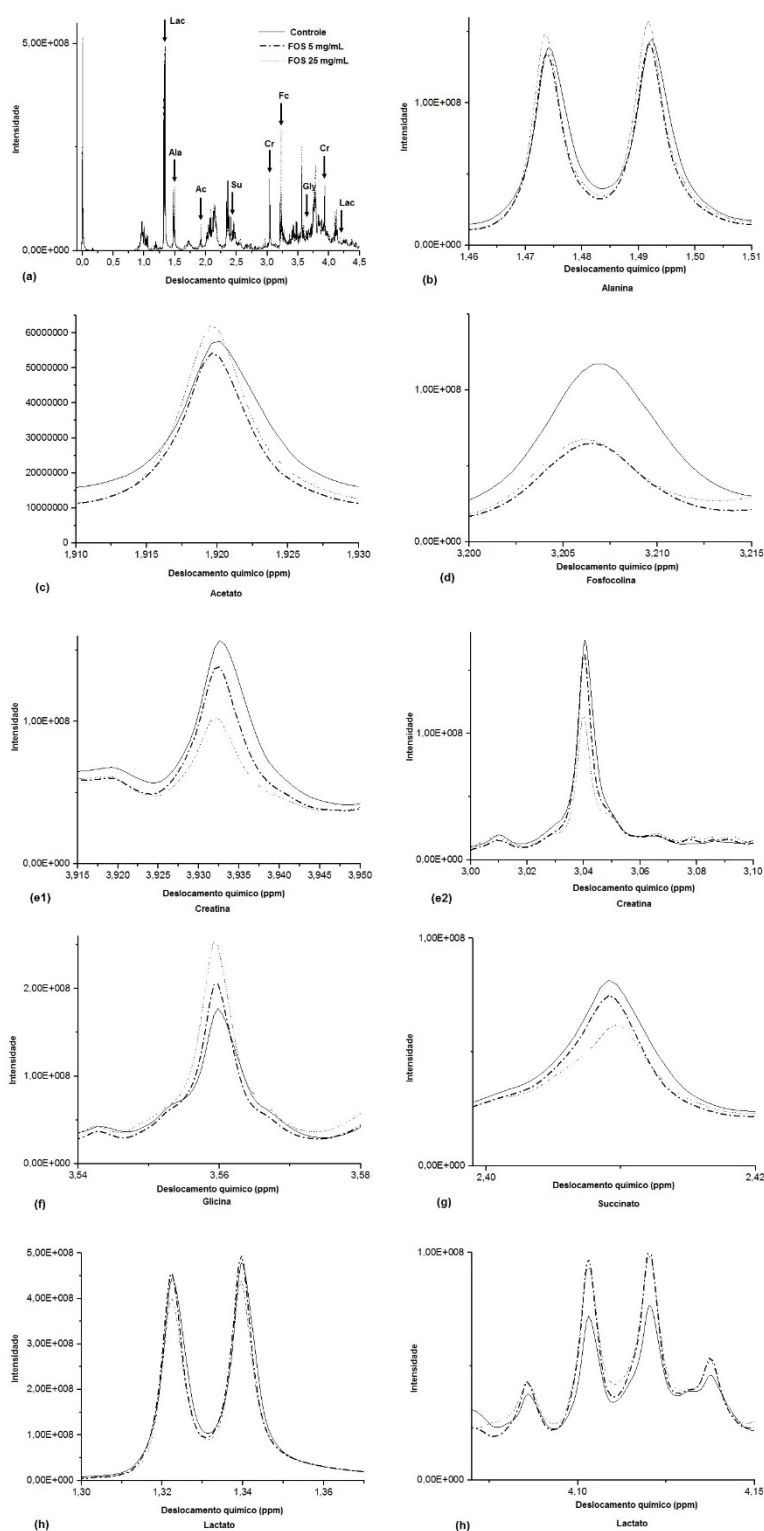
Os dados foram normalizados com o gene β -actin. **Controle:** meio de cultura DMEM. Diferença estatística significativa, realizada conforme parâmetros do software REST-384 (PFAFFEL, 2002).

Embora nas condições avaliadas neste estudo não tenha ocorrido alterações citotóxicas e de proliferação celular em 24 h, as alterações observadas nos transcritos IL-8 e TNF- α , conduz a um indicativo de pró-inflamação do tipo dose resposta. É interessante ressaltar que a sinalização desencadeada que poderia ter levado à resposta pró-inflamatória, possivelmente é dependente do tipo de oligossacarídeo, pois conforme relato de Homann et al (2012), tanto o tamanho quanto as diferentes estruturas do esqueleto frutossil podem influenciar a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Nas mesmas condições de avaliação da expressão gênica, foi realizada a verificação do possível efeito modulador dos FOS sobre o metabolismo das células HepG2/C3A, a partir dos espectros de ^1H RMN dos extratos celulares destas células expostas ou não aos FOS (5 e 25 mg/mL).

Os tratamentos com 5 e 25 mg/mL de FOS proporcionaram no ambiente intracelular a diminuição de fosfocolina, acetato, creatina, lactato, alanina e succinato, e o aumento de glicina (Figura 9).

Figura 9 - Perfil metabólico diferencial de células HepG2/C3A expostas aos FOS de *Bacillus subtilis* natto em comparação ao controle.



(a) Perfil metabólico global das células HepG2/C3A controle e expostas (5 e 25 mg/ml) aos FOS. Os principais metabólitos identificados com expressão diferencial foram: Lactato (Lac), acetato (Ac), alanina (Ala), succinato (Su), creatina (Cr), fosfocolina (Fc) e glicina (Gly). Os demais gráficos correspondem a expressão diferencial entre os diferentes tratamentos dos metabólitos: **(b)** alanina; **(c)** acetato; **(d)** fosfocolina; **(e1)** e **(e2)** creatina; **(f)** glicina; **(g)** succinato; **(h1)** e **(h2)** lactato.

A exposição de células HepG2/C3A aos FOS proporcionou a diminuição de acetato que pode ter contribuído com o aumento da expressão gênica de *TNF- α* , uma vez que o acetato possui ação anti-inflamatória comprovada por intermédio da inibição de *TNF- α* (TEDELIND et al., 2007).

O aumento de glicina é relatado em diversos tipos de câncer, estando relacionado à sua progressão e aumento de proliferação celular (KOH ET AL., 1999; JAIN ET AL., 2012, CHENETTE; ROSENTHAL; ZAROMYTIDOU, 2012).

Quanto ao lactato, foi demonstrado que sua utilização para o pré e pós tratamento de hepatócitos suprimiu fortemente a inflamação, apontando seu grande potencial como terapêutico (HOQUE et al., 2014). Nas células tratadas com FOS a redução dos níveis de lactato pode ter contribuído com o aumento da inflamação local.

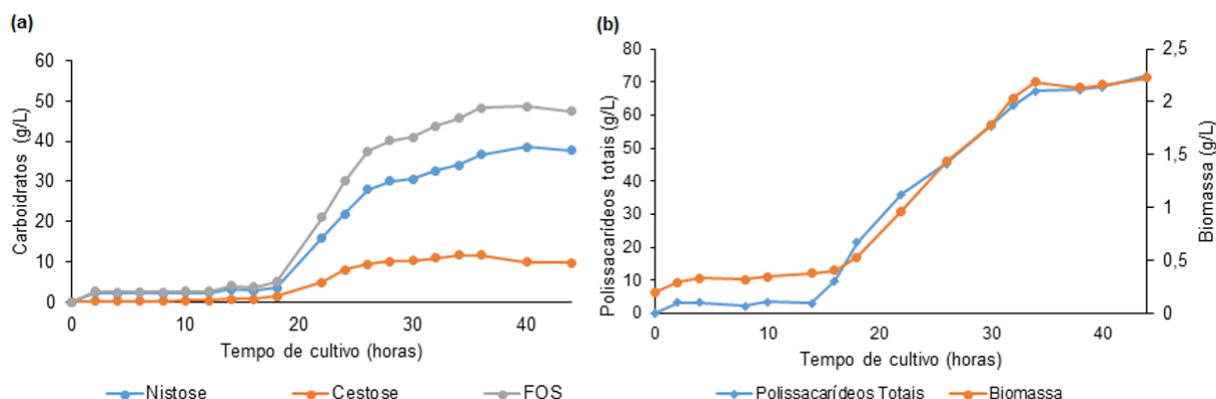
Alterações nos metabólitos alanina e creatina estão ligadas ao metabolismo energético celular (WINTER et al., 2001; ALBERS et al., 2015), já alterações na quantidade de succinato intracelular estão relacionadas ao distúrbio da via metabólica do ácido cítrico (WANG et al., 2013). Desse modo, a diminuição destes metabólitos indica quebra da homeostase intracelular, pela alteração do metabolismo primário celular.

5.2.2 Avaliação dos Parâmetros para Produção de FOS em Biorreator

5.2.2.1 Efeito da agitação

Para o estudo do efeito da agitação em biorreator, as condições de aeração (0,2 vvm) e pH (controlado) utilizados na Fermentação 2 (0,2 vvm, pH controlado e 150 rpm) foram fixadas, no entanto a agitação foi reduzida para 50 rpm. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 10. Nas condições avaliadas, a produção máxima de FOS foi observada em 40 h com 48,60 g/L (nistose 38,6 g/L e cestose 10 g/L), e a maior produtividade, em 26 h com 1,44 g/L/h (Figura 10a).

Figura 10 - Produção de FOS por *Bacillus subtilis natto* por conversão da sacarose e acompanhamento dos açúcares (EPS_T, glicose e frutose) e biomassa



(a): Conversão de sacarose em nistose, cestose e açúcares redutores. **(b):** Cinética de produção de levanasacarase e biomassa de *Bacillus subtilis natto*.

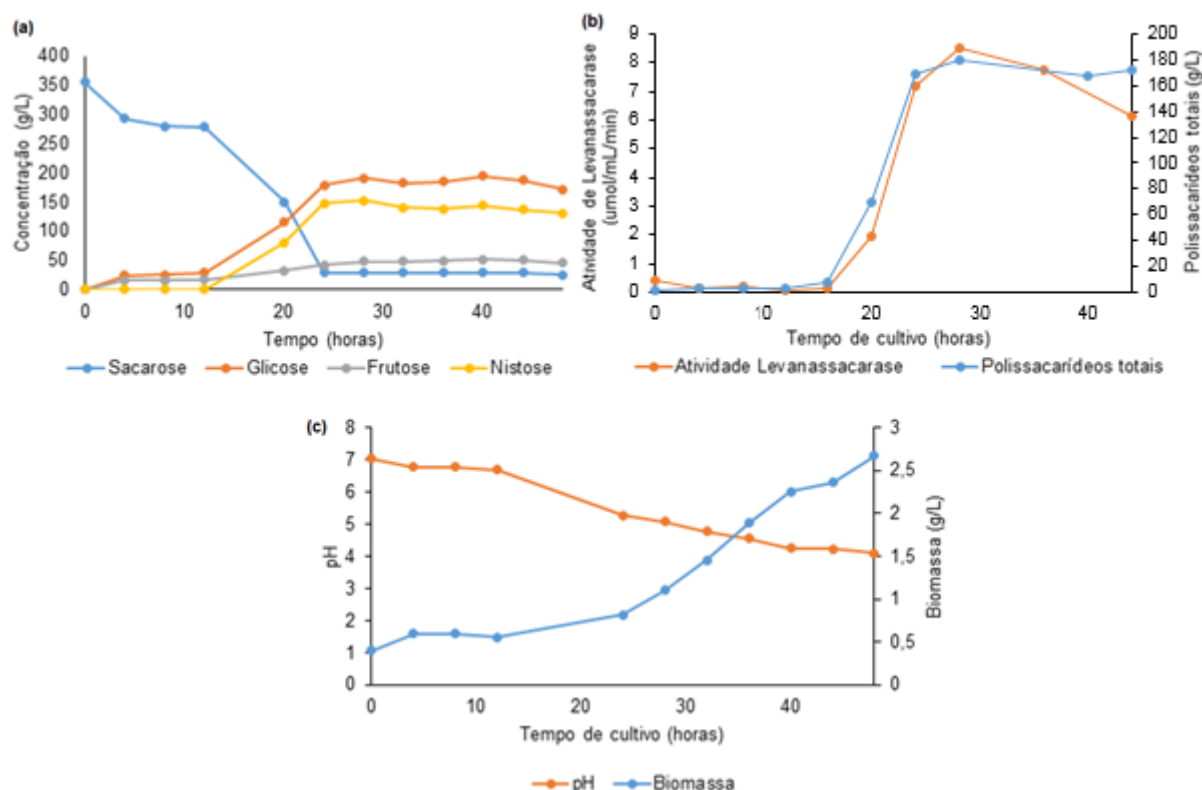
A biomassa se manteve constante após 34 h chegando a massa final de 2,23 g/L. A produção de EPS_T acompanhou o crescimento da biomassa, com a maior produção de 71,81 g/L em 48 h (Figura 10b). A baixa rotação (50 rpm) proporcionou menor produção do FOS (48,60 g/L), no entanto favoreceu o desenvolvimento de maior biomassa (2,23 g/L) quando comparada aos valores obtidos na Fermentação 2 (55,39 g/L de FOS e biomassa de 1,44 g/L).

5.2.2.2 Efeito do tamanho do inóculo

A fim de avaliar o efeito do tamanho do inóculo sobre a produção de FOS, foi realizada uma fermentação nas mesmas condições da Fermentação 1 (frascos, 240 ml, pH 7,7, 0,2 g/L de inóculo), variando apenas a concentração do inóculo para 0,4 g/L de células de *B. subtilis natto*.

Observou-se que após 24 h de cultivo o consumo de sacarose, a produção de FOS, e a liberação de frutose e glicose livre no meio, permaneceram estáveis. A produção de nistose chegou ao valor máximo (151,98 g/L) em 28 h de cultivo, com produtividade de 5,43 g/L/h e rendimento de 71,64% (Figura 11a). A liberação de glicose (194,38 g/L; 40 h) no meio superou a produção de FOS durante todo cultivo (Figura 11a).

Figura 11 - Produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto por conversão da sacarose e acompanhamento dos açúcares (EPS_t, glicose e frutose), biomassa e levanasacarase



(a): Conversão de sacarose em nistose e açúcares redutores. **(b):** Cinética de produção de levanasacarase e EPS_t. **(c):** Crescimento de *Bacillus subtilis* natto e acompanhamento do pH do cultivo.

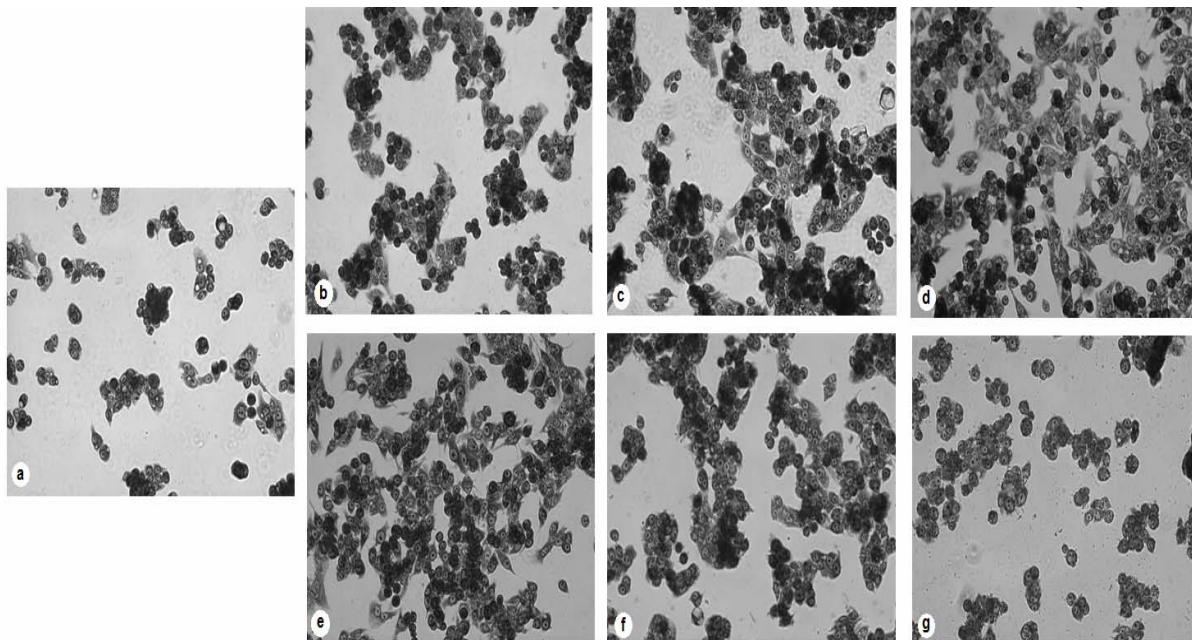
A produção máxima de EPS_T acompanhou a produção de levanasacarase, chegando em 28 h a 179,6 g/L e 8,52 μmol/mL/min, respectivamente (Figura 11b). O pH caiu de 7,04 para 4,01 ao decorrer do cultivo em resposta ao crescimento da biomassa, e esta alcançou o valor de 2,67g/L em 48 h, se mantendo em crescimento constante durante todo o período (Figura 11c).

Observou-se que o aumento do inóculo utilizado promoveu a produção tardia de FOS, com menor rendimento (71,64%) e menor produtividade máxima (5,43 g/L/h em 28 h), enquanto proporcionou aumento da produção de levanasacarase (8,52 μmol/mL/min) quando comparada à Fermentação 1 (75,63%, 15,26 g/L/h em 8 h e 6,80 μmol/mL/min).

5.2.3 Microscopia das Linhagens Celulares

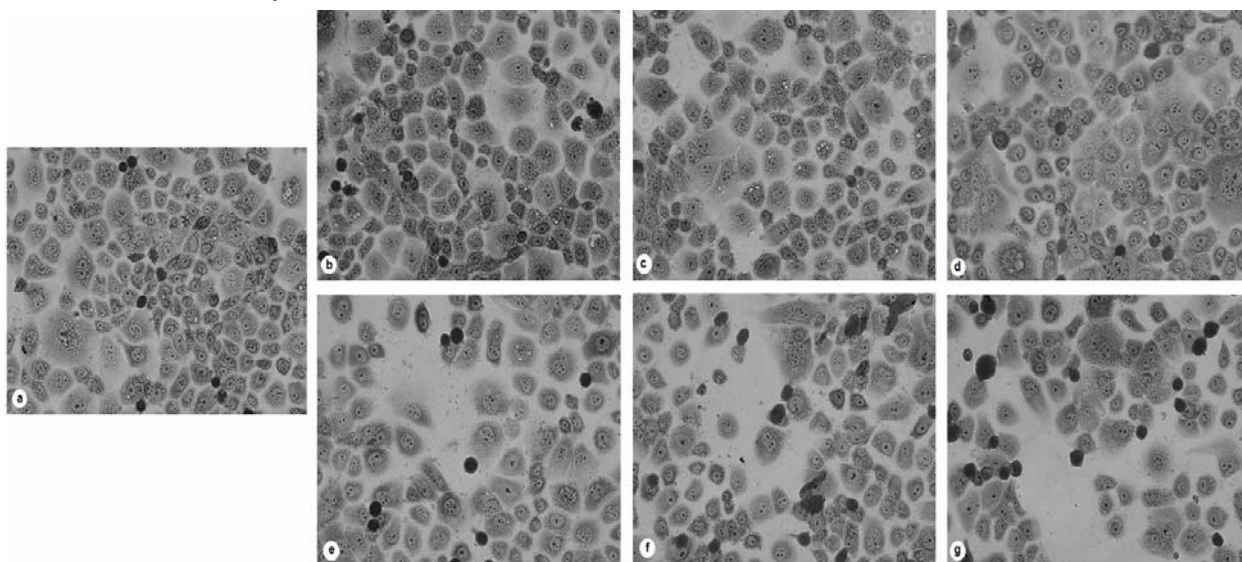
A microscopia das linhagens celulares foi realizada para detecção de possíveis alterações morfológicas em resposta aos tratamentos com as diferentes concentrações de FOS. No entanto, em nenhuma das concentrações utilizadas foram identificadas diferenças morfológicas (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Microscopia de linhagem celular HepG2/C3A exposta aos tratamentos de FOS por 24 horas.



Linhagem celular HepG2/C3A. **(a)Controle:** meio de cultura DMEM; **(b)**FOS 5 mg/mL;**(c)**10 mg/mL;**(d)**25 mg/mL;**(e)**50 mg/mL; **(f)**75 mg/mL; **(g)**100 mg/mL: concentrações do tratamento de fruto-oligossacarídeo diluído em meio de cultura DMEM. Aumento real de 460x.

Figura 13 - Microscopia de linhagem celular OVCAR-3 exposta aos tratamentos de FOS por 24 horas.



Linhagem celular OVCAR-3. **(a)Controle:** meio de cultura DMEM; **(b)**FOS 5 mg/mL;**(c)**10 mg/mL;**(d)**25 mg/mL;**(e)**50 mg/mL; **(f)**75 mg/mL; **(g)**100 mg/mL: concentrações do tratamento de fruto-oligossacarídeo diluído em meio de cultura DMEM. Aumento real de 460x.

5.2.4 Curvas Padrões para Determinação de Açúcares por CLAE

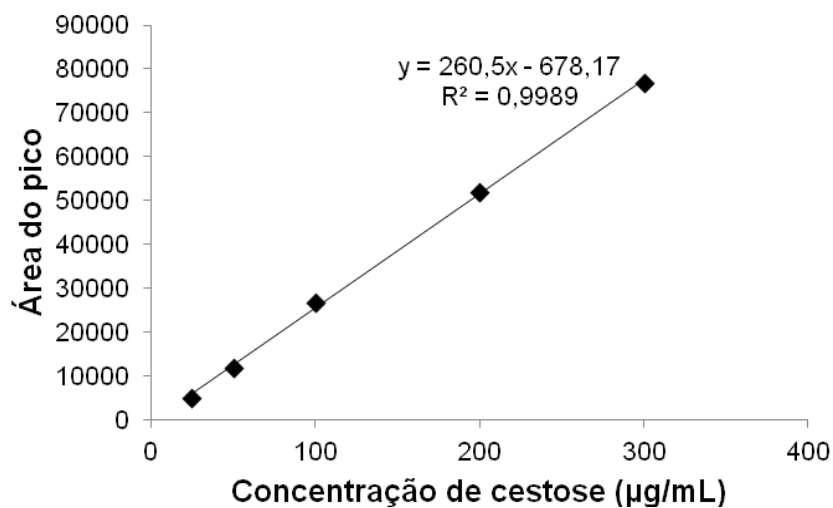
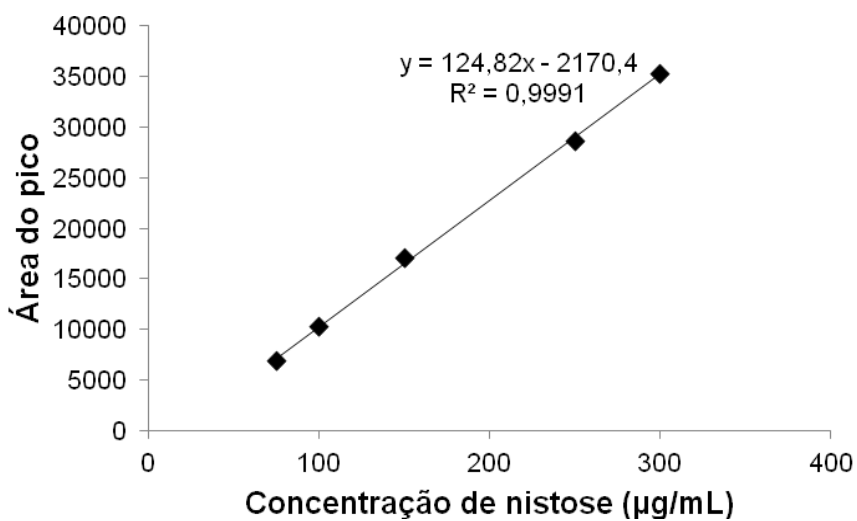
Figura 14 - Curva padrão para determinação de cestosose por CLAE**Figura 15** - Curva padrão para determinação de nistose por CLAE

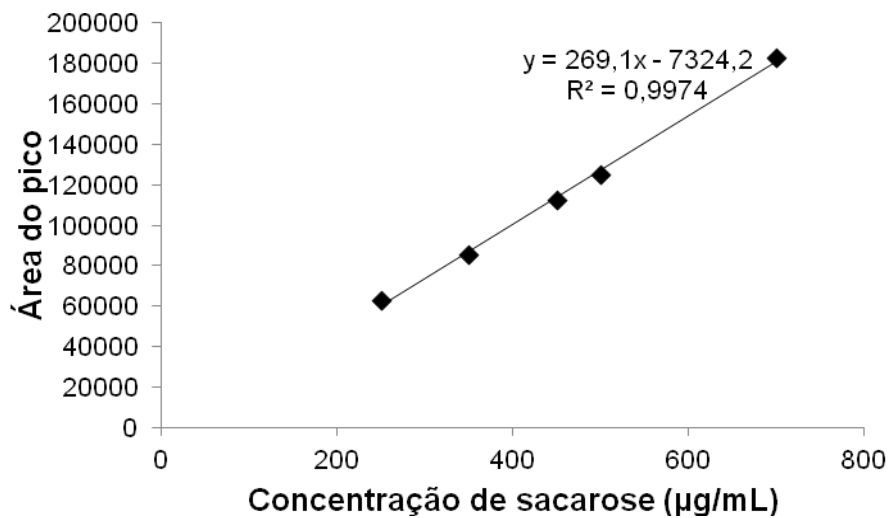
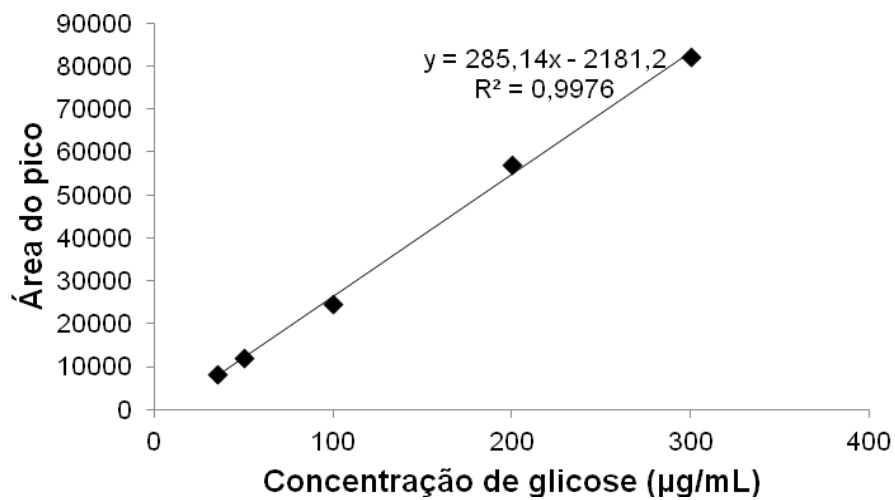
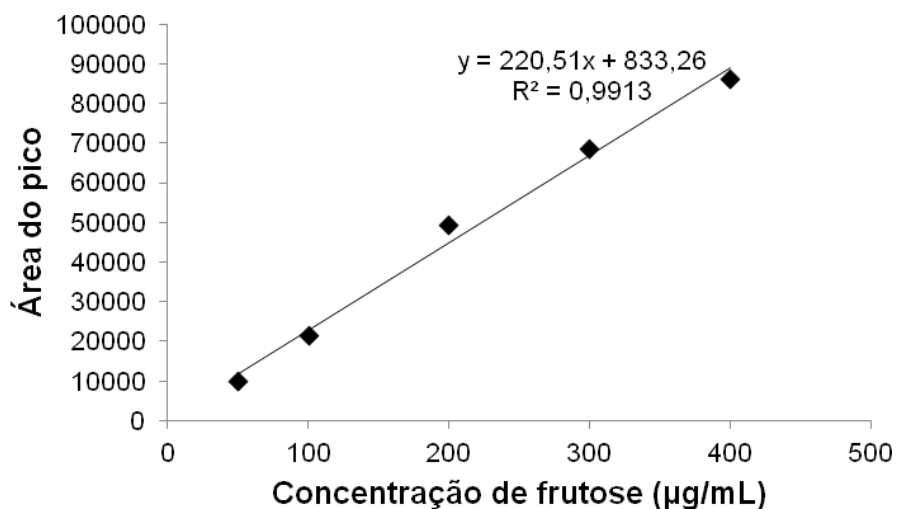
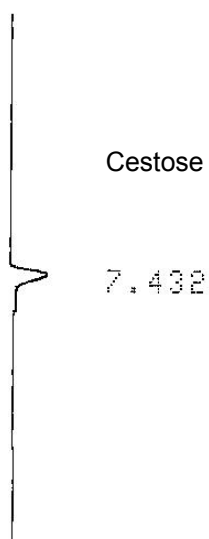
Figura 16 - Curva padrão para determinação de sacarose por CLAE**Figura 17** - Curva padrão para determinação de glicose por CLAE

Figura 18 - Curva padrão para determinação de frutose por CLAE



5.2.5 Cromatogramas dos Padrões de FOS

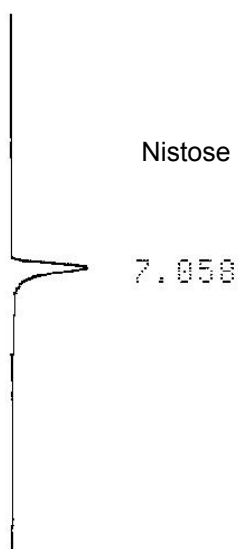
Figura 19 - Cromatograma do padrão de cestose na concentração de 50 µg/mL



CHROMATOPAC C-R6A
 SAMPLE NO 0
 REPORT NO 12992

FILE 0
 METHOD 44
 SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.432	9194				
TOTAL		9194			0	

Figura 20 - Cromatograma do padrão de nistose na concentração de 100 µg/mL

CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 13003

FILE 0
METHOD 44
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	7.058	21808				
	TOTAL	21808			0	

6 CONCLUSÕES

- A maior produção de FOS foi de 173,60 g/L (42h) e ocorreu em biorreator a 150 rpm, aeração de 0,2 vvm e sem controle de pH (Fermentação 3). A maior atividade de levanasacarase observada foi de 8,70 $\mu\text{mol/mL/min}$ (48h), mostrando que a baixa aeração e o não controle de pH influenciaram positivamente a produção de FOS.
- A purificação e caracterização dos FOS obtidos confirmou a presença de ligações glicosídicas do tipo β (2 \rightarrow 1) e a presença de FOS variando de cadeias GF₂ até GF₇, predominando a presença de GF₃ (nistose).
- Os FOS proporcionam diferentes respostas de acordo com a linhagem celular testada.
- A interação do FOS com células de carcinoma ovariano OVCAR-3 reduziu a proliferação celular e desencadeou a resposta pró-inflamatória, confirmada por indução da expressão dos transcritos dos genes *IL-8* e *TNF- α* seguido da redução da expressão de *ER β* . Também observou-se no perfil metabólico, alterações em metabólitos associados a resposta inflamatória, proliferação celular e metabolismo energético. Esses fatores contribuíram para a queda da homeostase celular e conseqüente declínio da proliferação celular. Desse modo, os FOS obtidos de *Bacillus subtilis* natto é um promissor alvo para aplicações terapêuticas.
- A exposição dos FOS às células de carcinoma hepatocelular humano HepG2/C3A não foi citotóxica, não levando à redução da proliferação celular no tempo de exposição analisado, no entanto induziu inflamação com conseqüente desestabilização do ambiente intracelular, confirmada pelas análises de expressão gênica e metabólica.

REFERÊNCIAS

- AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Value addition to spent osmotic sugar solution (SOS) by enzymatic conversion to fructooligosaccharides (FOS), a low calorie prebiotic. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 10, n. 2, p. 284–288, 2009.
- ABDEL-FATTAH, A.F.; MAHMOUD, D.A.R.; ESAWY, M.A.T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymatic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Current Microbiology*, v. 51, p. 402-407, 2005.
- AIBA, S.; OKABE, M.; OKADA, M. Modified complex method as applied to optimization of aeration and agitation in fermentation. *Journal Fermentation Technology*, v. 51, n. 8, p. 594-605, 1973.
- ALBERS, R.B.; CHEN, P.A. CHARLES H; CUNNINGHAM et al. Hyperpolarized ¹³C lactate, pyruvate, and alanine: noninvasive biomarkers for prostate cancer detection and grading mark. *Cancer Research*, v. 68, n. 20, 2008.
- ALLSOPP, P.; POSSEMIERS, S.; CAMPBELL, D.; OYARZÁBAL, I.S.; GILL, C.; ROWLAND, I. An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe*, v. 22, p. 38–44, 2013.
- AL-SHARIDAH, A.; RICHARDT, A.; GOLECKI, J.R.; DIERSTEIN, R.; TADROS, M.H. Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. *Microbiological Research*, v.155, n. 3. p. 157-164. 2000.
- ALVARADO, M.; MAUGERI, F. Production of polyglycerol polyricinoleate (PGPR) by using free and immobilized *Mucor javanicus* lipase. *Journal of Biotechnology*, v. 131, n. 2, p. S90–S91, 2007.
- ANANTHALAKSHMY, V.K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.42, n.3, p.291-297, 1999.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alegações de propriedade funcional aprovadas. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >. Acesso em 22 jan 2014.
- ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Production of fructose and ethanol from media with high sucrose concentrations by a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.76, p.1017-1022, 2001.
- BAKKER-ZIERIKZEE, A.M.; TOLL, E.A.; KROES, H.; ALLES, S.; KOK, J.; BINDELS, G. Fecal SIgA secretion in infants fed on pre- or probiotic infant formula. *Pediatric Allergy and Immunology*, n. 17, p. 134-140, 2006.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. *Food Technology & Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 323–333, 2006.

BEGER, R. D. A review of applications of metabolomics in cancer. *Metabolites*, v. 3, n. 3, p. 552–74, 2013.

BEKERS, M.; LAUKE, J.; UPITE, D.; KAMINSKA, E.; VIGANTS, A.; VIESTURS, U.; PANKOVA, L.; DANILEVICS, A. Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 701–706, 2002.

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, n. 2, p. 451–8, 2012.

BHARTI, S. K.; KRISHNAN, S.; KUMAR, A.; RAJAK, K. K.; MURARI, K.; BHARTI, B. K. GUPTA, A. K. Antidiabetic activity and molecular docking of fructooligosaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* in poloxamer-407-induced T2DM rats. *Food Chemistry*, v. 136, n. 2, p. 813–21, 2013.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, n. 41, p. 11-16, 2002.

BO, Y.; JIN, C.; LIU, Y.; YU, W.; KANG, H. Metabolomic analysis on the toxicological effects of TiO₂ nanoparticles in mouse fibroblast cells: from the perspective of perturbations in amino acid metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 24, n. 7, p. 461-469, 2014.

BOEHM, G.; JELINEK, J.; KNOL, J.; RABET, M.L.; STAHL, B.; VOS, P.; GARSSEN, J. Prebiotics and immune responses. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, n. 39, p. 772-773, 2004.

BRANDT, L. Prebiotics enhance gut health. *Prepared Foods*, n. 170, p. 7-10, 2001.

BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System. Information on EC 2.4.1.10 – levansucrase. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.10>>.

BROWN, A. D. Microbial Water Stress. *Bacteriological Reviews*, v.40, n. 4, p. 803-843, 1976.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGET, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITWER, C. T. The MIQE guidelines: the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v.55, p.611-622, 2009.

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

- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, n. 19, v. 1, p. 19-21, 1997.
- CHAMBERT, R.; TREBOUL, G.; DEDONDER, R. Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*. *European Journal of Biochemistry*, v. 41, p. 285–300, 1974.
- CHENETTE, E. J.; ROSENTHAL, C. K.; BOT, N. L.; ZAROMYTIDOU, A.-I. Glycine fuels cancer cells. *Nature Cell Biology*, v. 14, n. 7, p. 658, 2012.
- CHIU, Y.-H.; LIN, S.-L.; OU, C.-C.; LU, Y.-C.; HUANG, H.-Y.; LIN, M.-Y. Anti-inflammatory effect of lactobacilli bacteria on HepG2 cells is through cross-regulation of TLR4 and NOD2 signalling. *Journal of Functional Foods*, v. 5, n. 2, p. 820–828, 2013.
- COTE, G.L.; AHLGREN, J. Metabolism in microorganisms, Part I. Levan and levansucrase. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N.J. *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 141–168.
- COUSSEMENT, P. A. A. Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose Inulin and Oligofructose : Safe Intakes and Legal Status. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 1412–1417, 1999.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and characterization of the extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.41, n.3, 302-308. 1994.
- CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, p. 353–361, 1996.
- DELZENNE, N. M. Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 62, p. 6, 2003.
- DELZENNE, N. M.; NEYRINCK, A. M.; CANI, P. D. Gut microbiota and metabolic disorders : how prebiotic can work ? *British Journal of Nutrition*, v. 109, p. 81–85, 2013.
- DELZENNE, N.; AERTSSENS, J.; VERPLAETSE, H.; ROCCARO, M.; ROBERFROID, M. Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Life Science*, n. 57, p. 1579-1587, 1995.
- DOMINGUEZ, A.; NOBRE, C.; RODRIGUES, L. R.; PERES, A. M.; TORRES, D.; ROCHA, I.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate polymers*, v. 89, n. 4, p. 1174–9, 2012.
- DUAN, K. J.; CHEN, J. S.; SHEU, D. C. Kinetic studies and mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microbial Technology*, v. 16, p. 334–339, 1994.

EIWEGGER, T.; STAHL B.; SCHMIDT, J.; BOEHM, G.; GERSTMAYR, M.; PICHLER, J.; DEHLINK, E.; LOIBICHLER, C.; URBANEK, R.; SZÉPFALUSI, Z. Human milk-derived oligosaccharides and plant-derived oligosaccharides stimulate cytokine production of cord blood T-cells in vitro. *Pediatric Research*, n. 56, p. 536-540, 2004.

EIWEGGER, T.; STAHL, B.; HAIDL, P.; SHIMITT, J.; BOEHM, G.; DEHLINK, E.; URBANEK, R.; SZÉPFALUSI, Z. Prebiotic oligosaccharides : In vitro evidence for gastrointestinal epithelial transfer and immunomodulatory properties. *Pediatric allergy and immunology*, v. 21, p. 1179–1188, 2010.

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

ESAWY, M.; AHMED, E.; HELMY, W.A.; MANSOUR, N.M.; EL-SENOUSY, W.M.; EL-SAFETY, M.M. Production of levansucrase from novel honey *Bacillus subtilis* isolates capable of producing antiviral levans. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 823-820, 2011.

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

FENG, J.; LI, J.; WU, H.; CHEN, Z. Metabolic responses of HeLa cells to silica nanoparticles by NMR based metabolomic analyses. *Metabolomics*, n. 9, p. 874-886, 2013.

FERNÁNDEZ, E. C.; RAJCHL, A.; LACHMAN, J.; ČÍŽKOVÁ, H.; KVASNIČKA, F.; KOTÍKOVÁ, Z.; MILELLA, L.; VOLDŘICH, M. Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short- and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. *LWT - Food Science and Technology*, v. 54, n. 1, p. 80–86, 2013.

GANAI, 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.

GIACCO, R.; CLEMENTE, G.; LUONGO, D.; LASORELLA, G.; FIUME, I.; BROUNS, F.; BORNET, F.; PATTI, L.; CIPRIANO, P.; RIVELLESE, A.A.; RICCARDI, G. Effects of short-chain fructo-oligosaccharides on glucose and lipid metabolism in mild hypercholesterolaemic individuals. *Clinical Nutrition*, v. 23, n. 3, p. 331–40, 2004.

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

GONÇALVES, B. C. M.; MANTOVAN, J.; RIBEIRO, M. L. L.; BORSATO, D., CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization production of thermo active levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, v. 1, n. 2, p. 1–8, 2013.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 89, n. 5, p. 685–95, 2011.

GUNDERSEN, R. Y.; VAAGENES, P.; BREIVIK, T.; FONNUM, F.; OPSTAD, P. K. Glycine — an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol Scand*, v. 49, p. 1108–1116, 2005.

HENDRY, G. A. F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. *Science and Technology of Fructans*. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.119–139.

HERNALSTEENS, S. Isolamento, identificação e caracterização de microrganismos produtores de oligossacarídeos a partir de coletas em diferentes regiões brasileiras. 2006. 174 fls. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

HERNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUAREZ, V., SELMAN, G.; PETIT-GLATRON, M. F.; CHAMBERT, R. Isolation and enzymatic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *Biochemistry journal*, v. 309, p. 113–118, 1995.

HOMANN, A.; TIMM, M.; SEIBEL, J. Chemo-enzymatic synthesis and in vitro cytokine profiling of tailor-made oligofructosides. *BMC Biotechnology*, v. 12, n. 90, p. 1-7, 2012.

HOQUE, R.; FAROOQ, A.; GHANI, A.; GORELICK, F.; MEHAL, W. Z. Lactate Reduces Liver and Pancreatic Injury in Toll-Like. *Gastroenterology*, v. 146, n. 7, p. 1763–1774, 2014.

HSIA, C.-H.; WANG, C.-H.; KUO, Y.-W.; HO, Y.-J.; CHEN, H.-L. Fructo-oligosaccharide systemically diminished D-galactose-induced oxidative molecule damages in BALB/cJ mice. *The British Journal of Nutrition*, v. 107, n. 12, p. 1787–92, 2012.

HUANG, Y.H.; SHANG, B.Y.; ZHEN, Y.S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. *World Journal of Gastroenterology*, v. 11, n. 26, p. 3980-3984, 2005.

IUB-IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>. Acesso em: 10 abr 2013.

JAIN V., NILSSON R., SHARMA S., MADHUSUDHAN N., KITAMI T., SOUZA A.L., KAFRI R., KIRSCHNER M.W., CLISH C.B., MOOTHA V.K. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, v. 336, p. 1040-1044, 2012.

JALAN, N.; VARSHNEY, L.; MISRA, N.; PAUL, J.; MITRA, D.; RAIRAKHWADA, D.D.; BHATHENA, Z.; KUMAR, V. Studies on production of fructo-oligosaccharides (FOS) by gamma radiation processing of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, v. 96, n. 1, p. 365–70, 2013.

JANG, K.-H.; SONG, K.-B.; PARK, B.-S.; et al. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 4, p. 339–343, 2001.

JUNG, K. H.; YUN, J. W.; KANG, K. R.; LIM, J. Y.; LEE, J. H. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, n. 8, p. 491–494, 1989.

KOH T.J., DOCKRAY G.J., VARRO A., CAHILL R.J., DANGLER C.A., FOX J.G., WANG T.C. Overexpression of glycine-extended gastrin in transgenic mice results in increased colonic proliferation. *Journal of Clinical Investigation*, v. 103, p.1119-1126, 1999.

KRISHNAN, P; KRUGER, N; RATCLIFFE, R. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p. 255–265, 2005.

KUMAR, V. P.; PRASHANTH, K. V. H.; VENKATESH, Y. P. Structural analyses and immunomodulatory properties of fructo-oligosaccharides from onion (*Allium cepa*). *Carbohydrate polymers*, v. 117, p. 115–122, 2015.

KUNČIČ, M. K.; ZAJC, J.; DROBNE, D.; PIPAN TKALEC, Z.; GUNDE-CIMERMAN, N. Morphological responses to high sugar concentrations differ from adaptation to high salt concentrations in the xerophilic fungi *Wallemia* spp. *Fungal biology*, v. 117, n. 7-8, p. 466–78, 2013.

KUNČIČ, M.K.; ZAJC, J.; DROBNE, D.; TKALEC, Z.P.; GUNDE-CIMERMAN, N. Morphological responses to high sugar concentrations differ from adaptation to high salt concentrations in the xerophilic fungi *Wallemia* spp. *Fungal Biology*, v. 117, n. 7-8, p. 466-478, 2013

KUNST, F.; OGASAWARA, N.; MOSZER, I.; et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, v. 390, n. 20, p. 249–266, 1997.

LANZA, I. R.; ZHANG, S.; WARD, L. E.; KARAKELIDES, H.; RAFTERY, D.; NAIR, K. S. Quantitative metabolomics by H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PloS One*, v. 5, n. 5, p. e10538, 2010.

LEE, B.; KIM, E. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, p. 639-647, 2004.

LIEBEL, S.; RIBEIRO, C. A. O.; MAGALHÃES, V. F.; et al. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicology in Vitro*, v. 29, p. 479–488, 2015.

LIN, T.-J.; LEE, Y.-C. High-content fructooligosaccharides production using two immobilized microorganisms in an internal-loop airlift bioreactor. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v. 39, n. 3, p. 211–217, 2008.

LINDSAY, J.O.; WHELAN, K.; STAGG, A.J.; GOBIN, P.; AL-HASSI, H.O.; RAYMENT, N.; KAMM, M.A.; KNIGHT, S.C.; FORBES, A. Clinical, microbiological,

and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease. *Gut*, 55, 348-355, 2006.

LOPEZ, H. W.; COUDRAY, C.; FEILLET-COUDRAY, C.; DEMIGNE, C.; RE, C. Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 2863, p. 500–508, 2000.

LORENZONI, A. S. G.; AYDOS, L. F.; KLEIN, M. P.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F. Fructooligosaccharides synthesis by highly stable immobilized β -fructofuranosidase from *Aspergillus aculeatus*. *Carbohydrate Polymers*, v. 103, p. 193–197, 2014

LUNDBERG, P., VOGEL, T., MALUSEK, A., LUNDQUIST P.-O., COHEN, L., DAHLQVIST, O. MDL - The Magnetic Resonance Metabolomics Database. 2005. Disponível em: < mdl.imv.liu.se>. Acesso em: 13 jan 2015.

MABEL, M. J., SANGEETHA, P. T., KALPANA, P., SRINIVASAN, K., PRAPULLA, S. G. Physicochemical characterization of fructooligosaccharides and evaluation of their suitability as a potential sweetener for diabetic. *Carbohydrate Research*, v. 343, p. 56–66, 2008.

MALAGUARNERA, M.; VACANTE, M.; ANTIC, T.; GIORDANO, M.; CHISARI, G.; ACQUAVIVA, R.; MASTROJENI, S.; MALAGUARNERA, G.; MISTRETTA, A.; LI VOLTI, G.; GALVANO, F. Bifidobacterium longum with fructo-oligosaccharides in patients with non alcoholic steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 57, n. 2, p. 545–53, 2012.

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*, v. 19, p. 8434–8455, 2014.

MARTÍNEZ-FLEITES, C.; ORTÍZ-LOMBARDÍA, M.; PONS, T.; TARBOURIECHA, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; HERNÁNDEZ, L.; DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from the gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *The Biochemical journal*, v. 390, n.1, p. 19–27, 2005.

MAUGERI, F; HERNALSTEENS, S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 49, p. 43–49, 2007.

MONSAN, P.; PAUL, F. Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 16, p.187-192, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods*, n. 65, p. 55-63, 1983.

MURATA, T.; USUI, T. Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides and Neoglycoconjugates. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 70, n. 5, p. 1049–1059, 2006.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I. M. Nondigestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, n. 68, p. 587-597, 2007.

NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochemistry*, v. 84, p. 375-380, 1944.

NEVES, Luiz Carlos Martins das. Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. 2003. 260 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NGUYEN, H. B.; LOOMBA, M.; YANG, J. J.; JACOBSEN, G.; SHAH, K.; OTERO, R. M.; SUAREZ, A.; PAREKH, H.; JAEHNE, A.; RIVERS, E. P. Early lactate clearance is associated with biomarkers of inflammation, coagulation, apoptosis, organ dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. *Journal of Inflammation*, v. 7, n. 6, p. 1-11, 2010.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition*, v. 129, n. 7, p.1402S-1406S, 1999.

NING, Y.; LI, Q.; CHEN, F.; YANG, N.; JIN, Z.; XU, X. Low-cost production of 6G-fructofuranosidase with high value-added astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Bioresource Technology*, v. 104, p. 660-667, 2012.

NISHIZAWA, K.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H. Kinetic study on transfructosylation by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for fructooligosaccharide production. *Food Science and Technology*, v.7, p. 39-44, 2001.

OKU, T. Special physiological functions of newly developed mono and oligosaccharides. In: *Functional foods – designer foods, pharma foods, nutraceuticals*. New York: Chapman & Hall, 1994. p. 202-217.

OZIMEK, L. K.; KRALJ, S.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. The levansucrase and inulosucrase enzymes of *Lactobacillus reuteri* 121 catalyze processive and non-processive transglycosylation reactions. *Microbiology*, v. 152, n. 4, p. 1187–96, 2006.

PARK, H.E.; PARK, N.H.; KIM, M.J.; LEE, T.H.; YANG, J.Y.; CHA, J. Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATC 15953. *Enzyme Microbial Technology*, v. 32, p. 820-827, 2003.

PARK, J.P.; OH, T.K.; YUN, J.W. Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 471-476, 2001.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 9-36, 2002.

- POOL-ZOBEL, B.; VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M. B. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *British Journal of Nutrition*, v. 87, n. 2, p. 273–281, 2002.
- PRATA, M.B.; MUSSATO, S.I.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A. Fructooligosaccharide production by *Penicillium expansum*. *Biotechnol Letters*, v. 32, p. 837-40. 2010.
- ROBERFROID, M.B.; DELZENNE, N.M. Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition*, v. 18, p. 117-143, 1998.
- ROLLER, M.; RECHKEMMER, G.; WATZL, B. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. 153–156, 2004.
- RUMI, G.; TSUBOUCHI, R.; OKAYAMA, M.; KATO, S.; MOZSIK, G.; TAKEUCHI, K. Protective effect of lactulose on dextran sulfate sodium-induced colonic inflammation in rats. *Digestive Disease and Science*, v. 49, p. 1466-1472, 2004.
- SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food Science and Technology*, v. 50, n. 1, p. 1–16, 2013.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CUMMINGS, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, v. 80, p. 147-171, 1998.
- SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. Fructo-oligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food and Bioproducts Processing*, n. 86, p. 109-115, 2008.
- SANGEETHA, P. T. Microbial Production of Fructo-oligosaccharides. 2003. 290 fls. Tese (Doctor of Philosophy in Biotechnology) - University of Mysore, Mysore. 2003.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Fructo-oligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 1085–1088, 2005a.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Maximization of fructo-oligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. *Journal of Food Engineering*, v. 68, n. 1, p. 57–64, 2005b.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, n. 10, p. 442–457, 2005c.
- SANTOS, R. DOS Produção e aplicação do prebiótico galactoligossacarídeo como alimento funcional: estudos in vitro e in vivo. 2010. 146 fls. Dissertação (Meste em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

SCHNEEMAN, B.O. Fiber, inulin and oligofructose: similarities and differences. *Journal of Nutrition*, v. 129, p. 1424-1427, 1999.

SEIFERT, S.; WATZL, B. Inulin and oligofructose: review of experimental data on immune modulation. *The Journal of Nutrition*, v. 137, n. 11 Suppl, p. 2563S–2567S, 2007.

SERBAN, D. E. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, v. 345, n. 2, p. 258-270, 2013.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SHEU, D. C.; CHANG, J. Y.; WANG, C. Y.; WU, C. T.; HUANG, C. J. Continuous production of high-purity fructooligosaccharides and ethanol by immobilized *Aspergillus japonicus* and *Pichia heimii*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, n. 11, p. 1745–51, 2013.

SHEU, D.C.; DUAN, K. J.; CHENG C. Y.; BI, J. L.; CHEN, J. Y. Continuous production of high-content fructooligosaccharides by a complex cell system. *Biotechnology Progress*, v. 18, n. 6, p.1282-1286, 2002.

SHI, C; CAO, A.M., SHENG, H-Z; YAN, X-Z; LIAO, M-Y: NMR-spectroscopy-based metabonomic approach to the analysis of Bay41-4109, a novel anti-HBV compound, induced hepatotoxicity in rats. *Toxicol Letters*, n. 173, p. 161–167, 2007.

SHIH, I.; CHEN, L.; WU, J. Levan production using *Bacillus subtilis natto* cells immobilized on alginate. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 1, p. 111–117, 2010.

SHIH, I.-L.; YU, Y.-T.; SHIEH, C.-J.; HSIEH, C.-Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 21, p. 8211–5, 2005.

SILVA, J. B. da. Síntese de fructooligosacarídeos pela biotransformação da sacarose por micro-organismos osmofílicos. 2014. 166 fls. Doutorado (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2014.

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, n. 27, p. 2734–2740, 2014a.

SILVA, P. B. DA; 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, n. 3, p. 144–150, 2014b.

SOMOGY, M.A, A new reagent for determination of sugar. *Journal Biology Chemistry*, v. 160, p. 61-68, 1945.

STRAATHOF, A. J.J.; KIEBOOM, A. P.G.; BEKKUM, H. V. Invertase-catalysed fructosyl transfer in concentrated solutions of sucrose. *Carbohydrate Research*, n. 146, p. 154-159, 1986.

SZWENGIEL, A.; CZARNECKA, M.; ROSZYK, H.; CZARNECKI, Z. Levan production by *Bacillus subtilis* dsm 347 strain. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, v. 7, n. 2, p. 1–9, 2004.

TACIRO, M.K. Estudo da influência de diferentes condições de transferência de oxigênio no cultivo de *Azospirillum brasilense*. 1992. 209 fls. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo/Escola Politécnica, São Paulo. 1992.

TEDELIND, S.; WESTBERG, F.; KJERRULF, M.; VIDAL, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate : A study with relevance to inflammatory bowel disease. *Clinical Research*, v. 13, n. 20, p. 2826-2832, 2007.

THAKUR, M.; CONNELLAN, P.; DESEO, M. A; MORRIS, C.; PRAZNIK, W.; LOEPPERT, R.; DIXIT, V. K. Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, n. 1, p. 77–81, 2012.

THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 3, p. 103–105, 2002.

TIAN, F.; KARBOUNE, S.; HILL, A. Synthesis of fructooligosaccharides and oligolevans by the combined use of levansucrase and endo-inulinase in one-step bi-enzymatic system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 121, p. 1–9, 2014.

TONG, G.E.; INLOES, D.S. Making more. *CHEMTECH*, v. 1, n. 9, p. 567-573, 1990.

TOUSEN, Y.; UEHARA, M.; ABE, F.; KIMIRA, Y.; ISHIMI, Y. Effects of short-term fructooligosaccharide intake on equol production in Japanese postmenopausal women consuming soy isoflavone supplements: a pilot study. *Nutrition Journal*, v. 12, n. 127, p. 1-8, 2013.

TOUTIRAIS, O.; GERVAIS, A; CABILLIC, F.; GALLO, M. LE.; COUDRAIS, A.; LEVÊQUE, J.; CATROS-QUEMENER, V.; GENETET, N. Effects of CD40 binding on ovarian carcinoma cell growth and cytokine production in vitro. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 149, n. 2, p. 372–7, 2007.

TRUJILLO, L. E.; ARRIETA, J. G.; DAFHNIS, F.; GARCÍA, J.; VALDÉS, J.; TAMBARA, Y.; PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ, L. Fructo-oligosaccharides production by the *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 28, n. 2-3, p. 139–144, 2001.

TYAGI, R.; RANA, P.; GUPTA, M.; KHAN, A.R.; BHATNAGAR, D.; BHALLA, P.J.S.; CHATURVEDI, S.; TRIPATHI, R.P.; KHUSHU, S. Differential biochemical response of rat kidney towards low and high doses of NiCl₂ as revealed by NMR spectroscopy. *Journal of Applied Toxicology*, v. 33, n. 2, p. 134–141, 2013.

VANDAKOVA, M.; PLATKOVA, Z.; ANTOSOVA, M.; BALES, V.; POLAKOVIC, M. Optimization of cultivation conditions for production of fructosyltransferase by *Aureobasidium pullulans*. *Chemical Papers*, v. 58, n. 1, p. 15–22, 2004.

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

VEGA-PAULINO, R. J.; ZÚNIGA-HANSEN, M. E. Potential application of commercial enzyme preparations for industrial production of short-chain fructooligosaccharides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 76, p. 44–51, 2012.

VIGANTS, A.; KRUCE, R.; BEKERS, M.; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride. *Biotechnology Letters*, v. 20, n. 11, p. 1017–1019, 1998.

VIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas*-strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, n. 23, p. 240–244, 1986.

VIJN, I.; SMEEKENS, S. Update on Biochemistry Fructan : More Than a Reserve Carbohydrate? *Plant Physiology*, v. 120, p. 351–359, 1999.

VITOLO, M. Reatores com enzimas imobilizadas. In: Eugênio Aquarone; Walter Borzani; Willibaldo Schmidell; Urgel de Almeida Lima. (Org.). *Biotechnologia Industrial*. 1 ed. v. 2. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001. p. 373–396.

VOGT, L.; MEYER, D.; PULLENS, G.; FAAS, M.; SMELT, M.; VENEMA, K.; RAMASAMY, U.; SCHOLS, H. A.; DE VOS, P. Immunological properties of inulin-type fructans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, n. 3, p. 414–36, 2015.

WANG, C.; KONG, H.; GUAN, Y.; YANG, J.; GU, J.; YANG, S.; XU, G. Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis. [Analytical Chemistry](#), v. 77, n. 13, p. 4108–4116, 2005.

WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. *Fermentation and Enzyme Technology*. 1. ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 374p.

WANG, H.; WANG, L.; ZHANG, H.; et al. H NMR-based metabolic profiling of human rectal cancer tissue. *Molecular Cancer*, v. 12, n. 121, p. 2–12, 2013.

WANT, E. J.; MASSON, P.; MICHPOULOS, F.; WILSON, I. D.; THEODORIDIS, G.; PLUMB, R.S.; SHOCKCOR, J.; LOFTUS, N.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature protocols*, v. 8, n. 1, p. 17–32, 2012.

WARD, J.L.; BAKER, J.M.; BEALE, M.H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *FEBS Journal*, v. 274, p. 1126–1131, 2007.

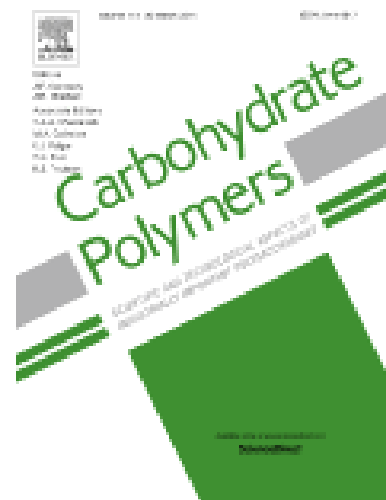
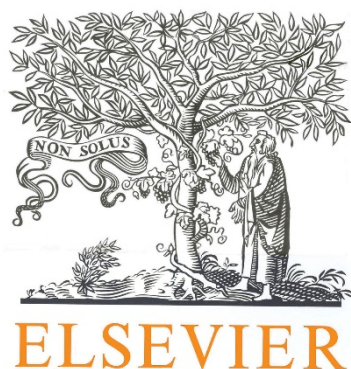
- WATZL, B.; GIRRBACH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. *British Journal of Nutrition*, v. 93, n. 1, p. 49–55, 2005.
- WEI, L.; LIAO, P.; WU, H.; LI, X.; PEI, F.; LI, W.; WU, Y. Toxicological effects of cinnabar in rats by NMR-based metabolic profiling of urine and serum. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 227, p. 417–429, 2008.
- WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1694, n. 1-3, p. 299–310, 2004.
- WINKLER, J.; BUTLER, R.; SYMONDS, E. Fructo-oligosaccharides reduces inflammation in a dextran sodium sulphate mouse model of colitis. *Digestive and Disease Science*, v. 52, p. 52-58, 2006.
- WINTER, P.M.; POPTANI, H.; BANSAL, N. Effects of chemotherapy by 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea on single-quantum and triple-quantum-filtered ²³Na and ³¹P nuclear magnetic resonance of the subcutaneously implanted 9L glioma. *Cancer Research*, v. 61, p. 2002–2007, 2001.
- WU, F.-C.; CHOU, S.-Z.; SHIH, I.-L. Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 44, n. 6, p. 846–853, 2013.
- WU, H.; CAO, L.; LI, F.; LIAN, P.; ZHAO, J. Multiple biomarkers of the cytotoxicity induced by BDE-47 in human embryonic kidney cells. *Chemosphere*, n. 126, p. 32-39, 2015.
- XIAO, C.-L.; TAO, Z.-H.; GUO, L.; LI, W. W.; WAN, J. L.; SUN, H. C.; WANG, L.; TANG, Z. Y.; FAN, J.; WU, W. Z. Isomalto oligosaccharide sulfate inhibits tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice. *BMC Cancer*, v. 11, n. 150, p. 1-11, 2011.
- YEH, M.; LEITINGER, N.; DE MARTIN, R.; ONAI, M.; MATSUSHIMA, K.; VORA, D.K.; BERLINER, J.A.; REDDY, S. T. Increased transcription of IL-8 in endothelial cells is differentially regulated by TNF-alpha and oxidized phospholipids. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 21, n. 10, p. 1585-1591, 2001.
- YUN, J. W. Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, n. 2, p. 107–117, 1996.
- YUN, J. W.; SONG, S. K. Enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. In: BUCKE, C. *Carbohydrate Biotechnology Protocols: Methods in Biotechnology*. Totowa: Humana Press Inc., 1999. p. 141-152.
- ZENHOM, M.; HYDER, A.; VRESE, M. DE; HELLER, K. J.; ROEDER, T. Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPAR γ and Peptidoglycan Recognition Protein 3 1 – 3. *The Journal of Nutrition*, v. 141, n. 5, p. 971–977, 2011.
- ZHENG, S.; STEENHOUT, P.; KUIRAN, D.; QIHONG, W.; WEIPING, W.; HAGER, C.; HASCHKE, F.; CLEMENS, R.A. Nutritional support of pediatric patients with

cancer consuming an enteral formula with fructooligosaccharides. *Nutrition Research*, v. 26, n. 4, p. 154–162, 2006.

ANEXO

ANEXO A

Normas para a submissão do artigo para o periódico Carbohydrate Polymers



Carbohydrate Polymers

Editor-in-chief: J.F. Kennedy

ISSN: 0144-8617

Impact Factor: 3.916

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. Each heading should appear on its own separate line.

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 oneclick 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 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>.