



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PATRÍCIA BITTENCOURT DA SILVA

**PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto**

---

Londrina  
2012

PATRÍCIA BITTENCOURT DA SILVA

**PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Antonia  
Pedrine Colabone  
Celligoi

Londrina  
2012

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

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

S586p Silva, Patrícia Bittencourt da.  
Produção de fruto-oligossacarídeos por levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto /  
Patrícia Bittencourt da Silva. – Londrina, 2012.  
111 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Microbiologia industrial – Teses. 2. Alimentos – Biotecnologia – Teses.  
3. *Bacillus subtilis* – Teses. 4. Levanasacarase – Teses. 5. Probióticos – Teses.  
I. Celligoi, Maria Antonia Pedrine Colabone. II. Universidade Estadual de Londrina.  
Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

PATRÍCIA BITTENCOURT DA SILVA

**PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR  
LEVANASACARASE DE *Bacillus subtilis* natto**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone  
Celligoi  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Sandra Garcia  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Graciette Matioli  
UEM – Maringá – PR

Londrina, 15 de Fevereiro de 2012.

Dedico esse trabalho à minha mãe,  
ao meu pai e meu irmão,  
por todo amor e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, profissional e pessoa admirável com quem aprendi muito. Agradeço pela orientação, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Agradeço a Deus, por ter me guiado ao longo dessa caminhada de dois anos.

Aos meus pais, Maria da Graça e Miguel, por todo amor, cumplicidade e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu irmão, Rodrigo, por seu amor, apoio e incentivo.

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

Ao professor Dionísio Borsato, por sua dedicação e ajuda nas análises estatísticas.

À professora Sandra Garcia por fornecer as cepas de micro-organismos probióticos e auxílio nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Aos amigos: Adriana Casavecchia Petri, Aline Francisca de Souza, Carol Nachi Rossi, Thiago Andrade Marques, Tamires Minucelli, Paulo Ricardo Franco Marcelino, Emilyn Emy Matsumura, Leonardo Cardoso, Lucas Bissoqui, Alex Makoto Kuroishi, Ana Carolina Souza e Clara Tanaka pelo apoio e momentos de descontração.

Ao amigo Ismael Amador pela palavra amiga e apoio ao longo do Mestrado.

Aos colegas do Mestrado em Biotecnologia, com os quais foram compartilhadas experiências, preocupações e até mesmo trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

SILVA, Patrícia Bittencourt. **Produção de fruto-oligossacarídeos por levanasacarase de *Bacillus Subtilis* Natto**. 2012. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## RESUMO

A preocupação com um estilo de vida saudável tem aumentado a busca por alimentos funcionais. Entre os produtos que conferem benefícios à saúde estão alguns tipos específicos de carboidratos dietéticos, destacando-se os fruto-oligossacarídeos (FOS), que tem se popularizado devido aos efeitos fisiológicos proporcionados ao consumidor. Os FOS atuam como prebióticos, pois no sistema digestivo, eles servem como fonte de carbono para as bactérias presentes no cólon, lactobacilos e bifidobactérias, as quais são benéficas a saúde humana. O crescimento e/ou estímulo da atividade dessas bactérias atuam na supressão das bactérias potencialmente patogênicas. Os objetivos desse trabalho foram determinar, utilizando a metodologia de superfície de resposta, as melhores condições para a produção de FOS por fermentação de *Bacillus subtilis* natto em meio contendo sacarose e também por síntese pela enzima levanasacarase, e avaliar o potencial prebiótico dos FOS produzidos. Para se determinar a melhor produção de FOS por via fermentativa, um planejamento fatorial composto central foi desenvolvido variando a concentração de sacarose, pH e agitação. A otimização do processo apontou a concentração de sacarose em 300 g.L<sup>-1</sup>, pH 7,7 e agitação de 234 rpm como a melhor condição para a produção, alcançando 98,86 g.L<sup>-1</sup>. A síntese enzimática de FOS foi realizada utilizando o sobrenadante da condição otimizada da fermentação como fonte de enzima. Um novo planejamento fatorial composto central foi desenvolvido variando concentração de sacarose, pH e temperatura. A partir da análise estatística verificou-se que o valor máximo da produção de FOS foi 65,35 g.L<sup>-1</sup> nas condições ótimas de sacarose em 334 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,0 e temperatura de 45,8°C. Os FOS obtidos por fermentação foram separados por ultrafiltração. Avaliou-se o crescimento das cepas probióticas *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* em meio contendo FOS como única fonte de carbono e determinou-se uma pontuação para o crescimento dessas cepas em comparação com *Escherichia coli* em meio com prebiótico. Entre as cepas utilizadas, *L. plantarum* apresentou a maior produção de ácidos orgânicos (36,8 mM de ácido acético e 54,4 mM de ácido láctico), ao se comparar o crescimento das cepas com seu comportamento em meio contendo glicose, verificou-se que *L. plantarum* apresentou o escore mais elevado (0,526). Os resultados mostram que *B. subtilis* natto é capaz de produzir FOS com efeitos prebióticos demonstrados *in vitro* e que *L. plantarum* apresenta maior afinidade com o prebiótico.

**Palavras-chave:** Fruto-oligossacarídeos. *Bacillus subtilis* natto. Prebióticos, Probióticos.



SILVA, Patrícia Bittencourt. **Production of fructooligosaccharides by levansucrase of *Bacillus Subtilis* Natto**. 2012. 109 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

## ABSTRACT

The concern with a healthy lifestyle has increased the search for functional foods. Among the products that confer health benefits are some specific types of dietary carbohydrates, especially fructo-oligosaccharides (FOS), which has become popular due to physiological effects provided to the consumer. FOS act as prebiotics, because in the digestive system, they serve as carbon source for the bacteria in the colon, lactobacilli and bifidobacteria, which are beneficial to human health. The growth and / or stimulate the activity of these bacteria act in the removal of potentially pathogenic bacteria. The aims of this work were to evaluate, using response surface methodology, the best conditions for the production of FOS by fermentation of *Bacillus subtilis* natto in a medium containing sucrose and also by synthesis by the enzyme levansucrase, and evaluate the potential of prebiotic FOS produced. To determine the best production of FOS by fermentation a central composite design was developed, the sucrose concentration, pH and agitation were the variables. The optimization process showed that the concentration of sucrose at 300 g.L<sup>-1</sup>, pH 7.7 and agitation of 234 rpm as the best condition for the production, reaching 98.86 g. L<sup>-1</sup>. The enzymatic synthesis of FOS was performed using the supernatant of optimized condition of fermentation such as enzyme source. A new central composite design was developed with the variables: sucrose concentration, pH and temperature. The statistical analysis showed that the maximum value of enzymatic production of FOS was 65.35 g.L<sup>-1</sup> in optimum conditions of sucrose in 334 g.L<sup>-1</sup>, pH 6.0 and temperature of 45.8° C. FOS obtained by fermentation were separated by ultrafiltration. The growth of probiotic strains *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* were evaluated in media containing FOS as the sole carbon source and a score was determined to the growth of these strains in comparison with *Escherichia coli* in medium with prebiotics. Among the strains used, *L. plantarum* showed the highest production of organic acids (36.8 mM acetic acid and 54.4 mM lactic acid). When comparing the growth of strains with their behavior in medium containing glucose, it was found that *L. plantarum* showed the highest score (0.526). The results show that *B. subtilis* natto is able to producing FOS with prebiotics effects demonstrated *in vitro* and that *L. plantarum* showed more affinity with FOS produced. .

**Keywords:** Fructooligosaccharides. *Bacillus subtilis* natto. Prebiotics. Probiotics.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Meio de preservação.....	28
<b>Tabela 2</b>	– Meio de inóculo (CALAZANS et al., 2000). ....	29
<b>Tabela 3</b>	– Meio de fermentação (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997, Modificado).....	29
<b>Tabela 4</b>	– Meio MRS (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).....	30
<b>Tabela 5</b>	– Ágar bacteriológico.....	30
<b>Tabela 6</b>	– Meio TSB (Tryptic Soy Broth).....	31
<b>Tabela 7</b>	– Solução de sais para meio M9 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).....	31
<b>Tabela 8</b>	– Meio M9 para ensaio de escore prebiótico.....	32
<b>Tabela 9</b>	– Delineamento fatorial composto central do tipo 2 <sup>3</sup> com 3 repetições verdadeiras no ponto central e 6 pontos axiais para avaliar a concentração de sacarose, pH, e agitação na produção de FOS por <i>B. subtilis</i> natto.....	34
<b>Tabela 10</b>	– Delineamento fatorial composto central do tipo 2 <sup>3</sup> com 5 repetições verdadeiras no ponto central para avaliar o efeito da concentração de sacarose, pH e a temperatura na produção de FOS (Y1) pela levanasacarase de <i>Bacillus subtilis</i> natto . ....	36
 <b>Artigo A</b>		
<b>Tabela 1</b>	– Níveis codificados e reais do planejamento fatorial composto central para produção de FOS por fermentação submersa por <i>Bacillus subtilis</i> natto. A temperatura fixada em 37°C e tempo de cultivo em 24 h .....	57
<b>Tabela 2</b>	– Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de FOS por <i>B. subtilis</i> natto em meio de sacarose .....	58

## Artigo B

- Tabela 1** – Concentração de ácidos orgânicos produzidos na fermentação de FOS por *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*. Meio inicial com FOS de 20 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,5 e inóculo de 0,02 g.L<sup>-1</sup> de células ..... 76
- Tabela 2** – Comparação de população microbiana em 24 h em meio com FOS e glicose..... 76

## Artigo C

- Tabela 1** – Produção de fruto-oligossacarídeos por levansacarase com três variáveis independentes em três níveis, tempo de incubação de 12 h e concentração enzimática de 6 UA/mL..... 98
- Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para modelo de segunda ordem para produção de FOS por levansacarase..... 99

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Estrutura química de alguns fruto-oligossacarídeo: (A) 1-cestose (GF2), (B) nistose (GF3) e (C) frutofuranosil nistose (GF4). ..... 17

### Artigo A

**Figura 1** – Otimização da produção de FOS por *B. subtilis* natto usando o Software Statistica 7.0 ..... 59

### Artigo B

**Figura 1** – Superfície de resposta para a produção de FOS por síntese por levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto em função da concentração de sacarose e temperatura, fixando o pH em 6,0 ..... 78

**Figura 2** – Otimização da produção de FOS pela levanasacarase usando o Software Statistica 7.0 ..... 78

### Artigo C

**Figura 1** – Escore prebiótico em FOS para *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* ..... 99

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ART</b>	Açúcares Redutores Totais
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DP (<i>Degree Polymerization</i>)</b>	Grau de polimerização
<b>FOS</b>	Fruto-oligossacarídeos
<b>FTase</b>	Frutossiltransferase
<b>KDa</b>	kilodaltons
<b>MRS</b>	Meio de Man-Rogosa-Sharpe
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>TSA</b>	Meio Tryptic Soy Agar
<b>TSB</b>	Meio Tryptic Soy Broth
<b>PGA</b>	Polyglutamic acid- Ácido poli glutâmico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	17
2.1	FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)	17
2.2	PRODUÇÃO DE FOS POR VIA FERMENTATIVA	18
2.3	SÍNTESE DE LEVANA E OLIGOSSACARÍDEOS POR LEVANASACARASE	20
2.4	SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS	22
2.5	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FOS	23
2.6	PREBIÓTICOS	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	27
3.1	GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS</b>	28
4.1	MATERIAIS	28
4.1.1	Micro-Organismos	28
4.1.2	Meios de Cultura	28
4.1.2.1	Meio de preservação para Bacillus subtilis natto	28
4.1.2.2	Meio de inóculo para Bacillus subtilis natto	29
4.1.2.3	Meio de fermentação para B. subtilis natto	29
4.1.2.4	Meio de preservação, cultivo e escore prebiótico para Lactobacillus	30
4.1.2.5	Meio para preservação de Escherichia coli	30
4.1.2.6	Meio para cultivo de E. coli	31
4.1.2.7	Meio M9 para determinar o escore prebiótico de E. coli	31
4.2	MÉTODOS	32
4.2.1	Preservação dos Micro-Organismos	32
4.2.2	Fermentação de B. subtilis natto	32
4.2.2.1	Inóculo	32
4.2.2.2	Otimização da produção de fruto-oligossacarídeos por Bacillus subtilis	33

4.2.2.3	Produção do extrato enzimático .....	34
4.2.3	Síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos .....	35
4.2.4	Análise Estatística .....	37
4.2.5	Produção e Purificação de FOS para Atividade e Escore Prebiótico.....	37
4.2.6	Atividade Prebiótica .....	37
4.2.7	Escore de Atividade Prebiótica.....	38
4.2.8	Métodos Analíticos .....	39
4.2.8.1	Determinação da biomassa.....	39
4.2.8.1.1	Curva padrão de biomassa de <i>Bacillus subtilis</i> natto .....	39
4.2.8.1.2	Curva padrão de biomassa das cepas probióticas (MANISSERI; GUDIPATI, 2011) .....	39
4.2.8.1.3	Quantificação da biomassa .....	40
4.2.8.2	Determinação dos Açúcares Redutores (AR) das fermentações .....	40
4.2.8.3	Atividade da levanasacarase no caldo fermentativo.....	40
4.2.8.4	Síntese de enzimática de FOS .....	41
4.2.8.5	Determinação de fruto-oligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	42
4.2.8.6	Dosagem de ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	42
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>50</b>
	ANEXO A – Artigo A –Produção de Fruto-Oligossacarídeos por fermentação de <i>Bacillus Subtilis</i> Natto .....	51
	ANEXO B .....	63
	ANEXO C – Artigo B –Síntese enzimática de Fruto-Oligossacarídeos por <i>Bacillus Subtilis</i> Natto aplicando metodologia estatística .....	69

ANEXO D .....	82
ANEXO E – Artigo C –Atividade prebiótica de Fruto-Oligossacarídeos produzidos por <i>Bacillus Subtilis</i> Natto .....	91
ANEXO F.....	102



## 1 INTRODUÇÃO

O interesse mundial em oligossacarídeos se deve ao fato de serem caracterizados como prebióticos, isso é, são ingredientes não digeríveis que afetam benéficamente o organismo por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias benéficas ao organismo (PERRIN et al., 2001).

Esses compostos são obtidos de diversas fontes como bactérias, algas, fungos e plantas sendo utilizados como ingredientes e suplementos alimentares. Entre os oligossacarídeos funcionais estão os fruto-oligossacarídeos.

Fruto-oligossacarídeos (FOS) é a denominação dada aos oligômeros de frutose, nos quais as unidades de frutose são ligadas na posição  $\beta$ -2,1 da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros (YUN, 1996). Esses oligômeros de frutose possuem características específicas que permitem aplicação na indústria de alimentos como possuir um terço do poder adoçante da sacarose, não serem calóricos, não cristalizar e não precipitar (PASSOS; PARK, 2003).

A atividade prebiótica desses compostos se deve ao fato de promoverem o crescimento dos probióticos, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, promovendo, estabilizando e aumentando a proliferação dessas bactérias no trato gastrointestinal do hospedeiro e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, entre estas *Clostridium perfringens* (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

Os fruto-oligossacarídeos podem ser obtidos por hidrólise da inulina ou por síntese enzimática. As enzimas que catalisam a produção de FOS são  $\beta$ -frutofuranosidases, também chamadas de invertases e frutotransferases (FTases), essas enzimas são encontradas em plantas como chicória e cebola e produzidos por micro-organismos tais como *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus macerans*, *Bacillus subtilis* (GHAZI et al. 2005; SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

A levanasacarase (E.C. 2.4.1.10) é uma frutotransferase que forma levana a partir da sacarose e concomitantemente realiza a produção de fruto-oligossacarídeos (PARK et al., 2003; ABDEL-FATTAH; MAHMOUD; ESAWY, 2005). Dentre os microrganismos que produzem levanasacarase, o *Bacillus subtilis* natto, se destaca como um produtor eficiente de levana, acumulando 30 a 50 g.L<sup>-1</sup> ou mais

do exopolissacarídeo durante uma batelada fermentativa. (SHIH; CHEN; WU, 2010). Como um bom produtor de levana, também pode ocorrer produção de oligossacarídeos concomitantemente.

O mercado de alimentos funcionais movimenta entre 20 e 30 bilhões de dólares em vendas por ano, representando cerca de 5% do mercado de alimentos nos Estados Unidos. Esse setor está em expansão com estimativas recentes indicando o crescimento em torno de 8,5% ao ano (TUOHY et al., 2009). Para aumentar a viabilidade da produção industrial, diversos processos são importantes como a busca e identificação de novas cepas produtoras de frutossiltransferases, compreensão das propriedades cinéticas das FTases, além de formas de purificação desses compostos. Assim o estudo da produção de FOS por via fermentativa usando *Bacillus subtilis* natto e pela síntese enzimática passa a ser uma alternativa, na busca de compostos com aplicação em alimentos funcionais.

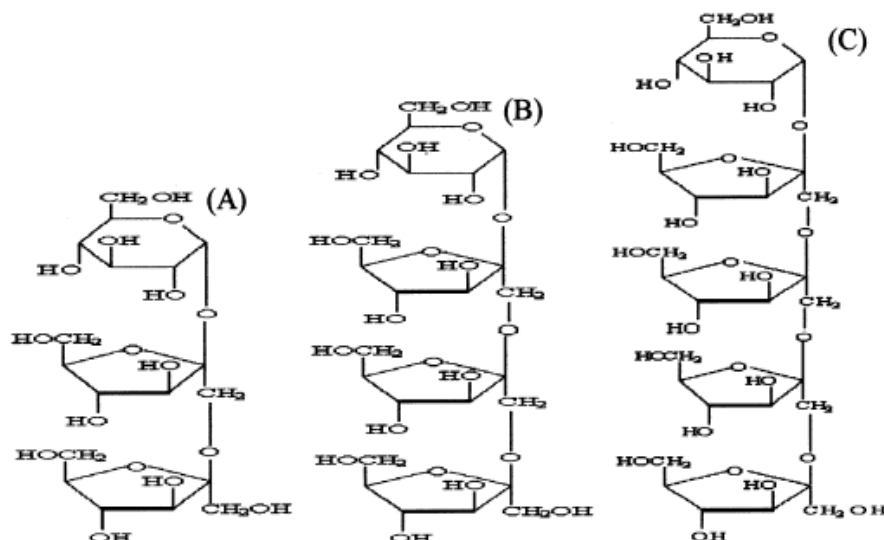
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS (FOS)

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são cadeias de comprimento curto e médio de  $\beta$ -D frutanas nas quais as unidades de frutose são unidas por ligação na posição  $\beta$ -2,1. Sua síntese se inicia a partir da transferência de um radical frutose (F) à sacarose (GF). Assim essas moléculas apresentam uma unidade de glicose terminal, diferindo de outros oligômeros (YUN, 1996).

Os FOS são caracterizados pelo número de frutoses ligadas e denominados por seu grau de polimerização (*degree of polymerization* - DP), abrangendo as oligofrutoses com DP menor que 9, com média de 4,8 resíduos de frutose (GIBSON; ROBERFROID, 1995). As oligofrutoses mais encontradas são: 1-kestose (GF<sub>2</sub>), nistose (GF<sub>3</sub>) e frutofuranosil nistose (GF<sub>4</sub>), com suas estruturas representadas na Figura 1.

**Figura 1** – Estrutura química de alguns fruto-oligossacarídeos: (A) 1-kestose (GF<sub>2</sub>), (B) nistose (GF<sub>3</sub>) e (C) frutofuranosil nistose (GF<sub>4</sub>).



Fonte: Park; Passos (2003)

Os FOS apresentam diversas propriedades de grande destaque devido as suas funções fisiológicas (YUN, 1996). Possuem um terço do poder

adoçante da sacarose e são compostos não calóricos, devido as suas ligações  $\beta$ -2,1 que não são hidrolisadas pelas enzimas digestivas, podendo ser utilizados em formulações de alimentos para diabéticos. São compostos não cariogênicos, uma vez que *Streptococcus mutans* não os utilizam na formação de ácidos e  $\beta$ -glucana - principais causas da cárie dentária.

Diversas plantas e micro-organismos produzem fruto-oligossacarídeos. Os FOS obtidos de fontes vegetais são extraídos com água quente das raízes da chicória na forma de inulina (DP<60). Essa frutana é submetida à hidrólise enzimática parcial, sob condições rigorosamente controladas obtendo oligômeros de inulina (GIBSON; ROBERFROID, 1996). Destacam-se entre as fontes vegetais aspargo, beterraba, cebola e alcachofra (PASSOS; PARK, 2003).

Entre os micro-organismos produtores, tem-se fungos como o *Aureobasidium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. entre outros e bactérias como *Bacillus subtilis*, *B. macerans*, *Zymomonas mobilis* e *Arthrobacter* sp. (YUN, 1996, EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997; PASSOS; PARK, 2003; SANGEETHA et al., 2005). Nesses organismos, os FOS são obtidos por reação enzimática de transfrutossilacção a partir de resíduos de sacarose, sendo constituídos por cadeias lineares e ramificadas de oligossacarídeos com grau de polimerização variando entre 2 e 9 unidades de frutossil (SILVA, 2008).

## 2.2 PRODUÇÃO DE FOS POR VIA FERMENTATIVA

Os membros do gênero *Bacillus* são Gram-positivos (em culturas jovens), mas algumas vezes Gram-variáveis ou mesmo Gram-negativos, em forma de bastonetes, formadores de endósporos que podem ser aeróbios ou facultativos anaeróbios e podem ser móveis por flagelos. A maioria das espécies é mesofílica, porém podem ser psicrófilas e termófilas (BARROS, 2004).

*Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva e formadora de esporos que pode crescer em meio contendo sais essenciais, carbono, nitrogênio e fonte de fósforo. *B. subtilis* natto é uma cepa utilizada no preparo de soja fermentada, produto conhecido por natô, o qual é alimento tradicional no Japão (HO et al., 2006). Shih et al. (2005) demonstraram que essa é uma das cepas mais eficientes na produção de levana com pouco tempo de cultivo (21 h), chegando a

produzir 30-50 g.L<sup>-1</sup> de levana durante uma fermentação em batelada. Ho et al. (2006) verificaram que além de levana, *B. subtilis* natto produz uma mistura de ácido gama poliglutâmico (PGA) e levana em meio contendo sacarose e L-glutamato. O direcionamento da produção desses compostos pode ser obtido por meio do ajuste da composição do meio, produzindo somente levana ou PGA.

A levana microbiana é produzida a partir do substrato sacarose por reação de transfrutossilacção da levanasacarase ( $\beta$  2,6-frutana: D glicose-frutossil transferase, E.C.2.4.1.10) que polimeriza as unidades de frutose (SHIH et al., 2005). O processo de polimerização da frutose, para a formação do exopolissacarídeo, origina cadeias de tamanhos moleculares variados, que vão da faixa dos oligossacarídeos (FOS), com os menores graus de polimerização (DP), aos polímeros com as mais altas massas moleculares (VIKARI, 1984). Isso ocorre porque os polissacarídeos são produzidos como uma mistura de diferentes comprimentos de cadeia (CALAZANS et al., 2000). O tamanho médio das cadeias produzidas durante a fermentação em meio de sacarose varia com as condições do processo. As cadeias menores, na faixa de oligossacarídeos, são favorecidas por temperaturas mais altas que as usadas para a obtenção de cadeias maiores (COIMBRA, 2006).

A linhagem de *Bacillus subtilis* LBJBS03 foi isolada do favo de mel e se mostrou hábil na produção de FOS com graus de polimerização entre 2 e 11, em meio com alta concentração de sacarose (SILVA, 2010).

O aumento da produção de FOS levou a busca de novos microorganismos com atividade de transfrutossilacção. Hendges et al. (2001) isolou uma estirpe de levedura osmofílica de flores de mangueira, produtora da enzima  $\beta$ -D-frutofuranosidase com atividade de transfrutossilacção. Avaliou-se a produção de FOS em meio de fermentação de sacarose a 10%, e incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm, por 4 dias. Esse meio mostrou indicado para isolamento de microorganismos, bem como para a produção de FOS. Ao final da fermentação os açúcares produzidos foram determinados, a concentração de cetoose foi de 33,2% e nistose de 16,1%. Silva (2008) avaliou a produção de FOS pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*. Os cultivos foram desenvolvidos em meio contendo diferentes concentrações de sacarose ou melaço de cana de açúcar. Após diferentes períodos de cultivos, foi observada a produção

de FOS em meio contendo melaço onde foi cultivado *K. marxianus*, o que não ocorreu para *S. cerevisiae*. Em meios contendo sacarose as duas leveduras não realizaram produção de FOS.

### 2.3 SÍNTESE DE LEVANA E OLIGOSSACARÍDEOS POR LEVANASACARASE

A produção de levana e oligossacarídeos ocorre a partir da hidrólise da sacarose. A glicose obtida é prioritariamente consumida como fonte de carbono e energia pelo micro-organismo e a frutose é polimerizada. Estudos sobre o metabolismo da sacarose por *B. subtilis* revelaram três enzimas importantes: uma sacarase intracelular (InvA ou SacA), uma sacarase extracelular (InvB ou B46) responsável pela hidrólise extracelular da sacarose e a levanasacarase extracelular (SacB) uma  $\beta$ -frutofuranosidase, única responsável pela hidrólise da sacarose e formação de levana, com massa molecular de 56 kDa (SANGILYAND; GUNASEKARAN, 2001).

As atividades de transfrutossilacção e hidrólise da sacarose da levanasacarase são realizadas em sítios ativos distintos. A formação de levana depende de fatores ambientais (temperatura e concentração de glicose, frutose e sacarose) e da taxa de hidrólise da sacarose. Mas as condições que favorecem a síntese podem ser as que inibem a hidrólise (COIMBRA, 2006).

A levanasacarase é uma frutossiltransferase bifuncional e sua estrutura de domínios, bem com seu mecanismo de síntese fruto-oligossacarídeos e levana a partir de sacarose ainda não são completamente conhecidos.

Hijum (2003) descreve que as enzimas frutossiltransferases (FTase) bacterianas realizam 3 tipos de reação com a sacarose: 1º hidrólise, quando a sacarose é invertida em frutose e glicose; 2º polimerização, quando a unidade de frutose é ligada a um polímero frutossil; e 3º transferase, de frutose para um aceptor, formando um oligossacarídeo. As FTases que produzem polímeros de frutana, cujas ligações entre as unidades frutossil são tipo  $\beta$ -2,1, são chamadas inulosacarases (E.C. 2.4.1.9). As levanasacarase (E.C. 2.4.1.10) são as que produzem levana, que tem ligação  $\beta$ -2,6 entre suas unidades frutossil, também são capazes de formar ligação  $\beta$ -2,1 ou uma mistura de ambos (MATULOVÁ et al., 2011).

A síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos é realizada a partir da frutossiltransferase extracelular que se encontra no meio de cultivo do micro-organismo. Bekers et al. (2002) propuseram a utilização do sedimento obtido após precipitação com etanol. Esse precipitado era composto por levana e levanasacarase e foi utilizado como biocatalisador, em meio reacional de sacarose, apresentando resultados satisfatórios. El-Rafai, Abdel-Fattah e Mostafa (2009) utilizaram a levanasacarase de *Bacillus circulans*, que foi obtida da precipitação com a adição de 50% de etanol. Nos ensaios em meio reacionais verificou-se que em concentrações de sacarose acima de 32% são obtidos fruto-oligossacarídeos de menor massa molecular.

O uso do caldo fermentativo após a remoção das células é uma das formas utilizadas em estudos visando à produção desses compostos. Sangeetha, Ramesh e Prapulla (2005) realizaram a produção de FOS utilizando a frutossiltransferase obtida de *Aspergillus oryzae* CFR 202, sendo utilizado o sobrenadante do cultivo como fonte de enzima. A adição da enzima a uma solução de sacarose a 60% resultou em um rendimento de 53% de FOS.

A purificação da enzima para síntese desses compostos é relatada em diversos trabalhos. Park e al. (2003) utilizaram a levanasacarase purificada produzida por *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953 para a produção de FOS, nesse estudo as condições ótimas de produção foram de temperatura a 30°C e pH 6,0.

Nemukula et al. (2009) avaliaram por metodologia de superfície de resposta as condições ótimas de produção de FOS pela frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* isolada e purificada. A influência de pH, concentração de sacarose, temperatura e tempo de reação foram avaliadas na produção de FOS, sendo as condições ótimas obtidas em: 400 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 60°C e pH 5,6. O tempo de reação teve um efeito crítico nos produtos finais, já que até 4 h de reação a concentração de cetoose era alta, após 8h a concentração de frutossilnístose aumentou e por fim, a partir de 16 h de reação o aumento de cetoose foi detectado, resultante da atividade hidrolítica da enzima.

A produção de fruto-oligossacarídeos pode ser otimizada através da metodologia de superfície de resposta, ferramenta que possibilita a otimização das condições do meio de cultivo e outras variáveis críticas para a produção através de

um menor número de ensaios experimentais (LIU et al., 2010). Sangeetha et al. (2004) utilizaram essa ferramenta estatística para avaliar o efeito do tempo de fermentação, concentrações de sacarose e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na produção da frutossiltransferase de *A. oryzae* CFR 202 e os efeitos do tempo de reação e pH na produção de FOS pela enzima. Após a determinação do ótimo desses parâmetros, pode-se atingir um rendimento de 58% de oligofrutose.

A síntese de FOS com altas concentrações de cestose foi realizada por Vega e Zúnifa-Hansen (2011) utilizando a metodologia de superfície de resposta. A partir de uma preparação enzimática comercial (Rohapect CM) obtiveram a concentração de 68,2 % de cestose em 5 h de reação a 50°C, 2,103 M de sacarose e pH 5,5.

#### 2.4 SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

A principal aplicação de poli e oligossacarídeos é para o consumo humano, o alto grau de purificação do produto é indispensável, especialmente quando a manufatura é a partir de uma mistura complexa. A integração da tecnologia de purificação do produto com a tecnologia enzimática é um requisito para o sucesso da produção de polissacarídeos biofuncionais (LI et al., 2004).

A tecnologia de purificação utilizando ultrafiltração é uma promissora técnica, na estratégia de recuperação durante a produção de FOS. A utilização de membranas tem inúmeras vantagens, em comparação às técnicas cromatográficas de purificação. As vantagens incluem pouca necessidade de energia, processo sustentável, fácil modificação de pontos críticos operacionais como temperatura, pressão, taxa de alimentação, agitação e a relativa facilidade no processo de aumento de escala. Além disso, a inibição da produção enzimática pode ser reduzida com a integração de um sistema contínuo ou semicontínuo na remoção do produto. Isto é possível através da utilização de biorreatores de membrana (PINELO et al., 2009)

Kamada et al. (2002) testaram o processo de purificação e concentração de oligossacarídeos a partir da raiz de chicória. Utilizou-se uma membrana com porosidade de 10 kDa. Esse processo resultou em uma redução de mono e dissacarídeos em 9% na solução inicial para 2,6% no final, aumentando a



concentração em aproximadamente 20 vezes. Isso indica que a combinação de um sistema de membranas é uma técnica valiosa no processo de purificação e concentração de oligossacarídeos.

## 2.5 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS FOS

Os fruto-oligossacarídeos tem um grande número de propriedades funcionais que os tornam importantes ingredientes alimentares. Os benefícios nutracêuticos dos FOS têm sido objeto de muitos estudos nos últimos anos.

Prebióticos são compostos não-digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade benéfica das bactérias intestinais. Os FOS não são hidrolisados pelas enzimas digestivas humanas, isto é, eles sofrem a fermentação no cólon e estimulam o crescimento de bactérias benéficas. Isso desestimula potencialmente o crescimento de micro-organismos putrefativos, resultando em um ambiente intestinal saudável. Os efeitos prebióticos são demonstrados em avaliações *in vivo* e *in vitro* (PASSOS; PARK, 2003).

Os FOS podem ser utilizados como fibras dietéticas já que não são hidrolisados por enzimas humanas. Em estudo desenvolvido por Cherbut (2002) foi verificado que os compostos resultantes da fermentação colônica de inulina e frutose atuam sobre o epitélio intestinal, protegendo a mucosa e reduzindo o risco de doenças gastrointestinais.

A fermentação desses compostos aumenta a absorção de íons minerais a partir do intestino, principalmente cálcio e magnésio. Scholz-Ahrens e Schrezenmeir (2002) verificaram que a ação pode ser devido ao aumento do transporte passivo e ativo de minerais através do epitélio intestinal, mediado pelo aumento de metabólitos específicos na microbiota intestinal e redução de pH.

Os oligômeros de frutose, também apresentam atuação nas funções de defesa do organismo. Estudos têm mostrado que a suplementação da dieta de galinhas, porcos e ratos com oligofrutose e outros oligossacarídeos não digeríveis, reduz a densidade fecal de *Salmonella* (LELLIER *et al.*, 2000). Buddington et al. (2002) avaliaram o efeito da suplementação com inulina da Encore Technologies (EUA) (100 g/kg) na dieta de camundongos, infectados sistemicamente com cepas virulentas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Os camundongos

que tiveram inulina adicionada à dieta apresentaram uma mortalidade menor que os camundongos alimentados com celulose e uma fonte de fibras. Os camundongos com dieta suplementada com inulina apresentaram aumento da atividade de células naturais de defesa e fagócitos, além de estimular as funções dos linfócitos T, em comparação aos animais alimentados com celulose e fibras.

Estudos com inulina e FOS têm mostrado redução de nódulos e a prevenção de câncer de cólon. O efeito anticarcinogênico dos FOS, em ratos, de acordo com Pool-Zobel et al. (2002), se deve a um efeito prebiótico resultante da proliferação de bifidobactérias (com produção dos metabólitos lactato ou acetato), bem como de outras bactérias, que poderiam ser responsáveis pelos efeitos anticarcinogênicos. O tratamento da dieta com inulina e oligofrutose a 15% resultou em redução de incidência de tumores mamários induzidos em ratos Sprague Dawley por metilnitrosouréia e inibiu o crescimento de tumores malignos, transplantados em camundongos, além de reduzir a incidência de metástase de tumores malignos, implantados intramuscularmente em camundongos. Os autores afirmam que esse tratamento com FOS corresponde potencialmente aos efeitos subterapêuticos das doses de seis diferentes drogas citotóxicas, comumente utilizadas em tratamento de câncer humano.

Os fruto-oligossacarídeos, também 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 os efeitos benéficos descritos anteriormente. (SANGEETHA; RAMESH; PRAPULLA, 2005).

## 2.6 PREBIÓTICOS

Atualmente, com o acúmulo de informações sobre a ecologia da microbiota gastrointestinal, sabe-se que, cerca de 100 trilhões de bactérias pertencentes a mais de 400 espécies diferentes, de natureza saprofítica e patogênica, vivem harmoniosamente num delicado balanço, até que este seja desequilibrado pela dieta, consumo de drogas, situações de estresse, tratamentos quimioterápicos e outras situações, provocando diferentes tipos de problemas gastrointestinais. Sabe-se também que, em diferentes regiões do trato intestinal,

estão presentes grupos específicos de micro-organismos, como bactérias lácticas e bífidas, que modulam a microbiota nestes espaços principalmente devido aos seus produtos de metabolismo (FERREIRA; TESHIMA, 2000).

Três ferramentas para a modulação desta microbiota foram propostas: a adição de micro-organismos exógenos vivos em alimentos (probióticos), a estimulação seletiva de crescimento e atividade dos micro-organismos benéficos endógenos no intestino (prebióticos) e a combinação de ambos (simbióticos). Todas as três abordagens aumentam o número de bactérias, vistas como positivas para a saúde gastrointestinal humana, normalmente lactobacilos e bifidobactérias (MANDERSON et al., 2005).

Segundo Gibson e Roberfroid (1995) os prebióticos são definidos como ingredientes de alimentos não digeríveis, que estimulam o crescimento seletivo de um número limitado de bactérias do cólon, melhorando a saúde do hospedeiro. Para um substrato ser classificado como prebiótico, ao menos três critérios são requeridos: o substrato não pode ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado; deve ser seletivo no benefício de bactérias comensais no intestino grosso, como as bifidobactérias; fermentação do substrato deve induzir a efeitos benéficos sistêmicos ou na luz intestinal do hospedeiro (PARRACHO, McCARTENEY, GIBSON, 2007).

O efeito seletivo dos prebióticos se deve ao crescimento de bifidobactérias e lactobacilos, que são conhecidos pelo efeito inibitório direto sobre o crescimento de bactérias patogênicas, como clostrídios e enterobactérias patogênicas. A inibição ocorre devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH do cólon, produção de compostos antimicrobianos, e/ou competição por substrato ou sítios de adesão (RYCROFT et al. 2001). Os ácidos estimulam o crescimento das células da mucosa colorretal, retardando a atrofia da mucosa e diminuindo o risco de transformações malélicas ao cólon. (NINGEGOWDA; GURUDUTT, 2011).

Os prebióticos já são amplamente comercializados no Japão e na Europa como adoçantes funcionais e são utilizados como ingredientes na produção de bebidas lácteas, balas, doces, chocolate, biscoitos, geléias, pudins e goma de mascar. Além de FOS e inulina, transgalacto-oligossacarídeo, lactulose, isomalto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, glico-oligossacarídeo e oligossacarídeos de

soja também possuem efeito prebiótico, com resultados demonstrados *in vitro* e *in vivo* (GIBSON; FULLER, 2000).

A modulação dietética da microbiota intestinal humana tem sido realizada por muitos anos. Nos seres humanos, a adição de prebióticos a dieta trouxe aspectos positivos ao balanço da microbiota intestinal. O uso de prebióticos na produção animal resulta numa melhora no desempenho animal e também, na redução do colesterol, redução da incidência de diarreias e constipação, redução de tumores e aumento da resposta imune em várias espécies (LIMA, 2008).

A suplementação da dieta de aves resulta no aumento do ganho de peso, redução na mortalidade e redução da colonização intestinal por salmonela. (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010).

É importante determinar as propriedades prebióticas de um substrato. Isso pode ser feito, por estudo em cultura pura de bactérias intestinais, com utilização de modelos animais com microbiota humana associada em ratos e com ensaios em humanos. Perrins et al. (2001) compararam o comportamento de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697, crescendo em meio sintético contendo oligofrutose ou seus componentes mono e diméricos, visando a compreensão da natureza bifidogênica desse composto. A glicose presente no FOS e a sacarose sustentam o crescimento e a produção celular, enquanto a frutose permite a indução da produção de frutofuranosidase, enzima necessária para a hidrólise de FOS.

Dal Bello et al. (2001) realizaram a avaliação dos efeitos prebióticos de fruto-oligossacarídeos com ligações  $\beta$ -2,6 entre as ligações das unidades de frutossil produzidos por *Lactobacillus*. Esse exopolissacarídeo promoveu o aumento do número de bifidobactérias em cerca de 100 vezes, sendo que os FOS afetaram principalmente o crescimento de *Eubacterium bifforme*.

Outro estudo realizado por Marx, Winkler, Hartmeier (2000) verificou a metabolização de FOS com ligações  $\beta$ -2,6 por 4 cepas de bifidobactérias, foram avaliados crescimento, redução de pH, formação de ácidos graxos de cadeia curta e degradação de FOS, que apresentaram resultados muito diferentes entre as espécies. *B. adolescentis* apresentou o melhor crescimento, a maior produção de ácidos orgânicos e metabolização do substrato

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Estudar a produção de fruto-oligossacarídeos por via fermentativa usando *Bacillus subtilis* natto e por síntese enzimática, bem como verificar a atividade prebiótica desses polímeros.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as melhores condições de produção de fruto-oligossacarídeos por via fermentativa por *B. subtilis* natto a partir de sacarose utilizando a metodologia de superfície de resposta.
- Otimizar a síntese de FOS pela levanasacarase de *B. subtilis* natto em diferentes condições por metodologia de superfície de resposta.
- Verificar a atividade prebiótica dos fruto-oligossacarídeos frente a cepas probióticas.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Micro-organismos

*Bacillus subtilis* natto, foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia a partir do alimento natô e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia - Campinas SP.

*Lactobacillus casei* (LC-1), da Christian Hansen (Dinamarca), *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (cepas probióticas) e *Escherichia coli* ATCC 55302 foram utilizados para a avaliação dos efeitos prebióticos dos fruto-oligossacarídeos. Cepas probióticas cedidas pelo Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UEL) e *E. coli* cedida pela Profa. Jacinta Sanchez Pelayo do Programa de Pós Graduação em Microbiologia (UEL).

#### 4.1.2 Meios de Cultura

##### 4.1.2.1 Meio de preservação para *Bacillus subtilis* natto

**Tabela 1** - Meio de preservação

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

##### 4.1.2.2 Meio de inóculo para *Bacillus subtilis* natto

**Tabela 2 – Meio de inóculo**

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

**Fonte:** Calazans et al. (2000).

#### 4.1.2.3 Meio de fermentação para *B. subtilis natto*

**Tabela 3 – Meio de fermentação**

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Sacarose	*
Extrato de Levedura	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0,6
MnSO <sub>4</sub> . (H <sub>2</sub> O)	0,2
Amônio Citrato	0,25

\*concentração variável de acordo com o planejamento

**Fonte:** Euzenat, Guibert e Combes, (1997, Modificado).

#### 4.1.2.4 Meio de preservação, cultivo e escore prebiótico para *Lactobacillus*

**Tabela 4 – Meio MRS**

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Peptona de soja	10
Extrato de levedura	4
Extrato de carne	8
Glicose	20
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
CH <sub>3</sub> COONa H <sub>2</sub> O	2
Citrato triamoniaco	2
MgSO <sub>4</sub> .7(H <sub>2</sub> O)	0,2
MnSO <sub>4</sub> .4(H <sub>2</sub> O)	0,05

**Fonte:** Man, Rogosa e Sharpe (1960)

Para meio sólido foi adicionado 1,5% de ágar bacteriológico

#### 4.1.2.5 Meio para preservação de Escherichia coli

**Tabela 5 – Ágar bacteriológico**

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Extrato de carne	5
Peptona	10
Cloreto de sódio	5
Ágar	15

#### 4.1.2.6 Meio para cultivo de E. coli



**Tabela 6 – Meio TSB (Tryptic Soy Broth)**

Componente	g.L <sup>-1</sup>
Triptona	17,0
Peptona de soja	3,0
Glicose	2,5
NaCl	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5

Para ativação da *E. coli* e para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) do teste de escore prebiótico o meio sólido TSB foi acrescido de 1,5% de ágar e definido como TSA (Tryptic Soy Agar).

#### 4.1.2.7 Meio M9 para determinar o escore prebiótico de *E. coli*

**Tabela 7 – Solução de sais para meio M9**

Componentes	g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15
NaCl	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	5

**Fonte:** Sambrook, Fritsch e Maniatis. (1989)

**Tabela 8-** Meio M9 para ensaio de escore prebiótico

Componentes	mL.L <sup>-1</sup>
Mg SO <sub>4</sub> (1 M)	2
Glicose ou FOS (20%)	50
CaCl <sub>2</sub> (1 M)	0,1
Solução de sais	200
Água destilada	700

A solução de sais utilizada no meio M9 está descrita na Tabela 7.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação dos Micro-organismos

A preservação do micro-organismo *Bacillus subtilis* natto foi realizada em meio de preservação, como descrito no item 4.1.2.1 a 37°C, por 48 h e mantido a 4°C em câmara refrigerada. O repique das células foi realizado a cada quarenta e cinco dias e a verificação da pureza da cultura foi observada pela técnica de coloração de Gram.

*L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum* foram armazenados em meio MRS (item 4.1.2.4) contendo 15% (v/v) de glicerol a 4°C.

A *E. coli* foi preservada em ágar bacteriológico descrito no item 4.1.2.5. a 4°C.

### 4.2.2 Fermentação de *B. subtilis* natto

#### 4.2.2.1 Inóculo

O inóculo foi obtido através de fermentação em batelada, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio de inóculo descrito no item 4.1.2.2, durante 48 h a 37 °C. Após o tempo de cultivo, o meio foi centrifugado por

15 minutos a 9056 g e as células ressuspensas assepticamente em solução salina NaCl a 0,9% (m/v).

Posteriormente foram realizadas leituras de absorvância a 400 nm e estas correlacionadas com sua respectiva curva de biomassa em  $\text{g.L}^{-1}$ . Todas as fermentações foram padronizadas com inóculo de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de células.

#### 4.2.2.2 Otimização da produção de fruto-oligossacarídeos por *Bacillus subtilis*

Para a produção de fruto-oligossacarídeos por *B. subtilis* natto, uma fermentação submersa foi desenvolvida a partir do planejamento fatorial composto central com as seguintes variáveis independentes: ( $X_1$ ) Sacarose nas concentrações de 216 a 384  $\text{g.L}^{-1}$ ; ( $X_2$ ) pH de 4,3 a 7,7 e ( $X_3$ ) agitação de 66 a 234 rpm, a temperatura foi fixada em 37°C e tempo de cultivo em 24 h. As variáveis codificadas e decodificadas estão listadas na Tabela 9, e a resposta foi ( $Y_1$ ) produção de FOS em  $\text{g.L}^{-1}$ .

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio descrito no item 4.1.2.3 com as variáveis ajustadas conforme Tabela 9. A interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 9056 g por 15 minutos a 4°C, para a separação da biomassa. No sobrenadante foram determinados açúcares totais para a verificação do consumo, atividade da enzima levanasacarase e produção de fruto-oligossacarídeos (FOS).

Após análise estatística obteve-se as melhores condições para a produção de FOS. Os valores ideais das variáveis foram submetidos a validação experimental, com 5 repetições do ponto ótimo. Os resultados observados foram comparados com o valor esperado através de comparação de média com um valor fixo realizado no programa Statistica 7.0, em nível de 5% de significância.

**Tabela 9** – Delineamento fatorial composto central do tipo  $2^3$  com 3 repetições verdadeiras no ponto central e 6 pontos axiais para avaliar a concentração de sacarose, pH, e agitação na produção de FOS por *B. subtilis* natto.

Ensaio	Variáveis originais			Variáveis codificadas		
	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> )	pH	Agitação (rpm)	Sacarose x <sub>1</sub>	pH x <sub>2</sub>	Agitação x <sub>3</sub>
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>			
1	250	5	100	-1	-1	-1
2	350	5	100	1	-1	1
3	250	7	100	-1	1	-1
4	350	7	100	1	1	-1
5	250	5	200	-1	-1	1
6	350	5	200	1	-1	1
7	250	7	200	-1	1	1
8	350	7	200	1	1	1
9	300	6	150	0	0	0
10	300	6	150	0	0	0
11	300	6	150	0	0	0
12	216	6	150	-1,68	0	0
13	384	6	150	1,68	0	0
14	300	4,3	150	0	-1,68	0
15	300	7,7	150	0	1,68	0
16	300	6	66	0	0	-1,68
17	300	6	234	0	0	1,68

#### 4.2.2.3 Produção do extrato enzimático

Na melhor condição de produção de FOS obtida segundo o planejamento da Tabela 9 foi realizada uma nova fermentação, em maior escala, da qual se obteve o extrato enzimático de levanasacarase.

As fermentações foram realizadas em 4 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 250 mL do meio descrito no item 4.1.2.3, com concentração de

sacarose, pH e agitação ajustados na condição otimizada para produção de FOS, segundo o item 4.2.2.2.

A interrupção dos cultivos ocorreu por centrifugação a 9056 g por 15 minutos a 4°C para remoção das células e o sobrenadante foi considerado extrato bruto da levanasacarase, sendo utilizado na etapa de síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos. Ao final da fermentação foram analisadas a produção da levanasacarase, levana e FOS.

#### 4.2.3 Síntese Enzimática de Fruto-oligossacarídeos

A partir do extrato bruto enzimático obtido no item 4.2.2.3 foram realizados ensaios para a produção de fruto-oligossacarídeos.

Um planejamento fatorial composto central  $2^3$ , com cinco repetições verdadeiras no ponto central e seis pontos axiais (Tabela 10) foi realizado para avaliar os efeitos da sacarose, pH e temperatura na síntese enzimática de FOS. As variáveis independentes foram ( $X_1$ ) concentração de sacarose de 81,8 a 418,18 g.L<sup>-1</sup>, ( $X_2$ ) pH em 4,3 a 7,7 e ( $X_3$ ) temperatura de 41,6 a 58,4°C. A resposta avaliada foi produção de FOS em g.L<sup>-1</sup> ( $Y_1$ ).

Para analisar a síntese de FOS pela enzima foi utilizado o método descrito por Sangeetha et al. (2004) sendo utilizados tampão citrato 0,1 M para os pH de 4,3 a 6 e tampão fosfato (Sprensen) 0,1 M para pH 7 a 7,7. As reações foram incubadas nas temperaturas descritas no planejamento experimental da Tabela 10, os produtos da mistura reacional foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados obtidos indicaram uma condição ótima. Esses valores foram submetidos a validação experimental através da repetição dos pontos ótimos e análise estatística, entre os resultados obtidos e os valores esperados.

**Tabela 10** – Delineamento fatorial composto central do tipo  $2^3$  com 5 repetições verdadeiras no ponto central para avaliar o efeito da concentração de sacarose, pH e a temperatura na produção de FOS ( $Y_1$ ) pela levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto.

Ensaio	Varáveis Originais			Variáveis Codificadas		
	Sacarose (g.L <sup>-1</sup> ) X <sub>1</sub>	pH X <sub>2</sub>	Temperatura (°C) X <sub>3</sub>	Sacarose x <sub>1</sub>	pH x <sub>2</sub>	Temperatura x <sub>3</sub>
1	150	5	45	-1	-1	-1
2	150	5	55	-1	-1	1
3	150	7	45	-1	1	-1
4	150	7	55	-1	1	1
5	350	5	45	1	-1	-1
6	350	5	55	1	-1	1
7	350	7	45	1	1	-1
8	350	7	55	1	1	1
9	81,8	6	50	-1,68	0	0
10	418,18	6	50	1,68	0	0
11	250	4,3	50	0	1,68	0
12	250	7,7	50	0	1,68	0
13	250	6	41,6	0	0	-1,68
14	250	6	58,4	0	0	1,68
15	250	6	50	0	0	0
16	250	6	50	0	0	0
17	250	6	50	0	0	0
18	250	6	50	0	0	0
19	250	6	50	0	0	0

#### 4.2.4 Análise Estatística

As respostas  $Y_1$  produção de FOS em  $g.L^{-1}$ , das tabelas 9 e 10 foram analisadas pelo programa Statistica 7.0, para análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5% e por metodologia de superfície de resposta. A validação experimental foi analisada por teste-t em nível de 5% de significância.

#### 4.2.5 Produção e Purificação de FOS para Atividade e Escore Prebiótico.

Na melhor condição de produção de FOS obtida segundo o planejamento da Tabela 9 foi realizada uma nova fermentação para a obtenção de fruto-oligossacarídeo para análise de atividade prebiótica e escore prebiótico.

As fermentações foram desenvolvidas conforme o item 4.2.2 ao término da fermentação o meio foi centrifugado a 9056  $g$  para a remoção das células, em seguida os sobrenadantes foram filtrados em membrana Ultracel YM de porosidade de 3 kDa para retenção da levana (polissacarídeo com massa molecular superior a 3 kDa).

Os FOS foram precipitados com adição de três partes de etanol absoluto gelado para uma parte do filtrado (BEKERS et al., 2002). O precipitado foi removido, lavado com etanol e seco em estufa a 70°C por 6 h ou até a completa eliminação do solvente, em seguida o material foi solubilizado em água destilada e submetido ao processo de liofilização.

#### 4.2.6 Atividade Prebiótica

A análise da atividade prebiótica foi realizada de acordo com Hu et al. (2006). Os micro-organismos *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum* foram ativados por três repiques sucessivos realizados a cada 24 h em meio MRS (item 4.1.2.4). Para os testes foram utilizados os meios MRS sem glicose (controle negativo); MRS

com glicose 2 % (m/v) (controle positivo) e MRS com FOS 2% (m/v) (teste). O controle negativo foi realizado para a verificação de contaminação de glicose.

Foram utilizados 10 mL de cada meio, em triplicata e o inóculo foi de 1% (v/v) para todos os ensaios. Mantidos a 37°C. por 48 h de incubação. A interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 3000 g por 10 minutos e o crescimento celular foi acompanhado por turbidimetria e do sobrenadante foi determinado o pH, concentração de carboidratos e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e nos tratamentos com diferenças estatísticas, realizou-se o teste de Tukey. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

#### 4.2.7 Escore de Atividade Prebiótica

Esse teste é a base para a seleção de prebióticos para uso em alimentos e prediz a extensão do efeito da atividade prebiótica. O escore da atividade prebiótica do FOS foi realizado segundo Huebner, Wehlong e Hutkins (2007) utilizando os probióticos (4.1.1) e a *E. coli*.

Os probióticos mantidos no meio MRS (Tabela 4) foram ativados e transferidos para o meio MRS ágar por 48 h a 37°C. Após esse período uma colônia foi transferida para 10 mL do meio MRS, incubado por 12 h. Na seqüência foi transferido 1% (v/v) da cultura para tubos contendo 10 mL dos meios MRS com glicose 2% (m/v) e meio MRS com FOS 2% (m/v). As culturas foram incubadas por 24h, alíquotas foram diluídas, plaqueadas em meio MRS Agar e mantidas a 37°C até crescimento celular. A contagem das células viáveis foram definidas como unidades formadoras de colônia (UFC).

A cepa de *E. coli* mantida em ágar bacteriológico (item 4.1.2.5) foi ativada em meio TSA e incubada por 48 h a 37°C. Ao final desse período uma colônia foi transferida para 10 mL de meio TSB incubada por 12h h a 37°C. Após esse período foi retirado 1% (v/v) da cultura e transferida para 10 mL do meio M9 contendo 2% (m/v) de glicose e para o meio M9 com 2% (m/v) de FOS. As culturas foram incubadas a 37 °C e após 24 h alíquotas foram diluídas, plaqueadas em meio



TSA e mantidas a 37°C até crescimento celular. A contagem das células viáveis foi definida como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

O escore da atividade prebiótica foi determinado usando a seguinte equação:

$$\text{escore de atividade prebiótica} = \left[ \frac{(\log \text{ UFC/mL do probiótico em FOS a 24h} - \log \text{ UFC/mL do probiótico em FOS a 0h})}{(\log \text{ UFC/mL do probiótico em glicose a 24h} - \log \text{ UFC/mL do probiótico em glicose a 0h})} \right] - \left[ \frac{(\log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em FOS a 24h} - \log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em FOS a 0h})}{(\log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em glicose a 24h} - \log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em glicose a 0h})} \right].$$

#### 4.2.8 Métodos Analíticos

##### 4.2.8.1 Determinação da biomassa

###### 4.2.8.1.1 Curva padrão de biomassa de *Bacillus subtilis natto*

A curva padrão de biomassa foi confeccionada a partir de um cultivo realizado em meio de fermentação contendo 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e a biomassa obtida após centrifugação, foi lavada com água destilada e ressuspensa em salina 0,9 % (m/v). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série de diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,7 de absorvância em  $\lambda = 400 \text{ nm}$ . Paralelamente, distribuiu-se 3 alíquotas de 1 mL em cadinhos, previamente tarados e levados à estufa (70°C), até atingir peso constante. Em seguida, plotou-se o gráfico relacionando absorvância x peso seco g.L<sup>-1</sup>.

###### 4.2.8.1.2 Curva padrão de biomassa das cepas probióticas (*MANISSERI; GUDIPATI, 2011*)

Para confeccionar a curva padrão de biomassa um cultivo foi realizado em meio líquido de MRS, a 37°C e após 24 h de cultivo a biomassa foi obtida após centrifugação (3000 g, 15 minutos, 15°C), lavada com água destilada e ressuspensa em salina 0,9% (m/v). Uma alíquota de 1 mL foi submetida a uma série

de diluições para a obtenção de leituras de 0,1 a 0,7 de absorvância em  $\lambda = 600$  nm. Paralelamente, distribuiu-se 3 alíquotas de 1 mL em cadinhos, previamente tarados e levados à estufa (70°C), até atingir peso constante. Em seguida, plotou-se o gráfico relacionando absorvância x peso seco  $\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.2.8.1.3 Quantificação da biomassa

Ao final das fermentações, os meios de cultivo foram centrifugados, a 9056 g por 15 minutos a 4°C e do sedimento celular ressuspenso em solução salina 0,9 % (m/v). Determinou-se a concentração de biomassa a  $\lambda = 400$  nm. Os valores obtidos foram relacionados à curva de biomassa, obtendo os valores em  $\text{g.L}^{-1}$ .

Para a quantificação da biomassa das cepas probióticas, os cultivos foram centrifugados a 3000 g, 20 minutos a 15°C, o sedimento celular foi ressuspenso em solução salina 0,9 % (m/v) determinou-se a concentração de biomassa a  $\lambda = 600$  nm. Os valores obtidos foram relacionados à curva de biomassa, obtendo os valores em  $\text{g.L}^{-1}$ .

#### 4.2.8.2 Determinação dos açúcares redutores (AR) das fermentações

Os açúcares redutores do início e do final das fermentações foram dosados pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944) após hidrólise e as absorvâncias foram medidas a  $\lambda = 540$  nm.

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

#### 4.2.8.3 Atividade da levanasacarase no caldo fermentativo

A atividade da levanasacarase foi determinada do sobrenadante da fermentação imediatamente após interrupção do cultivo pela medida de formação de levana. Foram utilizados, 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 h a 30°C conforme Ananthalakshmy & Gunasekaran, (1999). A reação foi interrompida por banho-maria fervente por 10 min.

Após o tempo de reação, a atividade foi estimada pela produção de levana. Para determinar a levana das fermentações e na síntese enzimática foi realizada a precipitação por etanol a 90% a 4°C na proporção de 3:1 (etanol: sobrenadante) por 12 h. Após este tempo, a levana foi centrifugada a 18620 g por 20 minutos, em centrifuga refrigerada a 4°C. A levana separada foi lavada em 3 volumes de etanol 90% gelado e centrifugada novamente.

A levana obtida foi ressuspensa em 1mL de HCl 1N e hidrolisada por uma hora a 100°C, resfriada e neutralizada com 0,1mL de NaOH 2N segundo Ananthalakshmy & Gunasekaran (1999), modificado.

A concentração de levana foi estimada pelo método descrito no item 4.2.8.2 através de açúcares redutores, utilizando frutose como padrão, em concentrações de 0 a 100 µg/ml. As leituras das absorvâncias foram realizadas em  $\lambda = 540$  nm.

A atividade de formação da levana foi expressa em 1 µMol de frutose polimerizado em mL por minuto nas condições experimentais.

#### 4.2.8.4 Síntese de enzimática de FOS

Os ensaios para a produção de FOS pela levanasacarase foram realizados com 0,5 mL da fonte de enzima (item 4.2.2.2) com 1,5 mL de sacarose em diferentes concentrações e variando os valores de pH e temperatura. A reação enzimática foi conduzida por 12 h, interrompida em banho-maria fervente, por 15 minutos. Os FOS foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Sangeetha et al. 2004).

#### 4.2.8.5 Determinação de fruto-oligossacarídeos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As amostras da fermentação, da síntese enzimática e de atividade prebiótica foram submetidas à análise por cromatografia de alta eficiência (CLAE) para quantificar os FOS. As amostras foram previamente filtradas com o auxílio de um sistema de filtração de membrana 0,45 µm Millipore.

A amostra filtrada foi submetida a de cromatografia líquida de alta eficiência, segundo metodologia de Park, Oh e Yun (2001), em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10A e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel foi água desmineralizada e degaseificada, o forno foi mantido a 80°C sob fluxo de 0,6 mL/min. Como padrões foram utilizados sacarose, frutose, glicose, 1-cestose, nistose (Sigma Aldrich, grau HPLC).

#### 4.2.8.6 Dosagem de ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Dos testes de atividade prebiótica foram dosados os ácidos orgânicos por CLAE. Alíquotas dos testes de atividade prebiótica (item 4.2.6) foram filtradas e injetadas em um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A coluna utilizada foi exclusão iônica Aminex HPX- 87H (7,8 x 300mm,) mantida a temperatura de 65°C. A fase móvel foi 0,005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a um fluxo de 0,8 ml/min, detector UV a 210nm (DURIEUX et al, 2001).

A quantificação das amostras foi conduzida utilizando curvas de calibração de ácido acético e láctico, nas concentrações entre 0,5 e 3 mM e os resultados serão expressos em mMol.L<sup>-1</sup>.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

O artigo intitulado “Produção de fruto-oligossacarídeos por fermentação de *Bacillus subtilis* natto” está apresentado no Anexo A, submetido de acordo com as normas do periódico World Journal of Microbiology and Biotechnology (Anexo B).

O artigo intitulado “Síntese enzimática de fruto-oligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto aplicando metodologia estatística” está apresentado no Anexo C submetido de acordo com as normas do periódico “Bioresource Technology” (Anexo D).

O artigo intitulado “Atividade prebiótica de fruto-oligossacarídeos produzidos por *Bacillus subtilis* natto” está apresentado no Anexo E, submetido de acordo com as normas do periódico Food Science & Technology (Anexo F)

## CONCLUSÕES

O micro-organismo *Bacillus subtilis* natto mostrou-se promissor na produção de FOS tanto por via fermentativa como por síntese enzimática, utilizando a levanasacarase.

A otimização da produção de FOS por via fermentativa, apresentou a produção máxima de 98,86 g.L<sup>-1</sup> quando a concentração de sacarose foi de 300 g.L<sup>-1</sup>, pH 7,7 e agitação de 234 rpm.

A produção de FOS por síntese enzimática pela levanasacarase também foi otimizada. A análise estatística mostrou que para alcançar a máxima produção de 65,35 g.L<sup>-1</sup>, as condições ótimas foram sacarose em 334 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,0 e temperatura de 45,8°C.

Os FOS produzidos por via fermentativa e purificados tiveram seu efeito prebiótico avaliado frente a três linhagens de *Lactobacillus*. A oligofrutose foi metabolizada por todas as linhagens que cresceram e produziram ácidos orgânicos, mostrando que os FOS produzidos por *Bacillus subtilis* natto é um carboidrato prebiótico.

A partir do escore prebiótico verificou-se que *L. plantarum* apresentou a maior pontuação (0,526), indicando uma maior afinidade dessa cepa com os FOS, o que possibilita a combinação de ambos para a produção de um alimento simbiótico.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A.F.; MAHMOUD, A.R.; ESAWY, M.A.T. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. **Current microbiology**. v.51, p.402–407, 2005.
- ANANTHALAKSMY, V.K., GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.87, p. 214-217, 1999.
- BARROS, V.R.M. **Estudo dos fatores de patogenicidade de *Bacillus* sp isolado em leite UHT**. 2004. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses)-Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, 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.
- BUDDINGTON, R.K.; KELLY-QUAGLIANA, K.; BUDDINGTON, K.K.; KIMURA, Y. Non-digestible oligosaccharides and defense functions: lessons learned from animal models. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. 231-239, 2002.
- 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**, v. 27, p. 245–247, 2000.
- CHERBUT, C. Inulin and oligofructose in the dietary fibreconcept. **British Journal of Nutrition**, v.87, p.159–162, 2002.
- COIMBRA, C. G. O. **Produção de fructo-oligossacarídeos e aspectos da biosseparação das frações leves de levana hidrolisada**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- DAL BELLO, F.; WALTER, J.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolisaccharides from Lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 232-237, 2001.
- DURIEUX, A., FOUNGNIES, C., JACOBS, H. SIMON, J.P. Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria. **Biotechnology Letters**. v. 23, p. 1523-1527, 2001.
- 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.

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.

FERREIRA, C.L.L.F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 16, 2000.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, p. 15-28, 2010.

GHAZI, I.; SEGURA, A.G.; FÉRNANDEZ-ARROJO, L.; ALCADE, M.; YATES, M.; ROJAS-CERVANTES, M.L.; PLOU, F.J.; BALLESTEROS, A. Immobilisation of fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated Sepabeads EC for the synthesis of fructo-oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.35, p. 19-27, 2005.

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

GIBSON, G.R., FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **The Journal of Nutrition**. P. 391-395, 2000.

HIJUM, S.A.F.T., MAAREL, M.J.E.C., DIJKHUIZEN, L. Kinetics properties of an inulosucrase from *Lactobacillus reuteri* 121. **FEBS Letters**. V. 54, p. 207-210, 2003.

HO, G.H.; HO, T.I.; HSIEH, K.H.; SU, Y.C.; LIN, P.Y.; YANG, J.; YANG, K.H.; YANG, S.C..  $\gamma$ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, p. 1363-1384, 2006.

HENDGES, D. H. ; DARTORA, D. F. ; SANGALETTI, N. ; AGUIAR, C. L. ; CADORIN, T. L. ; ONOFRE, S. B. ; ALENCAR, S. M. . Produção de fruto-oligosacarídeo a partir da fermentação de sacarose por linhagem de levedura osmofílica. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003, Florianópolis - SC. CD-ROM do XIV Simpósio Nacional de Fermentações, 2003. v. 1. p. 1-1.

HU, B.; GONG, G.; WANG, Y.; MA, Y.; LI, J.; YU, W. Prebiotic effects of neoagarose-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. **Anaerobe**. v. 12, p. 260-266, 2006.

HUEBNER, J., WEHLONG, R.L., HUTKINS, R.W. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**. v.17, p. 770-775, 2007.

LETLIER, A.; MESSIER, S.; LESSARD, L.; QUÉSSY, S. Assessment of various treatments to reduce carriage of Salmonella in swine. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p.27-31, 2000.



LI, W.; LI, J.; CHEN, T.; CHEN, C. Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides I. Operation models. **Journal of membrane science**. v.245, p. 123-129, 2004.

LIMA, H.J.D. Prebióticos na dieta de frangos de corte. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.5, p. 599-606, 2008.

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

KAMADA, T.; NAKAJIMA, M.; NABETANI, H.; SAGLAM, N.; IWAMOTO, S. Availability of membrane technology for purifying and concentrating oligosaccharides. **Europe Food Research Technology** v. 212 p. 435-440, 2002.

MAN J.C., ROGOSA M., SHARPE M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology** 1961; 23:130-5.

MANDERSON, K., PINART, M., TUOHY, K.M. GRACE, W.E., HOTCHKISS, A.T., WIDMER, W., YADHAV, M.P., GIBSON, G.R., RASTALL, R.A. Determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, p. 8383-8389, 2005.

MANISSERI, C., GUDIPAI, M. Prebiotic activity of purified xilobiose obtained from ragi (*Eleusine coracana*, Indaf-15) Bran. **Indian Journal of Microbiology**. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/8q1128322212766k/fulltext.pdf>>.

MARX, S.P., WINKLER, S., HARTMEIE, W. Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 182, p. 163-169, 2000.

MATULOVÁ, M., HUSÁROVÁ, S., CAPEK, P., SANCELME, M., DELORT, A.M. NMR structural of fructans produced by *Bacillus* sp. 3B6, bacterium isolated in cloud water. **Carbohydrate Research**. v. 346, p. 501-507, 2011.

MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**. v. 56, p. 181-188, 2003.

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

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

NINGEGOWDA, M.A., GURUDUTT S. In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on

$\beta$ -glucuronidase activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 2011. Disponível em: < <http://www.springerlink.com/content/90124015t5gr1742/>>

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

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

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

PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Fruto-oligosacarídeo: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p385-390, 2003

PERRIN, S.; WARCHOL, M.; GRILL, J.P.; SCHNEIDER, F. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 859-865, 2001.

PINELO, M.; JONSSON, G.; MEYER, A.S. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operation features affecting performance. **Separation and Purification Technology**. v.70, p.1-11, 2009.

POOL-ZOBEL, B. LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBEFROID, M.B. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. **British Journal of Nutrition**, v.. 87, p.273-281, 2002.

RYCROFT, C.E.; JONES, M.R.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R. A. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 878-887, 2001.

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

SANGEETHA, P.T.; RAMESH, M.N; PRAPULLA, S.G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**. v.16, p. 442-457, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning. 2<sup>nd</sup> edição, vol. 3, 1989.

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

SCHOLZ-AHRENS K.E.; SCHREZENMEIR, J. Inulin, oligofructose and mineral metabolism-experimental data and mechanism. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p.179–186, 2002.

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. 21, p. 8211–8215, 2005.

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

SILVA, C.E.V. **Produção enzimática de fruto-oligossacarídeo (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Universidade Estadual de São Paulo. Piracicaba.

SILVA, J. B.; FAI, A.E.C.; KAWAGUTI, H.Y.; THOMAZELLI, I.; BASSO, L.C.; PASTORE, G.M. Caracterização dos fruto-oligossacarídeo de cadeia longa produzidos pela linhagem osmofília de *Bacillus* sp. IX Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzática: Versatilidade e eficiência na inovação sustentável, p 115, 2010.

SOMOGYI, M. A. A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v. 160, p 61 – 68, 1952.

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

TUOHY, M., PAPPALARDO, G., MANNING, R., DUGAL, L.F., LEVY, D. Leveraging growth in the emergency functional foods industry: Trends and market opportunities. **Functional Foods**. Agosto, 2009.

VEGA, R., ZÚNIGA- HANSEN, M.E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. **Bioresource Technology** v. 102, p. 10180-10186, 2011.

VIKARI, L. Formation of levana and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p. 252-255, 1984.

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

## **ANEXOS**

**ANEXO A**  
**Artigo A**

**PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR FERMENTAÇÃO DE**  
***BACILLUS SUBTILIS* NATTO**

**Patrícia Bittencourt da Silva, Dionísio Borsato, Maria Antonia Pedrine Colabone**  
**Celligoi<sup>a\*</sup>**

## PRODUÇÃO DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR FERMENTAÇÃO DE *BACILLUS SUBTILIS* NATTO

Patrícia Bittencourt da Silva<sup>a</sup>, Dionísio Borsato<sup>1</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone  
Celligoi<sup>a\*</sup>

### Resumo

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose, que contém um resíduo de glicose no final da cadeia e sua produção ocorre pela ação de frutossiltransferases presentes em plantas e micro-organismos. Os FOS possuem propriedades funcionais que fazem deles importantes ingredientes alimentares, como atuação na modulação do metabolismo lipídico, aumento na absorção intestinal de cálcio e por serem prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade das bactérias benéficas ao organismo. *Bacillus subtilis* natto é um produtor de levana em meio de fermentação rico em sacarose. A produção de levana é devida a enzima levansacarase que também é responsável pela produção de FOS. O objetivo desse trabalho foi avaliar por metodologia estatística, usando um delineamento fatorial composto central, a influência das variáveis concentração de sacarose ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e agitação ( $X_3$ ) na formação de FOS por *B. subtilis* natto. As fermentações foram conduzidas em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura, os meios foram inoculados com  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de células e foram incubados em *shaker* orbital a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h e os parâmetros foram ajustados de acordo com o delineamento experimental. Após a fermentação, a produção de FOS foi acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência usando cefose e nistose como padrões. As análises estatísticas mostraram que o pH foi significativo. As condições ótimas determinadas foram concentração de sacarose em  $300 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 7,7 e agitação 234 rpm, onde a produção foi de  $98,86 \text{ g.L}^{-1}$  e não diferiu do valor esperado estatisticamente de  $106,98 \text{ g.L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** *Bacillus subtilis* natto. Levansacarase. Fruto-oligossacarídeos. Prebióticos

### Introdução

A preocupação com um estilo de vida saudável tem aumentado a busca por alimentos funcionais. O mercado global voltado para esta área movimentou, pelo menos, 33 bilhões de dólares em 2001 (Menrad 2003) e somente nos Estados Unidos a demanda do mercado de alimentos funcionais foi de aproximadamente 30 bilhões de dólares. Entre os produtos que conferem benefícios a saúde estão alguns tipos específicos de carboidratos

---

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil. Autor para correspondência Tel.: +55 43 33714513 E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br)

<sup>1</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil. \*

dietéticos, destacando-se os fruto-oligossacarídeos (FOS), que tem se popularizado devido aos efeitos fisiológicos proporcionados ao consumidor (Patel, Goyal 2011).

Os FOS são carboidratos de baixa massa molecular, contendo resíduos de açúcares com grau de polimerização entre 3 e 9, nos quais as unidades de frutossil são unidas por ligações na posição  $\beta$ -(2 $\rightarrow$ 1) da sacarose, entre as oligofrutoses as mais encontradas são 1-cestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil nistose (GF4) (Yun 1996). O tipo de ligação presente os torna não suscetíveis a atividade hidrolítica das enzimas digestivas humanas, possuindo importante função fisiológica como prebióticos (Biedrzycka, Bielecka 2004). Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias presentes no cólon, proporcionando a melhora da saúde do hospedeiro (Gibson, Roberfroid 1995).

Além de estimular o crescimento de lactobacilos e bifidobactérias, ocorre a produção de ácidos graxos de cadeia curta como um dos produtos finais da fermentação. Esses ácidos estimulam o crescimento das células da mucosa colorretal, retardando a atrofia da mucosa e diminuindo o risco de transformações malélicas ao cólon. (Ningegowda, Gurudutt 2011). Outras características dos FOS tem tido atenção especial como o baixo valor calórico, os efeitos na redução de níveis de fosfolipídios, triglicerídeos e colesterol, auxílio na absorção de cálcio e magnésio pelo intestino (Mussato, Teixeira 2010).

Embora os FOS possam ser encontrados em diversas fontes naturais como aspargo, beterraba, cebola, chicória e alho, sua concentração nessas fontes é baixa e sua produção é limitada por condições climáticas (Yun 1996). Industrialmente, os FOS são produzidos principalmente a partir da sacarose por enzimas microbianas com atividade de transfrutossilação ( $\beta$ - frutofuranosidases, também denominadas frutossiltransferases) (Mussato et al 2009). Convencionalmente, a produção industrial de FOS por micro-organismos inclui um processo de dois estágios e outro processo de uma única etapa. No primeiro, inicialmente é feita a produção da enzima por fermentação microbiana, seguida por reação enzimática com substrato para a produção de FOS. O segundo processo é realizado com a produção da enzima e reação enzimática em um único processo fermentativo. Esse último processo não depende da purificação da enzima, possibilitando a produção de FOS com apenas uma etapa, aliado ao menor custo de produção (Ning et al. 2010).

Diversos são os micro-organismos que possuem enzimas com atividade de transfrutossilação, entre os fungos destacam-se *Aspergillus japonicus* (Mussato et al 2009;

Mussato e Ferreira 2010), *Aspergillus oryzae* (Sangeetha, Ramesh, Prapulla 2005), *Aureobasidium pullulans* (Shih et al 2004) e bactérias como *Microbacterium laevaniformans* (Park et al 2003), *Zymomonas mobilis* (Bekers et al 2002), *Bacillus circulans* (El-refai, Abdel-Fattah, Mostafa, 2009) e *B. subtilis* (Euzenat, Guibert, Combes 1997; Abdel-Fattah, Mahmoud, Esawy 2005).

*B. subtilis* natto possui a enzima levanasacarase (EC 2.4.1.10), uma frutossiltransferase que a partir da sacarose realiza a formação de levana, um homopolímero com ligações  $\beta$ - (2 $\rightarrow$ 6) com ramificações  $\beta$ - (2 $\rightarrow$ 1). Além da formação desse polímero, a levanasacarase catalisa a liberação de frutose e formação de fruto-oligossacarídeos (Abdel-fattah, Mahmoud, Esawy 2005).

A produção de FOS é afetada por diferentes variáveis como concentração de sacarose no meio de fermentação, pH, tempo de cultivo, entre outros (Sangeetha, Ramensh, Prapulla 2003), o que torna a metodologia de superfície de resposta uma ferramenta que possibilita a otimização das condições do meio de cultivo e outras variáveis críticas para a produção através de um menor número de ensaios experimentais (Liu et al 2010).

Este trabalho teve por objetivo selecionar as melhores condições de produção de fruto-oligossacarídeos por via fermentativa por *B. subtilis* natto utilizando a metodologia de superfície de resposta.

## **Materiais e métodos**

### Micro-organismo e meios

O *Bacillus subtilis* natto, foi isolado no departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Fundação André Tosello Pesquisa e Tecnologia – Campinas, SP. O micro-organismo foi mantido a 4°C em meio de preservação com a seguinte composição: peptona 50 g.L<sup>-1</sup>, extrato de carne 30 g.L<sup>-1</sup> e ágar 20 g.L<sup>-1</sup>. O meio de inóculo continha sacarose 100 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup> e MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 0,5 g.L<sup>-1</sup>. O meio de fermentação foi composto por sacarose (concentração de acordo com o planejamento), extrato de levedura 2 g.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g.L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g.L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O) 0,6 g.L<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>. (H<sub>2</sub>O) 0,2 g.L<sup>-1</sup>; amônio citrato 0,25 g.L<sup>-1</sup>.



## Condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir de cultura estoque que foi transferida para Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio, mantido a 37°C, agitação de 150 rpm por 48 h. Após a incubação o meio foi centrifugado a 9056 g e as células foram ressuspensas em solução salina 0,9% (m/v), sendo então utilizada para inóculo de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de células nos diferentes meios de fermentação. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 25 mL de meio de fermentação, sendo conduzidas a 37°C por 24 h, as concentrações de sacarose, pH e velocidade de agitação foram ajustadas de acordo com o planejamento estatístico (Tabela 1). Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9056 g por 15 min a 4°C, em seguida foi determinada a produção de FOS no sobrenadante da fermentação.

## Determinação de fruto-oligossacarídeos

Amostras para análise da produção de FOS foram obtidas do caldo fermentativo após centrifugação. Essas amostras foram previamente filtradas com o auxílio de um sistema de filtração de membrana 0,45 µm Millipore. A análise dos fruto-oligossacarídeos foi realizada em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector de índice de refração Shimadzu RID-10A e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). A temperatura da coluna foi mantida a 80°C, as amostras (20 µL) foram eluídas a um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> de água ultrapura (Jung et al. 1989). Os padrões utilizados foram 1-cestose e nistose (Sigma Aldrich, grau HPLC). A concentração de final de FOS foi definida pela soma de cestose e nistose e expressa em g.L<sup>-1</sup>.

## Delineamento composto central

Para verificar as melhores condições para a produção FOS por *B. subtilis* natto, foi realizado um planejamento fatorial composto central com as variáveis: concentração de sacarose ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e agitação ( $X_3$ ) para a produção de fruto-oligossacarídeos. As variáveis foram codificadas pela Equação (1):

$$x_i = (X_i - X_{cp}) / \Delta X_i \quad (1)$$

onde  $x_i$  é o nível codificado da variável,  $X_i$  é o valor real da variável,  $X_{cp}$  é o valor real da variável no ponto central, e  $\Delta X_i$  é a variação de valor nos níveis reais. Os parâmetros para a produção de FOS foram sacarose nas concentrações de 216 a 384 g.L<sup>-1</sup>, pH de 4,3 a 7,7 e agitação de 66 a 234 rpm (Tabela 1). A resposta ótima para a produção de FOS foi predita seguindo o modelo quadrático Equação 2:

$$\hat{Y} = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

onde  $\hat{Y}$  é a variável resposta,  $b_0$  é o intercepto,  $b_i$  é o coeficiente para o efeito linear,  $b_{ii}$  é o coeficiente para o efeito quadrático,  $b_{ij}$  é o coeficiente para o efeito da interação, e  $x$  é o nível codificado da variável.

#### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (2004) e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### Resultados

A produção de fruto-oligossacarídeos por fermentação por *Bacillus subtilis* natto foi avaliada em diferentes meios. A otimização da produção de FOS foi realizada utilizando um planejamento fatorial composto central. Os resultados do delineamento estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Pelos resultados analisados estatisticamente o coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) foi de 0,882, isso indica que 88,20% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo, esse valor foi considerado aceitável já que, de acordo com Joglekar e May (1987), o coeficiente de determinação deve ser de no mínimo 80%. A falta de ajuste do modelo foi avaliada, apresentando-se não significativa ( $p=0,5541$ ), indicando que a equação do modelo foi adequada para a predição da produção de FOS, sob qualquer combinação de valores das variáveis.

*B. subtilis* natto mostrou ser promissor na produção de FOS atingindo valores de oligofrutose, de 91,98g.L<sup>-1</sup> no ensaio 4 (250 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7 e 200rpm), Tabela 1. A partir da análise de regressão das variáveis, verificou-se que a sacarose

apresentou efeito negativo tanto no efeito linear quanto no quadrático, enquanto pH e agitação apresentaram efeito linear positivo sobre a produção de FOS.

**Tabela 1** – Níveis codificados e reais do planejamento fatorial composto central para produção de FOS por fermentação submersa por *Bacillus subtilis* natto. A temperatura fixada em 37°C e tempo de cultivo em 24 h.

Ensaio	$x_1$ ( $X_1$ , g.L <sup>-1</sup> )	$x_2$ ( $X_2$ )	$x_3$ ( $X_3$ , rpm)	Produção de FOS (g.L <sup>-1</sup> )
1	-1 (250)	-1 (5)	-1 (100)	12,61
2	-1 (250)	-1 (5)	1 (200)	0
3	-1 (250)	1 (7)	-1 (100)	58,28
4	-1 (250)	1 (7)	1 (200)	91,98
5	1 (350)	-1 (5)	-1 (100)	10,77
6	1 (350)	-1 (5)	1 (200)	0
7	1 (350)	1 (7)	-1 (100)	53,61
8	1 (350)	1 (7)	1 (200)	77,23
9	-1,68 (216)	0 (6)	0 (150)	44,89
10	1,68 (384)	0 (6)	0 (150)	0
11	0 (300)	-1,68 (4,3)	0 (150)	0
12	0 (300)	1,68 (7,7)	0 (150)	69,97
13	0 (300)	0 (6)	-1,68 (66)	11,39
14	0 (300)	0 (6)	1,68 (234)	62,78
15	0 (300)	0 (6)	0 (150)	64,86
16	0 (300)	0 (6)	0 (150)	82,01
17	0 (300)	0 (6)	0 (150)	48,56

$x_1$ : Concentração de sacarose,  $x_2$ : pH e  $x_3$ : agitação

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para o modelo quadrático da produção de FOS por *B. subtilis* natto em meio de sacarose.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	p-valor
Sacarose (L)	684,96	1	684,96	0,1693
pH (L)	10296,05	1	10296,05	0,0005*
Agitação (L)	1060,19	1	1060,19	0,0983
Sacarose (Q)	1969,51	1	1969,51	0,0355*
pH (Q)	872,09	1	872,09	0,1274
Agitação (Q)	729,75	1	729,75	0,1578
x1x2	38,63	1	38,63	0,7267
x1x3	8,49	1	8,49	0,8694
x2x3	814,06	1	814,06	0,1388
Erro puro	559,57	2		
Lack of fit	1467,02	5	279,79	0,5541

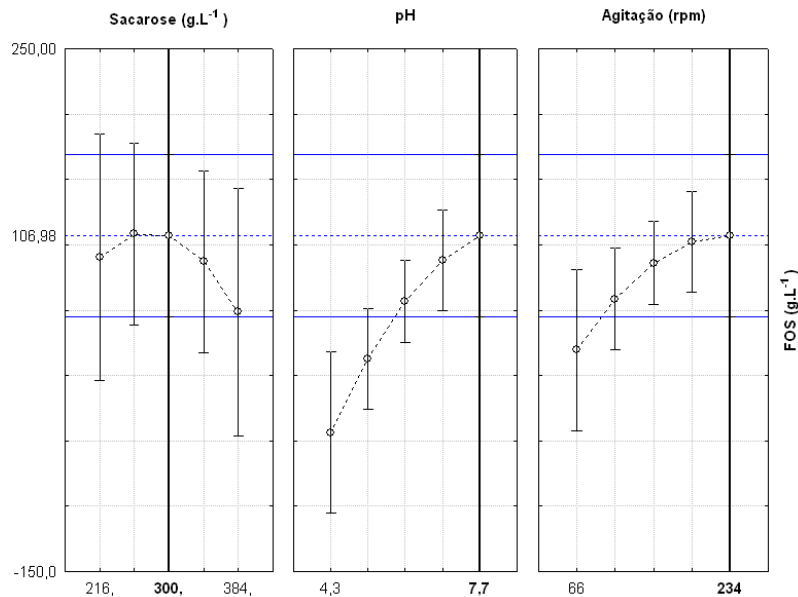
$R^2=0,88$  \* Significativo para valores de  $p<0,05$

A análise da equação de regressão (3) mostrou que apenas o intercepto, o termo linear do pH e o termo quadrático da sacarose foram significativos em nível de 5%. Ao se comparar os ensaios 2 e 4, na mesma concentração de sacarose (250 g.L<sup>-1</sup>) e mesma agitação (200 rpm), observa-se uma redução drástica na produção de FOS. Quando o pH foi alterado de 7 para 5, alterou a produção de 91,98 g.L<sup>-1</sup> e para zero de oligofrutose.

A variável sacarose atua na produção de FOS e quando no valor de 384 g.L<sup>-1</sup> (Ensaio 10, pH 6, 150 rpm) a produção foi nula e já nos ensaios 15, 16 e 17 (pontos centrais) a produção média foi de 65,14 g.L<sup>-1</sup>.

A Figura 1 mostra as melhores condições de produção de FOS obtidas pelo modelo preditivo. Ela indica que a concentração de 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,7 e agitação de 234 rpm possibilita o máximo teórico de 106,98 g.L<sup>-1</sup> de FOS. Com o objetivo de validar a equação do modelo, três ensaios adicionais sob as condições ótimas descritas foram realizados. O valor médio de FOS foi 98,86 g.L<sup>-1</sup>, o qual está muito próximo do predito, ao serem comparados pelo teste Tukey, em nível de 5%, não foram diferentes estatisticamente.

**Figura 1** Otimização da produção de FOS por *B. subtilis* natto usando o Software Statistica 7.0



A partir dos coeficientes de regressão foi obtida a seguinte equação polinomial de segunda ordem para a predição da produção de FOS:

$$Y=64,59-7,08x_1+27,49x_2+8,81x_3-13,18x_1^2-8,75x_2^2-8,01x_3^2-2,19 x_1x_2-1,03 x_1x_3+10,08 x_2x_3 \quad (3)$$

onde Y é a resposta predita para FOS (g.L<sup>-1</sup>),  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os valores codificados para sacarose, pH e agitação respectivamente.

## Discussão

A produção de FOS foi realizada pela enzima levanasacarase extracelular (E.C.2.4.1.10) que se apresenta livre no meio de fermentação. Assim, a produção de FOS e levana encontra-se sujeita a condições como concentração de sacarose e pH, variáveis que interferem nas duas atividades da levanasacarase, de hidrólise e transfrutossilção.

A concentração de sacarose com melhor produção de FOS foi com 342 g.L<sup>-1</sup> resultado próximo ao encontrado por Abdel-Fattah, Mahmoud e Esawy (2005). Esses autores observaram que concentrações altas de sacarose estimularam a produção de fruto-oligossacarídeos por levanasacarase de *Bacillus subtilis* NRC 33. Silva (2008) estudou a produção de FOS por via fermentativa por *Kluyveromyces marxianus* e

*Saccharomyces cerevisiae* os quais atingiram o máximo de 2,38 e 0,73 g. L<sup>-1</sup>, respectivamente. Coimbra (2006) obteve uma produção de FOS de 32,5 g.L<sup>-1</sup> na fermentação com *Zymomonas mobilis* conduzida por 24 h a 40°C, 100 rpm e a 150 g.L<sup>-1</sup> de sacarose pelo micro-organismo. No presente estudo o *Bacillus subtilis* natto demonstrou ser capaz de produzir grandes quantidades de fruto-oligossacarídeos. Os resultados obtidos indicaram que a produção máxima de 98,86 g.L<sup>-1</sup> de FOS pode ser atingida em 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 7,7 e agitação 234 rpm. Esses resultados tornam esse micro-organismo promissor na produção de oligofrutose industrialmente.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes- Brasil.

## Referências

- Abdel-Fattah, AF; Mahmoud AR, Esawy MAT (2005) Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr Microbiol* 51:402–407.
- Bekers M, Laukevics J, Upite D, Kaminska E, Vigants A, Viesturs U, Pankova L, Danilevics A (2002) Fructooligosaccharide and levan producing activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochem* 38: 701-706.
- Biedrzycka E, Bielecka M (2004) Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization. *Trends Food Sci Technol* 15: 170-175.
- Coimbra, CGO (2006) Produção de fructo-oligosacarídeos e aspectos da biosseparação das frações leves de levana hidrolisada. 2006. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- El-Refai HA, Abdel-Fattah AF, Mostafa FA (2009) Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 821-827.
- Euzenat O, Guibert A, Combes D (1997) Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem* 32:237-243.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125: 1401-1412.
- Joglekar AM, May AT (1987) Product excellence through design of experiments. *Cereal Chem* 32: 857-868.
- Jung KH, Yun JW, Kang KR, Lim JY, Lee JH (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. *Enzyme and Microb Technol* 11: 491-494.
- Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X (2010) Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydr Polym* 79: 206-213.
- Park HE, Park NH, Kim MH, Lee TH, Lee HG, Yang JY, Cha J (2003) Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Enzyme and Microb Technol* 32: 820- 827.
- Patel, S, Goyal, A (2011) Functional oligosaccharides: production, properties and applications. *World J Microbiol Biotechnol* 27: 1119-1128.
- Menrad K (2003) Market and marketing of functional food in Europe. *J Food Eng* 56: 181-188.
- Mussato, SI, Aguilar, CN, Rodrigues LR, Teixeira JA (2009) Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic material and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydr Res* 344: 795 -800.

- Mussato SI, Teixeira, JA (2010) Increase in the fructooligosaccharides yield and productivity by solid-state fermentation with *Aspergillus japonicus* using agro-industrial residues as support and nutrient source. *Biochem Eng J* 53: 154-157.
- 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*. *Bioresour Technol* 101: 7472-7478.
- Ningegowda, MA, Gurudutt, PS (2011). In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on  $\beta$ -glucuronidase activity. *World J Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s11274-011-0887-z
- Sangeetha PT, Ramensh MN, Prapulla SG (2003) Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 16: 442-457.
- Sangeetha PT, Ramesh PT, Prapulla MN (2005) Fructooligosacchride production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of *Aspergillus oryzae* CFR 202. *Process Biochem* 40:1085-1088.
- Shih HT, Baig SY, Lee SW, Suh DS, Kwon ST, Lim YB (2004) Production of fructooligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresour Technol* 93: 59-62.
- Silva, CEV (2008) Produção enzimática de fruto-oligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melaço de cana-de-açúcar. Dissertação. Universidade de São Paulo.
- Statistica for Windows Software, 7.0, Tulsa, O.K., USA, 2004.
- Yun JW (1996) Fructooligosaccharides- Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microb Technol* 19:107-111.



## ANEXO B

### Normas para a submissão do artigo para o periódico World Journal of Microbiology and Biotechnology



#### **World Journal of Microbiology and Biotechnology**

Editor-in-Chief: Peter J. Large

ISSN: 0959-3993 (print version)

ISSN: 1573-0972 (electronic version)

Impact Factor: 1.214

*World Journal of Microbiology & Biotechnology* publishes research papers, short communications, technical communications and review articles on all aspects of applied microbiology and biotechnology. Virological topics however are outside the scope of the journal. The Journal provides a forum for research work directed towards microbiological and biotechnological solutions to global problems encouraging contributions from all scientists from all across the globe who have an interest in tackling them. As many global issues, for example improving crop productivity, public health and waste management, have more acute consequences in the developing world, the Journal emphasizes the role of biotechnological advances, for and from developing regions.

### *Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### *Permissions*

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

### *Title Page*

The title page should include:

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

### *Abstract*

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

### *Keywords*

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

### *Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

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

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

### *Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *Abbreviations*

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

### *Footnotes*

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

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

Always use footnotes instead of endnotes.

### *Acknowledgments*

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

### References

#### *Citation*

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

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

#### *Reference list*

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

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

- Journal article  
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate

variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

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

- Book

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

- Book chapter

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

- Online document

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

- Dissertation

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

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

- [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

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

- [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
  - Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

**ANEXO C**  
**Artigo B**

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR *BACILLUS*  
*SUBTILIS* NATTO APLICANDO METODOLOGIA ESTATÍSTICA**

**Patrícia Bittencourt da Silva, Dionísio Borsato, Maria Antonia P. Colabone  
Celligoi\***

## SÍNTESE ENZIMÁTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS POR *BACILLUS SUBTILIS* NATTO APLICANDO METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Patrícia Bittencourt da Silva<sup>a</sup>, Dionísio Borsato<sup>b</sup>, Maria Antonia P. Colabone Celligoi<sup>a\*</sup>

### Resumo

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada como uma ferramenta de otimização para a produção de fruto-oligossacarídeos (FOS), utilizando a enzima levanasacarase presente no sobrenadante de fermentação de *Bacillus subtilis* natto. Três variáveis independentes, concentração de sacarose, pH e temperatura foram testadas no meio de reação. A resposta para o delineamento foi produção de FOS. A concentração de enzima utilizada para a reação foi de 6 unidades de atividade. A partir da análise estatística os efeitos significativos das três variáveis incluíram o efeito quadrático (pH) e efeitos lineares (concentração de sacarose e temperatura). O valor máximo da produção de FOS foi de 65,35 g.L<sup>-1</sup> nas condições otimizadas de sacarose em 334 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,0 e temperatura de 45,8°C. Esse resultado foi validado a partir da repetição dos pontos ótimos.

**Palavras-chave:** Fruto-oligossacarídeos. *Bacillus subtilis* natto. Levanasacarase. Prebióticos

### 1 INTRODUÇÃO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são carboidratos de baixa massa molecular, contendo resíduos de frutose com grau de polimerização entre 3 e 9, nos quais as unidades de frutossil são unidas por ligações na posição  $\beta$ - (2→1) da sacarose e, entre as oligofrutoses, as mais encontrados são 1-cestose (GF2), nistose (GF3) e frutofuranosil (GF4) (Yun 1996). OS FOS são produzidos pela ação de frutossiltransferases presente em plantas e micro-organismos (Sanchez et al., 2008). Fazem parte do grupo de fibras não digeríveis e atuam como prebióticos, pois, no sistema digestivo, eles servem como fonte de carbono para as bactérias

---

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil. \* Autor para correspondência Tel.: +55 43 33714513\* E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br) (Maria Antonia P. Colabone Celligoi)

<sup>b</sup> Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil.



presentes no cólon, lactobacilos e bifidobactérias, os quais são benéficos a saúde humana (Matulová et al., 2011). O crescimento e/ou estímulo da atividade dessas bactérias atuam na supressão das bactérias potencialmente patogênicas (Gibson e Roberfroid, 1995; Yun, 1996).

Durante o crescimento desses micro-organismos benéficos do cólon, ocorre a produção de ácidos graxos de cadeia curta, estimulando a proliferação das células da mucosa colorretal, retardando a atrofia da mucosa e diminuindo o risco de transformações maléficas ao cólon. (Ningegowda e Gurudutt 2011). Outras características dos FOS têm tido atenção especial, como o baixo valor calórico, os efeitos na redução de níveis de fosfolipídeos, triglicerídeos e colesterol, auxílio na absorção de cálcio e magnésio pelo intestino (Mussato et al. 2010).

Os FOS podem ser obtidos a partir da hidrólise da inulina através de tratamento com ácidos a altas temperaturas. O alto custo do processo, as altas temperaturas e os ácidos utilizados na hidrólise tornam vantajoso a busca por novas formas de obtenção via síntese microbiana ou enzimática (Nemukula et al., 2009). Diversos micro-organismos possuem enzimas com atividade de transfrutoseilação, que são responsáveis por produzir FOS a partir da sacarose, entre estes se destacam *Aspergillus oryzae*, *Aureobasidium pullulans*, *Bacillus subtilis*, *Zymomonas mobilis* entre outras espécies (Bekers et al., 2002, Euzenat et al., 1996, Sangeetha et al., 2004, Shin et al., 2004).

Dentre os micro-organismos produtores de FOS destaca-se o *Bacillus subtilis*, que tem capacidade de produzir levana através da enzima levanasacarase extracelular, em meio de sacarose e com capacidade de síntese de FOS pela ação dessa enzima. (Abdel-Fattah et al., 2005). A produção de FOS por levanasacarase de micro-organismos tem sido relatada por diversos autores, tais como *B. circulans* (El-Refai et al., 2009); *B. subtilis* NRC 33a (Abdel-Fattah et al., 2005); *B. subtilis* C4 (Euzenat et al. 1997) e *Zymomonas mobilis* (Bekers et al., 2002). Esses autores destacam a influência de parâmetros como concentração de sacarose e temperatura no tamanho das cadeias de oligofrutose.

O aumento da temperatura da reação interfere na síntese de FOS porque acelera a taxa de transfrutoseilação, convertendo 1-cestose rapidamente em nistose (Vega e Zúniga-Hansen, 2011). Abdel-Fatah et al. (2009) ao estudarem o efeito da concentração de sacarose e temperatura verificaram que o aumento da

concentração de sacarose para 40% favoreceu a formação de fruto-oligossacarídeos e o aumento da temperatura foi acompanhado com a redução da massa molecular da oligofrutose. Outros fatores como pH, concentração de enzima e tempo de reação são parâmetros que atuam na produção de FOS (Sangeetha et al., 2005).

Diante da importância dos fatores que influenciam a produção de FOS, uma alternativa é a utilização da metodologia de superfície de resposta, um método utilizado na otimização da composição de meios e de outras variáveis críticas responsáveis pela produção de biomoléculas. Esse método possibilita testar múltiplas variáveis com um número mínimo de experimentos e avaliar a interação entre os fatores (Liu et al., 2010).

A fim de se estabelecer as condições ótimas para a produção de fruto-oligossacarídeos por levanasacarase extracelular de *Bacillus subtilis* natto, uma cepa utilizada no preparo de soja fermentada, a metodologia de superfície de resposta foi utilizada variando o pH, temperatura e concentração de sacarose.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIOS DE CULTIVO

O *Bacillus subtilis* natto foi isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, Brasil e identificado pela Fundação de Pesquisa André Tosello. A cepa foi mantida a 4°C em meio inclinado contendo 50 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 30 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne e 20 g.L<sup>-1</sup> de ágar bacteriológico. O meio de preparo do inóculo continha 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 2 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O). O meio de fermentação para obtenção do extrato bruto enzimático foi composto por 300 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 2 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 1 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 g.L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O), 0,2 g.L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>. (H<sub>2</sub>O); 0,25 g.L<sup>-1</sup> de citrato de amônio e o pH foi ajustado para 7,7.

### 2.3 PRODUÇÃO DA ENZIMA

O inóculo foi preparado por um cultivo realizado em Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio de inóculo, mantido sob agitação de 150 rpm, 37°C por 48 h. Após a incubação o meio foi centrifugado a 9056 g, as células foram ressuspensas em solução salina 0,9% (m/v) e o inóculo foi padronizado a 0,2 g.L<sup>-1</sup> de células para todas as fermentações. As fermentações para a produção da enzima foram conduzidas a 37°C por 24 h com agitação de 234 rpm, 334 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH 7,7, condições estas definidas por ensaios preliminares, onde ocorreu a maior produção de FOS e a enzima apresentou sua maior atividade. Ao final do período de incubação, a cultura de *B. subtilis* foi centrifugada (4°C, 9056 g) usando centrífuga refrigerada Hetic V 320R, para a remoção das células. O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima extracelular.

### 2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO

Para determinar a atividade da enzima do extrato bruto utilizou-se o sobrenadante da fermentação imediatamente após interrupção do cultivo. Adicionou-se 250 µL do sobrenadante (fonte de enzima), 250 µL de uma solução de sacarose 1M e 500 µL de tampão acetato pH 5,0, a reação ocorreu a 30°C por 2 h, conforme Ananthalakshmy e Gunasekaran, (1999) O exopolissacarídeo resultante da reação, foi precipitado com adição de três volumes de etanol absoluto gelado, hidrolisado, em seguida foi realizada a determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944). Uma unidade de atividade foi definida pela quantidade de enzima que polimeriza 1 µMol de açúcar redutor por mL por minuto nas condições experimentais.

### 2.5 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE FOS POR ENZIMA UTILIZANDO METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Para verificar as melhores condições para a produção de FOS pela enzima levanasacarase, foi realizado um planejamento fatorial composto central com

as variáveis: concentração de sacarose ( $X_1$ ), pH ( $X_2$ ) e temperatura ( $X_3$ ) para a produção de FOS. As variáveis foram codificadas pela Equação (1):

$$x_i = (X_i - X_{cp}) \Delta X_i \quad (1)$$

onde  $x_i$  é o nível codificado da variável,  $X_i$  é o valor real da variável,  $X_{cp}$  é o valor real da variável no ponto central, e  $\Delta X_i$  é a variação de valor nos níveis reais. Os parâmetros para a produção de FOS foram sacarose nas concentrações de 81,8 a 418,18 g.L<sup>-1</sup>, pH e 4,3 a 7,7 e temperaturas de 41,6 a 58,4°C. A resposta ótima para a produção de FOS foi predita seguindo o modelo quadrático da Equação 2:

$$\hat{Y} = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

onde  $\hat{Y}$  é a estimativa da variável resposta,  $b_0$  é o intercepto,  $b_i$  é o coeficiente para o efeito linear,  $b_{ii}$  é o coeficiente para o efeito quadrático,  $b_{ij}$  é o coeficiente para o efeito da interação, e  $x$  é o nível codificado da variável.

Os ensaios para a produção de FOS foram conduzidos com 0,5mL da fonte de enzima com atividade de 6 unidades em 1,5 mL de sacarose em diferentes concentrações, variando os valores de pH e temperatura (Tabela 1). A produção de FOS foi conduzida pela reação enzimática por 12 h, interrompida em banho-maria fervente por 15 min (Sangeetha et al. 2004), após as reações os fruto-oligossacarídeos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A análise dos fruto-oligossacarídeos produzidos foi realizada em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector de índice de refração Shimadzu RID-10A e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). A temperatura da coluna foi mantida a 80°C e as amostras (20 µL) foram eluídas a um fluxo de 0,6 mL/min de água ultrapura. Os padrões 1-cestose e nistose foram da marca Sigma-

Aldrich. A concentração de FOS foi determinada pela soma da quantidade de 1-cestose e nistose expressa em  $\text{g.L}^{-1}$ .

## 2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (2004) e os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores ótimos de concentração de sacarose, pH e temperatura foram investigados utilizando um planejamento composto central. As condições experimentais e resultados da produção de FOS são demonstrados na Tabela 1.

O coeficiente de determinação do modelo ( $R^2$ ) foi de 0,902, isso indica que 90,2% da variabilidade das respostas podem ser explicadas pelo modelo, esse valor foi considerado aceitável, pois de acordo com Joglekar e May (1987), o coeficiente de determinação deve ser de no mínimo 80%. A falta de ajuste não foi significativa ( $p=0,248$ ), indicando que a equação do modelo foi adequada para a predição da produção de FOS.

A análise da equação de regressão mostrou que o intercepto, o termo linear da sacarose, o termo linear da temperatura e o termo quadrático do pH foram significativos em nível de 5% (Tabela 2).

Nos ensaios realizados a maior produção de FOS alcançada foi de  $67,73 \text{ g.L}^{-1}$  em sacarose  $418,18 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 6 e temperatura de  $50^\circ\text{C}$ . O efeito da concentração da sacarose pode ser observado nos ensaios 9 (sacarose  $81,8 \text{ g.L}^{-1}$ ; pH 6;  $50^\circ\text{C}$ ) e 10 (sacarose  $418,18 \text{ g.L}^{-1}$ , pH 6,  $50^\circ\text{C}$ ), onde ambos apresentavam o mesmo pH (6,0) e a mesma temperatura de reação ( $50^\circ\text{C}$ ). No ensaio 9 a produção foi de  $40,31 \text{ g.L}^{-1}$  e no ensaio 10 com  $67,73 \text{ g.L}^{-1}$ , indicando o efeito positivo dessa variável que pode ser comprovado na equação 3.

A temperatura foi significativa na produção de FOS ( $p = 0,0231$ ) (Tabela 2), reduzindo a produção quando ocorreu o aumento da temperatura de 45

para 55°C nos ensaios de 1 a 8 (Tabela 1). No ensaio 1 a produção foi de 47,86 g.L<sup>-1</sup> de FOS, sendo que o aumento de 10°C, no ensaio 2, foi de 22,12g.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 1** – Produção de fruto-oligossacarídeos por levanasacarase com três variáveis independentes em três níveis, tempo de incubação de 12 h e concentração enzimática de 6 UA/mL.

Ensaio	x <sub>1</sub> (X <sub>1</sub> , g.L <sup>-1</sup> )	x <sub>2</sub> (X <sub>2</sub> )	x <sub>3</sub> (X <sub>3</sub> , °C)	Produção de FOS (g.L <sup>-1</sup> )
1	-1 (150)	-1 (5)	-1 (45)	47,86
2	-1 (150)	-1 (5)	1 (55)	22,12
3	-1 (150)	1 (7)	-1 (45)	37,62
4	-1 (150)	1 (7)	1 (55)	30,691
5	1 (350)	-1 (5)	-1 (45)	50,537
6	1 (350)	-1 (5)	1 (55)	39,322
7	1 (350)	1 (7)	-1 (45)	48,089
8	1 (350)	1 (7)	1 (55)	33,69
9	-1,68 (81,8)	0 (6)	0 (50)	40,314
10	1,68 (418,18)	0 (6)	0 (50)	67,736
11	0 (250)	-1,68 (4,3)	0 (50)	22,553
12	0 (250)	1,68 (7,7)	0 (50)	18,574
13	0 (250)	0 (6)	-1,68 (41,6)	57,997
14	0 (250)	0 (6)	1,68 (58,4)	53,492
15	0 (250)	0 (6)	0 (50)	51,153
16	0 (250)	0 (6)	0 (50)	64,215
17	0 (250)	0 (6)	0 (50)	54,386
18	0 (250)	0 (6)	0 (50)	59,386
19	0 (250)	0 (6)	0 (50)	60,403

X<sub>1</sub>: Concentração de sacarose, X<sub>2</sub>: pH e X<sub>3</sub>: temperatura

**Tabela 2** – Análise de variância (ANOVA) para modelo de segunda ordem para produção de FOS por levanasacarase.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	p-valor
Sacarose (L)	462,389	1	462,389	0,0092*
pH (L)	19,79	1	19,79	0,5125
Temperatura (L)	317,613	1	317,613	0,0231*
Sacarose (Q)	65,389	1	65,389	0,246
pH (Q)	2682,78	1	2682,78	0,000024*
Temperatura (Q)	34,116	1	34,116	0,394
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	5,136	1	5,136	0,736
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	6,224	1	6,224	0,711
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	30,531	1	30,531	0,419
Lack of fit	276,96	5	55,393	0,248
Erro puro	106,218	4	26,554	

R<sup>2</sup>=0,9020 \* Significativo para valores de p<0,05

Abdel-Fattah et al. (2005) verificaram que uma concentração de sacarose acima de 400 g.L<sup>-1</sup> e o aumento de temperatura (40°C) levam a redução da massa molar da levana, aumentando a concentração de FOS produzida.

A faixa ótima do pH, para a produção de FOS, foi ao redor de 6,0 valor que corresponde ao pH ótimo de atividade da enzima levanasacarase de *Bacillus* sp. (Ammar et al., 2002).

A resposta para a produção de FOS pode ser estimada pela equação polinomial de segunda ordem:

$$\hat{Y} = 58,05 + 5,82x_1 - 1,20x_2 - 4,82x_3 - 2,1887x_1^2 - 14,02x_2^2 - 1,58x_3^2 - 0,80x_1x_2 + 0,88x_1x_3 + 1,95x_2x_3 \quad (3)$$

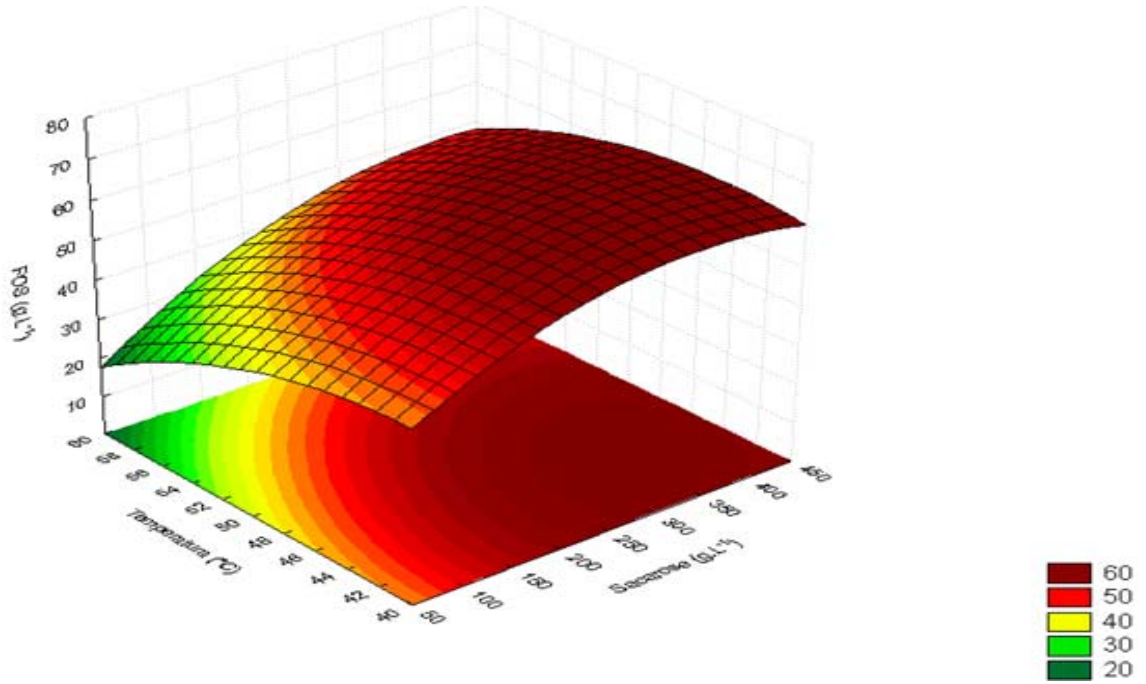
Onde  $\hat{Y}$  é a resposta para a produção de FOS,  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$  são os valores codificados para sacarose, pH e temperatura, respectivamente.

A Figura 1 apresenta a superfície de resposta da produção de FOS pela levanasacarase de *B. subtilis* natto em função da concentração de sacarose. O aumento da sacarose favorece a produção de FOS e a temperatura acima de 44°C reduz a produção.

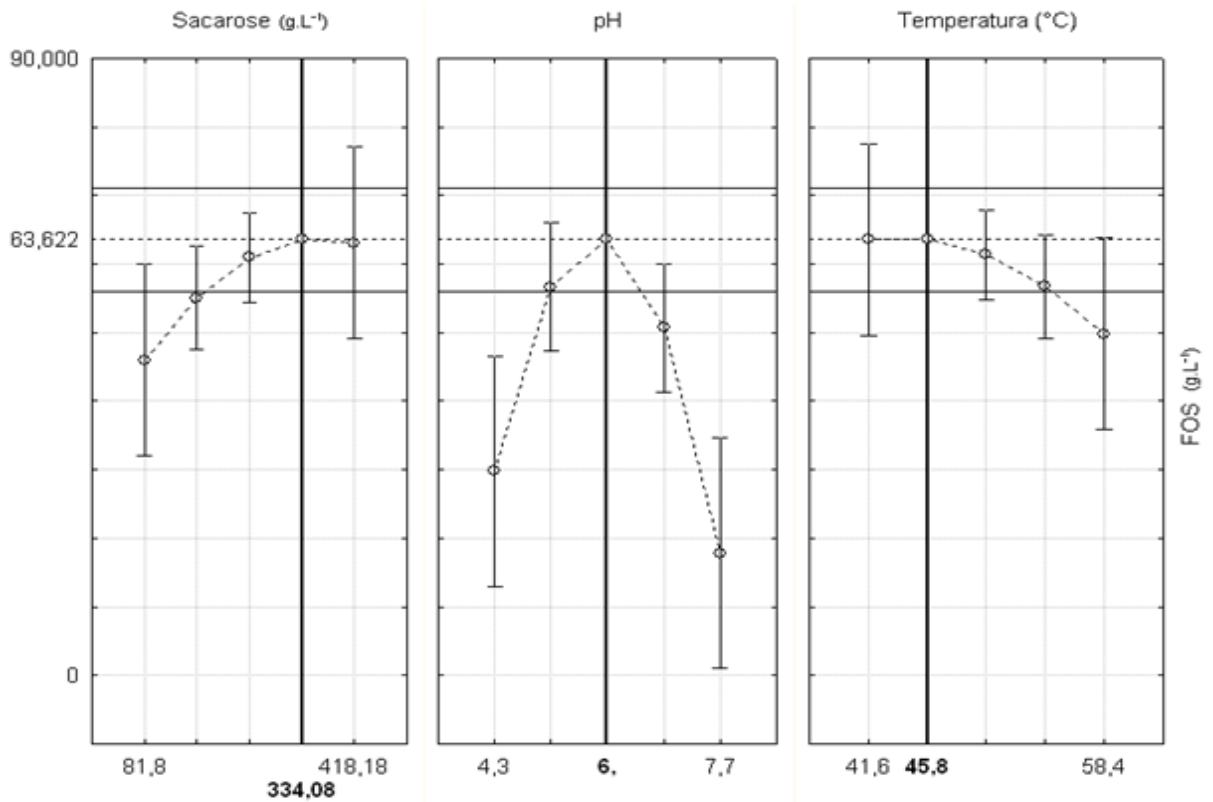
Para determinar os valores ótimos de produção de FOS por levanasacarase, realizou-se uma análise preditiva, sendo o valor máximo teórico da produção de FOS de 63,62 g.L<sup>-1</sup>, com sacarose em 334 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,0 e temperatura de 45,8°C (Figura 2). Coimbra (2006) avaliou a produção de FOS por levanasacarase de *Zymomonas mobilis* e determinou que as condições que mais favoreceram a atividade de transfrutossilção, para produção de FOS, foram 400 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, pH 6 e 40 °C, na qual mais de 50% da sacarose foi hidrolisada e polimerizada.

A fim de se validar o modelo preditivo (Eq. 3), quatro novos ensaios foram realizados sob as condições ótimas estabelecidas. O valor médio da produção foi de 54,86 g.L<sup>-1</sup>, o qual se apresentou próximo do valor predito. Através do teste de comparação de médias, o valor predito e o experimental obtido na validação não foram diferentes estatisticamente em nível 5% de significância.

**Figura 1** – Superfície de resposta para a produção de FOS por síntese por levanasacarase de *Bacillus subtilis* natto em função da concentração de sacarose e temperatura, fixando o pH em 6,0.



**Figura 2** – Otimização da produção de FOS pela levanasacarase usando o Software Statistica 7.0





## CONCLUSÕES

A enzima levanasacarase produzida por *Bacillus subtilis* natto realizou a síntese de FOS em todas as condições experimentais, evidenciando seu potencial para o uso em um processo industrial de produção de FOS a partir de solução de sacarose. A utilização da metodologia de superfície de resposta possibilitou a determinação dos melhores valores de sacarose ( $334 \text{ g.L}^{-1}$ ), pH (6,0) e temperatura ( $45,8^\circ\text{C}$ ) para uma produção máxima de FOS de  $54,86 \text{ g.L}^{-1}$ .

## Agradecimentos

Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes- Brasil.

## Referências

- Abdel-Fattah, A.F., Mahmoud,D.A.R., Esawy, M.A.T. 2005. Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *Curr. Microbiol.* 51, 402-407.
- Ammar, Y., Matsubara, T, Iizuka, M., Limpaseni, T., Pongsawasdi, P., Minaiura, N. 2002. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* SP. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. 99, 111-119.
- Ananthalakshmy, V.K., Gunasekaran, P. 1999. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 214-217.
- Bekers, M., Lukevics, J., Upite, D., Kaminska, E. VigantsA, Viesturs, U. Pankova, L. Danilevis, A., 2002. Fructooligosaccharides and levan production activity of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase. *Process Biochem.* 38, 701-706.
- Coimbra, C.G.O. 2006. Produção de fruto-oligosacarídeos e aspectos da bioseparação das frações leves de levana hidrolisada. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Pernambuco
- El- Refai, H.A.; Abdel-Fatah, A.F.; Mostafa, F.A. 2009. Enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides by *Bacillus circulans* and improvement of levansucrase stability by carbohydrate coupling. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 821-827.
- Euzenat, O., Guibert, A, Combes, D. 1997. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. *Process Biochem.* 32, 237-243.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125, 1401–1412.
- Joglekar, A.M., May, A.T., 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Chem.* 32,857-868.
- Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng,X. 2010. Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyza* EJS-3. *Carbohydr. Polim.* 79, 206-213.
- Matulová, M., husárová, S., Capek, P., Sancelme, M. Delort, A.M. 2011. NMR structural study of fructans produced by *Bacillus* sp. 3B6, bacterium isolated in cloud water. *Carbohydr. Res.* 346, 501-507.
- Mussato, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., Teixeira, J. A. 2010. Colonization of *Aspergillus japonicus* on synthetic materials and application to the production of fructooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 344, 795-800.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Biochem.*, 84, 375-380 .

Nemukula, A., Mutanda, T., Wilhemi, B.S., Whiteley, C.G., 2009. Response surface methodology: Synthesis of short chain fructooligosaccharides with a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Bioresour. Technol.* 100, 2040-2045.

Ningegowda, M.A., Gurudutt, P. S. 2011. In vitro fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on  $\beta$ -glucuronidase activity. *World J. Microbiol. Biotechnol* <http://www.springerlink.com/content/90124015t5qr1742/>

Sánchez, O., Guio, F., Garcia, D., Silva, E., Caicedo, L., 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* SP. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food Bioprod Process* 86, 109-115.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G., 2004. Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from *Aspergillus oryzae* CFR 202 and *Aureobasidium pullulans* CFR 77. *Process Biochem.* 39, 753-758.

Sangeetha, P.T., Ramesh, M.N., Prapulla, S.G., 2005. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Food Sci. Technol.* 16, 442-457.

Shin, H.T., Baig, S.Y., Lee, S.W., Suh, D.S., Kwon, S.T., Lim, Y.B., Lee, J.H., 2004. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresour. Technol.* 93, 59-62.

Somogyi, M. A. 1952. A new reagent for determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 160, 61 – 68.

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

Vega, R., Zúniga-Hansen, M.E. Enzymatic synthesis of fructooligosaccharides with high 1-kestose concentrations using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 102, 10180-10186.

Yun, J.W., 1996. Fructooligosaccharides- Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microb. Technol.* 19, 107-11

## ANEXO D

Normas para a submissão do artigo para o periódico World Journal of Microbiology and Biotechnology



**Bioresource Technology**  
**Editor-in-Chief: A. Pandey**  
**ISSN: 0960-8524**  
**Impact Factor: 4.365**

### INTRODUCTION

Bioresource Technology publishes original articles, review articles, case studies and short communications on the fundamentals, applications and management of bioresource technology.

The journal's aim is to advance and disseminate knowledge in all the related areas of biomass, biological waste treatment, bioenergy, biotransformations and bioresource systems analysis, and technologies associated with conversion or production.

Topics include:

- Biofuels: liquid and gaseous biofuels production, modeling and economics
- Bioprocesses and bioproducts: biocatalysis and fermentations

- Biomass and feedstocks utilization: bioconversion of agro-industrial residues
- Environmental protection: biological waste treatment
- Thermochemical conversion of biomass: combustion, pyrolysis, gasification, catalysis

## Manuscript Preparation

### General:

Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

### Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions Acknowledgements,

The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length: Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

## Article structure

### 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.

### Material and methods

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.

### 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.

### Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### Results and Discussion

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.

## Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (maximum 100 words).

## 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 and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **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, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that 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. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, 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.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field 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.

## 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.

## Math formulae



Present simple formulae in the line of 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, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

#### Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

#### Artwork

##### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

#### 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. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6.

### 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. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

### References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

### Citation in text

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

### Web references

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

#### 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 style

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;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

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. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

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: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

**ANEXO E**  
**Artigo C**

**ATIVIDADE PREBIÓTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR**  
***BACILLUS SUBTILIS* NATTO**

**Patrícia Bittencourt da Silva, Sandra Garcia, Maria Antonia P. Colabone**  
**Celligoi\***

## ATIVIDADE PREBIÓTICA DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR *BACILLUS SUBTILIS* NATTO

Patrícia Bittencourt da Silva<sup>a</sup>, Sandra Garcia<sup>b</sup>, Maria Antonia P. Colabone  
Celligoi<sup>a\*</sup>

### Resumo

*Bacillus subtilis* natto é uma potencial produtor de fruto-oligossacarídeos (FOS) que podem ser obtidos por fermentação. Como outra fonte de fibra dietética, os FOS produzidos por essa bactéria podem estimular o crescimento de micro-organismos presentes no cólon (probióticos), atuando assim como prebióticos. Neste trabalho a oligofrutose produzida por *B. subtilis* natto em meio de sacarose foi purificada por ultrafiltração e liofilizada. A capacidade de atividade prebiótica dos FOS produzidos foi avaliada para três linhagens de *Lactobacillus*. Os resultados sugerem que os FOS apresentam atividade prebiótica no trato gastrointestinal, por serem utilizados no crescimento e produção de ácidos orgânicos por *Lactobacillus*. A partir do escore prebiótico verificou-se a maior afinidade de *L. plantarum* sobre os FOS, combinação que deve ser estudada para aplicação em alimentos simbióticos.

**Palavras-chave:** Fruto-oligossacarídeos. Probióticos. Prebióticos. *Bacillus subtilis*.

### 1 INTRODUÇÃO

Fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina e outros carboidratos têm recebido atenção considerável devido aos benefícios que podem proporcionar aos consumidores. Esses carboidratos são chamados de prebióticos e foram definidos por Gibson e Roberfroid (1995) como alimentos não digeríveis, que afetam benéficamente a saúde do hospedeiro, estimulando o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon. Entre as bactérias intestinais presentes, que são estimuladas por prebióticos, estão lactobacilos e bifidobactérias que metabolizam esses carboidratos *in vivo*, proporcionando o enriquecimento seletivo no trato gastrointestinal, o que resulta na formação de lactato, acetato e outros

---

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil. <sup>b</sup> \* Autor para correspondência Tel.: +55 43 33714513\* E-mail: [macelligoi@uel.br](mailto:macelligoi@uel.br) (Maria Antonia P. Colabone Celligoi)

<sup>b</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Londrina, Paraná, Brasil.

ácidos orgânicos de cadeia curta, que atuam na inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos (Kolida et al., 2002).

O potencial prebiótico de FOS e de outros carboidratos podem ser determinados *in vitro*. Essa avaliação se baseia na mensuração da população microbiana, taxa de crescimento, assimilação de substrato, e/ou produção de ácidos graxos de cadeia curta (Synytsya et al., 2009).

A atividade prebiótica foi demonstrada *in vitro* para prebióticos bem estabelecidos, como a oligofrutose obtida a partir da chicória (Durieux et al. 2001). Os FOS obtidos por fermentação e síntese enzimática, também tem sido avaliados como relatam Marx, Winkler e Hartmeier (2000) que estudaram a metabolização de FOS obtido a partir da hidrólise de levana produzida por fermentação de *Zymomonas mobilis*. Hernalsteens e Maugeri (2010) avaliaram o efeito dos FOS obtidos por síntese enzimática por uma frutossiltransferase de *Rhodotorula* sp. sobre o crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e Hu et al. (2006) estudaram, *in vitro*, os efeitos prebióticos de oligossacarídeos de agarose em *Lactobacillus*.

Para melhor definir a potencialidade dos carboidratos prebióticos Huebner, Wehling e Hutkins (2007) propuseram um escore de atividade prebiótica em diferentes prebióticos comerciais. Para isto, definiram que a pontuação do escore obtida nos ensaios é realiza pela comparação do crescimento da cepa probiótica, nos meios contendo glicose ou meio contendo prebiótico. Este mesmo procedimento é realizado com a *Escherichia coli*, (cepa gastrointestinal) para as mesmas fontes de carbono utilizadas para os probióticos. Esse teste é a base para a seleção de prebióticos para uso em alimentos e prediz a extensão do efeito da atividade prebiótica.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade prebiótica dos FOS obtidos por fermentação da sacarose por *Bacillus subtilis* natto e definir a potencialidade através do escore de atividade prebiótica.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 CEPAS, MEIOS DE PRESERVAÇÃO E CULTIVO

*Lactobacillus casei* (LC-1) da Christian Hansen, *Lactobacillus paracasei* ATCC 27092, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, foram mantidos em meio de Man-Rogosa-Sharpe - MRS (1961) contendo glicerol a 4°C. A cultura de *Escherichia coli* ATCC 55302 foi mantida em ágar bacteriológico (Extrato de carne 5 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, Cloreto de sódio 5 g.L<sup>-1</sup> e ágar 15 g.L<sup>-1</sup>) a 4°C.

Para o cultivo das linhagens probióticas foi utilizado o meio MRS contendo 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose ou 20 g.L<sup>-1</sup> de FOS. Para *E. coli* foram utilizando os meios TSA (Tryptic Soy Agar), TSB (Tryptic Soy Broth) (Huebner, Wehling e Hutkins, 2007) e meio M9 (Sambrook, Fritsch, Maniatis, 1989).

### 2.2 ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE FOS

Os prebióticos utilizados nesse estudo foram os fruto-oligossacarídeos produzidos por *Bacillus subtilis* natto em fermentações realizadas em sacarose 300 g.L<sup>-1</sup>, pH 7,7, agitação de 234 rpm, 24h a 37°C. Esta condição foi escolhida a partir de um planejamento estatístico que definiu essas variáveis como significativas e preditivas para a melhor produção de FOS. Para separação dos FOS, ao final do cultivo, o caldo fermentativo foi centrifugado e as células removidas. O meio livre de células foi então filtrado em uma membrana, com porosidade de 3 kDa (Pinelo, Jonsson, Meyer, 2009) e em seguida o filtrado foi submetido a precipitação com três volumes de etanol gelado. O precipitado (FOS) foi lavado com etanol e seco em estufa a 70°C. O FOS obtido foi ressuspenso em água destilada e posteriormente liofilizado. A pureza do material foi verificada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que mostrou uma completa remoção de monossacarídeos e dissacarídeos e polissacarídeos com massa molar superior a 3 kDa.



### 2.3 ATIVIDADE PREBIÓTICA

A análise da atividade prebiótica foi realizada de acordo com Hu et al. (2006). Os micro-organismos *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum* foram ativados por três repiques sucessivos realizados a cada 24 h em meio MRS.

Para os testes de atividade foram utilizados os meios MRS sem glicose (controle negativo); MRS com glicose 20 g.L<sup>-1</sup> (controle positivo) e MRS com FOS 20 g.L<sup>-1</sup> (teste). O controle negativo foi realizado para a verificação a presença de outras fontes de carbono.

Para teste foi utilizado 10 mL de cada meio, em triplicata e o inóculo foi de 100 µL para todos os ensaios. Os tubos foram mantidos a 37°C por 48 h. A interrupção dos cultivos foi realizada por centrifugação a 2000 g por 10 minutos e o crescimento celular foi acompanhado por turbidimetria e do sobrenadante foi determinado o pH, concentração de carboidratos e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (item 2.5).

### 2.4 ESCORE DE ATIVIDADE PREBIÓTICA

O escore da atividade prebiótica do FOS foi realizado segundo Huebner, Wehling e Hutkins (2007) utilizando *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum* e a *E. coli*.

Os probióticos mantidos no meio MRS foram ativados e transferidos para o meio MRS Agar por 48 h a 37°C. Após esse período uma colônia foi transferida para 10 mL do meio MRS, incubado por 12 h (inoculo). Na sequência foi transferidos 100 µL do inóculo para cada tubo, os quais continham 10 mL dos meios MRS com glicose 20 g.L<sup>-1</sup> ou meio MRS com FOS 20 g.L<sup>-1</sup>. As culturas foram incubadas por 24 h a 37°C, alíquotas foram diluídas, plaqueadas em meio MRS ágar e mantidas a 37°C até crescimento celular. A contagem das células viáveis foi definida como unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

A linhagem de *E. coli* mantida em ágar bacteriológico foi ativada em meio TSA e incubada por 48 h a 37°C. Ao final desse período uma colônia foi transferida para 10 mL de meio TSB incubada por 12 h a 37°C (inoculo). Após esse período foi retirado 100µL do inóculo e transferido para 10 mL do meio M9 contendo

20 g.L<sup>-1</sup> de glicose e para o meio M9 com 20 g.L<sup>-1</sup> de FOS. As culturas foram incubadas a 37 °C e após 24 h alíquotas foram diluídas, plaqueadas em meio TSA e mantidas a 37°C até crescimento celular. A contagem das células viáveis foi definida como unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

O escore da atividade prebiótica foi determinado usando a seguinte equação:

$$\text{escore de atividade prebiótica} = \left[ \frac{(\log \text{ UFC/mL do probiótico em FOS a 24h} - \log \text{ UFC/mL do probiótico em FOS a 0h})}{(\log \text{ UFC/mL do probiótico em glicose a 24h} - \log \text{ UFC/mL do probiótico em glicose a 0h})} \right] - \left[ \frac{(\log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em FOS a 24h} - \log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em FOS a 0h})}{(\log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em glicose a 24h} - \log \text{ UFC/mL de } E. coli \text{ em glicose a 0h})} \right].$$

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

A biomassa foi mensurada por densidade óptica a 600 nm correlacionada ao peso seco. Uma curva de calibração foi estabelecida para cada linhagem probiótica utilizada.

Os ácidos orgânicos (lático, acético) foram determinados por HPLC, usando uma coluna Biorad HPX-87H, fase móvel 0,0022 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, fluxo de 0,8 mL/min, a 65°C em 210 nm. O consumo de FOS e glicose foi monitorado por HPLC utilizando uma coluna Biorad HPX-87C, água deionizada como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min a 80°C e utilizando um detector de índice de refração. Padrões cestose, nistose, glicose, ácido lático e ácido acético (Sigma-Aldrich).

## 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os ensaios de atividade prebiótica e os ensaios para o escore prebiótico foram realizados em triplicata e os dados foram analisados pelo software Statistica 7.0 (2004). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e foram considerados significativos quando p<0,05. Os ensaios que mostraram diferenças significativas foram submetidos ao teste de Tukey. As unidades formadoras de colônia contadas nos meios com FOS e com glicose, nos

ensaios para score prebiótico, foram comparados através do teste t, em nível de 5% de significância.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As três espécies de lactobacilos (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*) foram avaliadas quanto a sua habilidade em metabolizar os fruto-oligossacararídeos produzidos por *B. subtilis* natto, como única fonte de carbono. Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 1, Tabela 2 e Figura 1.

As cepas avaliadas cresceram nos meios em que os FOS estavam como única fonte de carbono. As concentrações de biomassa final de *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum* foram 0,54 g.L<sup>-1</sup>, 1,45 g.L<sup>-1</sup> e 0,98 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Não houve crescimento dos *Lactobacillus* nos meios sem adição de carboidrato.

Durante o crescimento, o pH inicial era de 6,5 para todos os testes e foi reduzido para 5,09, 4,86 e 4,94 conforme Tabela 1. A redução do pH se deve a produção de ácidos orgânicos pelas cepas estudadas demonstrando que o FOS presente foi fermentado pelos lactobacilos, o mesmo foi descrito por Hu et al., 2006. Os micro-organismos foram capazes de metabolizar o FOS, o que pode ser evidenciado pelo consumo dos FOS (Tabela 1).

A produção de ácido láctico foi igual nas três espécies avaliadas, no entanto a produção de ácido acético foi de 36,8; 24,48 e 11,58 mM em *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. casei*, respectivamente. Nesta produção *L. paracasei* e *L. plantarum* não apresentaram diferença estatística entre si, apenas entre o *L. casei*. A produção dos ácidos graxos com cadeias curtas limita o crescimento de bactérias putrefativas e patogênicas e são importantes como fonte de energia para o hospedeiro (Marx Winkler e Hartmeir, 2000).

**Tabela 1** – Concentração de ácidos orgânicos produzidos na fermentação de FOS por *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*. Meio inicial com FOS de 20 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,5 e inóculo de 0,02 g.L<sup>-1</sup> de células.

	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>
	LC-1	ATCC 27092	ATCC 14917
Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	0,54 ± 0,11 <sup>c</sup>	1,45±0,19 <sup>a</sup>	0,98± 0,04 <sup>b</sup>
pH final	5,09 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,005 <sup>b</sup>	4,94 ± 0,08 <sup>b</sup>
Acetato (mM)	11,58 ± 0,59 <sup>b</sup>	24,48 ± 8,71 <sup>a</sup>	36,8 ± 0,63 <sup>a</sup>
Lactato (mM)	54,74 ± 7,59 <sup>a</sup>	58,33 ± 16,61 <sup>a</sup>	54,44 ± 9,26 <sup>a</sup>
FOS final (g.L <sup>-1</sup> )	15,09 ± 3,6 <sup>a</sup>	16,65 ± 1,04 <sup>a</sup>	18,7 ± 1,04 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05)

Além da avaliação do efeito da oligofrutose sobre o desenvolvimento das cepas, foi conduzido um experimento para se determinar o escore de atividade prebiótica para pontuar a eficiência do FOS como prebiótico. O crescimento das três cepas probióticas (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*) e da bactéria gastrointestinal *E. coli* foi realizado em meios contendo FOS (prebiótico) e meio glicose (não prebiótico).

Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e Figura 1. Pela Tabela 2 *L. casei* e *E. coli* apresentaram um crescimento significativamente maior no meio que continha glicose quando comparado ao meio com FOS como a única fonte de carbono (p < 0,05). *L. paracasei* e *L. plantarum* apresentaram o mesmo crescimento para as duas fontes de carbono, evidenciando a habilidade dessas cepas em metabolizar o prebiótico. Para todas as cepas testadas verificou-se que após 24 h a quantidade de UFC/mL foi superior a 10<sup>6</sup>, quantidade mínima desejada para aplicação probiótica de uma bactéria em alimentos (Thuaytong e Anprung, 2011)

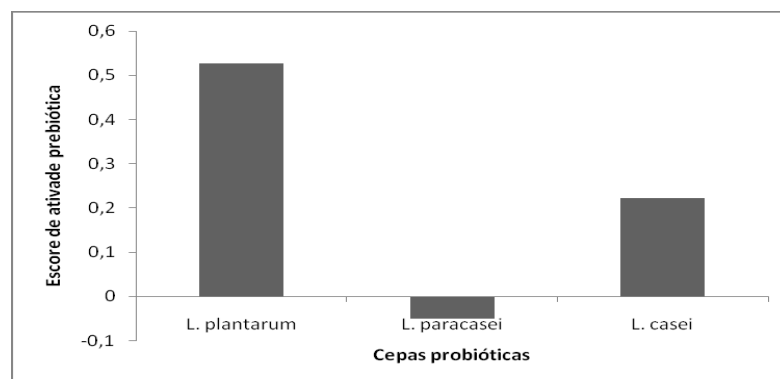
**Tabela 2** – Comparação de população microbiana em 24 h em meio com FOS e glicose.

	População celular [ $\log_{10}$ (UFC/mL)]	
	Meio +FOS	Meio +Glicose
<i>L. casei</i> LC-1	7,6 ± 0,00 <sup>b</sup>	8,79 ± 0,17 <sup>a</sup>
<i>L. paracasei</i> ATCC 27092	7,54 ± 0,00 <sup>a</sup>	8,99 ± 0,03 <sup>a</sup>
<i>L.plantarum</i> ATCC 14917	8,88 ± 0,10 <sup>a</sup>	8,57 ± 0,69 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 55302	8,56 ± 0,05 <sup>b</sup>	9,00 ± 0,03 <sup>a</sup>

Valores são representados por média ± desvio padrão. Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

O escore de atividade prebiótica foi calculado a partir do crescimento microbiano em 24 h, mostrado na Figura 1. Os escores prebióticos de *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. casei* foram 0,526, 0,055 e – 0,222 . A cepa estudada apresenta uma pontuação próxima a zero ou negativa quando apresenta menor crescimento em meio com prebiótico quando comparado com o crescimento em meio com glicose e/ou tem menor crescimento no prebiótico quando comparado ao crescimento de *E. coli* em prebiótico (Huebner, Wehling e Hutkins, 2007).

**Figura 1** – Escore prebiótico em FOS para *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei*.



O valor do escore mostra que *L. plantarum* apresenta maior afinidade com os FOS produzidos por *B. subtilis* natto, mostrando que essa linhagem é a mais adequada para futuras aplicações em alimentos simbióticos com esse FOS específico.

## Conclusões

A metabolização de FOS de *B. subtilis* natto por três linhagens de *Lactobacillus* foi demonstrada neste trabalho. Os resultados sugerem que os FOS apresentam atividade prebiótica no trato gastrointestinal, por serem utilizados para o crescimento e produção de ácidos orgânicos por *Lactobacillus* sp. A partir do escore prebiótico verificou-se a maior afinidade de *L. plantarum* com o FOS, combinação que deve ser estudada para aplicação em alimentos simbióticos.

## Referências

- Durieux, A., Fournies, C., Jacobs, H., Simon, J.P. (2001) Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria. *Biotechnology Letters*, 23, 1523-1527.
- Gibson, G.R., Roberfroid, M., (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401–1412.
- Hernalsteens, S., Maugeri, F. (2010). Synthesis of fructooligosaccharides using extracellular enzymes from *Rhodotorula* sp. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 520-534.
- Hu, B., Gong, Q., Wang, Y., Ma, Y., Li, J., Yu, W. (2006). Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe*, 12, 260-266.
- Huebner, j., Wehling, R.L., Hutkins, R.W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17, 770-775.
- Kolida, S., Tuohy, K. & Gibson, G. R. (2002) Prebiotic effects of inulina and oligofrutose. *British Journal of Nutrition*, 87, 193-197.
- Man, J.C., Rogosa, A. M., Sharpe, M.E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23,130-135.
- Marx, S.P., Winkler, S., Hartmeier, W. (2000). Metabolization of  $\beta$ -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 182, 163-169.
- Pinelo, M. Jonsson, G., Meyer, A.S. (2009). Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operation features affecting performance. *Separation and Purification Technology*, 70, 1-11.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2<sup>a</sup> edição, vol. 3.
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., Kovářikova, E., Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potencial prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76, 548-556.
- Thyaytong, W., Anprung, P. (2011) Bioactive compounds and prebiotic activity in Thailand-grown red and White guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Food Science and Technology International*. DOI: 10.1177/1082013210382066.

## ANEXO F

Normas para a submissão do artigo para o periódico Food and Science Technology



### INTRODUCTION

LWT - Food Science and Technology is an official journal of the Swiss Society of Food Science and Technology (SGLWT/SOSSTA) and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST).

LWT - Food Science and Technology is an international journal that publishes innovative papers in the fields of food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and nutrition. The work described should be innovative either in the approach or in the methods used. The significance of the results either for the science community or for the food industry must also be specified. Contributions that do not fulfil these requirements will not be considered for review and publication. Submission of a paper will be held to imply that it presents original research, that it has not been published previously, and that it is not under consideration for publication elsewhere. Papers featuring animal trials are outside the scope of the journal and will not be considered for publication.

Types of paper

Three types of peer-reviewed papers will be published:



Timely Reviews. These concise reviews should present a focused aspect on a topic of current interest or an emerging field. They are not intended as comprehensive literature surveys covering all aspects of the topic, but should include all major findings and bring together reports from a number of sources. They should aim to give balanced, objective assessments by giving due reference to relevant published work, and not merely present the prejudices of individual authors or summarise only work carried out by the authors or by those with whom the authors agree. Undue speculation should also be avoided.

These reviews will receive priority in publication. The reviews may address pertinent issues in food science, technology, processing, nutritional aspects of raw and processed foods and may include nutraceuticals, functional foods, use of "omics" in food quality, food processing and preservation, and food production.

Topics to be covered should be at the cutting edge of science, well thought out, succinct, focused and clear. Ideally, the review should provide a view of the state of the art and suggest possible future needs and trends.

Abstract of the proposed work should include the following:

- a. The abstract should identify the need for the proposed article, the intended audience, and five key words.
- b. Title (120 characters or less)
- c. Short abstract ( $\leq 300$  words).
- d. Identify the address and contact information for the contact author. The contact information should include author name, postal address, telephone number, fax number, and email.
- e. Anticipated time needed to complete the proposed work once the initial abstract has been approved.

#### Manuscript Preparation

- a. All lines and pages must be continuously numbered.

- b. All text should be double-spaced.
- c. Total manuscript length  $\leq$  3,000 words (text portion).
- d. Total number of Tables  $\leq$  5.
- e. Total number of figures  $\leq$  5.
- f. Maximum number of references (including those cited in tables and figures) not to exceed 50.
- g. In the reference list identify five (5) key references (indicated by an \* in front of the reference in the reference section). In two to three sentences explain why this reference is a key reference.

Research Papers. Reports of complete, scientifically sound, original research which contributes new knowledge to its field. The paper must be organised as described in Article Structure below. Papers should not exceed 5000 words (approximately 18 typed pages)

#### 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 and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- 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, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that 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. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts should not exceed 200 words for research papers and notes, or 300 words for reviews

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British 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.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field 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.

### 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. Do not use %, ppm, M, N, etc. as units for concentrations. If analytical data are reported, replicate analyses must have been carried out and the number of replications must be stated throughout the manuscript.

### Article structure

#### 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.

#### Material and methods

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

Results should be clear and concise.

## Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

## 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.

## Figure captions

Figures must be comprehensible without reference to the text. 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 in the caption. If analytical data are reported, replicate analyses must have been carried out. State the number of replications and provide standard error or other evidence of reliability of the data.

## Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Include a short but informative title. Provide the experimental conditions, as far as they are necessary for understanding. The reader should not have to refer to the text in order to understand the tables. 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. If analytical data are reported, replicate analyses must have been carried out. State the number of replications and give standard error or other

evidence of reliability of data. Probabilities may be indicated by \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

## References

### Citation in text

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

### Web references

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

### 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 style

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

London, WC3E 8LU, UK. Details concerning this referencing style can also be found at <http://linguistics.byu.edu/faculty/henrichsen/apa/apa01.html>.

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. (1979). *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.