

Produção de Frutooligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto CCT7712: Efeito de Parâmetros Fermentativos

Dieyssi Alves dos Santos¹, Janaina Mantovan¹, Nicole C. Pan¹, Dionísio Borsato² e Maria Antonia P. Colabone Celligoi¹

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10011 – CEP 86.057.970 Londrina – Paraná – E-mail: dieyssi@hotmail.com

²Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Química

RESUMO

*Frutooligossacarídeos (FOS) são considerados fibras alimentares prebióticas e, dessa forma, candidatos a aplicação na indústria alimentícia podendo ser utilizados como ingredientes nutracêuticos no desenvolvimento de produtos com baixo valor calórico e com propriedades funcionais. FOS podem ser obtidos por processo fermentativos de microrganismos quando estes são cultivados em meios com sacarose. A síntese microbiológica de FOS é influenciada por parâmetros fermentativos de forma que a manipulação destes é de grande importância para a otimização de processos de produção. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da concentração de substrato, temperatura e tempo de fermentação na produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto CCT7712, utilizando-se delineamento experimental Box-Behnken. Observou-se efeito significativo da concentração de sacarose e da temperatura na produção, obtendo-se 142,97 g. L⁻¹ quando as variáveis em estudo eram 400 g. L⁻¹ de sacarose, 35 °C e 24 h de fermentação.*

Palavras-chave: prebióticos, síntese microbiológica, concentração de substrato, temperatura, tempo de fermentação.

INTRODUÇÃO

Frutooligossacarídeos (FOS), oligômeros de frutose, são considerados açúcares não-convencionais. Por sua configuração química, são resistentes a enzimas digestivas, de forma que chegam intactos ao intestino grosso onde são fermentados por bactérias nativas benéficas exercendo, dessa forma, seu efeito prebiótico¹.

Por serem considerados fibras alimentares solúveis prebióticas, FOS são fortes candidatos a aplicação na indústria alimentícia, na qual podem ser utilizados como ingredientes nutracêuticos no desenvolvimento de produto com especificações de “baixo valor calórico” e, por seu efeito prebiótico, alimentos com propriedades funcionais³.

FOS podem ser obtidos por processos fermentativos quando seleciona-se microrganismos produtores e estes são cultivados em meios com sacarose como fonte de carbono. Vários microrganismos tem sido reportados como produtores de FOS, dentre estes, o *Bacillus subtilis* natto, uma cepa isolada de um alimento japonês, que tem recebido especial atenção por sua eficiência na produção destes compostos⁴. A manipulação de parâmetros fermentativos é fator determinante na otimização da produção microbiológica de

exopolissacarídeos, de forma que variações nas condições do processo podem favorecer a síntese dos produtos². O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da concentração de substrato, temperatura e tempo de fermentação na produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto CCT7712, utilizando metodologia de superfície de resposta com delineamento experimental Box-Behnken.

MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo de *B. subtilis* natto foi obtido por cultivo submerso em meio composto por (g. L⁻¹): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 2; (NH₄)₂SO₄, 1 e MgSO₄(7H₂O), 0,5. Realizou-se fermentação em batelada por 48 h, a 37 °C e 150 rpm.

A padronização do inóculo foi de 0,2 g. L⁻¹ de células e as fermentações foram conduzida em meios de cultivo composto por (g. L⁻¹): extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 1; (NH₄)₂SO₄, 3; MgSO₄(7H₂O), 0,6; MnSO₄, 0,2 e amônio citrato, 0,25. As fermentações foram conduzidas nas condições do planejamento, em agitação constante de 234 rpm e com pH fixo em 7,7.

Para analisar a influência dos parâmetros fermentativos na produção de FOS, utilizou-se delineamento experimental Box-Behnken, com três repetições no ponto central, totalizando 15 ensaios (Tabela 1). As variáveis testadas foram: (X₁) Concentração de sacarose em 200, 300 e 400 g. L⁻¹, (X₂) Temperatura em 35, 45 e 55 °C e (X₃) Tempo de cultivo em 12, 24 e 36 h.

As fermentações foram interrompidas por centrifugação e o sobrenadante submetido a processo de ultrafiltração em membrana com porosidade de 3 kDa para concentração dos FOS e remoção dos polissacarídeos que podem ser formados no meio de reação. A partir do sobrenadante ultrafiltrado, determinou-se a produção de FOS por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10^a e coluna AMINEX Carbohydrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel utilizou-se água ultrapura a 80°C sob fluxo de 0,6 mL/min. Para a quantificação das amostras utilizou-se curvas de calibração dos padrões 1-cestose e nistose.

As respostas obtidas dos modelos experimentais foram submetidas ao programa STATISTICA 7.0 para análise de variância (ANOVA) e dos coeficientes de regressão em nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito dos parâmetros concentração de sacarose (X₁), temperatura (X₂) e tempo de fermentação (X₃) na produção de FOS (Y₁) foi testado utilizando-se um delineamento experimental Box-Behnken, conforme listado na Tabela 1. Os resultados mostraram efeito significativo da concentração de substrato (X₁), da temperatura (X₂) e da interação entre a variável X₁ com X₂ enquanto a variável X₃ não mostrou efeito significativo. A estimativa dos efeitos é representada pela equação 1:

$$Y = 67,1367 + 43,7888 \times x_1 - 11,9113 \times x_2 + 20,1379 \times x_2^2 + 4,32 \times x_2 \times x_3 \quad (\text{Equação 1})$$

Nesta, Y representa a produção de FOS, x₁ a concentração de sacarose, x₂ a temperatura e x₃ o tempo de fermentação. O coeficiente de correlação para o modelo quadrático obtido foi de 98%, indicando ser um modelo preditivo adequado para as condições experimentais.

O efeito positivo da concentração de sacarose e negativo da temperatura são representados na figura 1, onde observa-se maior produção de FOS no maior nível de sacarose

testado e em nível menor de temperatura. A melhor condição das variáveis indicada foi a de 400 g. L⁻¹ de sacarose, 35 °C e 24 h de fermentação, com produção de 142,97 g. L⁻¹ de FOS.

Tabela 1 – Delineamento experimental Box-Behnken para produção de FOS por

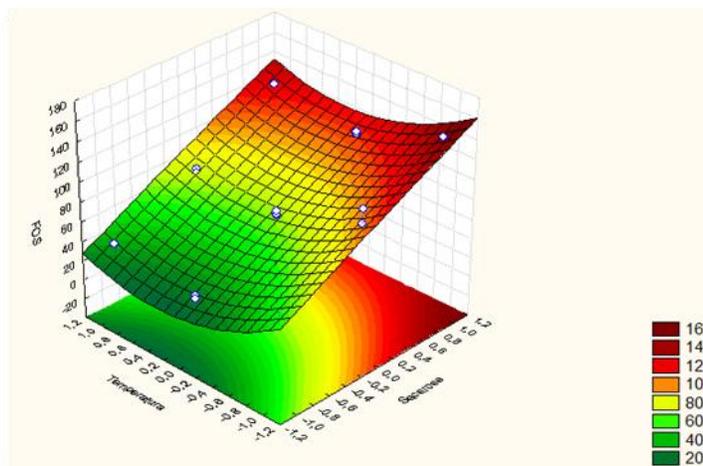
Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas			Variável Resposta
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ [Sacarose] (g. L ⁻¹)	X ₂ Temp. (°C)	X ₃ Tempo (h)	Y FOS (g. L ⁻¹)
1	+	+	0	400	55	24	121,60
2	+	-	0	400	35	24	142,97
3	-	+	0	200	55	24	37,63
4	-	-	0	200	35	24	42,57
5	+	0	+	400	45	36	107,29
6	+	0	-	400	45	12	109,54
7	-	0	+	200	45	36	27,33
8	-	0	-	200	45	12	23,56
9	0	+	+	300	55	36	72,61
10	0	+	-	300	55	12	69,20
11	0	-	+	300	35	36	98,46
12	0	-	-	300	35	12	112,33
13	0	0	0	300	45	24	65,70
14	0	0	0	300	45	24	66,39
15	0	0	0	300	45	24	69,32

fermentação submersa de *Bacillus subtilis* natto CCT7712.

O efeito da concentração de substrato e da temperatura na produção microbiológica de FOS é reportado em estudos anteriores, testando valores de temperatura entre 28 e 32 °C e valores de 200, 300 e 400 g. L⁻¹ de sacarose e verificaram efeito positivo destes parâmetros, sendo os maiores rendimentos obtidos nos maiores valores de temperatura e concentração de sacarose testados em fermentação de *Aureobasium pullulans*⁵.

O microrganismo selecionado mostrou-se eficiente na síntese de FOS, com rendimento superior a 38 % em relação ao consumo de substrato no meio de fermentação. Estudos anteriores referentes a fermentação submersa de *Bacillus subtilis* natto demonstram a alta eficiência deste microrganismo na síntese de exopolissacarídeos, observando-se produção de 98, 86 g. L⁻¹ de FOS em meio com 300 g. L⁻¹ de sacarose em 24 horas de fermentação⁶.

Figura 1. Superfície de resposta para o efeito da concentração de sacarose e temperatura na produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto CCT7712.



CONCLUSÃO

Dentre os parâmetros testados, observou-se efeito significativo da concentração de substrato e da temperatura na síntese microbológica de FOS. Considerando a crescente demanda pelo referido produto, possibilidades de manipulação destes parâmetros na otimização de processos torna a produção microbológica uma alternativa viável e eficiente.

REFERÊNCIAS

- (1) BOUHNİK, Y.; RASKINE, L.; SIMONEAU, G.; PAINEAU, D.; BORNET, F. The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans. *Nutrition Journal*, v.5, n.8, 2006.
- (2) COIMBRA, C. G. O. Produção de fructo-oligosacarídeos e aspectos da biosseparação das frações leves de levana hidrolisada. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- (3) PASSOS, L.M.L & PARK, Y.K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciência Rural*, v. 33, n.2, p.385-390, 2003.
- (4) 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.
- (5) SILVA, JULIANA BUENO DA; FAI, ANA ELIZABETH CAVALCANTE; SANTOS, ROSÂNGELA DOS; BASSO, LUIZ CARLOS; PASTORE, GLÁUCIA MARIA. Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. 11º Congresso Internacional de Engenharia de Alimentos (ICEF11). *Proced. Food Science*, v. 1, p. 1547-1552, 2011.
- (6) SILVA, PATRÍCIA BITTENCOURT. Produção de fruto-oligosacarídeos por levanasacarase de *Bacillus subtilis* Natto (2012). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná.