

Efeito da Agitação sobre a Produção de Fruto-oligossacarídeo por *Bacillus subtilis* natto

Agnes Magri¹, Nicole Caldas Pan¹, Isadora Cernach Carneiro da Fontoura¹, Marcos Roberto Oliveira¹ e Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi¹

¹Universidade Estadual de Londrina – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10.011 – CEP 86.057-970 Londrina – Paraná - E-mail: agnesmagri92@gmail.com

RESUMO

Os fruto-oligossacarídeos (FOS) são oligômeros de frutose produzidos através da transfrutossilacção da sacarose pela enzima levanasacarase. Destaca-se a obtenção de FOS via processos fermentativos, sendo o *Bacillus subtilis* natto uma cepa com grande potencial produtor em meio rico em sacarose. Este trabalho objetivou estudar a influência da agitação em biorreator sob a produção de FOS por *B. subtilis* natto. Foram realizadas duas fermentações variando a agitação (50 e 150 rpm). A maior produção de FOS (173,60 g/L) e de exopolissacarídeos totais (EPS_t) (192,41 g/L) foram observadas na condição de 150 rpm. No entanto, a maior biomassa (2,23 g/L) foi obtida na condição de 50 rpm, mostrando que o aumento da agitação tem influência positiva sobre a produção de FOS e EPS_t, mas desfavorece o desenvolvimento da biomassa.

Palavras-chave: fruto-oligossacarídeos, agitação, biorreator, *Bacillus subtilis* natto.

INTRODUÇÃO

Fruto-oligossacarídeos são oligômeros de frutose com baixo grau de polimerização, formados por ligações β (2 \rightarrow 1) e sintetizados por enzimas como a levanasacarase. São produzidos por processos fermentativos, sendo o *Bacillus subtilis* relatado como um promissor produtor a partir da sacarose (BERTÉ et al., 2013). Os FOS destacam-se devido às suas propriedades fisiológicas, como prebióticos, imunomoduladores, antioxidantes, entre outras (THAKUR et al., 2012; HSIA et al., 2012). Além disso, são caracterizados pela metade da doçura da sacarose (JALAN et al., 2013), se tornando adequados para uso em alimentos de baixa caloria e para o consumo por pessoas com diabetes. Essas propriedades conferem aos FOS inúmeras aplicações em diversas áreas industriais.

A produção é influenciada por diversos fatores como a composição do meio de fermentação, pH, agitação, entre outros (SÁNCHEZ et al., 2008; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013). A agitação e a aeração são importantes uma vez que suprem a demanda de oxigênio para o microrganismo no processo fermentativo, mantêm as células em suspensão e aumenta as condições de mistura e transferência de calor e massa no meio (AIBA; OKABE; OKADA, 1973). Essas condições de mistura influenciam fortemente a produção de enzimas, o que leva ao aumento da quantidade de produto obtido por esta via (SILVA-SANTISTEBAN; MAUGERI FILHO, 2005). Assim, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito da agitação sobre a produção de FOS em biorreator utilizando o micro-organismo *B. subtilis* natto.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: A cepa utilizada no estudo foi *Bacillus subtilis* Natto CCT7712 isolada do alimento japonês natto, no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Meio de preservação e inóculo: A cepa foi mantida a 4°C em meio de preservação inclinado (peptona, 50g/L; extrato de carne, 30g/L; ágar, 20g/L). O inóculo foi preparado pela transferência da cultura do meio de preservação para frascos Erlenmeyer (1L) com 200 mL de meio de inóculo (CALAZANS, 2000), pH ajustado em 7,0 e incubados a 37°C, 150 rpm, 48 h. O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L de células.

Avaliação da influência da agitação: As fermentações foram conduzidas em biorreator Bio-tec (Tecnal) 4,5L e volume operacional 3L de meio de fermentação (g/L): sacarose, 400; extrato de levedura, 2; KH_2PO_4 , 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3; $\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$, 0,6; MnSO_4 , 0,2; amônio citrato, 0,25; com pH controlado (7,7), aeração de 0,2 vvm, por 48 h a 35°C. Foram realizadas duas fermentações em agitações de 50 e 150 rpm. Como antiespumante foi utilizado óleo de girassol. O cultivo foi interrompido a 9000rpm, 15' a 4°C.

Quantificação dos FOS: Determinados por CLAE, utilizando padrões de cestose e nistose (Sigma Aldrich), em cromatógrafo Shimadzu, acoplado ao detector refratométrico Shimadzu RID-10^a e à coluna AMINEX Carbohidrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel foi utilizada água ultrapura degaseificada a 80°C sob fluxo de 0,6 mL/min.

Determinação de Biomassa e Exopolissacarídeos Totais (EPS_t): A biomassa foi medida a $\lambda=400\text{nm}$. Para dosagem de EPS_t o sobrenadante foi precipitado em etanol absoluto na proporção de 3:1 (etanol:sobrenadante) por 12 h a 4°C. A solução foi centrifugada (9050xg, 10', 4°C) e os pellets foram hidrolisados com 1mL de HCl 0,1N, incubados a 100°C por 1h e neutralizados com 0,1 mL de NaOH 2N. Posteriormente a quantificação foi realizada pelos açúcares redutores (NELSON, 1944; SOMOGY, 1945).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições avaliadas, a produção de FOS utilizando agitação de 50 rpm proporcionou em 40 h, 48,60 g/L de FOS (nistose 38,6 g/L e cestose 10 g/L) e maior produtividade, em 26 h com 1,44 g/L/h (Figura 1a).

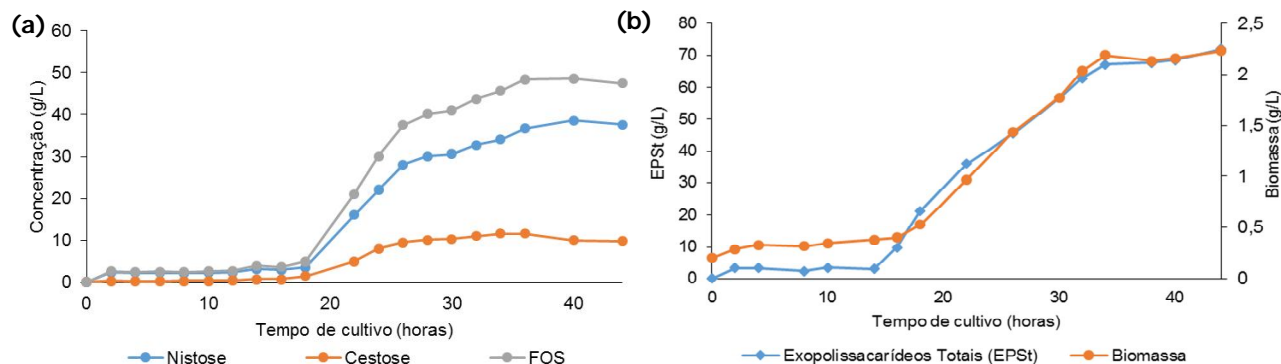


Figura 1 - Produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto em biorreator a 50 rpm. **(a):** Produção de nistose, cestose e FOS. **(b):** Produção de EPS_t e biomassa.

A biomassa se manteve constante após 34 h chegando a 2,23 g/L. A produção de EPS_t acompanhou o crescimento da biomassa, com a maior produção de 71,81 g/L em 48 h (Figura 1b).

Na fermentação com agitação de 150 rpm observou-se que até 24 h a produção de FOS não foi significativa, atingindo apenas 7,7g/L (5,72 g/L de nistose e 1,99 g/L de cestose). Já em 44h ocorreu aumento da produção com valor máximo de 55,38 g/L de FOS em 44h (40,93 g/L de nistose e 14,45 g/L de cestose) (Figura 2a), alcançando um rendimento de 26,33 % em 40 h e maior produtividade em 38 h (1,39 g/L/h).

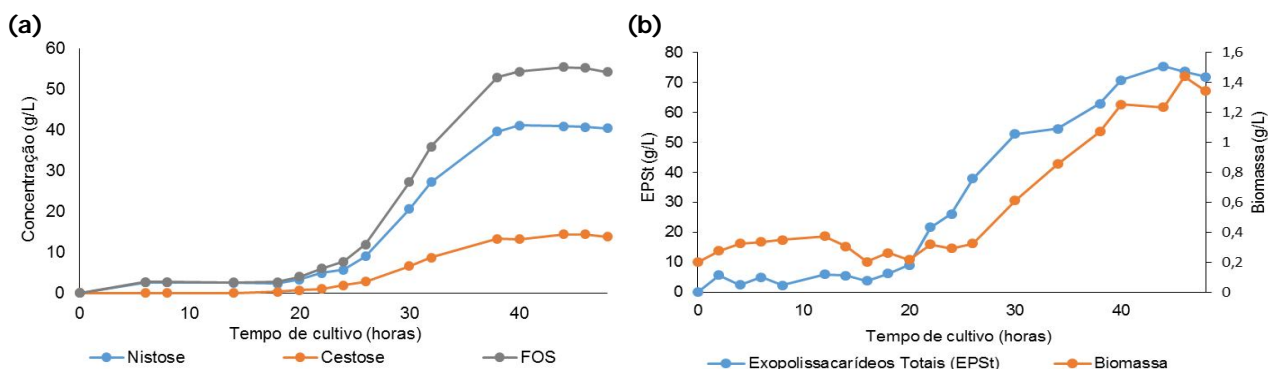


Figura 2 - Produção de FOS por *Bacillus subtilis* natto por conversão da sacarose e acompanhamento dos EPS_t e biomassa em biorreator a 150 rpm. **(a)**: Produção de nistose, cestose e FOS. **(b)**: Cinética de produção de EPS_t e biomassa.

Quanto ao perfil de crescimento de *B. subtilis* natto, nas primeiras 28 h de cultivo se manteve com valores constantes (0,42 g/L), e a biomassa atingiu o valor máximo de 1,44g/L em 44 horas (Figura 2a). A produção de EPS_t se manteve constante nas primeiras 20 h, com produção máxima de 75,45 g/L em 44h (Figura 2b).

Para influenciar positivamente a produção de FOS são utilizadas agitações entre 150 a 300 rpm (CSANÁDI; SISAK, 2008; SÁNCHEZ et al., 2008; GANAIE; GUPTA; KANGO, 2013), sendo esta relatada por influenciar positivamente a produção de FOS (SILVA; BOSATO; CELLIGOI, 2014). Alterações na produção utilizando grandes volumes podem ocorrer devido ao fenômeno de transporte, que envolve principalmente a mistura e as transferências de massa e calor, levando ao aumento do tempo necessário para formação de produto (THIRY; CINGOLANI, 2002). No entanto, o aumento da velocidade de agitação leva a um aumento da taxa de mortalidade celular (SILVA-SANTISTEBAN; MAUGERI FILHO, 2005). Isso ocorre provavelmente, devido à tensão de cisalhamento causada pelas pontas das pás do agitador, a qual aumenta à medida que aumenta a velocidade de rotação (MÄRKL; BRONNENMEIER, 1985).

A baixa agitação (50 rpm) proporcionou menor produção do FOS (48,60 g/L), no entanto favoreceu o desenvolvimento de maior biomassa (2,23 g/L) quando comparada aos valores obtidos na fermentação com agitação de 150 rpm (55,39 g/L de FOS e biomassa de 1,44 g/L).

CONCLUSÕES

A agitação foi um fator importante para *B. subtilis* natto, afetando diretamente o crescimento da biomassa. A melhor condição foi de agitação de 150 rpm, aeração de 0,2 vvm em sacarose a 400 g/L e produziu 55,38 g/L de FOS em 44h (40,93 g/L de nistose e 14,45 g/L de cestose) e 75,45 g/L de EPS_t. Observou-se que o aumento da aeração proporcionou diminuição da biomassa e leve aumento da produção de FOS, além de aumentar o tempo de adaptação do micro-organismo (fase lag) e de produção de FOS e EPS_t.

Agências de Fomento: Capes e CNPq.

REFERÊNCIAS

- AIBA, S.; OKABE, M.; OKADA, M. Modified complex method as applied to optimization of aeration and agitation in fermentation. **Journal of Fermentation Technology**, v. 51 n. 8, p. 594-605, 1973.
- BERTÉ, S. D.; BORSATO, D.; SILBA, P. B.; VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Statistical optimization of levansucrase production from *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using response surface methodology. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 10, p. 898-904, 2013.
- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, n. 19, v. 1, p. 19-21, 1997.
- CSANÁDI, Z.; SISAK, C. Production of short chain fructooligosaccharides. **Hungarian Journal of Industrial Chemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 23-26, 2008.
- GANAIÉ, M. A.; GUPTA, U. S.; KANGO, N. Screening of biocatalysts for transformation of sucrose to fructooligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis Enzymatic**, v. 97, p. 12-17, 2013.
- HSIA, C.-H.; WANG, C.-H.; KUO, Y.-W.; HO, Y.-J.; CHEN, H.-L. Fructo-oligosaccharide systemically diminished D-galactose-induced oxidative molecule damages in BALB/cJ mice. **The British journal of nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1787-92, 2012.
- MÄRKL H, BRONNENMEIER R. Mechanical stress and microbial production. In: Rehm HJ, Reed G, editors. **Biotechnology. Fundamentals of biochemical engineering**, vol. 2. H. Brauer (Volume Ed.); 1985. Chapter 18. p. 369-92.
- NELSON, N., A photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 84, p. 375-380, 1944.
- SÁNCHEZ, O.; GUIO, F.; GARCIA, D.; SILVA, E.; CAICEDO, L. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, n. 2, p. 109-115, 2008.
- SILVA, P. B. DA; BORSATO, D.; CELLIGOI, M. A. P. C. Optimization of high production of fructooligosaccharides by sucrose fermentation of *Bacillus subtilis* Natto CCT 7712. **American Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 144-150, 2014.
- SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; FILHO, F. M. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 717-724, 2005.
- SOMOGY, M.A, A new reagent for determination of sugar. **Journal Biology Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.
- THAKUR, M.; CONNELLAN, P.; DESEO, M. A; et al. Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 77-81, 2012.
- THIRY, M.; CINGOLANI, D. Optimizing scale-up fermentation processes. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 103-105, 2002.
- JALAN, N.; VARSHNEY, L.; MISRA, N.; PAUL, J.; MITRA, D.; RAIKHWADA, D. D. Studies on production of fructo-oligosaccharides (FOS) by gamma radiation processing of microbial levan. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 365-70, 2013.