

Efeito dos parâmetros de preparo de natto liofilizado com maior atividade antioxidante

Effects of parameters of production of lyophilized natto with higher antioxidant activity

Renata F. C. Badini¹, José Marcos G. Mandarino², Josemeyre B. Silva³, Elza I. Ida³, Mara Lúcia L. Ribeiro^{1,*}

¹Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. ²Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, Acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta, Caixa Postal 231, CEP 86001-970, Londrina, Paraná, Brasil. ³Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil. *Correspondent author Email: maraluciaribeiro@uel.br

Resumo

O natto é um alimento fermentado de soja e devido as suas propriedades químicas apresenta elevado valor nutritivo. Um dos benefícios deste produto é a atividade antioxidante que pode ser influenciada pelas condições de preparo. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da quantidade de inóculo (10^3 ; 10^6 e 10^9 UFC mL⁻¹), temperatura (25; 35 e 45°C) e tempo de fermentação (12; 24 e 36 h) sobre a atividade antioxidante do natto liofilizado produzido por fermentação de grãos de soja com *B. subtilis* natto. Para produção de natto liofilizado com maior atividade antioxidante é recomendado 10^9 UFC mL⁻¹, tempo de incubação de 36 h a 45 °C.

Palavras-chaves: soja, *Bacillus subtilis* natto, atividade antioxidante.

Abstract

The natto is a fermented soybean food and due its chemical characteristics have a higher nutritive value. This fermented soybean food has activity antioxidant that can be influenced by preparation conditions. This study aimed to investigate the effect of amount of inoculum (10^3 ; 10^6 and 10^9 CFU mL⁻¹), temperature (25; 35 and 45°C) and fermentation time (12; 24 and 36 h) during the production of lyophilized natto by fermentation of soybean grains with *B. subtilis* natto with higher antioxidant activity. The condition that resulted in the lyophilized natto with higher antioxidant activity (1.23 µM of Trolox g⁻¹) was with 10^9 CFU mL⁻¹ and incubation time of 36 h at 45°C.

Keywords: soybean, *Bacillus subtilis* natto, antioxidant activity.

Introdução

Natto é um alimento tradicional de soja obtido pela fermentação dos grãos com *Bacillus subtilis* natto e contém 59,5 % de umidade, 16,5 % de proteínas e 10 % de lipídeos (Ohta, 1986).

As condições de preparo do natto podem variar e incluem a hidratação dos grãos de soja, o cozimento, a adição de inóculo *Bacillus subtilis* natto e por fim, a fermentação dos grãos (Steinkraus, 1983). Os grãos de soja hidratados são cozidos até ficarem macios, resfriados, inoculados com *Bacillus* natto e então, embalados

em sacos plásticos e incubados durante 12 a 20 h. Hu et al. (2010) observaram que a atividade antioxidante dos natts produzidos com soja preta aumentou linearmente com o tempo de fermentação e quantidade de inóculo adicionada. Os autores descrevem que a maior atividade antioxidante, método do DDPH, foi maior durante a fermentação dos grãos de soja provavelmente devido ao aumento no teor total de polifenóis e de isoflavonas. O teor de polifenóis teve aumento de 1,5 vezes durante a etapa de fermentação.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito das variáveis quantidade de inóculo (10^3 ; 10^6 e 10^9 UFC mL⁻¹), temperatura (25; 35 e 45°C) e tempo de fermentação (12; 24 e 36 h) durante a produção de natto liofilizado com maior atividade antioxidante usando um delineamento composto central (DCC) 2³.

Material e Métodos

Para a produção dos natts liofilizados foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 216 fornecidos pela Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, Brasil.

Os natts foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Wu e Chou (2009). Os grãos de soja foram hidratados em água à temperatura ambiente (28°C) por 14 h, cozidos no vapor a 121° C (1kg/cm²) por 20 min em autoclave, cobertos com uma folha de alumínio e então, resfriados até 28°C. Para a fermentação foram adicionados 5 mL do inóculo de *B. subtilis* natto em 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico perfurado na parte superior.

Para avaliar o efeito das condições de produção do natto com maior atividade antioxidante foi utilizado o planejamento experimental com esquema fatorial 2³, com três repetições do ponto central totalizando 17 ensaios (Tabela 1). As variáveis independentes investigadas foram: X_1 = inóculo (10^3 , 10^6 e 10^9 UFC mL⁻¹), X_2 = temperaturas (25, 35 e 45°C) e X_3 = tempo de fermentação (12, 24 e 36 h) e a função-resposta avaliada foi expressa como atividade antioxidante (μ M de Trolox g⁻¹). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), de regressão e coeficiente de determinação total (R^2). As análises foram realizadas no programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2007).

Os natts obtidos foram liofilizados e desengordurados com hexano e os compostos fenólicos foram extraídos com etanol 80% na proporção 1:10 (m/v). Para a determinação da capacidade antioxidante (Casagrande et al., 2007) foi misturado 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5; 1,0 mL de etanol absoluto, 0,5 mL do radical DPPH 250 μ mol L⁻¹ e 50,0 μ L de amostra. As misturas foram mantidas em repouso no escuro por 30 min a temperatura ambiente e, posteriormente, realizada a leitura da absorvância a 517 nm. A quantificação foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox (0,5 a 20 μ mol L⁻¹) e os resultados foram expressos em μ M Trolox g⁻¹ de amostra em base seca.

Resultados e Discussão

De acordo com a Tabela 1, pode-se observar que o natto liofilizado preparado nas condições do ensaio 8 apresentou a maior atividade antioxidante ($X_1 = 10^9$ UFC mL⁻¹; $X_2 = 45^\circ\text{C}$; $X_3 = 36$ h) enquanto a menor atividade foi obtida no ensaio 14 ($X_1 = 10^6$ UFC mL⁻¹; $X_2 = 35^\circ\text{C}$; $X_3 = 36$ h).

Tabela 1. Delineamento Composto Central (DCC) 2^3 e função-resposta experimental para produção de natto com maior atividade antioxidante.

Ensaio	X_1 (x_1)	X_2 (x_2)	X_3 (x_3)	Y_1
1	10^3 (-1)	25 (-1)	12 (-1)	0,98018
2	10^3 (-1)	25 (-1)	36 (+1)	0,79109
3	10^3 (-1)	45 (+1)	12 (-1)	0,93655
4	10^3 (-1)	45 (+1)	36 (+1)	0,68018
5	10^9 (+1)	25 (-1)	12 (-1)	0,96745
6	10^9 (+1)	25 (-1)	36 (+1)	0,63291
7	10^9 (+1)	45 (+1)	12 (-1)	1,19291
8	10^9 (+1)	45 (+1)	36 (+1)	1,22745
9	10^3 (-1)	35 (0)	24 (0)	0,62927
10	10^9 (+1)	35 (0)	24 (0)	0,69655
11	10^6 (0)	25 (-1)	24 (0)	1,04200
12	10^6 (0)	45 (+1)	24 (0)	0,82018
13	10^6 (0)	35 (0)	12 (-1)	0,81473
14	10^6 (0)	35 (0)	36 (+1)	0,50018
15	10^6 (0)	35 (0)	24 (0)	1,00
16	10^6 (0)	35 (0)	24 (0)	0,96018
17	10^6 (0)	35 (0)	24 (0)	0,83836

x_1 , x_2 and x_3 são as variáveis codificadas; X_1 (quantidade de inóculo, UFC mL⁻¹), X_2 (temperatura, °C) e X_3 (tempo de fermentação, h) são as variáveis reais; Y_1 (atividade antioxidante, µM Trolox g⁻¹).

Pela análise de regressão e de variância (ANOVA), o efeito quadrático da variável X_2 (temperatura, °C), efeito linear da variável X_3 (tempo de fermentação, h) e ao efeito da interação entre as variáveis X_1X_2 foram significativos ($p < 0,10$) sobre a função-resposta Y_1 (atividade antioxidante). Considerando somente as variáveis significativas foi possível construir o modelo matemático (Equação 1).

$$Y = 0,81108 + 0,21133x_2^2 - 0,10600x_3 + 0,12181x_{12} \text{ (Equação 1)}$$

O coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 0,68 indicando que 68% dos dados experimentais ajustaram-se ao modelo polinomial proposto. A falta de ajuste foi não significativa e, portanto este modelo é útil para fins preditivos.

A análise da superfície de resposta (Figura 1) sugere que a maior atividade antioxidante ($\hat{Y}_1 = 1,228$ µM Trolox g⁻¹) foi obtida quando $x_1 = +1$ ou $X_1 = 10^9$ UFC mL⁻¹, $x_2 = +1$ ou $X_2 = 45$ °C e $x_3 = +1$ ou $X_3 = 36$ h.

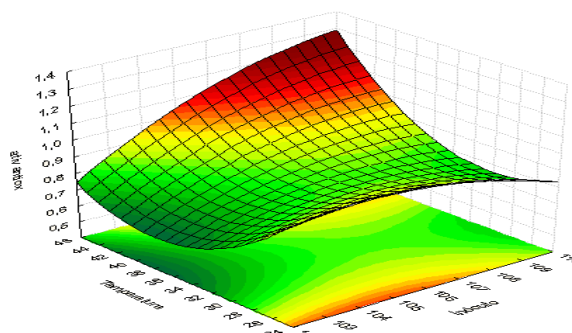


Figura 1. Superfície de resposta para efeito da quantidade de inóculo (UFC mL⁻¹) e temperatura (°C) na atividade antioxidante de natto liofilizado

Ishihara et al. (2007) observaram relação positiva entre temperatura e atividade antioxidante no preparo de extrato de soja e tofu. O tratamento térmico auxiliou na bioconversão de isoflavonas, aumentando o teor de agliconas que possivelmente estão associadas ao aumento da atividade antioxidante. Além disto, o aumento do inóculo pode estar associado ao aumento de atividade de β -glicosidase que hidrolisa a forma glicosilada das isoflavonas com aumento de agliconas.

Conclusões

Para produção de natto liofilizado com maior atividade antioxidante é recomendado 10^9 UFC mL⁻¹, tempo de incubação de 36 h a 45 °C.

Agradecimentos

À Fundação CAPES/MEC pela concessão da bolsa de estudo para Renata F. C. Badini. À Profa. Dra Maria A. P. C. Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* natto para a execução deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A., JR; BORIN, M.F.; LOPEZ, R.F.V.; FONSECA, M.J.V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 183-190, 2007.
- HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 90, p. 1194–1202, 2010.
- ISHIHARA, M.; SINGH, H.; CHUNG, G.; TAM, C. Content composition and antioxidant activity of isoflavones in commercial and homemade soymilk and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 87, Issue 15, p. 2844–2852, 2007.
- OHTA T. Natto. Legume-based Fermented Foods NR Reddy MD Pierson. D Merle, DK Salunkhe, CRC Press. p. 85-93, 1986.
- STEINKRAUS, K. H. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods, seção 5 in Handbook of Indigenous Fermented Foods Microbiology series, v. 9 p. 530–547, 1983.
- WU, C.; CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10695–10700, 2009.