

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROBIÓTICOS EM BIORREATORES E  
SUAS APLICAÇÕES EM SISTEMAS ALIMENTÍCIOS SOB A FORMA  
IMOBILIZADA**

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia  
Química da UFRGS como um dos  
requisitos à obtenção do grau de  
Doutora em Engenharia Química

Graziela Bruschi Brinques  
Engenheira de Alimentos, MSc.

Orientador: Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre (RS), Brasil

Novembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE ENGENHARIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese Otimização da produção de probióticos em biorreatores e suas aplicações em sistemas alimentícios sob a forma imobilizada, elaborada por Graziela Bruschi Brinques, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Tessaro

---

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

---

Dr<sup>a</sup>. Giandra Volpato

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marco Antônio Záchia Ayub, pela orientação, apoio, ensinamentos, amizade e incentivo realizados ao longo deste trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro dado durante parte deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Tessaro, Dr. Plinho Francisco Hertz e à pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Giandra Volpato, por terem aceitado discutir este trabalho, pelas sugestões e correções realizadas.

À Professora Maria do Carmo Peralba pelo auxílio na realização de parte deste trabalho.

A todos os colegas do BIOTECLAB, que além da ajuda fizeram com que a trabalho em laboratório fosse bastante prazeroso através da amizade e carinho.

Às bolsista de iniciação científica Viviane, Nilvane, Renata, Maria Clara, Ludmille que trabalharam diretamente na realização deste trabalho e também às bolsistas Janira, Angela e Fernanda que me auxiliaram sempre nos momentos em que precisei.

As minhas queridas amigas, com as quais dividi minhas maiores angústias e realizações: Cibele Vencato, Precila Lopes e Nicole Sehnem.

Aos meus grandes amigos, de toda a vida, que juntos, ano após ano, crescemos e conquistamos mais uma parte desse imenso mundo, sempre com muitos sucessos e, graças a Deus, pouquíssimos fracassos.

À minha mãe, Ozita, pelo amor incondicional, pelo exemplo de vida e determinação, pelo incentivo e força. Te amo.

Ao meu marido, Vladimir (Fuca), meu maior companheiro nesta jornada, pelo companheirismo, amizade, amor, auxílio, compreensão. À você dedico esta tese.

A Deus, pela saúde e bênçãos.

# PENSAMENTO

“O Universo é o eco de nossas ações e de nossos pensamentos.”

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fermentação homoláctica .....	6
Figura 2: Fermentação heteroláctica .....	7
Figura 3: Árvore filogenética, baseada na análise comparativa de 16S rRNA, mostrando o grupos filogenéticos principais das LAB e os gêneros Gram-positivos não relacionados <i>Bifidobacterium</i> e <i>Propionibacterium</i> .....	12
Figura 4: Esquema do fluxo da encapsulação de bactérias pelas técnicas de extrusão e emulsificação.....	35
Figura 5: Resíduos de ácido-β-D-manurônico (M) e ácido-α-L-gulurônico (G). 37	
Figura 6: Fórmula estrutural de ácido poli-galacturônico, parcialmente metilado. ....	38
Figura 7: Esquema da formação da rede de pectina com íons Ca <sup>2+</sup> .....	39
Figura 8: Estrutura química da quitosana.....	41
Figura 9: Diagrama esquemático do sistema de microencapsulação pela técnica de emulsão. ....	60
Figura 10: Fluxograma de produção de iogurte.....	66
Figura 11: Diagrama dos valores de UFC mL <sup>-1</sup> dos microrganismos <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> (57); <i>C. maltaromaticum</i> (88) e <i>L. plantarum</i> (117). 73	
Figura 12: Diagrama de proteínas de soro de queijo precipitadas em diferentes condições de hidrólise.....	77
Figura 13: Cinética de crescimento no meio SPYEP em <i>shaker</i> rotatório a 180 rpm, 37 °C de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> .....	78
Figura 14: Cinética de crescimento no meio SPYEP em <i>shaker</i> rotatório a 180 rpm, 37 °C de <i>C. maltaromaticum</i> . ....	78

Figura 15: Cinética de crescimento no meio SPYEP em <i>shaker</i> rotatório a 180 rpm, 37 °C de <i>L. plantarum</i> . .....	79
Figura 16: Acompanhamento do crescimento de <i>L. plantarum</i> em meios com diferentes tipos de fontes de nitrogênio.....	81
Figura 17: Cinética de crescimento em biorreator do <i>L. plantarum</i> . .....	83
Figura 18: Superfícies de contorno da produção de biomassa de <i>L. plantarum</i> isolado de queijo Serrano.....	91
Figura 19: Cinética de crescimento de <i>L. plantarum</i> em biorreator submerso em meio base de soro de queijo, a 34 °C, 3,5 vvm. ....	95
Figura 20: Variação de número de células viáveis de <i>L. plantarum</i> quando submetido à SIS com seus respectivos controles. ....	97
Figura 21: Variação do número de células viáveis de <i>L. plantarum</i> submetido a SGS entre tempo 0 e 120 min. (barra brancas) número inicial de células (barras pretas) número final de células. ....	99
Figura 22: Viabilidade de <i>L. plantarum</i> imobilizado em ALGQ em iogurte em condições de estocagem sob refrigeração ( $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).....	102

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das LAB por Orla-Jensen e classificação taxonômica atual <sup>2</sup> .....	4
Tabela 2: Características diferenciais das LAB <sup>a</sup> .....	9
Tabela 3: Classificação do gênero <i>Lactobacillus</i> em relação ao tipo de fermentação .....	14
Tabela 4: Produtos disponíveis no mercado, comercializados como probióticos contendo <i>L. plantarum</i> .....	15
Tabela 5: Microrganismos considerados probióticos.....	29
Tabela 6: Composição dos meios utilizados para comparação do crescimento dos isolados 57, 88 e 117.....	49
Tabela 7: Composição dos meios para avaliação da fonte de nitrogênio.....	52
Tabela 8: Matriz de delineamento experimental Plackett-Burman .....	56
Tabela 9: Matriz do DCCR com níveis codificados e decodificados das variáveis. ....	57
Tabela 10: Delineamento dado pelo caminho de ascendência máxima.....	58
Tabela 11: Tratamentos empregados na imobilização de <i>L. plantarum</i> . ....	61
Tabela 12: Rendimento de biomassa em massa seca de células para experimentos de seleção de isolados de queijo Serrano. ....	69
Tabela 13: Resultado da identificação das bactérias. ....	70
Tabela 14: Tabela de diferenças significativas para avaliação da formação de biomassa dos isolados de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>C. maltaromaticum</i> , <i>L. plantarum</i> por UFC mL <sup>-1</sup> para diferentes meios. ....	74



Tabela 15: Resultado do teste de Tukey, com significância de 95%, para os meios com diferentes fontes de nitrogênio. ....	82
Tabela 16: Matriz de delineamento experimental Plackett-Burman com a variável de resposta produção de biomassa em 48 h. ....	85
Tabela 17: Efeitos estimados para a produção de biomassa resultantes do delineamento P-B. ....	86
Tabela 18: Planejamento DCCR e resultados de biomassa de <i>L. plantarum</i> produzida em 48 h de cultivo. ....	89
Tabela 19: Coeficientes estimados pelo modelo de regressão no DCCR. ....	90
Tabela 20: Planejamento dos experimentos pela metodologia de caminho de ascendência máxima e resposta em 48 h de cultivo. ....	92
Tabela 21: Redução de número de células viáveis de <i>L. plantarum</i> durante 38 dias de armazenamento sob refrigeração à 4 °C. ....	101

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALG – esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v)

ALGA – esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)

ALGQ – esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)

ALPE – esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v)

ALPEA – esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)

ALPEQ – esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Saniária

DO – densidade óptica

G + C – porcentagem molar de guanina mais citosina

GRAS – *Generally Recognized As Safe*

LAB – bactérias ácido lácticas

MS – massa seca de células ( $\text{g L}^{-1}$ )

MRS – caldo padrão de crescimento de *Lactobacillus* (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960)

PEC – tratamento esferas elaboradas com pectina cítrica 4 % (p/v)

PECA – esferas elaboradas com pectina cítrica 4 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)

PECQ – esferas elaboradas com pectina cítrica 4% (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)

rpm – rotações por minuto

SES - meio de cultivo contendo 25 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo

SEYEP - meio de cultivo contendo 25 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo, 10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> peptona na formulação

SIMO – tratamento células sem imobilização

SPS – meio de cultivo contendo 70 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo

SPYEP – meio de cultivo contendo 70 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo, 10 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 20 g L<sup>-1</sup> peptona na formulação

UFC – unidades formadoras de colônias

## ÍNDICE

1	Introdução.....	1
2	Revisão da literatura.....	3
2.1	Bactérias ácido lácticas.....	3
2.1.1	Lactobacilos.....	13
2.1.1.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	14
2.2	Fermentações com LAB.....	21
2.3	Probióticos.....	25
2.4	Imobilização de células.....	33
2.4.1	Técnica de imobilização.....	34
2.4.2	Materiais utilizados em imobilizações.....	36
2.4.2.1	Alginato.....	37
2.4.2.2	Pectina.....	38
2.4.3	Tratamentos especiais.....	39
2.4.3.1	Poli-eletrólitos.....	40
2.4.3.1.1	Quitosana.....	40
2.4.4	Utilização das técnicas de imobilização para melhora da viabilidade de probióticos.....	41
3	Materiais e Métodos.....	47
3.1	Seleção de lactobacilos para produção de biomassa.....	47
3.1.1	Microrganismos: recuperação e manutenção.....	47
3.1.2	Avaliação da produção de biomassa.....	48
3.2	Ensaio preliminares.....	48
3.2.1	Elaboração da curva de calibração DO X massa seca de células secas.....	48

3.2.2	Crescimento de isolados em meios a base de soro de queijo .....	49
3.2.3	Hidrólise das proteínas do soro de queijo.....	50
3.2.4	Estudo da cinética de crescimento em <i>shaker</i> dos isolados 57, 88 e 117 .....	51
3.2.5	Avaliação da adição de fonte de nitrogênio em <i>shaker</i> .....	51
3.2.6	Ensaio preliminar em cultivo submerso em biorreator .....	52
3.3	Produção de biomassa de <i>L. plantarum</i> em cultivo submerso em biorreator .....	53
3.3.1	Microrganismo .....	54
3.3.2	Preparação do inóculo.....	54
3.3.3	Condições de cultivo em biorreator submerso.....	54
3.3.4	Planejamento experimental .....	55
3.3.4.1	Seleção das condições de cultivo.....	55
3.3.4.2	Delineamento composto central rotacional (DCCR).....	56
3.3.4.3	Método do caminho de ascendência máxima .....	57
3.4	Viabilidade de <i>L. plantarum</i> sob diferentes condições de estresse.....	58
3.4.1	Microrganismo .....	58
3.4.2	Imobilização de <i>L. plantarum</i> .....	59
3.4.2.1	Preparo da cultura concentrada de células .....	59
3.4.2.2	Preparação das esferas .....	60
3.4.2.3	Recobrimento com alginato .....	61
3.4.2.4	Recobrimento com quitosana.....	62
3.4.3	Testes de resistência aos meios gastrointestinais.....	62
3.4.3.1	Meios para testes de tolerância ao trânsito gastrointestinal.....	62
3.4.3.2	Teste de tolerância ao trânsito gastrointestinal .....	63

3.4.3.3	Dissolução das esferas .....	64
3.4.4	Teste de resistência à condição de refrigeração .....	64
3.4.5	Produção de iogurte suplementado com <i>L. plantarum</i> imobilizado em alginato recoberto com quitosana .....	64
3.5	Métodos analíticos .....	66
3.6	Análise estatística .....	67
4	Resultados e discussão .....	68
4.1	Seleção de lactobacilos para produção de biomassa .....	68
4.1.1	Avaliação da produção de biomassa .....	68
4.2	Ensaio preliminares.....	70
4.2.1	Elaboração da curva de calibração DO X massa seca de células secas .....	70
4.2.2	Crescimento de isolados em meios a base de soro de queijo .....	71
4.2.3	Hidrólise das proteínas do soro de queijo.....	75
4.2.4	Estudo da cinética de crescimento em <i>shaker</i> de <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> , <i>C. maltaromaticum</i> e <i>L. plantarum</i> .....	77
4.2.5	Avaliação da adição de fonte de nitrogênio em <i>shaker</i> .....	80
4.2.6	Ensaio preliminar em biorreator submerso .....	82
4.3	Produção de biomassa de <i>L. plantarum</i> em cultivo submerso em biorreator .....	84
4.3.1	Delineamento experimental Plackett-Burman.....	84
4.3.2	Delineamento composto central rotacional (DCCR) .....	89
4.4	Resultados imobilizações.....	95
4.4.1	Resistência aos meios gastrointestinais .....	95
4.4.2	Resistência à condição de refrigeração.....	100

4.4.3	Resistência à estocagem sob refrigeração em iogurte .....	101
5	Conclusões .....	104
6	Perpectivas .....	106
7	Referências bibliográficas .....	108

## RESUMO

Probióticos são suplementos alimentares de microrganismos vivos com efeitos benéficos no hospedeiro animal pela melhora do balanço intestinal. Dentre os microrganismos considerados probióticos, somente aqueles microrganismos classificados como bactérias ácido lácticas (LAB) são considerados importantes em relação à alimentação. Cultivos de altas densidades de células são cada vez mais importantes do ponto de vista industrial para a obtenção de LABs, pois produtos adicionados com esses suplementos apresentam alto valor agregado. Este trabalho tem por objetivo a produção de *Lactobacillus plantarum* em cultivo submerso em biorreator, avaliação da sua resistência na forma livre e imobilizada frente às condições de armazenamento sob refrigeração e trânsito gastrointestinal e elaboração de produto fermentado com adição de probióticos. Inicialmente foram realizados experimentos para selecionar *Lactobacillus* que apresentassem alta produtividade de biomassa. Em seguida foram realizados experimentos para avaliar a utilização de soro de queijo como ingrediente base da formulação do meio de cultivo e sua suplementação com diferentes fontes de nitrogênio. Com o microrganismo selecionado, *L. plantarum*, realizou-se a seleção de variáveis através do delineamento experimental Plackett Burman (P-B). A otimização das condições de cultivo foi realizada utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR). Paralelamente, foram testadas a sobrevivência de *L. plantarum* em armazenamento sob refrigeração e à exposição a meios que simulem a passagem pelo aparelho digestivo. Estas avaliações foram realizadas comparativamente entre os microrganismos na forma livre e na forma microencapsulada utilizando como polímeros alginato de sódio e pectina e recobrimentos com alginato de sódio e quitosana. Os resultados mostraram que a temperatura, pH, taxa de aeração, concentração de lactose e peptona foram os parâmetros que mais influenciaram a produção de biomassa. O DCCR para temperatura e taxa de aeração mostraram que o máximo de produção de biomassa predita foi de 14,30 g L<sup>-1</sup> de *L. plantarum*, nas condições otimizadas. No ponto central do DCCR, atingiu-se a produção de biomassa de *L. plantarum* de 10,2 g L<sup>-1</sup>, como taxa de conversão de 0,10 g de células g<sup>-1</sup> de lactose e 1,08 g de ácido láctico g<sup>-1</sup> lactose (m/m) com as seguintes condições de cultivos: 140 g L<sup>-1</sup> de lactose; 15 g L<sup>-1</sup> peptona; 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; pH 5,2; velocidade de agitação de 200 rpm; 34 °C e 3,5 vvm. O meio intestinal simulado não interferiu na viabilidade dos microrganismos em relação ao meio controle. Já o meio gástrico simulado diminuiu drasticamente a viabilidade dos microrganismos nas condições testadas não havendo diferença significativa entre os diferentes materiais imobilizantes utilizados e o controle sem imobilização. No armazenamento sob refrigeração houve aumento da viabilidade em relação às células não imobilizadas, sendo que os tratamentos em que houve menor perda de viabilidade foram imobilização em 4 % de pectina, 3 % de alginato de sódio recoberto com quitosana e mistura de 2 % de alginato de sódio e 2 % de pectina. Quando testada a viabilidade em iogurte de *L. plantarum* imobilizados em 3 % de alginato recoberto com quitosana houve perda de viabilidade de 0,55 ciclo logarítmico durante 38 dias de armazenamento. A cepa de *L. plantarum* estudada se mostra como um microrganismos potencial para utilização como probiótico em alimentos, uma vez que demonstrou alta produtividade de células e boa viabilidade frente às condições de estresse utilizadas.

Palavras chave: *Lactobacillus plantarum*, produção de ácido láctico, produção de probiótico, planejamento Plackett-Burman, planejamento DCCR, imobilização por emulsificação, recobrimento, viabilidade, iogurte.



## ABSTRACT

Probiotics are live microorganisms feed supplement, which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance. Among the microorganisms considered probiotics, only those strains classified as lactic acid bacteria - LAB are considered of importance regarding to the nutritional effects. High cell density cultivations of LABs are important from the industrial viewpoint, because products added with this supplement are of high value. The aims of this work were to investigate the biomass production of *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor cultures, evaluate the resistance of free and immobilized *L. plantarum* when submitted to refrigerated storage, the viability in simulated gastrointestinal juices and in yoghurt. Initially, experiments were performed to select *Lactobacillus* that showed high productivity of biomass. Further experiments were performed to evaluate the use of cheese whey as a basic ingredient in the formulation of the medium and its supplementation with different nitrogen sources. The selected microorganism, *L. plantarum*, was used for the selection of variables of the Plackett Burman (PB) design. The optimization of culture conditions was performed using a central composite rotational (CCD) design. In parallel, it was tested the survival of *L. plantarum* in refrigerated storage and exposure to media that simulated the passage through the digestive tract. These evaluations were performed comparatively between microorganisms in the free and microencapsulated form using as polymers sodium alginate and pectin, coated with sodium alginate or chitosan. Results have shown that temperature, pH, aeration rate, lactose, and peptone were the most influential over biomass formation. The CCD for temperature and aeration rate showed that the model predicted maximal biomass production of  $14.30 \text{ g L}^{-1} \text{ (dw)}$  of *L. plantarum* under the optimized conditions. At central point of CCD, it was obtained a biomass production of  $10.2 \text{ g L}^{-1} \text{ (dw)}$ , with conversion rates of  $0.10 \text{ g}$  of cell  $\text{g}^{-1}$  lactose and  $1.08 \text{ g}$  lactic acid  $\text{g}^{-1}$  lactose (w/w), with the following conditions:  $140 \text{ g L}^{-1}$  of lactose;  $15 \text{ g L}^{-1}$  peptone;  $5 \text{ g L}^{-1}$  of yeast extract; pH 5.2; stirred agitation of 200 rpm;  $34 \text{ }^\circ\text{C}$  and 3.5 vvm. The simulated intestinal medium did not affect the viability of microorganisms in relation to the control medium. However, the simulated gastric medium drastically reduces the viability of microorganisms in the conditions tested with no significant difference between the different materials used and the control without immobilization. In refrigerated storage there was an increase in the viability compared to free microorganisms, and the treatments with lower loss of viability were those of 4% pectin, 3% sodium alginate coated with chitosan and a mixture of 2% alginate sodium and 2% pectin. When tested the viability in yogurt of *L. plantarum* immobilized in 3% alginate coated with chitosan, the viability loss was 0.55 log cycle during 38 days of storage. The strain of *L. plantarum* studied was shown as a potential organism for use as probiotics in food, since it has shown high yield and good cell viability in the face of stress conditions used.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*; Lactic acid production; probiotic production; Plackett-Burman design; CCD experimental design, immobilization by emulsification, coating, viability, yogurt.

# 1 INTRODUÇÃO

Os últimos anos vêm sendo caracterizados pelo crescente interesse em uma alimentação mais saudável, que além de fornecer os nutrientes básicos à dieta, possuam ainda componentes ou substâncias que desempenhem papel benéfico sobre a saúde. Uma nova categoria de alimentos foi criada, a qual se denominou alimentos funcionais. Enquadram-se nesta categoria de alimentos os probióticos que são suplementos de microrganismos vivos que são administrados em quantidades adequadas conferindo benefícios à saúde do hospedeiro.

O desenvolvimento de tecnologia satisfatória para a produção de probióticos, levando em consideração sua viabilidade e sua estabilidade, é uma área chave de pesquisa e produção industrial. Cultivos que produzam alta densidade de células se mostram cada vez mais importantes e de interesse comercial, pois produtos adicionados de probióticos apresentam maior valor agregado e para algumas indústrias que possuem esta linha de alimentos estes têm se tornado os produtos responsáveis pelos maiores faturamentos empresariais.

Outro aspecto de extrema importância é a passagem do alimento suplementado com probióticos pelo trato gastrointestinal. Neste trânsito há a exposição ao pH ácido estomacal, sais biliares e enzimas e este processo representa a maior barreira à sobrevivência dos microrganismos. Isso se deve ao fato de que para que uma cepa probiótica exerça o efeito benéfico no seu hospedeiro, esta deve ser capaz de sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal de quem a consome chegando em quantidades adequadas no

intestino delgado e neste seja capaz de se desenvolver para desempenhar seu papel benéfico. Por este fato, a tolerância ao ácido e à bile estão entre os critérios para a seleção de cepas probióticas.

Com o intuito de melhorar a viabilidade dos probióticos nos produtos e aumentar a sua sobrevivência a condições adversas, diversas técnicas de imobilização de células têm sido investigadas como uma forma passível de proteção dos probióticos nos produtos. Encapsulação em esferas de hidrocolóides aprisiona ou imobiliza as células dos microrganismos dentro da matriz, o que pode promover proteção nestes meios. Existem diversos materiais que são empregados para microencapsulação, como pectina,  $\kappa$ -carragena, gelatina, amido e gomas, sendo que o mais amplamente utilizado é o alginato de sódio.

Membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais probióticos reconhecidos. *Lactobacillus plantarum* é uma versátil bactéria ácido láctica (LAB) que é encontrada em uma grande variedade de ambientes. Este microrganismo tem uma longa história de uso seguro em produtos alimentícios sendo reconhecido e largamente empregado como probiótico.

Em vista ao exposto, o objetivo do presente trabalho é otimizar a produção de probióticos em cultivo submerso em biorreator, utilizando como base do meio de fermentação soro de queijo, avaliar a viabilidade de *L. plantarum*, na forma livre e microencapsulada, sob condições simuladas de trânsito gastrointestinal, armazenagem sob refrigeração e em iogurte.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo é apresentada uma revisão sobre bactérias ácido lácticas, suas principais características, representantes de interesse e aplicação na indústria de alimentos. Também são discutidos conceitos como microrganismos probióticos, principais representantes e necessidade de pesquisa para aumento de sua viabilidade para a aplicação em produtos.

### 2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

O termo bactérias ácido lácticas (LAB) se refere a um grupo diverso de bactérias. Na descrição de uma LAB típica incluem-se como características destes microrganismos: Gram-positivos, fastidiosos, não esporulados, catalase negativos, destituídos de citocromo, ácido tolerantes, geralmente sem mobilidade, anaeróbios facultativos e com ácido láctico sendo o principal produto da fermentação de açúcares (AXELSSON, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; SAVIJOKI, INGMER, VARMANEN, 2006). Contudo, algumas exceções para essa descrição geral podem ocorrer pois algumas espécies podem formar catalase ou citocromo em meio contendo hematina ou compostos relacionados (AXELSSON, 1998). HEINEMAN (1920) apresentou a compilação dos dados apresentados sobre a classificação de LAB por Orla-Jensen, que subdividiu as LAB nos gêneros *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Betabacterium* e *Microbacterium*. A classificação foi baseada em poucas características, dentre elas morfologia (coco ou bacilo, formação de tétrede), modo de fermentação de glicose (hetero ou homo fermentação), gama de utilização de açúcares e crescimento em certas temperaturas. Estas

características continuam auxiliando na classificação das LAB (AXELSSON, 1998).

A Tabela 1 apresenta a classificação das LAB por Orla-Jensen comparativamente a atual subdivisão de gêneros de acordo com a taxonomia. Os gêneros estão agrupados segundo características de formação de catalase, redução de nitrito, forma do microrganismo e tipo de fermentação que realizam (HEINEMAN, 1920; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; PANESAR *et al.*, 2007).

**Tabela 1: Classificação das LAB por Orla-Jensen e classificação taxonômica atual<sup>2</sup>**

Gênero	Forma	Catalase	Redução de nitrito	Fermentação	Gênero atual
<i>Betabacterium</i>	Bacilo	-	-	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> <sup>3</sup> <i>Weissella</i> <sup>3</sup>
<i>Thermobacterium</i>	Bacilo	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i> <sup>3</sup>
<i>Streptobacterium</i>	Bacilo	-	-	Homo- e	<i>Lactobacillus</i> <sup>3</sup>
				Hetero-	<i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Coco	-	-	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <sup>3</sup> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Coco	-	-	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <sup>3</sup> <i>Oenococcus</i> <sup>3</sup> <i>Weissella</i> <sup>3</sup>
<i>Microbacterium</i>	Bacilo	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Coco	+ <sup>4</sup>	+	Homo-	<i>Pediococcus</i> <sup>3</sup> <i>Tetragenococcus</i> <sup>3</sup>

<sup>2</sup> Fonte: Heineman (1920), Holzapfel *et al.* (2001) e Panesar *et al.* (2007).

<sup>3</sup> Gêneros geralmente reconhecidos como seguros com base na informação científica e experiência prática.

<sup>4</sup> Pediococo são geralmente catalase negativo mas algumas cepas podem produzir pseudocatalase que resulta em reação de falso-positivos.

Como pode ser observado na Tabela 1, atualmente no grupo de LAB existem representantes de diversos gêneros, sendo os principais aqueles pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Também se enquadram nesse grupo alguns membros dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Teragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. O maior grupo de LAB pertence ao gênero *Lactobacillus* que compreende mais de 125 espécies e subespécies (AXELSSON, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; PANESAR *et al.*, 2007).

A característica chave das LAB que deve ser enfatizada é a inabilidade para sintetizar grupos porfirinas (como heme). Isto faz com que as LAB sejam destituídas de catalase e de citocromos quando crescem em meios laboratoriais que tenham carência de hematina ou compostos relacionados. Nestas condições, LAB não possuem o mecanismo da rede de transporte de elétrons e encaminha às fermentações para geração de energia (AXELSSON, 1998).

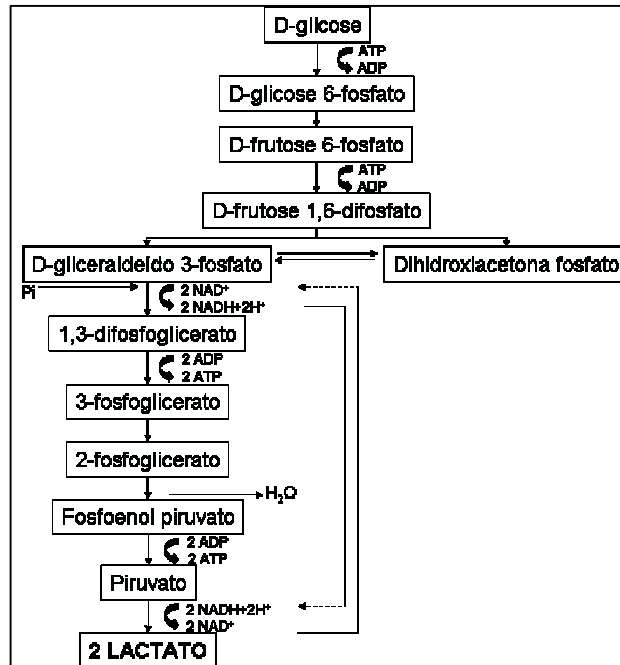
O gênero *Bifidobacterium* freqüentemente é considerado LAB, pois apresenta algumas das características do grupo: Gram-positiva, sem mobilidade e não esporulada. Contudo, é filogeneticamente não relacionado, sendo enquadrado no grupo dos Actinomycetos e possui modo único de fermentação de açúcares, característico do gênero. São microrganismos anaeróbios estritos e o grau de tolerância ao oxigênio depende da espécie e do meio de cultura (AXELSSON, 1998; BALLONGUE, 1998). Hexoses são degradadas exclusivamente e especificamente pela rota da frutose-6-fosfato (SCARDOVI, TROVATELLI, 1965<sup>1</sup> *apud* BALLONGUE, 1998). A fermentação de dois mols de glicose leva a formação de três mols de acetato e dois mols de lactato (BALLONGUE, 1998).

A característica essencial do metabolismo das LAB é a fermentação eficiente de carboidratos, associada à fosforilação ao nível do substrato. Basicamente existem duas rotas metabólicas para a fermentação de hexoses

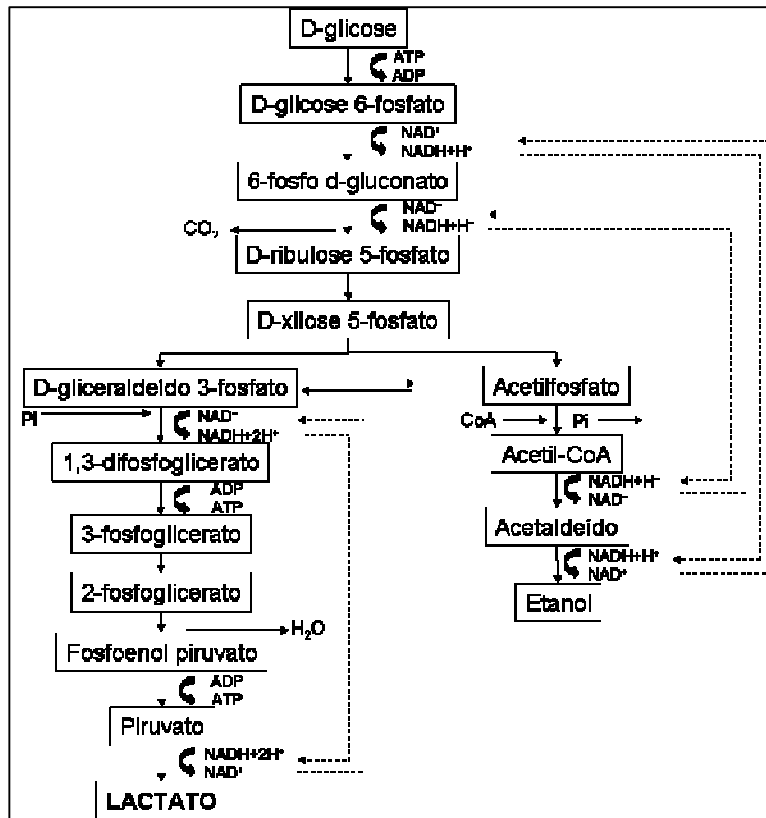
---

<sup>1</sup> SCARDOVI, V.; TROVATELLI, L. D. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in genus *Bifidobacterium*. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, v. 15, p. 19-29, 1965.

em LAB, a fermentação homoláctica (Figura 1) e a fermentação heteroláctica, apresentada na Figura 2 (AXELSSON, 1998).



**Figura 1: Fermentação homoláctica**  
 Fonte: Adaptado Axelsson, 1998.



**Figura 2: Fermentação heteroláctica**

Fonte: Adaptado Axelsson, 1998.

Teoricamente, na fermentação homoláctica, uma molécula de glicose produz duas moléculas de ácido láctico apresentando um ganho líquido de duas moléculas de ATP por molécula de glicose, através da via glicolítica (via Embden-Meyerhof). O nome homoláctica deve-se ao fato do ácido láctico ser o único ou predominante produto final (superior a 50%) sob condições típicas de fermentação (excesso de açúcar e acesso limitado ao oxigênio) e não há a fermentação de pentoses ou gluconato. As espécies heterolácticas facultativas metabolizam hexoses pela via glicolítica Embden-Meyerhof, contudo também são capazes de metabolizar pentoses e outras substâncias através da rota 6-fosfogluconato/fosfoacetolase tendo outros produtos finais de metabolismo além do ácido láctico, como ácido acético, etanol e  $\text{CO}_2$ . Já as espécies heterolácticas obrigatórias usam somente a rota fosfoacetolase para o



metabolismo de açúcares e seus produtos finais de fermentação são principalmente o ácido láctico e o ácido acético e/ou etanol com geração de CO<sub>2</sub> (AXELSSON, 1998).

A produção de ácidos orgânicos pelas LAB diminui o pH e torna o meio seletivo contra outros microrganismos menos ácido-tolerantes (McDONALD, FLEMING e HASSAN, 1990).

Um resumo da diferenciação dos gêneros de LAB com testes bioquímicos clássicos é apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2: Características diferenciais das LAB<sup>a</sup>**

Característica	Bacilo					Coco				
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella<sup>b</sup></i>
Tétrade formação	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO <sub>2</sub> a partir de glicose <sup>c</sup>	- <sup>e</sup>	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Crescimento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Crescimento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Crescimento a 6,5% NaCl	ND <sup>f</sup>	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Crescimento em 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Crescimento a pH 4,4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Crescimento a pH 9,6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Ácido láctico <sup>d</sup>	L	D, L, DL <sup>g</sup>	L	L	L	D	L, DL <sup>g</sup>	L	L	D, DL <sup>g</sup>

<sup>a</sup>+, positivo; -, negativo; ±, resposta variável entre espécies; ND, não determinado.

<sup>b</sup> Cepas de *Weissella* podem não ter a forma de bacilo

<sup>c</sup>Teste para homo ou heterofermentação de glicose, negativo e positivo denotam homofermentativo ou heterofermentativo, respectivamente.

<sup>d</sup>Configuração do ácido láctico produzido a partir da glicose.

<sup>e</sup>Pequenas quantidades de CO<sub>2</sub> podem ser produzidas, dependendo do meio.

<sup>f</sup>Sem crescimento em 8% de NaCl pode acontecer.

<sup>g</sup>Produção de D-, L- ou DL-ácido láctico varia dependendo da espécie.

Fonte: Axelsson, 1998.

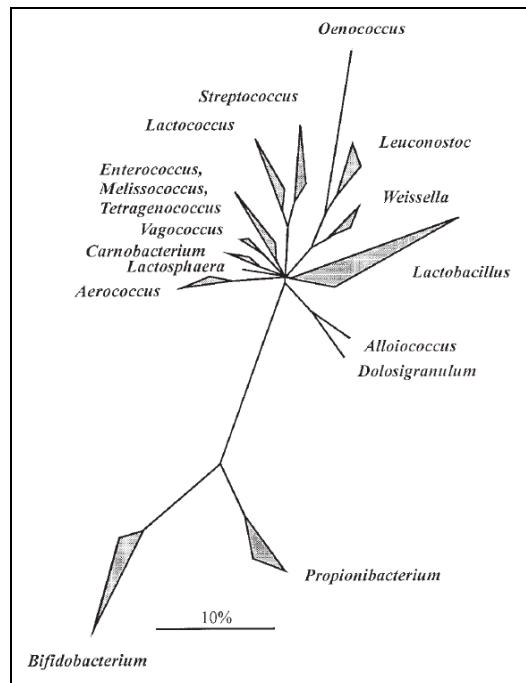
O gênero *Carnobacterium* é distinguível dos *Lactobacillus* com estes testes, bem como *Vagococcus* do *Lactococcus*. Em geral, carnobactérias podem ser distintas dos lactobacilos pela sua capacidade de crescer a pH 9,0 e inabilidade de crescer em meio acetato, seletivo para lactobacilos. *Weissella* pode ser facilmente confundida com leuconostococos ou lactobacilos heterofermentativos. Como pode ser notado, existem sobreposições entre gêneros e exceções às regras apresentadas podem ser encontradas. Dessa forma, a classificação depende de métodos mais sofisticados como seqüenciamento de DNA (AXELSSON, 1998; MAKAROVA, KOONIN, 2007).

Contudo, estas características fenotípicas com que as LAB são tradicionalmente classificadas como morfologia, modo de fermentação e crescimento em diferentes temperaturas, não corresponde em sua totalidade com os resultados de estudos baseados na comparação de seqüenciamento por rRNA. Dessa forma, algumas espécies não são adequadamente distintas por características fenotípicas e os estudos com técnicas moleculares têm demonstrado ser de grande importância para a correta identificação e diferenciação das espécies. A filogenia de bactérias deve ser baseada na comparação de moléculas altamente conservadas que estão presentes em todos os microrganismos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Comparação da seqüência de rRNA é considerada uma ótima medida para a determinação da relação filogenética entre bactérias. A porcentagem molar de guanina mais citosina (G + C) é uma técnica empregada para a classificação taxonômica bacteriana, que associada com os dados de seqüências de rRNA 16S a torna uma ferramenta bastante eficiente. Por meio da análise do rRNA 16S, as eubactérias Gram positivas dividem-se em dois filos: um grupo com

porcentagem molar de G + C maior que 55% e outro menor que 50%. O grupo de menor porcentagem G + C ou ramo de *Clostridium* inclui todas as LAB e uma “verdadeira” LAB é caracterizada por possuir conteúdo de G + C < 55% molar. Algumas bactérias que apresentam valores de porcentagem molar G + C na faixa de 50 – 55%, como *Lactobacillus fermentum*, pertencem ao grupo de baixa porcentagem molar (AXELSSON, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; JAY, 2005).

O gênero *Bifidobacterium* que apresenta algumas das características das LAB, mas que por motivos práticos continua sendo considerado parte das LAB, é filogeneticamente distinto. Bifidobactérias exibem alto conteúdo de G + C, na faixa de 55-67% molar no DNA e fazem parte do ramo dos Actinomycetos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

A relação filogenética dos diferentes gêneros de LAB é apresentada na Figura 3 e é baseada na comparação dos resultados de análise de seqüência de 16S rRNA. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* e o novo gênero *Lactosphaera* são mais relacionados entre eles do que em comparação com os demais LAB. Este grupo de gêneros é mais próximos filogeneticamente a aeróbios e anaeróbios facultativos da subdivisão de baixa porcentagem de G + C do que com demais LAB. *Lactococcus* e *Streptococcus* aparecem bastante próximos, enquanto que os *Lactobacillus* são filogeneticamente diversos (AXELSSON, 1998; HOLZAPFEL, *et al.*, 2001).



**Figura 3: Árvore filogenética, baseada na análise comparativa de 16S rRNA, mostrando o grupos filogenéticos principais das LAB e os gêneros Gram-positivos não relacionados *Bifidobacterium* e *Propionibacterium*.**

Fonte: HOLZAPFEL *et al.*, 2001

LAB têm longo histórico de uso nos processos produtivos de alimentos fermentados e grandes esforços tem sido feitos para investigar o papel destes microrganismos nestes processos (SAVIJOKI, INGMER, VARMANEN, 2006). Teusink e Smid (2006) apresentam uma revisão sobre as aplicações industriais de LAB e estratégias para o aperfeiçoamento dos processos tecnológicos, além das diferentes metodologias biotecnológicas usadas para o melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nestes processos. Entre as aplicações das LAB estão a produção de biomassa e de metabólitos. Cada requerimento específico para a produção de cepas depende da aplicação que se pretende realizar. A produção de biomassa de LAB tradicionalmente era realizada para o uso destas como culturas iniciadoras em produtos fermentados de leite, carnes e vegetais. Contudo, a partir dos anos 80 o

interesse no uso de probióticos tem aumentado e sendo também foco da otimização da produção de biomassa de LAB. Em geral, o critério para a seleção de culturas iniciadoras está relacionado com a sua taxa de acidificação e características de produção de *flavors*. Para probióticos, a seleção é baseada em efeitos benéficos em seus hospedeiros. Independentemente das características que devem ser atingidas para cada caso, sempre se deseja altas produções de biomassa com grande número de células viáveis. Adicionalmente, o uso de substratos agroindustriais de baixo custo é um importante objetivo para otimizar a produção de biomassa (TEUSINK, SMID, 2006).

### **2.1.1 Lactobacilos**

Lactobacilos são bacilos Gram positivos pertencentes ao grupo das LAB. Normalmente eles são encontrados em meios ricos em que estejam disponíveis fontes de carboidratos, como em mucosas de humanos e animais (cavidade oral, intestino e vagina), em plantas e materiais derivados destas, adubo, alimentos fermentados ou deteriorados. São microrganismos amplamente presentes na dieta e são encontrados no trato gastrointestinal desde o nascimento (BERNARDEAU *et al.*, 2008).

Lactobacilos, assim como outras LAB, desempenham um papel crucial na produção de alimentos fermentados como vegetais (GEREZ *et al.*, 2008; TOLONEN *et al.*, 2004), carnes (CENCI-GOGA *et al.*, 2008) e principalmente em laticínios (DE SOUZA *et al.*, 2008; GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2008). A contribuição primária destes microrganismos consiste na rápida formação de ácido láctico a partir das fontes de carbono disponíveis, resultando em

acidificação, que é um parâmetro crítico na preservação dos alimentos. Além deste abaixamento do pH, durante a fermentação há o desenvolvimento de importantes características como *flavour*, textura e alterações nutricionais (KLEEREBEZEM, HUGENHOLTZ, 2003).

A Tabela 3 apresenta classificação de *Lactobacillus* baseada nas suas características de fermentação. Como pode ser observado o gênero *Lactobacillus* pode ser dividido em três grupos.

**Tabela 3: Classificação do gênero *Lactobacillus* em relação ao tipo de fermentação**

Fermentação homoláctica	Fermentação heteroláctica	
	Facultativa	Obrigatória
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. coryneformis</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. paracasei</i>	

Fonte: PANESAR *et al.*, 2007

### 2.1.1.1 *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* é uma versátil LAB que é encontrada em uma grande variedade de ambientes. Este microrganismo tem uma longa história de uso seguro em produtos alimentícios como o chucrute e as preparações com azeitonas. Dentre centenas de estudos, pouquíssimos sugerem que *L. plantarum* esteja envolvido com infecção (DE VRIES *et al.*, 2006). Diversos produtos com cepas de *L. plantarum* estão disponíveis no mercado e comercializados como probióticos, como pode ser observado na Tabela 4.

**Tabela 4: Produtos disponíveis no mercado, comercializados como probióticos contendo *L. plantarum***

Administração	Produto	Website
Capsula	iFlora Multi-Probiotic Capsules	<a href="http://www.sedonalabs.com/shop/pc/viewPrd.asp?idCategory=2&amp;idProduct=1&amp;show=supfact">http://www.sedonalabs.com/shop/pc/viewPrd.asp?idCategory=2&amp;idProduct=1&amp;show=supfact</a>
	Probiotic Eleven	<a href="http://www.greatesherbsonearth.com/nsp/probiotic_eleven.htm">http://www.greatesherbsonearth.com/nsp/probiotic_eleven.htm</a>
	Plantadophilus	<a href="http://www.enzymeessentials.com/HTML/plantadophilus.html">http://www.enzymeessentials.com/HTML/plantadophilus.html</a>
	FloraFood	<a href="http://www.commercemarketplace.com/home/purprod/AIM_Products_-_WholeBody.html">http://www.commercemarketplace.com/home/purprod/AIM_Products_-_WholeBody.html</a>
	Living Vitamine C caps	<a href="http://www.fitfuel.com/living-vitamin-probiotics-enzymes-added-caps-p-16582.html">http://www.fitfuel.com/living-vitamin-probiotics-enzymes-added-caps-p-16582.html</a>
	Udo's Choice	<a href="http://www.florahealth.com/Flora/Home/international/Products/TG8_More.asp">http://www.florahealth.com/Flora/Home/international/Products/TG8_More.asp</a>
	Super Detox System	<a href="http://www.upforlife.com/detox.html">http://www.upforlife.com/detox.html</a>
Suco de fruta Bebida	Proviva	<a href="http://www.probi.com/standard.asp?id=83">http://www.probi.com/standard.asp?id=83</a>
	Lactovitale	<a href="http://www.filipinovegetarianrecipe.com/lactobacillus_plantarum/lactobacillus_plantarum.htm">http://www.filipinovegetarianrecipe.com/lactobacillus_plantarum/lactobacillus_plantarum.htm</a>
Pó/gel	ProBios	<a href="http://www.petfooddirect.com/store/product_detail.asp?pf%5Fid=2055101&amp;dept%5Fid=10&amp;brand%5Fid=1128">http://www.petfooddirect.com/store/product_detail.asp?pf%5Fid=2055101&amp;dept%5Fid=10&amp;brand%5Fid=1128</a>

Fonte: Adaptado de De Vries *et al.* (2006)

McDonald, Fleming e Hassan (1990) determinaram a resposta do pH interno celular de *L. plantarum* ao pH externo criado pelo próprio microrganismo ou por ácidos láctico ou acético e seus sais adicionados no meio de crescimento. O crescimento do *L. plantarum* parou quando o pH interno alcançou faixa de 4,6 - 4,8, sendo que a variação da composição do meio ou pH não alterou o limite do pH interno de crescimento alcançado pelo microrganismo. No entanto, foi verificado que a limitação do pH externo é altamente influenciada pelo meio de crescimento, tanto em relação ao pH inicial quanto em relação à presença e tipo de ácido orgânico. O microrganismo não manteve o seu pH interno constante, mas sim diminuiu com a diminuição do pH externo. Apesar do baixo pH externo (3,0) e altas concentrações de ácido láctico e acético (160 mM), o *L. plantarum* manteve um gradiente de pH. Este gradiente aumentou com a diminuição do pH externo e com a diminuição da concentração de lactato de sódio ou acetato de sódio (0-160 mM) em pH constante (5,0).



Tseng e Montville (1990) realizaram estudo em que mediram as atividades enzimáticas de *L. plantarum* crescendo sob condições combinadas de meio ácido (pH 5,5), alcalino (pH 7,7), aeróbias e anaeróbias; todos ensaios de 20 h a 37 °C; de modo que as mudanças nas atividades enzimáticas pudessem ser correlacionadas com troca no catabolismo da glicose em resposta às condições ambientais. Observaram que as maiores densidades celulares foram alcançadas nos cultivos aeróbios, ocorrendo maior formação de biomassa no pH 5,5 (215,3 mg L<sup>-1</sup>) do que no pH 7,7 (160,2 mg L<sup>-1</sup>). O lactato sempre foi o produto majoritário formado e as maiores concentrações ocorreram nas condições anaeróbias e alcalinas. O *L. plantarum* contém duas enzimas separadas lactato desidrogenase NAD-dependente (nLDH) que forma L-lactato e D-lactato. A maior atividade da nLDH das quatro condições estudadas foi alcançada em condição aeróbia no pH 7,7. A atividade enzimática de nLDH foi maior na cultura aeróbia em pH 5,5 do que na correspondente em condição anaeróbia. Quando comparados os cultivos realizados anaerobiamente, em pH 7,7 houve a maior atividade enzimática de nLDH.

Tseng, Tsau e Montville (1991) utilizaram estudo em cultura contínua para controlar os níveis de pH e O<sub>2</sub> de maneira que conseqüências bioenergéticas independentes dessas variáveis pudessem ser determinadas em *L. plantarum* 8014. Quando avaliado o efeito do oxigênio, houve aumento da concentração de ATP intracelular e força próton motriz (PMF) imediatamente após a cultura ser mudada da condição anaeróbia para aeróbia. Este aumento no ATP intracelular se deve possivelmente ao fato que um adicional ATP é formado com a formação de acetato. Estes autores

observaram que a mudança na concentração de ATP intracelular acontece paralelamente à mudança na PMF. Similarmente à PMF ocorre com as concentrações de lactato e acetato, que exportam prótons contribuindo para o gradiente de prótons. Também foi verificado que a PMF e a concentração de ATP intracelular foram mais altas nas culturas operando em estado estacionário anaeróbico. A variável estequiométrica de próton,  $n$ , para  $H^+$ /lactato varia de 0,8 a 1,2 e,  $H^+$ /acetato de 0,8 a 1,6 depois de 2 h da mudança nas condições de aerobiose, sendo que os valores de  $n$  para a excreção de acetato se mantêm elevados em estado estacionário aeróbio. Os autores também estudaram o efeito do pH nas culturas contínuas. Depois de atingido o estado estacionário na cultura anaeróbia a pH 5,5, o pH do meio foi modificado de 5,5 para 7,5. Houve aumento imediato da concentração de ATP intracelular e então diminuição deste rapidamente após 45 min da mudança do pH e, finalmente outra diminuição 3 h após. A PMF das células diminuiu 50 % quando o pH foi modificado devido à depleção do gradiente de próton transmembrana, mas a biomassa não mudou consideravelmente mesmo 9 h após a mudança de pH. O valor de  $n$  para o  $H^+$ /acetato foi sempre maior que  $H^+$ /lactato tanto em condições alcalinas quanto em aeróbias, demonstrando que o *L. plantarum* 8014 co-excreta mais prótons com produtos finais para a manutenção do pH intracelular e aumento da economia energética celular.

Em trabalho posterior, Tseng e Monteville (1992) aprofundaram o estudo da influência do oxigênio na regulação metabólica do catabolismo da glicose pelo *L. plantarum* 8014 em um quimeostato ( $D = 0,2 \text{ h}^{-1}$ , pH 5,5). Com a modificação de uma cultura operando em estado estacionário anaerobiamente para uma condição aeróbia pela transferência de oxigênio a uma taxa de

1,84 mmol L<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, determinaram as atividades enzimáticas, concentração de produtos finais e níveis de ATP durante os três estágios: estado estacionário em condição anaeróbia, estado transiente e estado estacionário em condição aeróbia. Durante os dois estados estacionários o produto final majoritário da fermentação foi o lactato (> 80 %), mas sob condições aeróbias a concentração de acetato mais que dobrou e de acetoína aumentou mais de 50 %. Durante a transição o oxigênio foi consumido e a concentração de ATP intracelular aumentou até que a concentração de peróxido de hidrogênio, que também aumentou, se tornou inibitória. Sob condição aeróbia em estado estacionário, a taxa específica de utilização de substrato aumentou, enquanto que o lactato extracelular, formação total de produtos finais e síntese de biomassa diminuíram. As atividades específicas de lactato desidrogenase, lactato desidrogenase NAD-dependente, acetato kinase, piruvato oxidase e NADH oxidase aumentaram sob condições aeróbias e estes aumentos, bem como as variações que ocorreram no estado transiente refletiram na distribuição dos produtos finais catabolizados durante a fermentação. Em experimentos subseqüentes usando cloranfenicol para inibir a síntese de proteínas *de novo*, a análise cinética dos extratos enzimáticos sugere que estas alterações foram devidas tanto a mudanças na síntese quanto aos níveis de atividade. Dessa forma, verificaram que o *L. plantarum* 8014 utiliza oxigênio como um aceptor final de elétrons resultando em mudanças nas atividades enzimáticas e síntese de diversas enzimas; que o piruvato foi convertido em acetato e acetoína em adição ao produto normal homofermentativo, o lactato, e, que esta conversão a acetato gera uma molécula extra de ATP, como verificado no estudo prévio (TSENG e MONTVILLE;1990).

Fu e Mathews (1999) estudaram o comportamento cinético do *Lactobacillus plantarum* na fermentação de lactose de soro de queijo sob condições aeróbicas e anaeróbicas (sem aeração), para uma faixa de pH e concentração inicial de substrato. O efeito da inibição pelo produto no crescimento celular e no consumo de substrato como resultado da variação do pH foi estudado utilizando o modelo de Monod permitindo que os parâmetros do modelo variassem como uma função do pH. Os experimentos de fermentação foram conduzidos em fermentadores de 2 L, a uma velocidade de agitação de 150 rpm com temperatura controlada a 37 °C. O pH foi mantido nos valores desejados utilizando um controlador de pH com adição automática de NaOH 12 N. As fermentação anaeróbicas foram conduzidas sem aeração e experimentos preliminares mostraram que o nível de oxigênio do meio fica em torno de 0,15 – 0,2 mg L<sup>-1</sup> no início da fermentação e este fica próximo a zero após 4 – 6 h de fermentação. Nos cultivos em aeróbiose a faixa da taxa de fluxo de ar usada foi de 0,5 – 1,0 vvm. O meio usado foi o mesmo em ambos os casos. No estudo do efeito do pH (faixa de 4 – 7) nos cultivos em batelada estes autores verificaram que a fermentação é um processo homoláctico, pois o ácido láctico é o único produto majoritário. No pH 4 houve uma grande inibição do crescimento celular enquanto que nos valores mais altos entre 5 e 7 houve um rápido crescimento bacteriano. O efeito do pH no crescimento celular em parte é devido às concentrações das formas dissociada e não-dissociada do ácido láctico no caldo. Alguns autores têm demonstrado que ambas formas dissociada e não-associada do ácido láctico têm efeito inibitório com a forma não-dissociada dos demais ácidos orgânicos tendo efeitos mais inibitórios que a forma dissociada do ácido. Em pH 5, 6,8 % do ácido láctico estão na forma

não-dissociada enquanto que no pH 4 a concentração da forma não-dissociada é de 42 %. No pH 7 houve reduzida taxa de crescimento celular, consumo de lactose e produção de ácido láctico. As maiores concentração de biomassa ( $11,0 \text{ g L}^{-1}$ ) e de ácido láctico ( $41,0 \text{ g L}^{-1}$ ) foram obtidas em cultivos onde a faixa de pH ficou entre 5 e 6, sendo necessárias de 36 a 40 h para o completo consumo de lactose. Pela observação dos dados experimentais Fu e Mathews (1999) verificaram que a produção de ácido láctico é fortemente associada ao crescimento. No estudo do efeito da concentração de substrato nos cultivos em batelada, os autores realizaram seis experimentos com concentração inicial de lactose entre 20 e  $60 \text{ g L}^{-1}$  sem controle de pH. Os resultados indicaram para a faixa de estudo somente uma leve inibição no crescimento celular pelo substrato na fase exponencial. A concentração mais baixa de lactose apresentou a mais curta fase lag, enquanto que a concentração mais alta apresentou o aumento da fase lag em cerca de 5 h indicando que a concentração inicial de substrato pode afetar o crescimento celular. Para comparar a influencia da condução de cultivo de forma aeróbia ou anaeróbia, os autores conduziram os experimentos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e pH 6. O rendimento final de células foi maior no cultivo aeróbio ( $12 \text{ g L}^{-1}$  após 48 h de fermentação) em comparação ao cultivo anaeróbio ( $10 \text{ g L}^{-1}$  após 40 h de fermentação). Durante o cultivo aeróbio, a geração de ATP beneficia o crescimento celular na presença de oxigênio, mas a inibição pelo oxigênio associada com superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) é possivelmente a responsável pela menor taxa de crescimento celular observada nesta condição. Outra importante observação foi o rendimento de ácido láctico no cultivo anaeróbio ser cerca de 2 vezes maior que no aeróbio. Para a estimação de parâmetros do modelo os autores utilizaram os dados de

fermentações anaeróbias com pH entre de 4 e 7. Na faixa de estudo o modelo conseguiu correlacionar adequadamente os dados experimentais e as expressões dos parâmetros como uma função do pH podendo ser úteis na modelagem e simulação de fermentações em processos em batelada e contínuos.

## 2.2 FERMENTAÇÕES COM LAB

Diferentes fatores afetam o crescimento das LAB em meios de fermentação. Além dos requerimentos nutricionais, a temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam o crescimento. Existe uma temperatura ótima em que a taxa de crescimento é máxima e esta depende das características dos microrganismos usados bem como das condições do meio. Quando a temperatura fica acima ou abaixo do requerido para um ótimo crescimento a atividade microbiana é substancialmente reduzida e os organismos podem eventualmente morrer. A temperatura ótima do grupo fica na faixa de 20 a 45 °C (PANESAR *et al.*, 2007).

A concentração de hidrogênio no meio durante a fermentação também reflete no crescimento microbiano e na taxa de produção do produto. O pH afeta no mínimo dois aspectos. O primeiro seria em relação à funcionalidade das enzimas e no transporte de nutrientes para dentro da célula o que pode limitar a síntese de metabólitos de interesse. Os valores de pH também influenciam no RNA e na síntese de proteínas. Dessa forma, o pH é um importante parâmetro a ser observado. A produção de ácido láctico durante as fermentações pode ser continuamente neutralizada. Geralmente, as fermentações são fortemente inibidas a baixos valores de pH (abaixo de 4,5),

mas o emprego de LAB ácido tolerantes promove uma vantagem competitiva frente outras bactérias (PANESAR *et al.*, 2007).

Hujanen e Linko (1996) estudaram o efeito da temperatura e de várias fontes de nitrogênio na produção de L(+) – ácido láctico por *Lactobacillus casei*. Neste trabalho, realizaram a seleção em 17 cepas bacterianas do gênero *Lactobacillus* em relação às suas capacidades de produção de ácido láctico. Esta seleção foi realizada em *shaker*, na temperatura de 37 °C, tendo como meio de cultivo o meio MRS modificado com 70 g L<sup>-1</sup> de glicose. Duas cepas foram selecionadas para estudos posteriores, *L. casei* NRRL B-441 e *L. casei* subsp. *ramnosus* NRRL B-445 que apresentaram 100 % de rendimento. O efeito da temperatura sobre a produção de ácido láctico foi investigado cultivando as duas cepas selecionadas previamente adaptadas em quatro diferentes temperaturas (30, 37, 41 e 45 °C). A melhor temperatura para *L. casei* foi 37 °C, com maior produtividade volumétrica, 4,1 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e maior concentração de ácido láctico (80 g L<sup>-1</sup>) produzidos em 24 h de cultivo. Uma importante observação foi o fato de quando o inóculo foi adaptado a 45 °C este não cresceu. No entanto, quando o inóculo foi cultivado a 37 °C, houve a produção de ácido láctico na temperatura de 45 °C. Com a outra cepa utilizada, a maior concentração de ácido láctico final (75 g L<sup>-1</sup> em 48 h) foi atingida na temperatura de 45 °C. No entanto, a maior produtividade volumétrica (3,5 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) foi obtida a temperatura de 37 °C e nesta temperatura 70 g L<sup>-1</sup> de ácido láctico foram produzidos em 24 h de cultivo. Dessa forma, a temperatura de 37 °C pareceu ser a melhor para a produção de ácido láctico por ambas as cepas estudadas. Para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio foi utilizado um meio cuja concentração inicial de glicose foi de 100 g L<sup>-1</sup> suplementado com

uma solução de vitaminas. Onze fontes de nitrogênio foram escolhidas para testes de fermentação. A quantidade de nitrogênio no meio foi mantida constante a 0,22 %, que se mostrou a concentração ótima para produção de ácido láctico por *L. casei* em estudo prévio com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Quando *L. casei* foi cultivado em um meio contendo nitrogênio inorgânico, ácido láctico não foi produzido. Dentre as fontes de nitrogênio investigadas, as três melhores na produção de ácido láctico foram o extrato de levedura (100 g L<sup>-1</sup> em 48 h), o broto de malte (88 g L<sup>-1</sup> em 66 h) e peptona (79 g L<sup>-1</sup> em 66 h). Como o broto de malte como única fonte de nitrogênio resultou em uma lenta taxa de produção de ácido láctico, estas três melhores fontes de nitrogênio foram escolhidas como variáveis independentes para um planejamento experimental. Por se tratarem de fontes caras, as concentrações de extrato de levedura ( $X_1$ ) e peptona ( $X_2$ ) foram mantidas na faixa de 0 – 5 g L<sup>-1</sup>, analisadas em 5 níveis (0, 0,7, 2,5, 4,3 e 5 g L<sup>-1</sup>). Já o broto de malte ( $X_3$ ) foi analisado em concentrações mais altas, também em 5 níveis (0; 15,8; 53,8; 91,8 e 107,6 g L<sup>-1</sup>). O rendimento de ácido láctico foi acima de 90 % com todas as combinações das variáveis independentes, exceto no caso em que não se adicionou broto de malte, pois o conteúdo de nitrogênio total foi de somente 0,06 %. Todas as variáveis foram significativas, sendo o extrato de levedura a mais significativa ( $P < 0,001$ ), com o broto de malte também apresentando grande significância. De acordo com o modelo, em 47 h de cultivo, quando a concentração de broto de malte aumenta de 0 até 80 g L<sup>-1</sup> e extrato de levedura não é adicionado, a produção de ácido láctico mais do que dobra. Estes estudos indicaram que é possível conseguir utilizar baixas concentrações de fontes nitrogenadas caras utilizando como fonte principal de



nitrogênio o broto de malte. Finalmente, foi desenvolvida uma técnica para a produção de extrato de broto de malte, pois o meio original apresentava elevada heterogeneidade e poderia causar problemas em operações *downstream*. O broto de malte com uma única extração apresentou a maior concentração final de ácido láctico ( $107 \text{ g L}^{-1}$ ) em 69 h de cultivo. Quando se utilizou extrato de broto de malte suplementado com 0,4 % de extrato de levedura obteve-se produção um pouco superior aos ensaios utilizando extrato de levedura puro.

Hujanen *et al.* (2001) realizaram estudos de otimização da produção de L(+)(S) – ácido láctico por *L. casei* NRRL B-441. Neste trabalho, primeiramente avaliou-se extrato de broto de malte como uma fonte alternativa ao extrato de levedura para compor o meio de cultivo na produção de ácido láctico, tendo como fonte de carbono a glicose ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ). Foram comparadas duas composições de meio, uma em que se utilizou extrato de broto de malte 5,38 % suplementado com 0,4 % extrato de levedura e outra formulação contendo somente extrato de levedura 2,2 % como fonte de nitrogênio e de fatores de crescimento. A concentração máxima de ácido láctico obtida para as duas composições foi bastante próxima, 95,3 e 98,8  $\text{g L}^{-1}$ , para extrato de levedura e extrato de broto de malte, respectivamente; e estas concentrações foram alcançadas depois de 24 h de cultivo em biorreator de batelada. Os autores também realizaram o estudo do efeito da concentração inicial de glicose (80, 100, 130 e 160  $\text{g L}^{-1}$ ) em fermentações em batelada, tendo como fonte principal de nitrogênio o extrato de broto de malte previamente estudado. Foi verificado que o aumento da concentração inicial de glicose resulta no aumento da concentração final de ácido láctico e do tempo de fermentação. Contudo,

verificaram que o rendimento final de ácido láctico foi inversamente proporcional à concentração inicial de glicose, obtendo o rendimento máximo (84 %) para a menor concentração de glicose. A maior produtividade volumétrica ( $4,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) foi atingida em 15 h com  $100 \text{ g L}^{-1}$  de glicose. Para todas as concentrações estudadas a produtividade volumétrica alcança o máximo e começa a decrescer gradualmente. Outro estudo realizado pelos autores foi a otimização do pH e da temperatura, mantendo a concentração de glicose em  $100 \text{ g L}^{-1}$  e de extrato de levedura em  $10 \text{ g L}^{-1}$  durante fermentações em bateladas de 25 h. Os resultados demonstraram que tanto o pH quanto temperatura afetam significativamente a produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* NRRL B-441, apresentando como valores ótimos de pH e temperatura 6,3 e  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. Finalmente, para avaliar a produção de ácido láctico a partir de um meio sem suplementação com fontes nitrogenadas, realizaram-se ensaios utilizando células previamente cultivadas e então recuperadas por decantação. Estas células foram então cultivadas em um sistema de batelada alimentada em meio contendo somente glicose,  $\text{MnSO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$ . Neste sistema, quando a concentração de glicose no meio ficava abaixo de  $5 \text{ g L}^{-1}$  era realizada alimentação de meio com glicose ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) por duas vezes. Nestes ensaios aproximadamente toda a glicose foi metabolizada em ácido láctico, com máxima produtividade volumétrica do processo de  $3,53 \text{ g L}^{-1}$  e tempo total de fermentação de 120 h.

## 2.3 PROBIÓTICOS

A principal aplicação de LAB é como culturas iniciadoras em produtos lácteos. Contudo, cada vez mais as descobertas de suas propriedades

probióticas têm ampliado a sua aplicação para uma série de produtos alimentícios e farmacêuticos. Aumentam as evidências de que o consumo de LAB pode afetar a composição da flora intestinal e promover uma série de benefícios para aqueles que às consomem. Estes microrganismos que têm capacidade de balancear a flora intestinal são denominados probióticos (CHAMPAGNE, GARDNER, ROY, 2005). A observação original do papel positivo desempenhado por algumas bactérias selecionadas é atribuída a Eli Metchnikoff no início do século XX (METCHNIKOFF, 1907). Contudo, o termo probiótico só foi criado nos anos 60 para nomear substâncias produzidas por microrganismos que promovessem o crescimento de outros microrganismos. No final da década de 80, para delimitar a natureza microbiana dos probióticos o termo foi redefinido como sendo “suplementos alimentares de microrganismos vivos com efeitos benéficos no hospedeiro animal pela melhora do balanço intestinal” (FAO/WHO, 2001). A definição do termo probióticos teve um contínuo aprimoramento e uma das mais utilizadas é a dada pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*), na qual probióticos são microrganismos que são administrados em quantidades adequadas conferindo benefícios à saúde do hospedeiro (DE VRIES *et al.*, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução n.º 2 de 7 de janeiro de 2002 estabelece o conceito de probióticos. Segundo esta Resolução “probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo”. Na embalagem dos produtos deve constar a quantidade dos microorganismos viáveis, que garanta a ação alegada dentro do prazo de

validade do produto (BRASIL, 2002). A Comissão de Assessoramento Técnico-Científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF) publica atualizações em relação ao tema probióticos, entre outros, com base em conhecimentos científicos atualizados, relatos e pesquisas. Assim, esta revisão considera a necessidade das alegações estarem de acordo com as políticas do Ministério da Saúde e serem de fácil compreensão pelos consumidores. Nesta revisão foi compilada uma lista de microrganismos considerados probióticos aceitos para emprego em alimentos bem como os limites mínimos de concentração nos produtos. Os microrganismos presentes nesta lista são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos desde que a empresa comprove sua eficácia (BRASIL, 2008).

É bastante claro nas definições apresentadas de probióticos que elas devem conter: a) o uso restrito da palavra probiótico a produtos que contenham microrganismos vivos; b) necessidade de ser apontada a dose de bactérias probióticas adequada para exercer o efeito desejado (FAO/WHO, 2001).

Cepas probióticas são selecionadas por sua aplicação potencial com base em propriedades fisiológicas e funcionais, algumas destas podendo ser determinadas *in vitro*. A classificação e a identificação de um probiótico pode

dar uma forte indicação do habitat típico e origem. A espécie, ou até mesmo o gênero, pode também indicar a segurança e a aplicabilidade técnica do microrganismo em produtos probióticos (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

A passagem gastrointestinal, que envolve a exposição ao pH ácido estomacal, sais biliares e enzimas, representa a maior barreira à sobrevivência dos probióticos (CHAMPAGNE, GARDNER, ROY; STANTON *et al.*; 2005). Para que uma cepa probiótica exerça o efeito benéfico no seu hospedeiro, esta deve ser capaz de sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal de quem a consome (MARAGKOUDAKIS *et al.*, 2006). Por este fato, a tolerância ao ácido e à bile estão entre os critérios para a seleção de cepas probióticas (STANTON *et al.*, 2005).

Kosin e Rakshit (2006) apresentam uma revisão na qual estabelecem critérios microbiológicos e de processo para produção de probióticos. Os critérios convencionais utilizados para a seleção de cepas probióticas são: biossegurança, na qual o microrganismo deve ser considerado *Generally Recognized As Safe* (microrganismo GRAS); a escolha da origem da cepa, em que se prefere primeiramente escolher aquelas da microflora original o próprio hospedeiro (pois o microrganismo deverá ser capaz de colonizar o intestino daquele que o consumir) ou cepas isoladas de alimentos de reconhecido e prolongado uso; resistência a condições *in vivo/vitro*, no qual devem resistir ao pH, bile e suco pancreático; aderência e colonização ao epitélio/tecido intestinal; apresentar atividade antimicrobiana e/ou antagonismo à cepas patogênicas, o que vai promover o balanço da flora intestinal; estimulação do sistema imune; e, viabilidade/sobrevivência e resistência durante o processamento. Baseado nestes critérios e propriedades específicas desejadas

é possível selecionar os melhores probióticos disponíveis para determinada aplicação industrial.

Membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais probióticos reconhecidos, mas não são os únicos. De acordo com as definições utilizadas para o termo probiótico, expressivo número de espécies é considerado probiótico, como pode ser observado na Tabela 5. No entanto, somente aqueles microrganismos classificados como LAB são considerados de importância em relação à alimentação (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

**Tabela 5: Microrganismos considerados probióticos**

<b>Espécies de <i>Lactobacillus</i></b>	<b>Espécies da <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Outras LAB</b>	<b>Não pertencentes às LAB</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <sup>1</sup>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> <sup>1,3</sup>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> <sup>1,3</sup>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <sup>3</sup>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i> <sup>3</sup>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. gallinarum</i> <sup>1</sup>	<i>B. lactis</i> <sup>2</sup>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> <sup>1</sup>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

<sup>1</sup>Aplicação principal para animais.

<sup>2</sup>Provavelmente sinônimo em relação a *B. animalis*.

<sup>3</sup>Aplicado principalmente como preparações farmacêuticas.

Fonte: HOLZAPFEL, *et al.*, 2001.

Stanton *et al.* (2005) elaboraram uma revisão com o propósito de descrever os principais desafios associados ao desenvolvimento científico e comercial de alimentos funcionais fermentados que utilizam probióticos. Entre outras observações relatadas, os autores comentam que os benefícios à saúde exercidos pelos probióticos não só acontecem no trato gastrointestinal, como também nos tratos respiratório e urogenital. A dose requerida de microrganismos nos produtos deve ser alta até o final do seu prazo de validade, fazendo com que as bactérias destinadas para este fim sejam

adequadas não só para a produção em larga escala como apresentem alta viabilidade sob as condições de estocagem dos produtos nas quais elas são adicionadas. As principais formas de conservar os probióticos para a aplicação em preparações em pó são a secagem por atomização (*spray dryer*) e liofilização, contudo ambas podem causar a perda de viabilidade das células. Para minimizar estas perdas, pesquisas que investigam o uso de osmo-, termo- e crio-protetores e técnicas de microencapsulação têm sido realizadas. Os probióticos produzem uma série de metabólitos e alguns desses têm sido associados com propriedades de promoção da saúde. Dentre eles estão vitaminas do complexo B e peptídeos bioativos liberados das proteínas dos alimentos. A alta produção destes compostos biogênicos durante as fermentações ou *in situ* no intestino através da introdução de probióticos pode oferecer ao hospedeiro proteção adicional contra doenças como câncer de intestino.

Maragkoudakis *et al.* (2006) investigaram o potencial probiótico de 29 cepas de *Lactobacillus* isolados de produtos lácteos através de testes *in vitro* para selecionar candidatos à probióticos que preencham os critérios estabelecidos e possam, dessa maneira, ser usados como novas cepas probióticas na indústria de alimentos. Somente seis cepas foram capazes de sobreviver a pH 1,0 por 1h. Estas cepas foram *L. paracasei* subsp. *paracasei* ACA-DC 119 e 3345, *L. paracasei* subsp. *tolerans* ACA-DC 4037, *L. plantarum* ACA-DC 146 e *Lactobacillus* sp. ACA-DC 108 e 109. Após 3 h de exposição a pH 1 somente as cepas de *Lactobacillus* sp. ACA-DC 108 e 109 mantiveram alguma viabilidade. Quando as cepas foram testadas em pH 2 e na presença de pepsina, também houve poucas cepas que sobreviveram a 3 h de

incubação. De forma distinta, todos os microrganismos testados foram resistentes a pH 3,0, pancreatina e sais biliares, mesmo após 4 h de incubação.

Apesar dos produtos lácteos serem os maiores veículos de administração de probióticos na dieta (LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001), diversos outros tipos de produtos alimentícios vem sendo desenvolvidos. Heenam *et al.* (2004) realizaram um estudo da sobrevivência de diversos microrganismos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* MJLA1, *L. rhamnosus* 100-C, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 01, *Bifidobacterium lactis* BBDB2, *B. lactis* BB-12 e *Saccharomyces boulardii* 74012) em uma sobremesa não fermentada congelada de soja durante 6 meses de estocagem. Além disso, investigaram a aceitabilidade sensorial do produto obtido. *L. acidophilus* MJLA1, *L. paracasei* ssp. *paracasei* Lp-01, *B. lactis* BDBB2 e *B. lactis* Bb-12 não apresentaram diferença significativa nas suas populações antes e depois da produção propriamente dita da sobremesa congelada, o que não aconteceu para *L. rhamnosus* 100-C e *S. boulardii* 74012. *Lactobacillus acidophilus* MJLA1, *L. rhamnosus* 100-C, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 01, *Bifidobacterium lactis* BBDB2, *B. lactis* BB-12 mantiveram as suas populações em  $10^7$  UFC  $g^{-1}$  ou mais durante os seis meses de estocagem a  $-20$  °C. *Saccharomyces boulardii* 74012 não manteve viabilidade suficiente, diminuindo sua contagem para valores inferiores a  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ . Para a detecção das diferenças sensoriais, produto contendo *L. acidophilus* MJLA1, *S. boulardii* 74012 e um controle sem probióticos foram estocados por 0, 4 e 7 meses e comparados. A sobremesa teve boa aceitabilidade pelos painelistas, com 94 % destes respondendo que teriam interesse em comprar o produto. O produto inoculado



com *L. acidophilus* MJLA1 não apresentou diferença em relação ao controle. O produto com *S. boulardii* 74012, apresentou diferença em relação aos produtos controle e com *L. acidophilus* MJLA1 além de desenvolver *flavours* indesejáveis durante a estocagem. Com todas as suas observações, os autores verificaram que o produto desenvolvido é um bom veículo para algumas cepas probióticas e apresenta aceitáveis características sensoriais.

Angelov *et al.* (2006) desenvolveram uma bebida simbiótica com aveia e cultura probiótica. Neste trabalho, foi utilizado *Lactobacillus plantarum* B28, para fermentar o substrato de aveia suplementado sacarose e edulcorantes para a produção da bebida. O estudo de diversos fatores para a obtenção da bebida funcional estabeleceu a concentração apropriada de cultura iniciadora (5 %), o conteúdo de farinha de aveia (5,5 %) e sacarose (1,5 %) para uma fermentação de 8 h. Eles observaram que a adição de aspartame, ciclamato de sódio, sacarina e Huxol (12 % ciclamato e 1,2 % de sacarina) não tiveram efeito tanto na dinâmica de fermentação quanto na viabilidade dos microrganismos durante a estocagem do produto. O tempo de vida-de-prateleira do produto foi de 21 dias sob condições de refrigeração.

Yoon, Woodams e Hang (2006) investigaram a possibilidade de utilização de repolho como uma matéria-prima para a produção de suco probiótico. As cepas probióticas investigadas foram *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 e *Lactobacillus delbrueckii* D7. Todas as três cepas investigadas cresceram bem na bebida de repolho, alcançando  $10 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> depois de 48 h de fermentação a 30 °C. Contudo, *L. casei* produziu menor valor de acidez titulável expresso como ácido láctico do que *L. delbrueckii* ou *L. plantarum*. Depois de quatro semanas de estocagem sob

refrigeração (4 °C) o número de células viáveis de *L. plantarum* e *L. delbrueckii* permaneceram  $4,1 \times 10^7$  e  $4,5 \times 10^5$  por mL, respectivamente. Já *L. casei* não sobreviveu às condições de alta acidez do suco de repolho fermentado e a perda completa de viabilidade foi atingida depois de 2 semanas de estocagem a 4 °C. Dessa forma, os autores demonstraram que *L. plantarum* e *L. delbrueckii* podem ser usadas como culturas probióticas para a produção de bebida de repolho a ser utilizada pelos consumidores.

Como pode ser observado, o *L. plantarum* apesar de ser um microrganismo internacionalmente reconhecido como probiótico (CONNELLY , 2008; DE VRIES *et al.*, 2006) ainda não faz parte da listagem de microrganismos permitidos pela ANVISA (BRASIL, 2008) para utilização como probiótico. Dessa forma, se faz necessário maiores investigações a cerca dos critérios que devem ser atendidos para que esta cepa seja considerada probiótica para corroborar com os estudos já realizados (CASTALDO *et al.*; ENOMOTO; LIM, AHN, IM; QIN *et al.*; 2009).

## 2.4 IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS

Os efeitos benéficos promovidos pelas bactérias probióticas têm levado ao aumento do uso destas em diversos tipos de produtos alimentícios. No entanto, a sua viabilidade nestes produtos muitas vezes é baixa e a habilidade de sobreviver e multiplicar no hospedeiro influencia fortemente nos benefícios que os probióticos podem promover. Os probióticos devem ser metabolicamente estáveis e ativos no produto, sobreviver à passagem do trato digestivo superior em grande quantidade, aderir e colonizar o intestino daquele que o consome. Em vista disto, as técnicas de imobilização de células têm sido

investigadas como uma forma passível de proteção dos probióticos nos produtos. Os itens subsequentes terão como foco a apresentação das técnicas de imobilização, os tipos de materiais utilizados como imobilizantes e pesquisas aplicadas na imobilização de células probióticas.

#### **2.4.1 Técnica de imobilização**

Microencapsulação de várias culturas bacterianas incluindo as probióticas tem sido uma prática comumente utilizada para aumentar a viabilidade durante a estocagem e as convertendo em pós para a sua fácil utilização. Existem diversas técnicas como *spray drying*, liofilização, secagem em leite fluidizado para encapsulação das culturas. No entanto, as bactérias encapsuladas por estas técnicas são completamente liberadas no produto. Neste caso, as culturas não são protegidas das condições adversas do meio alimentício e da passagem pelo trato gastrointestinal superior. Encapsulação em esferas de hidrocolóides aprisiona ou imobiliza as células dos microrganismos dentro da matriz, o que pode promover proteção nestes meios (KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003).

Existem dois tipos comuns de encapsulação divididos de acordo com o método usado para a formação das esferas: encapsulação por extrusão (*droplet method*) e encapsulação por emulsificação (sistema em duas fases); ambos métodos constituem-se na gelatinização externa por  $\text{Ca}^{+2}$ , processo no qual este difunde-se para o interior das gotas de alginato a partir da solução de  $\text{CaCl}_2$ ; (LIU *et al.*, 2002). A técnica de extrusão é a mais antiga e comum para a formação das esferas de hidrocolóides. Ela envolve a simples preparação da solução de hidrocolóide, adição dos microrganismos a esta solução, a extrusão

da suspensão formada através da agulha de uma seringa e o gotejamento na solução que vai tornar as esferas rígidas. O diagrama esquemático da técnica de extrusão pode ser observado na Figura 4 (KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003).

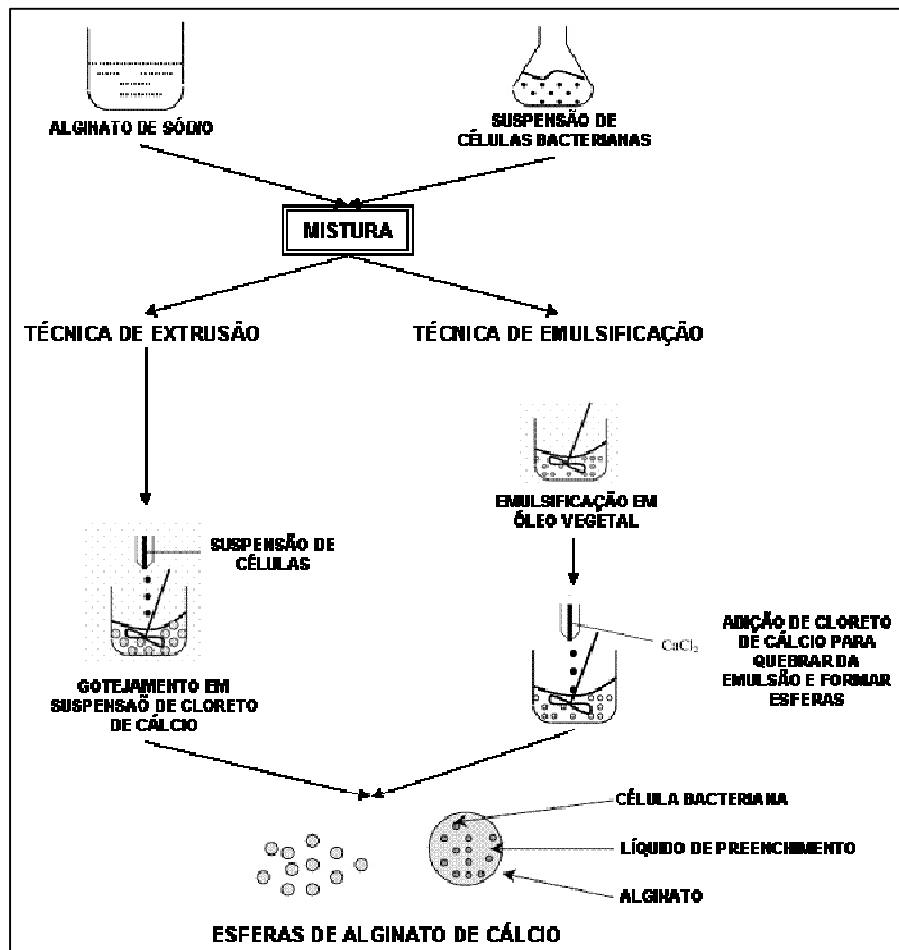


Figura 4: Esquema do fluxo da encapsulação de bactérias pelas técnicas de extrusão e emulsificação.

Fonte: Adaptado de Krasaekoopt, Bhandari, Deeth, 2003.

O método de extrusão possui uma série de inconvenientes como a limitação na obtenção de microesferas de diâmetros reduzidos, controle da forma das micropartículas produzidas e dificuldade no aumento de escala (SILVA *et al.*, 2005). Na técnica de emulsificação, um volume pequeno de

suspensão de célula e polímero (fase descontínua) é adicionado em um grande volume de óleo vegetal (fase contínua). A mistura é homogeneizada para formar uma emulsão água em óleo. Uma vez que a emulsão está formada, o polímero solúvel em água deve ser insolubilizado (*cross-linked*) para formar uma minúscula partícula de gel dentro da fase oleosa (Figura 4). Quanto menor o tamanho destas partículas na emulsão, menor serão as partículas finais formadas. A escolha do método de insolubilização depende do tipo de material suporte usado. O tamanho das esferas formadas é controlado pela velocidade de agitação e este pode variar de 25 µm a 2 mm. Para aplicação em alimentos, óleos vegetais são usados como fase contínua e emulsificantes podem ser adicionados para melhorar a emulsificação (KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003).

Kosin e Rakshit (2006) comentam que a técnica de microencapsulação é uma tecnologia existente que pode permitir que probióticos sejam formulados dentro de sistemas alimentares e talvez então possam preservar a sua viabilidade.

#### **2.4.2 Materiais utilizados em imobilizações**

Microencapsulação é uma tecnologia que tem aumentado a sua aplicação na indústria de alimentos probióticos, pois ela promove uma barreira física contra condições ambientais adversas. Comumente as aplicações de microencapsulação de probióticos são realizadas com cálcio-alginato, κ-carragena, gelatina, amido e gomas (STANTON *et al.*, 2005).

### 2.4.2.1 Alginato

Alginatos pertencem a uma família de polímeros heterogêneos com ampla faixa de composições químicas, tamanho molecular e, portanto, propriedades funcionais. Quimicamente, eles são polissacarídeos não ramificados compostos por resíduos de ácido- $\beta$ -D-manurônico (M) e ácido- $\alpha$ -L-gulurônico (G) ligados por ligações do tipo (1 $\rightarrow$ 4). Estes componentes podem ser organizados como díades de manuronato (MM), díades de guluronato (GG) e hetero-díades (MG/GM) e a quantidade relativa de cada díade varia com a fonte de alginato (HENG, *et al.*, 2003; SIMPSON, *et al.*, 2003; THU, *et al.*, 1996). A Figura 5 representa os resíduos de ácido- $\beta$ -D-manurônico e ácido- $\alpha$ -L-gulurônico.

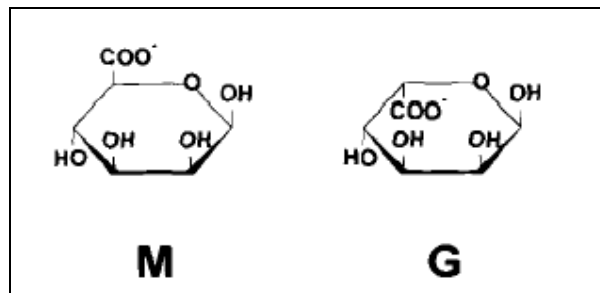
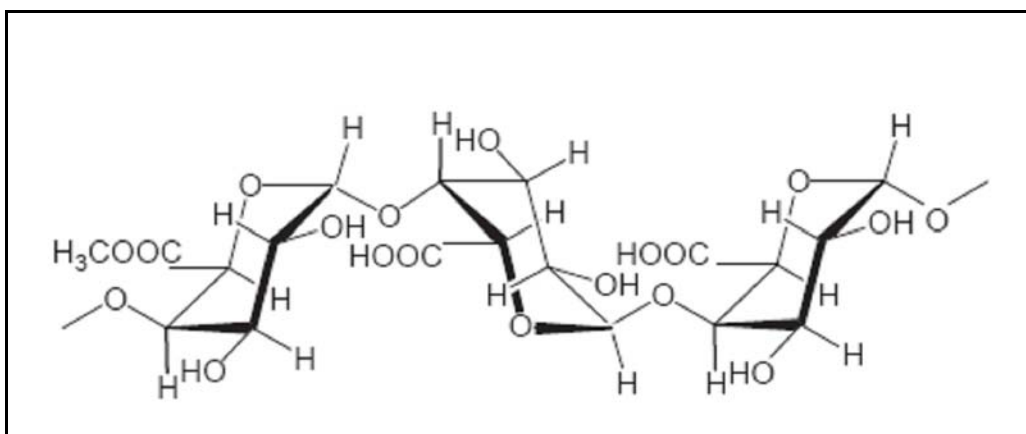


Figura 5: Resíduos de ácido- $\beta$ -D-manurônico (M) e ácido- $\alpha$ -L-gulurônico (G)  
Fonte: THU, *et al.*, 1996

Com um grupo funcional carboxílico em todas as unidades de M e G, o alginato é um polieletrólito altamente carregado negativamente a pH neutro ou básico. A ligação cruzada de cadeias de alginato com cátions divalentes, tais como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , leva a formação de um gel, rendendo uma rede tridimensional (HENG, *et al.*, 2003; SIMPSON, *et al.*, 2003). Os cátions divalentes ligam-se preferencialmente entre díades GG que entre díades MM ou MG.

## 2.4.2.2 Pectina

Pectinas são polissacarídeos complexos extraídos da parede celular das plantas, caracterizado por um esqueleto maior que 100 monômeros de ácido galacturônico ligados através de ligações  $\alpha$  - (1 $\rightarrow$ 4), que são parcialmente metilesterificados. A Figura 6 apresenta a fórmula estrutural do ácido poli-galacturônico, parcialmente metilado.



**Figura 6: Fórmula estrutural de ácido poli-galacturônico, parcialmente metilado.**

Fonte: THO, SANDE, KLEINEBUDE, 2005.

As propriedades das pectinas dependem do grau de esterificação. As pectinas nativas são de alto grau de metoxilação (HM) (> 50 % esterificadas) e as pectinas de baixo grau de metoxilação (LM) (< 50 % esterificadas) são geralmente obtidas pela de-esterificação ácida controlada das pectinas HM. A de-esterificação pelo uso de procedimentos com amônia produz um tipo diferenciado de pectina, as pectinas LM aminadas. A característica típica das pectinas LM é a sua habilidade de realizar ligações cruzadas com íons divalentes como os íons cálcio. Nesta ocorre a junção de zonas pela sua ordenação lado-a-lado das cadeias de pectina onde seqüências específicas de monômeros de ácido galacturônico formam cavidades onde os íons cálcio

encaixam-se (Figura 7). O resultado das ligações cruzadas é a gelatinização. Esquema semelhante ao que é apresentado na Figura 7 é o que ocorre com o alginato nas porções de ácido gulurônico da cadeia (BRACCINI, PÉREZ, 2001; THO, SANDE, KLEINEBUDDE, 2005).

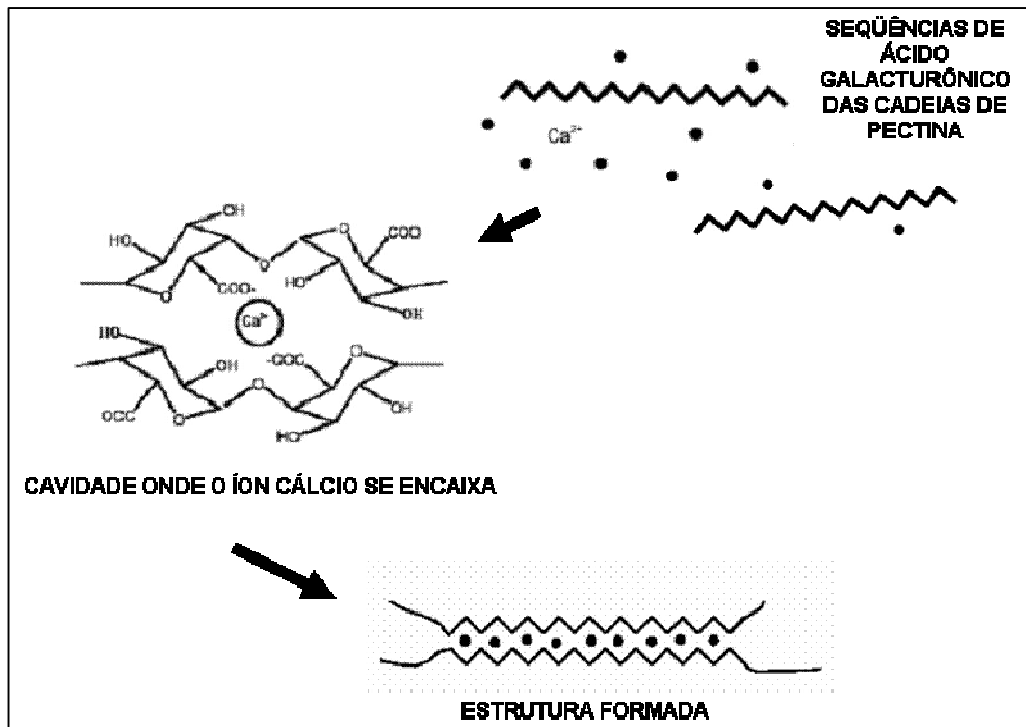


Figura 7: Esquema da formação da rede de pectina com íons  $\text{Ca}^{2+}$ .  
Fonte: Adaptado de THO, SANDE, KLEINEBUDDE, 2005.

### 2.4.3 Tratamentos especiais

Apesar da conveniência do uso do alginato como material para imobilização este apresenta algumas limitações devido a sua baixa estabilidade na presença de agentes quelantes que dividem afinidade pelo cálcio e desestabilizam o gel. Exemplos destes agentes são fosfatos, lactatos e citratos. No caso de outros materiais utilizados para a formação da matriz imobilizante pode ocorrer também a liberação das células durante os processos. Dessa forma, tratamentos especiais, como cobertura das esferas, são utilizados para



melhorar as propriedades das esferas. A realização de ligações cruzadas com polímeros catiônicos, cobertura com outros polímeros, mistura com amido e incorporação de aditivos podem melhorar a estabilidade das esferas (KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003).

#### 2.4.3.1 Polieletrólitos

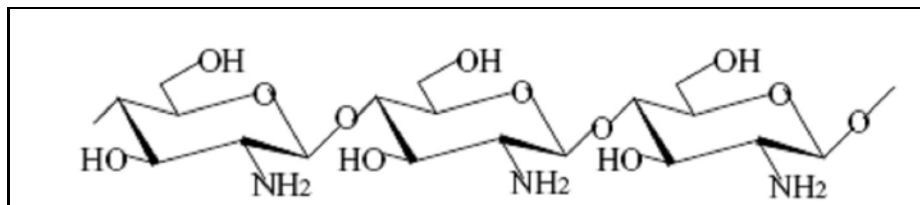
Polieletrólitos podem formar precipitados e/ou géis tanto através da complexação com uma carga oposta do políon como em alguns casos através das “ligações cruzadas iônicas” com um contra íon multivalente. Os materiais resultantes tipicamente apresentam melhor integridade mecânica. Dessa forma, géis de polieletrólitos e complexos de polieletrólitos têm desempenhado um importante papel na microencapsulação de células, com complexos de alginato/poli-L-lisina representando os materiais mais amplamente usados (BHATIA, KHATTAK, ROBERTS, 2005).

A função primeira de um políon é formar uma membrana complexa forte que deve estabilizar e fortalecer a rede de gel iônico, reduzindo e controlando a permeabilidade. A função da cobertura externa de cápsulas com políon é neutralizar os políons que não reagiram e dessa forma, gerar uma superfície carregada negativamente que evitará a anexação de células à membrana da cápsula (THU *et al.*, 1996).

##### 2.4.3.1.1 Quitosana

Quitosana é um polímero linear carregado positivamente formado pela deacetilação de quitina das cascas de crustáceos. Basicamente, o processo consiste da deproteinização da casca destes animais com solução diluída de

NaOH e decalcificação com solução diluída de HCl. Para resultar em quitosana, a quitina obtida é submetida a N-deacetilação pelo tratamento com solução de NaOH 40 – 45 %, seguido por processos de purificação. A estrutura da molécula é apresentada na Figura 8. Ela é insolúvel em água, mas a presença de grupos amino a torna solúvel em soluções ácidas em pH abaixo de 5, e como o alginato, forma um gel por gelatinização com íons. Quitosana, um polycation ( $pK_a \sim 6,5$ ) com grupos amina, pode formar ligações cruzadas com ânions ou poliânions, como polifosfatos,  $[Fe(CN)_6]^{-4}$  e  $[Fe(CN)_6]^{-3}$ . Isso ocorre pois quando dissolvida a quitosana possui altas cargas positivas dadas pelos grupamentos  $-NH_3^+$ , que por sua vez aderem-se a superfícies negativamente carregadas, se agrega a compostos polianiônicos e promove a quelação de íons de metais pesados. (KRAJEWSKA, 2004; KRASAEKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003).



**Figura 8: Estrutura química da quitosana.**  
Fonte: KRAJEWSKA, 2004

#### **2.4.4 Utilização das técnicas de imobilização para melhora da viabilidade de probióticos**

Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de investigar o papel protetor que a imobilização pode promover em relação às condições adversas as quais os probióticos podem ser expostos (CAPELA, HAY e SHAH,

2006; CHEN, CHEN e LIN, 2006; MANDAL, PUNIYA e SINGH, 2006; MICHIDA *et al.*, 2006; ÖZER *et al.*, 2009; SHEU e MARSHALL, 1993; SULTANA *et al.*, 2000). Neste item serão apresentadas algumas pesquisas realizadas nesta área.

Sheu e Marshall (1993) desenvolveram um procedimento para aprisionar cultura de bactérias usando um sistema de duas fases (água/óleo). O material utilizado para imobilização foi alginato de sódio. Para a avaliação da eficiência da técnica desenvolvida em relação à sobrevivência dos microrganismos, foram conduzidos experimentos em que foram adicionadas, separadamente, células livres e microesferas contendo células aprisionadas em sorvete. O número de lactobacilos viáveis foi determinado imediatamente antes do congelamento e nos dias 1, 4, 7 e 14 após o congelamento. O diâmetro das esferas foram na faixa de 5 – 100  $\mu\text{m}$  com média de 25 – 35  $\mu\text{m}$ . O número de células viáveis foi cerca de 40 – 45 % maior quando foi utilizada a matriz de imobilização quando comparada com as células sem imobilização.

Mandal, Puniya e Singh (2006) estudaram a tolerância de *L. casei* NCDC 298 encapsulado pela técnica de emulsificação em diferentes concentrações de alginato de sódio (2, 3 ou 4 %) exposto a baixo pH (1,5), alta concentração de sais biliares (1 ou 2 %) e aquecimento (55, 60 ou 65 °C) por 20 min. Verificaram que a encapsulação melhorou a resistência dos probióticos às condições testadas em relação a forma livre e que o aumento de viabilidade aumentou proporcionalmente com a concentração de alginato de sódio usada.

Capela, Hay e Shah (2006) avaliaram a sobrevivência de probióticos em iogurte utilizando crioprotetores, prebióticos e microencapsulação em alginato pela técnica de emulsificação. A microencapsulação foi a técnica que melhorou

a viabilidade dos probióticos no produto testado depois de 6 seis meses de estocagem a 4 e 21 °C.

Chen, Chen e Lin (2006) realizaram trabalho com o propósito de desenvolver um modelo otimizado para composição de material de encapsulação de probióticos. Verificaram que a viabilidade de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. era afetada pelos materiais utilizados na encapsulação (concentração de alginato, peptídeos, fructooligossacarídeos (FOS) e isomaltooligossacarídeos (IMO)). Dessa forma, investigaram o efeito das concentrações de alginato de sódio (1 – 3 %), peptídeos (0 – 1 %), FOS e IMO (0 – 3 %). A imobilização foi realizada pela técnica de extrusão. A resposta ao modelo foi o número de probióticos microencapsulados sobreviventes antes e após exposição a suco gástrico simulado. A combinação ótima de materiais empregados para encapsulação foi de 3 % de alginato de sódio, 1% de peptídeos, 3 % FOS e 0 % de IMO.

Özer *et al.* (2009) compararam a viabilidade de *B. bifidum* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 microencapsulados pelas técnicas de extrusão e emulsificação em queijo *white-brined*. Verificaram que as duas técnicas foram efetivas na manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o período de maturação em relação ao controle (células livres). Não observaram efeitos adversos nas avaliações sensoriais dos produtos adicionados de probióticos microencapsulados.

Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004) estudaram a influência da encapsulação de *L. acidophilus* 547, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1994 e *L. casei* 01 em esferas de alginato de cálcio sem recobrimento e as mesmas esferas submetidas a tratamento de recobrimento com três materiais:

quitosana, alginato de sódio e poli-L-lisina. Neste trabalho, verificaram que o tratamento com alginato de sódio recoberto com quitosana foi o que promoveu a melhor proteção para *L. acidophilus* e *L. casei*. Já *B. bifidum* não sobreviveu às condições ácidas do suco gástrico mesmo quando encapsulada em esferas com cobertura.

Mokarram *et al.* (2009) investigaram a influência do recobrimento de esferas de alginato de cálcio preparadas pela técnica de emulsificação com uma ou duas camadas de alginato de sódio na sobrevivência em solução digestiva simulada de *L. acidophilus* PTCC 1643 e *L. rhamnosus* PTCC1637. Na cobertura com alginato houve a redução do número de células das cepas estudadas tanto para suco gástrico simulado (pH 1,5, 2 h) quanto na incubação sequencial em suco gástrico (60 min) e em suco intestinal (pH 7,25, 2h). Nestes ensaios o maior número de sobreviventes ocorreu com cobertura de duas camadas de alginato de sódio, seguida pela cobertura de uma camada de alginato de sódio.

A microencapsulação de *L. plantarum* spp em matriz de alginato recoberto com proteínas do soro de queijo foi estudada por Gbassi *et al.* (2009). No tratamento com esferas de alginato sem recobrimento não foi detectados sobreviventes após 90 min de exposição ao meio gástrico simulado. Já o tratamento das esferas com recobrimento com proteínas do soro de queijo promoveu uma menor redução quando as cepas estudadas foram submetidas ao suco gástrico simulado. Na encubação seqüencial das mesmas esferas recobertas em suco intestinal simulado (180 min, 37 °C) houve novamente redução do número total de microrganismos testados, chegando a valores de  $3,04 \pm 0,05 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$  para *L. plantarum* 299v,  $3,44 \pm 0,04 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$

para *L. plantarum* 159 e  $2,91 \pm 0,02 \log_{10}$  UFC g<sup>-1</sup> para *L. plantarum* 800, demonstrando que as bactérias permaneciam viáveis após a tratamento.

Além dos estudos *in vitro*, alguns estudos demonstram o efeito protetor da imobilização dos probióticos *in vivo* incluindo a melhora no balanço da flora intestinal do hospedeiro, bem como proteção em relação à patógenos.

Kushal, Anand e Chander (2006) verificaram a influência da encapsulação com alginato de cálcio de co-cultura de *L. acidophilus* e *B. bifidum* em relação a sobrevivência, implantação e proteção em relação ao patógeno *Salmonella typhimurium*. Na implantação dos probióticos, após 8 dias de administração, as maiores contagens foram nos grupos de ratos em que a encapsulação foi utilizada. Além disso, para todos os tratamentos com probióticos (tanto na forma livre quanto imobilizada), não houve presença de coliformes fecais nas fezes. Os grupos que receberam as co-culturas de probióticos imobilizados apresentaram a maior proteção em relação a *S. typhimurium* e também exibiram um efeito protetor nos ratos, incluindo aumento da resposta imune.

Graff *et al.* (2008) estudaram a influência da microencapsulação em alginato de cálcio recoberto ou não com quitosana em relação a capacidade destas técnicas em proteger *Saccharomyces boulardii* durante o trânsito gastrointestinal simulado e quando estas esferas foram administrados em ratos saudáveis. Estes autores verificaram que menos de 1 % dos probióticos não microencapsulados sobreviveram a exposição durante 120 min a pH 1,1, enquanto houve menor diminuição da viabilidade das leveduras encapsuladas e pequena liberação de células (< 1 %) para o meio. Quando as esferas sofram submetidas ao tampão fosfato pH 6,8 houve completa liberação das células.

Em relação aos testes realizados *in vivo*, foi verificado aumento do número de células de *S. boulardii* após 96 h da administração dos probióticos (dose oral de  $2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). A recuperação nas fezes em relação a dose inicial foi de 2,5 % para as células livres, 13,3 % para as microesferas de alginato de cálcio sem recobrimento e 9,0 % para a administração de microesferas de alginato de cálcio com recobrimento com quitosana.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e a metodologia empregada para o estudo da otimização da produção de biomassa de *L. plantarum* bem como para o estudo do efeito da imobilização na viabilidade do probiótico em relação a condições de transito gastrointestinal simulado, estocagem sob refrigeração e em iogurte.

#### 3.1 SELEÇÃO DE LACTOBACILOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

##### 3.1.1 Microrganismos: recuperação e manutenção

Nesta etapa do trabalho escolheu-se 120 microrganismos identificados previamente como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* em uma coleção de bactérias lácticas extraídas de queijo Serrano (SOUZA, 2002). Estas estavam mantidas congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em caldo MRS ( $10\text{ g L}^{-1}$  de peptona,  $4\text{ g L}^{-1}$  de extrato de levedura,  $8\text{ g L}^{-1}$  de extrato de carne,  $20\text{ g L}^{-1}$  de glicose,  $1\text{ g L}^{-1}$  de Tween 80,  $2\text{ g L}^{-1}$  de fosfato de potássio dibásico de hidrogênio,  $5\text{ g L}^{-1}$  de acetato de sódio tri-hidratado,  $2\text{ g L}^{-1}$  de citrato tri-amônio,  $0,2\text{ g L}^{-1}$  de sulfato de magnésio hepta-hidratado,  $0,05\text{ g L}^{-1}$  de sulfato de manganês tetra-hidratado) com 20 % de glicerol. Os microrganismos foram inoculadas em 5 mL de caldo MRS e incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 h. Após o crescimento, seguiu-se a análise por coloração de Gram para verificar a presença de bacilos Gram positivos e aqueles que apresentaram esta morfologia foram estocados em



caldo MRS (Accumedia) com 20 % de glicerol a -18 °C para realização de ensaios posteriores.

### **3.1.2 Avaliação da produção de biomassa**

Alíquotas de 100 µL dos estoques dos isolados recuperados foram inoculadas em 5 mL de caldo MRS e incubadas a 37 °C por 24 h. Após as 24 h, o inóculo foi transferido para Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo MRS e estes foram incubados em *shaker* (modelo MA 830, marca Marconi) 180 rpm por 48 h a 37 °C. A avaliação da biomassa formada foi realizada através da medida da massa seca de células (MS) como descrito no item Métodos analíticos (3.5).

## **3.2 ENSAIOS PRELIMINARES**

### **3.2.1 Elaboração da curva de calibração DO X massa seca de células secas**

A biomassa nos experimentos realizados foi acompanhada por três métodos (item 3.5): contagem do número de células viáveis (UFC mL<sup>-1</sup>), densidade óptica (DO) de células a 600 nm e massa seca de células secas, MS (g L<sup>-1</sup>). Para obter uma relação entre DO e MS realizou-se um ensaio de crescimento em caldo MRS em que ambas as medidas foram acompanhadas. Esta curva de calibração foi elaborada somente para *L. plantarum* e foi utilizada para a padronização do inóculo em caldo MRS previamente ao procedimento de centrifugação, lavagens e ressuspensão em meio adequado e então utilizado nos experimentos em biorreator (itens 3.2.6; 3.3.2).

O procedimento experimental consistiu primeiramente em preparar um pré-inóculo. Inoculou-se 1,5 mL da cultura estoque de isolado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de MRS. Este foi incubado em *shaker* rotatório a 180 rpm a 37 °C por 18 h. Após este período, alíquotas de 1 mL do caldo fermentado foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de MRS. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C. Foram coletadas amostras a cada 1 h até atingir a DO igual a 1. A biomassa foi acompanhada através de medidas de MS e DO (item 3.5).

### 3.2.2 Crescimento de isolados em meios a base de soro de queijo

Foram realizados ensaios de crescimento dos isolados 57, 88 e 117 nos diferentes meios de crescimento apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6: Composição dos meios utilizados para comparação do crescimento dos isolados 57, 88 e 117.**

Componentes da formulação	MRS	SPYEP	SPS	SEYEP	SES
	Quantidade dos componentes em 1 L				
Peptona (g)	10	20	-	20	-
Extrato de levedura (g)	4	10	-	10	-
Extrato de carne (g)	8	-	-	-	-
Glicose (g)	20	-	-	-	-
Tween 80 (g)	1	-	-	-	-
Fosfato de potássio dibásico de hidrogênio (g)	2	-	-	-	-
Acetato de sódio.3H <sub>2</sub> O (g)	5	-	-	-	-
Citrato tri-amônio (g)	2	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Soro de queijo (g)	-	70	70	25	25
Enzima comercial* (μL)	-	400	400	160	160

\* Alcalase 2.4 L FG, Novozymes

O caldo MRS é o meio padrão de crescimento de lactobacilos. Os demais meios foram elaborados a base de soro de queijo (Eleva Alimentos) como fonte de carbono. Os meios SPYEP e SPS foram meios que apresentavam 70 g L<sup>-1</sup>, sendo que o primeiro continha em sua composição

extrato de levedura e peptona e o segundo não. Já os meios SEYEP e SES foram meios elaborados para conter em lactose o equivalente de glicose do meio MRS.

O procedimento experimental consistiu em inocular 50  $\mu\text{L}$  da cultura estoque de isolado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C por 24 h. A determinação de biomassa foi realizada através da contagem de número de células viáveis (item 3.5).

### **3.2.3 Hidrólise das proteínas do soro de queijo**

O soro de queijo foi escolhido como ingrediente base na formulação dos meios para o crescimento dos microrganismos. Como durante a esterilização (121 °C, 15 min) há a precipitação das proteínas presentes no meio foi realizado um estudo com o objetivo de hidrolisar as proteínas do soro de queijo e diminuir a formação de precipitado, diminuindo assim a quantidade de sólidos insolúveis em suspensão no meio.

Foi utilizado soro de queijo em pó diluído na concentração de 70 g L<sup>-1</sup> o que proporciona uma concentração de lactose de 55 g L<sup>-1</sup>. Os testes de hidrólise foram realizados variando a concentração da enzima utilizada (400, 500, 600 e 800  $\mu\text{L}$  (atividade 2,4, AU g<sup>-1</sup> (Unidades de Anson por grama), Alcalase 2.4 L FG, Novozymes) para 70 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo), a temperatura de hidrólise (40, 50 e 60 °C) e o tempo de hidrólise (1, 2 e 3 h) levando a realização de um total de 36 experimentos. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Foi avaliada a massa do *pellet* formado após a esterilização do meio obtido para cada ensaio de hidrólise. A massa foi avaliada da mesma forma que para a determinação de MS de células (item 3.5).

### **3.2.4 Estudo da cinética de crescimento em *shaker* dos isolados 57, 88 e 117**

Foram realizados estudos do crescimento dos isolados 57, 88 e 117 no meio SPYEP. O procedimento experimental consistiu em inocular 50 µL da cultura estoque de isolado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio. Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C por 16 h. Foram coletadas amostras a cada 2 h. A biomassa foi acompanhada através da MS. O sobrenadante resultante foi usado para a estimativa da concentração de lactose e de ácido láctico. Os métodos analíticos estão descritos no item 3.5. O pH durante o experimento foi acompanhado através de medidas potenciométricas.

### **3.2.5 Avaliação da adição de fonte de nitrogênio em *shaker***

Foram realizados estudos do crescimento do isolado 117 em três diferentes meios para avaliar a necessidade da adição de fontes de nitrogênio em meio à base de soro de queijo. O meio foi baseado no meio SPYEP. A Tabela 7 apresenta a composição dos três meios utilizados.

**Tabela 7: Composição dos meios para avaliação da fonte de nitrogênio.**

Componentes da formulação	SEM	PEPTONA	AMÔNIA
	Quantidade do componente em 1 L de meio		
Peptona (g)	-	10	-
Extrato de levedura (g)	10	10	10
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g)	0,2	0,2	0,2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O (g)	0,04	0,04	0,04
Soro de queijo (g)	70	70	70
Amônia (g)	-	-	10
Enzima (μL)	500	500	500

O procedimento experimental consistiu em inocular 1,5 mL da cultura estoque de isolado em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio SEM para todos os ensaios. Este foi incubado em *shaker* rotatório a 180 rpm a 37 °C por 18 h. Após este período, alíquotas de 1 mL do caldo fermentado foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio em estudo (SEM ou peptona ou amônia). Os frascos foram incubados em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C por 24 h. Foram coletadas amostras a cada 3 h. A biomassa foi acompanhada através da ME e o sobrenadante resultante foi usado para a estimativa da concentração de lactose e ácido láctico (item 3.5). O pH durante o tempo de experimento foi acompanhado através de medidas potenciométricas.

### 3.2.6 Ensaio preliminar em cultivo submerso em biorreator

Foi realizado ensaio em biorreator com cultivo submerso com pH controlado para verificar se este teria influência no consumo de lactose e na produção de biomassa com o isolado 117. Estes experimentos foram realizados usando um biorreator de 2000 mL Biostat B (B. Braum Biotech International, Alemanha). O pH foi controlado pela adição automática de NaOH 5,0 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M. O meio utilizado neste estudo foi o SPYEP. Para evitar a reação de Maillard, peptona e extrato de levedura bruto foram autoclavados

separadamente do soro de queijo e adicionados após a esterilização, sob condições assépticas, no biorreator. O inóculo foi preparado em 200 mL de MRS em um Erlenmeyer de 1 L, que foi incubado em *shaker* a 37°C até atingir a DO 1,0. Este foi centrifugado (Modelo Himac CR 21E, marca Hitachi) a 5000 *g* por 15 min a 4 °C e ressuspendido em 200 mL de caldo SPYEP. O inóculo padronizado foi transferido para o biorreator que continha 1800 mL de meio SPYEP. A temperatura foi controlada em 37 °C, o pH no valor de 6,1 e não foi realizada a aeração do meio. Foi acompanhado o crescimento por 28 h. Foram realizadas medidas de biomassa, concentração de lactose e de ácido láctico (item 3.5).

### 3.3 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *L. plantarum* EM CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR

Nesta parte do trabalho investigou-se a produção de biomassa de *L. plantarum* isolado de queijo Serrano, em biorreator submerso usando soro de queijo como constituinte principal do meio. Primeiramente, foram investigadas quais condições e nutrientes tinham influência na produção de biomassa em culturas submersas usando o delineamento de experimentos Plackett-Burman (P-B). Após, foi utilizada a ferramenta de planejamento fatorial com o objetivo de otimizar a produção de biomassa através da combinação dos efeitos de temperatura e taxa de aeração.

### **3.3.1 Microrganismo**

Culturas estoques de *L. plantarum* isolado de queijo Serrano foram mantidas congeladas a -18 °C em suspensões de caldo MRS contendo 20% de glicerol.

### **3.3.2 Preparação do inóculo**

Frascos Erlenmeyer (1000 mL) contendo 200 mL de caldo MRS foram inoculados com 1,5 mL de cultura estoque em glicerol. Estes foram incubados a 37 °C em *shaker* rotatório a 180 rpm até que sua densidade óptica (DO) atingisse o valor de 1,0 a 600 nm (aproximadamente 8 h). As células foram separadas por centrifugação a 5000 *g* por 10 min a 4 °C. O *pellet* de células foi enxaguado e ressuspendido diretamente no caldo de crescimento (200 mL), cuja composição variou de acordo com o delineamento experimental descrito nos itens 3.3.4.1 ou 3.3.4.2, apresentados na seqüência. Este procedimento foi realizado para padronizar a preparação do inóculo para todos os experimentos.

### **3.3.3 Condições de cultivo em biorreator submerso**

Na investigação de quais variáveis tinham efeito significativo na produção de biomassa, os cultivos foram realizados com um meio contendo (em g L<sup>-1</sup>): MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,04. Os demais ingredientes do meio foram: soro de queijo em pó, peptona, extrato de levedura bruto. Para evitar a precipitação de proteínas durante o processo de esterilização (121 °C, 15 min), as proteínas do soro de queijo foram hidrolisadas com protease comercial. Com este procedimento, a maioria das proteínas permaneceu solúvel no meio. Para evitar a reação de Maillard, peptona e extrato de

levedura bruto foram autoclavados separadamente do soro de queijo e adicionados após a esterilização, sob condições assépticas, no biorreator.

A quantidade de 200 mL de inóculo padronizado foi transferido para o biorreator que continha 1800 mL de meio cuja composição foi de acordo com o ensaio específico dado pelos planejamentos experimentais. Estes experimentos foram realizados usando um biorreator de 2000 mL Biostat B (B. Braum Biotech International, Alemanha). O pH foi controlado pela adição automática de NaOH 10,0 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,0 M. O oxigênio dissolvido foi medido usando um eletrodo polarográfico de O<sub>2</sub> (Mettler-Toledo, Alemanha). A taxa de oxigênio dissolvida (K<sub>1a</sub>) foi calculada pelo método dinâmico (SINCLAIR, CANTERO, 1990). Temperatura, taxa de aeração, pH e velocidade de agitação foram fixados conforme o delineamento P-B.

No planejamento composto central rotacional, temperatura e taxa de aeração foram as variáveis independentes; o pH e a agitação foram fixados conforme os resultados dos experimentos P-B e a composição do meio foi em g L<sup>-1</sup>: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,04; peptona, 15; extrato de levedura bruto (Prodesa), 5 e lactose (proveniente do soro de queijo, Eleva Alimentos), 140.

### **3.3.4 Planejamento experimental**

#### **3.3.4.1 Seleção das condições de cultivo**

Para determinar quais nutrientes e condições têm um efeito na produção de biomassa de *L. plantarum*, um delineamento de experimentos Plackett-Burman (P-B) foi utilizado (PLACKETT e BURMAN, 1946). Neste trabalho, sete variáveis independentes e quatro variáveis inertes foram estudadas em 15



experimentos com três repetições no ponto central. A matriz de delineamento está apresentada na Tabela 8. Cada linha representa um experimento e cada coluna representa uma variável independente ou inerte. As variáveis com nível de confiança maior que 90 % foram consideradas significativas na produção de biomassa.

**Tabela 8: Matriz de delineamento experimental Plackett-Burman**

Exp	Variáveis <sup>a</sup> / Níveis <sup>b</sup>										
	X <sub>1</sub> (°C)	X <sub>2</sub> (pH)	X <sub>3</sub> (g/L)	X <sub>4</sub> (g/L)	X <sub>5</sub> (g/L)	X <sub>6</sub> (rpm)	X <sub>7</sub> (vvm)	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
1	42 (+)	5,2 (-)	140(+)	5 (-)	5 (-)	200 (-)	2 (+)	+	+	-	+
2	42 (+)	6,4 (+)	80(-)	25 (+)	5 (-)	200 (-)	0 (-)	+	+	+	-
3	34 (-)	6,4 (+)	140(+)	5 (-)	15 (+)	200 (-)	0 (-)	-	+	+	+
4	42 (+)	5,2 (-)	140(+)	25 (+)	5 (-)	400 (+)	0 (-)	-	-	+	+
5	42 (+)	6,4 (+)	80(-)	25 (+)	15 (+)	200 (-)	2 (+)	-	-	-	+
6	42 (+)	6,4 (+)	140(+)	5 (-)	15 (+)	400 (+)	0 (-)	+	-	-	-
7	34 (-)	6,4 (+)	140(+)	25 (+)	5 (-)	400 (+)	2 (+)	-	+	-	-
8	34 (-)	5,2 (-)	140(+)	25 (+)	15 (+)	200 (-)	2 (+)	+	-	+	-
9	34 (-)	5,2 (-)	80(-)	25 (+)	15 (+)	400 (+)	0 (-)	+	+	-	+
10	42 (+)	5,2 (-)	80(-)	5 (-)	15 (+)	400 (+)	2 (+)	-	+	+	-
11	34 (-)	6,4 (+)	80(-)	5 (-)	5 (-)	400 (+)	2 (+)	+	-	+	+
12	34 (-)	5,2 (-)	80(-)	5 (-)	5 (-)	200 (-)	0 (-)	-	-	-	-
13	38 (0)	5,8 (0)	110(0)	15 (0)	10 (0)	300 (0)	1 (0)	0	0	0	0
14	38 (0)	5,8 (0)	110(0)	15 (0)	10 (0)	300 (0)	1 (0)	0	0	0	0
15	38 (0)	5,8 (0)	110(0)	15 (0)	10 (0)	300 (0)	1 (0)	0	0	0	0

<sup>a</sup> X<sub>1</sub> temperatura; X<sub>2</sub> pH; X<sub>3</sub> concentração de lactose; X<sub>4</sub> concentração de peptona; X<sub>5</sub> concentração de extrato de levedura bruto; X<sub>6</sub> agitação; X<sub>7</sub> taxa de aeração; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> são variáveis inertes (*dummy*).

<sup>b</sup> (+) nível superior da variável; (-) nível inferior da variável e (0) nível central da variável.

### 3.3.4.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A otimização das condições de cultivo, selecionadas pelo delineamento P-B, para maximizar a produção de biomassa foi determinada com um DCCR. As variáveis e os valores de seus níveis, codificados e decodificados, estão apresentadas na Tabela 9, onde a matriz do planejamento apresenta o delineamento de 11 experimentos para as duas variáveis estudadas, cada uma em cinco níveis. O delineamento foi realizado com três replicatas no ponto central e quatro pontos axiais. Em cada experimento, a produção de biomassa foi determinada.

A equação polinomial de segunda ordem para as variáveis está apresentada a seguir:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

Onde  $Y$  representa a resposta,  $\beta_0$  a constante,  $\beta_i$  o coeficiente do efeito linear,  $\beta_{ij}$  o coeficiente do efeito quadrático,  $\beta_{ij}$  o coeficiente da interação dos efeitos,  $x_i$  e  $x_j$  o nível codificado da variável  $X_i$  e  $X_j$ . A equação quadrática (1) foi usada para grafar as superfícies de resposta para as variáveis.

As variáveis testadas foram codificadas de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = \left( \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \right) \quad (2)$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado e  $X_i$  é o valor real da variável independente,  $X_0$  é o valor real do ponto central e  $\Delta X_i$  é o valor da diferença entre os pontos.

**Tabela 9: Matriz do DCCR com níveis codificados e decodificados das variáveis.**

Exp	Variáveis <sup>a</sup> / Níveis <sup>b</sup>	
	$X_1$ - Temperatura (°C)	$X_2$ - Taxa de aeração (vm)
1	-1 (31)	-1 (2,5)
2	-1 (31)	+1 (4,5)
3	+1 (37)	-1 (2,5)
4	+1 (37)	+1 (4,5)
5	-1,41 (30)	0 (3,5)
6	1,41 (38)	0 (3,5)
7	0 (34)	-1,41 (2)
8	0 (34)	1,41 (5)
9	0 (34)	0 (3,5)
10	0 (34)	0 (3,5)
11	0 (34)	0 (3,5)

### 3.3.4.3 Método do caminho de ascendência máxima

O método do caminho de ascendência máxima é um procedimento realizado no planejamento de experimentos com o intuito de buscar novas regiões de estudo das variáveis independentes estudadas. Esta busca é

realizada seqüencialmente ao longo de um caminho de ascendência na direção do máximo aumento da resposta (MONTGOMERY, 1997). Neste trabalho, este método foi usado para verificar se existia uma melhor região de estudo das variáveis temperatura e taxa de aeração. Para delinear estes experimentos, foi calculada a razão entre o valor do coeficiente linear da temperatura e o coeficiente linear da taxa de aeração, ambos obtidos no DCCR, obtendo-se assim uma série de 5 experimentos, iniciando-se do ponto central de DCCR. A Tabela 10 representa a planejamento experimental do caminho de ascendência máxima com 5 ensaios com seus respectivos valores de temperatura e taxa de aeração.

**Tabela 10: Delineamento dado pelo caminho de ascendência máxima**

Experimento	Temperatura (°C)	Taxa de aeração (vvm)
1	34	3,5
2	31	4,5
3	28	5,5
4	25	6,5
5	22	7,5
Ponto central DCCR	34	3,5

### 3.4 VIABILIDADE DE *L. plantarum* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE

#### 3.4.1 Microrganismo

Culturas estoques de *L. plantarum* isolado de queijo Serrano (SOUZA, 2002) foram mantidas congeladas a -18 °C em suspensões de caldo MRS contendo 20% de glicerol.

### 3.4.2 Imobilização de *L. plantarum*

A imobilização de *L. plantarum* através da técnica de microencapsulação por emulsão foi realizada com alginato de cálcio e/ou pectina. A técnica utilizada é baseada naquela apresentada por Sheu e Marshall (1993). Também foi realizado o recobrimento das esferas de material imobilizado com alginato de sódio e quitosana adaptando-se o método descrito por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004).

#### 3.4.2.1 Preparo da cultura concentrada de células

Foi inoculado 1,5 mL de cultura estoque em glicerol de *L. plantarum* em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de caldo MRS. Este foi incubado em *shaker* a 37 °C, 180 rpm até a DO atingir o valor 1. Foram utilizados o equivalente a 1000 mL de caldo MRS com a DO 1 para cada ensaio de imobilização. O caldo fermentado foi centrifugado (5000 *g*, 15 min, 4 °C) enxaguado com água destilada estéril e ressuspendido em 10 mL de água destilada estéril. Esta solução foi misturada com o polímero imobilizante e conectada ao sistema de imobilização.

A suspensão de células livres de *L. plantarum* foi preparada utilizando uma cultura de 1000 mL que foi cultivada em meio MRS em *shaker* rotatório a 180 rpm a 37 °C até atingir DO igual 1. Esta foi centrifugada (5000 *g*, 10 min, 4 °C), o *pellet* foi lavado duas vezes com água destilada estéril e finalmente ressuspendido em 100 mL de água destilada estéril.

### 3.4.2.2 Preparação das esferas

A Figura 9 ilustra o diagrama esquemático do sistema de microencapsulação utilizado nos experimentos.

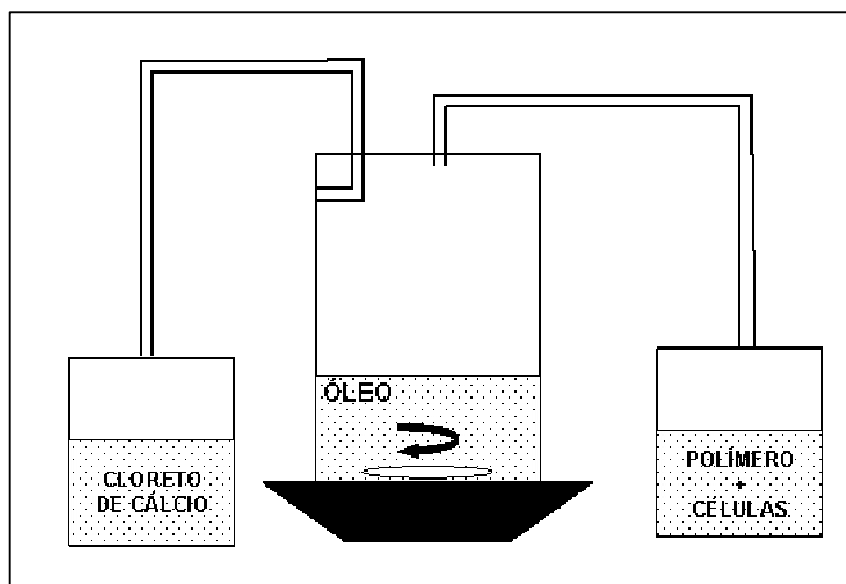


Figura 9: Diagrama esquemático do sistema de microencapsulação pela técnica de emulsão.

As células de *L. plantarum* foram confinadas pela mistura de uma parte de cultura concentrada de células (apresentada no item 3.4.2.1) com quatro partes do polímero imobilizante. A Tabela 11 apresenta os tratamentos com diferentes polímeros empregados para a imobilização de *L. plantarum*. Uma parte da mistura do polímero utilizado e células (50 mL) foi então adicionada a 5 partes de óleo (250 mL em frasco de 1 L) contendo Tween 80 (0,2 %), que foi agitado com barra magnética a 200 rpm. A nova mistura foi agitada por 10 min para a formação de uma emulsão uniforme sem a evidência de uma fase aquosa. Depois de transcorrido 10 min, 500 mL de cloreto de cálcio (0,05 M para ALG ou 0,10 M para PEC ou ALPE) foi adicionado rapidamente mas

gentilmente ( $20 \text{ mL s}^{-1}$ ) escorrendo pela parede do frasco até que a emulsão água/óleo fosse quebrada. As esferas de alginato de cálcio foram formadas dentro de 10 min. As esferas foram coletadas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e enxaguadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de água destilada estéril para os ensaios posteriores. Todo o procedimento foi realizado sob condições de esterilidade.

**Tabela 11: Tratamentos empregados na imobilização de *L. plantarum*.**

Tratamento	Sigla
Células sem imobilização	SIMO
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v)	ALG
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4 % (p/v)	PEC
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v)	ALPE
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)	ALGA
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)	PECA
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v) recobertas com solução de alginato 0,17 % (p/v)	ALPEA
Esferas elaboradas com alginato de sódio 3 % (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)	ALGQ
Esferas elaboradas com pectina cítrica 4% (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)	PECQ
Esferas elaboradas da mistura de alginato de sódio 2 % (p/v) e pectina cítrica 2 % (p/v) recobertas com solução de quitosana 0,4 % (p/v)	ALPEQ

### 3.4.2.3 Recobrimento com alginato

O procedimento de recobrimento das esferas de imobilizado com alginato de sódio seguiu o descrito por Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004). As esferas com *L. plantarum* imobilizado obtidas como descrito no item 3.4.2.2. foram misturadas com 100 mL de solução de alginato de sódio 0,17 % e colocadas sob agitação a 100 rpm, 37 °C por 20 min em *shaker* orbital. Após transcorrido este período as esferas com recobrimento de alginato foram recolhidas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e lavadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuspendido em 50 mL de água destilada estéril para

os ensaios posteriores. A Tabela 11 apresenta os tratamentos empregando recobrimento de alginato.

#### 3.4.2.4 Recobrimento com quitosana

O procedimento de recobrimento com quitosana foi adaptado de Krasaekoopt, Bhandari, Deeth (2004). 0,4 g de quitosana foi dissolvida em 90 mL de água destilada acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial até alcançar a concentração final de 0,4% (p/v). O pH foi então ajustado com NaOH 1M até atingir  $5,8 \pm 0,2$ . A mistura foi filtrada através de papel filtro Whatman nº 4 e o volume foi ajustado a 100 mL. Após foi autoclavado a 121 °C por 15 min. As esferas com *L. plantarum* imobilizado obtidas como descrito no item 3.4.2.2. foram misturadas com 100 mL da solução de quitosana e colocadas sob agitação a 100 rpm, 37 °C por 40 min em *shaker* orbital. Após transcorrido este período elas foram recolhidas por centrifugação (350 g, 10 min, 4 °C) e enxaguadas duas vezes com água estéril. O *pellet* foi ressuspenso em 50 mL de água destilada estéril para os ensaios posteriores.

### 3.4.3 Testes de resistência aos meios gastrointestinais

#### 3.4.3.1 Meios para testes de tolerância ao trânsito gastrointestinal

Os sucos gástrico e intestinal simulados foram preparados diariamente. Os meios simulados foram elaborados baseando-se nos trabalhos de Charteris *et al.* (1998) e Michida *et al.* (2006). O suco gástrico simulado (SGS) foi preparado pela suspensão de pepsina (1:10000) em solução salina estéril (0,5 %, p/v) até uma concentração final de 3 g L<sup>-1</sup> e o pH foi corrigido até 2,0 com HCl concentrado ou NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> usando um medidor de pH. O suco

intestinal simulado (SIS) foi preparado pela suspensão de pancreatina USP (P-1500, Sigma) em solução salina estéril até uma concentração final de  $1\text{g L}^{-1}$ , com 4,5 % de sais biliares (Oxoid) e o pH foi ajustado a 8,0 com NaOH  $0,1\text{ mol L}^{-1}$  usando um medidor de pH. Ambas as soluções foram filtradas para sua esterilização em membrana filtrante de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ .

### 3.4.3.2 Teste de tolerância ao trânsito gastrointestinal

A tolerância das células livres e imobilizadas de *L. plantarum* ao meios gástrico e intestinal simulados foi determinada segundo o método adaptado de Charteris *et al.*(1998). Os testes foram realizados em tubo de Falcon de 15 mL, previamente esterilizados. Foram realizados três tipos de testes. No primeiro e no segundo, 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram misturadas a 1,8 mL de SGS ou SIS, misturados levemente e colocados sob incubação por 120 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . No terceiro, primeiramente 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram misturadas levemente a 1,8 mL SGS e colocados sob incubação por 120 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ao final do período, 1,8 mL de SIS foi adicionado a amostra, misturado e procedeu-se mais 120 min de incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Como controle para os dois primeiros testes (CONT12), foi incubado 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas em 1,8 mL de solução salina (0,5 %, p/v) estéril por 120 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e, como controle para o terceiro teste (CONT3) foi incubado 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas em 1,8 mL de solução salina (0,5 %, p/v) estéril por 120 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e adicionado no tempo de 120 min mais 1,8 mL de solução salina (0,5 %, p/v) estéril, misturado e colocado para incubar por mais 120 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alíquotas de 1 mL foram tomadas nos tempos 0, 30, 60, 120 min (para todos os



testes), 180 e 240 min (para o terceiro teste e seu controle) para a determinação do número total de células viáveis.

#### 3.4.3.3 Dissolução das esferas

As esferas de imobilizado de ALG, PEC, ALPE, ALGA, PECA e ALPEA foram dissolvidas utilizando 1 mL do material incubado que foi dissolvido em 9 mL de tampão fosfato, pH 7,5, por 10 min em *shaker* a 37 °C, 180 rpm. Já as esferas de imobilizados que foram recobertas com solução de quitosana foram dissolvidas utilizando 1 mL do material incubado adicionado em 9 mL de tampão citrato de sódio, pH 6,0, na presença de 10 esferas de vidro, por 10 min em *shaker* a 37 °C, 180 rpm. A nova solução formada foi então utilizada para determinação do número de células viáveis (item 3.5).

#### 3.4.4 Teste de resistência à condição de refrigeração

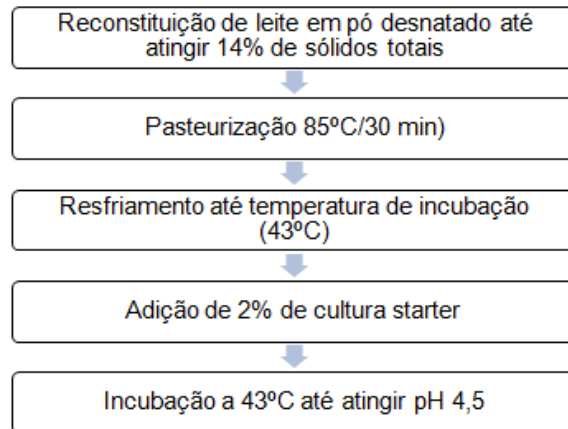
No teste de resistência à condição de refrigeração 0,4 mL da suspensão de células livres ou imobilizadas foram adicionadas em 1,8 mL de solução salina (0,5 %, p/v) estéril e incubadas em geladeira a 4 °C. Alíquotas de 1 mL foram tomadas durante 38 dias para a determinação do número total de células viáveis (item 3.5). A dissolução das esferas de imobilizado foi realizada conforme descrito no item 3.4.3.3.

#### 3.4.5 Produção de iogurte suplementado com *L. plantarum* imobilizado em alginato recoberto com quitosana

O iogurte foi produzido de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 10. Foi utilizada como cultura starter para a produção do iogurte Yo-

Flex® YF-L812 (Christian Hansen, Brasil) composto de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Após o iogurte atingir o pH 4,5, foram colocados 1,8 mL de iogurte em tubos falcon estéreis de 15 mL e adicionados a estes 0,4 mL de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ e estocadas em geladeira a 4 °C por 38 dias. Alíquotas de 1 mL foram tomadas durante 38 dias para a determinação do número total de células viáveis de *L. plantarum*. Para esta determinação foi utilizado o meio seletivo diferencial para *L. plantarum* (LPSM) descrito por Bujalance *et al.* (2006). O meio consistia em g L<sup>-1</sup>: peptona bacteriológica, 10; extrato de carne, 10; extrato de levedura, 10; D-sorbitol, 20; ciprofloxacina, 0,004; acetato de sódio, 5; citrato de amônia, 2; fosfato de potássio, 2; sulfato de magnésio, 0,1; sulfato de manganês, 0,05; púrpura de bromocresol, 0,02; ágar, 20. O meio sem ciproflaxacina foi autoclavado por 15 min a 121 °C e após resfriado a 50 °C. A ciprofloxacina foi esterilizada por filtração antes de ser adicionada ao meio resfriado com membrana filtrante de 0,22 µm. O pH do meio foi ajustado a 6,0 ± 0,1. O meio quando solidificado apresenta coloração púrpura e o *L. plantarum* quando cresce neste meio desenvolve coloração amarela ao redor das colônias pela formação de ácido. A dissolução das esferas de imobilizado foi realizada conforme descrito no item 2.4.3.3.



**Figura 10: Fluxograma de produção de iogurte.**

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para determinação da MS (massa seca de células secas, g L<sup>-1</sup>), amostras de 10 mL de caldo fermentativo foi centrifugado (Modelo 4R 15, marca Sigma) a 3500 g por 20 min a 4°C. As amostras foram centrifugadas, lavadas duas vezes com água destilada e secas em tubos plásticos previamente pesados a 80 °C até atingir peso constante em estufa à vácuo. O sobrenadante resultante foi usado para a estimacão da concentraçã de lactose e de ácido láctico. A concentraçã de lactose foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrossalicílico) usando lactose como padrão (CHAPLIN, 1986). A concentraçã de ácido láctico foi determinada por HPLC (Shimadzu LC-10A) equipado com uma coluna de fase reversa Supelcosil C18, 5 µ, 250 mm x 4,6 mm (Supelco, USA) e detector de ultravioleta a 210 nm (detector UV-VIS SPD-10<sup>a</sup> Shimadzu, Japão). Uma soluçã de 0,01 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi usada como eluente no fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

A medida de DO de células foi realizada espectofotometricamente (Modelo Ultraspec 3100 pro, marca Amersham Biosciences) a 600 nm. A

determinação de UFC mL<sup>-1</sup>, número total de células viáveis de *L. plantarum*, foi determinado pelo método de *pour plate* usando ágar MRS (caldo MRS com 2% de ágar) utilizando 1 mL do caldo fermentado para a realização das diluições seriadas. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h.

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nas análises estatísticas dos experimentos foi empregado o *software* STATISTIC versão 7.0 (StatSoft).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 SELEÇÃO DE LACTOBACILOS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

#### **4.1.1 Avaliação da produção de biomassa**

Dos 120 isolados descritos como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* testados, somente 30 foram selecionados para os testes de avaliação da produção de biomassa, pois os demais apresentaram alguma característica inadequada: muitos não apresentaram crescimento, outros apresentaram algum tipo de contaminação. A Tabela 12 apresenta os valores de biomassa em ME obtidos nos testes de crescimento. Observa-se que houve ampla diversidade nos valores de biomassa obtidos. Foram realizados testes de médias para verificar estatisticamente a diferença entre os valores de biomassa obtidos em cada isolado, sendo que para as médias consideradas estatisticamente iguais, com nível de confiança de 95 %, foram usados índices iguais.

A elevada conversão de biomassa é uma importante variável para a seleção de uma cepa de probiótico a ser utilizada em alimentos, uma vez que altos níveis de células normalmente são recomendados para que uma quantidade viável de células consiga chegar ao trato intestinal e ter atividade celular para desempenhar seu papel benéfico (FAO/WHO, 2001; MARAGKOUidakis *et al.*, 2006; STANTON *et al.*, 2005).

**Tabela 12: Rendimento de biomassa em massa seca de células para experimentos de seleção de isolados de queijo Serrano.**

Isolado	Massa seca de células (g/L)
9	1,1100 ± 0,1200 <sup>bcd</sup> e
13	1,4200 ± 0,1100 <sup>d</sup> e
18*	1,6350 ± 0,0850 <sup>e</sup>
35	0,7800 ± 0,0000 <sup>bc</sup>
38*	1,5100 ± 0,0900 <sup>d</sup> e
39*	1,5500 ± 0,1000 <sup>e</sup>
57*	1,6600 ± 0,1000 <sup>ef</sup>
58	1,0450 ± 0,3650 <sup>bcd</sup> e
68	0,5350 ± 0,0750 <sup>ab</sup>
70	0,7550 ± 0,0250 <sup>bc</sup>
73	1,4550 ± 0,0850 <sup>d</sup> e
74	1,4700 ± 0,0600 <sup>d</sup> e
75	1,2550 ± 0,1350 <sup>cd</sup> e
77*	1,5200 ± 0,0200 <sup>d</sup> e
78	1,4650 ± 0,0350 <sup>d</sup> e
79	1,3200 ± 0,1600 <sup>cd</sup> e
80	1,0750 ± 0,1150 <sup>bcd</sup> e
81	1,2350 ± 0,0150 <sup>cd</sup> e
83	0,7950 ± 0,0350 <sup>bc</sup>
84*	1,6600 ± 0,0300 <sup>ef</sup>
88*	2,2750 ± 0,0650 <sup>f</sup>
106	1,4350 ± 0,1650 <sup>d</sup> e
108	1,3500 ± 0,1500 <sup>cd</sup> e
109*	1,5600 ± 0,0700 <sup>e</sup>
111	0,9100 ± 0,0000 <sup>bcd</sup>
112	0,0150 ± 0,01500 <sup>a</sup>
114*	1,5550 ± 0,0450 <sup>e</sup>
115*	1,6350 ± 0,0250 <sup>e</sup>
116*	1,5400 ± 0,0000 <sup>e</sup>
117*	1,5100 ± 0,0200 <sup>d</sup> e

\* amostras nas quais foram realizados testes bioquímicos para identificação da espécie. Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Dos 30 microrganismos selecionados, 12 que apresentaram maior produção de biomassa, foram encaminhados para realização da identificação da espécie por testes bioquímicos pelo MAA/ICBS/UFRGS (Departamento de Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul). A Tabela 13 apresenta o resultado da identificação das bactérias. Para o prosseguimento do trabalho foram selecionados os isolados 117, identificado como *L. plantarum*, e 57, identificado como *L. paracasei* subsp. *tolerans*, por serem espécies descritas

como probióticas pela literatura (DE VRIES *et al.*, 2006; HOLZAPFEL *et al.*, 2001) e o isolado 88, identificado como *Carnobacterium maltaromaticum* (MORA *et al.*, 2003) (antiga classificação do *Lactobacillus maltaromicus* (MILLER, MORGAN E LIBBEY, 1974)), pois este apresentou a maior produção de biomassa nos testes realizados. A escolha entre os isolados 114 e 117 foi aleatória, já que estes não apresentaram diferença significativa entre os valores de biomassa formados.

**Tabela 13: Resultado da identificação das bactérias.**

<b>Código do Isolado</b>	<b>Resultado da identificação</b>
77	<i>Lactobacillus fructosus</i>
84, 88, 116 e 115	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
114 e 117	<i>Lactobacillus plantarum</i>
109, 39 e 38	<i>Lactobacillus divergens</i>
18	<i>Lactobacillus salivarius</i>
57	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>

## 4.2 ENSAIOS PRELIMINARES

### 4.2.1 Elaboração da curva de calibração DO X massa seca de células secas

Com o objetivo de verificar a existência de relação entre dois tipos de medidas de biomassa foram realizados experimentos de crescimento de *L. plantarum*. Nestes foram analisadas a DO e o MS das amostras em diferentes tempos de crescimento. A partir dos dados obtidos realizou-se uma regressão linear para correlacionar massa seca de células (MS) com DO. A equação originada pelos dados é dada por  $MS = 0,3934 \cdot DO - 0,0238$ , com  $R^2$  igual a 0,9974. A medida de DO é rápida e facilmente realizável. Já a medida de densidade específica de células demanda longo tempo para a obtenção do

resultado, já que os frascos em que as amostras vão ser pesadas devem ser previamente pesados e após colhida a amostra esta deve ser seca até massa constante, processo total que demora alguns dias. Dessa forma, esta equação se mostra importante, pois em diversos experimentos realizados durante este trabalho (inóculos dos experimentos em biorreator) a medida de DO foi realizada para padronização dos inóculos. Para os microrganismos *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* e *Carnobacterium maltaromaticum* não foram elaboradas estas curvas. A medida de DO foi realizada sempre concomitante a densidade específica de células para a padronização dos inóculos destes dois microrganismos.

#### **4.2.2 Crescimento de isolados em meios a base de soro de queijo**

Os primeiros ensaios realizados em *shaker* para a seleção de bactérias lácticas foram feitos com caldo MRS, que é um meio nutritivo especial para o crescimento de *Lactobacillus*. Este meio é rico em diferentes fontes de carbono (acetato, citrato e carboidratos) e em fontes de nitrogênio, sendo adequado para cepas de microrganismos fastidiosos que crescem pouco em outros tipos de meio comumente usados (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960). Contudo, é um meio bastante caro e seu uso em larga escala se torna impraticável.

O meio ideal para cultivar microrganismos deve ser barato e de grande disponibilidade para a sua aplicação comercial. Em vista disso, alguns resíduos agroindustriais são investigados para o cultivo de microrganismos (HORN, ASPMO e EIJSINK, 2005; LAITILA *et al.*, 2004; PANESAR *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 1993).



Neste cenário, o soro de queijo se mostra como um bom substrato para o crescimento de *Lactobacillus*, pois no soro de queijo permanece cerca de 55 % do total de nutrientes presentes no leite. Entre os nutrientes mais abundantes do soro de queijo em relação ao total de sólidos estão: a lactose (70 – 72 %), proteínas do soro (8 – 10 %) e sais minerais (12 – 15 %). Como a lactose é o maior componente do soro, a adição a ele de vitaminas, minerais e proteínas em que é carente, o torna um meio amplamente usado em processos biotecnológicos. Os requerimentos nutricionais das LAB são complexos, especialmente em relação às fontes de nitrogênio e somente parte do total de peptídeos disponíveis são metabolizados. Os meios de cultura, que podem possuir alto conteúdo de proteínas, são usualmente suplementados com extrato de levedura ou hidrolisados protéicos (peptonas) (PANESAR *et al.*, 2007; SISO, 1996).

Em vista do exposto, foram conduzidos estudos da formação de biomassa com os isolados *L. paracasei* subsp *tolerans* (57), *Carnobacterium maltaromaticum* (88) e *L. plantarum* (117) em quatro diferentes meios à base de soro de queijo e em MRS. Como havia a presença de sólidos insolúveis, optou-se neste estudo, pela avaliação da biomassa através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de caldo fermentativo.

A Figura 11 apresenta o gráfico dos valores de UFC mL<sup>-1</sup> obtidos para cada bactéria nos diferentes meios.

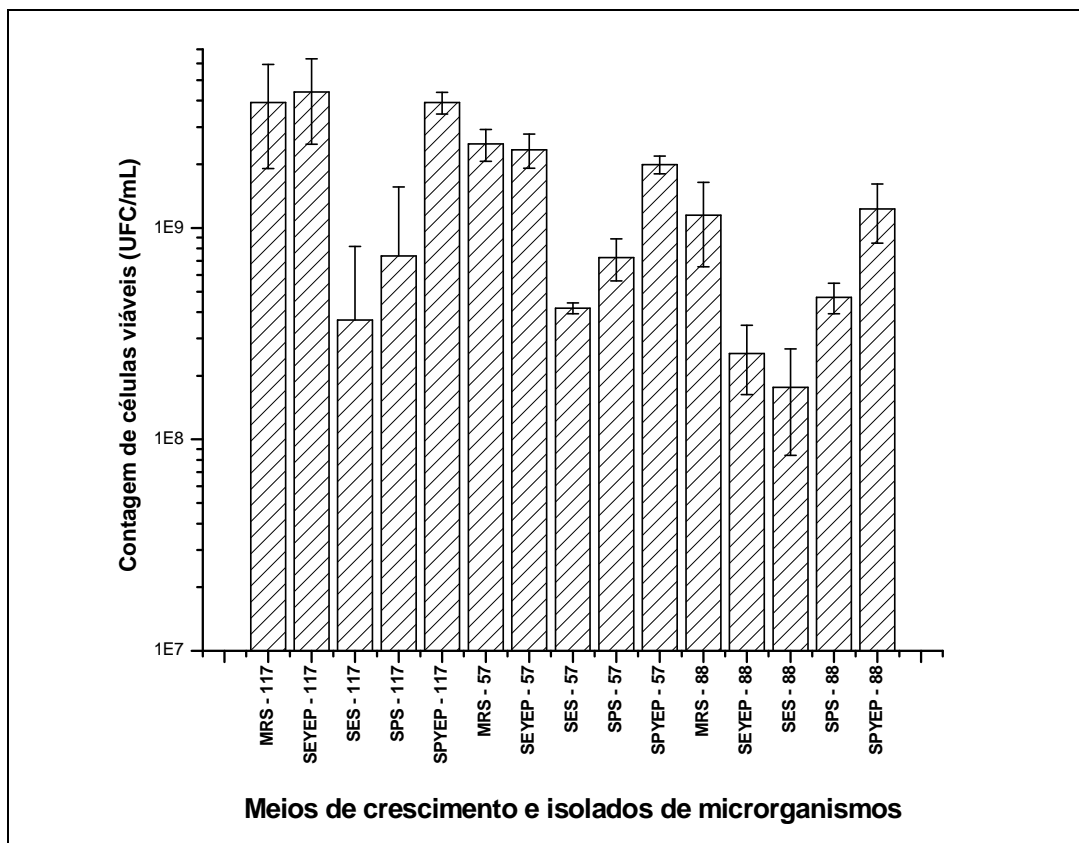


Figura 11: Diagrama dos valores de UFC mL<sup>-1</sup> dos microrganismos *L. paracasei* subsp. *tolerans* (57); *C. maltaromaticum* (88) e *L. plantarum* (117).

Para verificar a diferença estatística entre as médias dos valores de biomassa dos diferentes testes foi realizado o teste Tukey. As médias foram consideradas iguais ao nível de confiança de 95 %. A Tabela 14 apresenta os resultados da análise estatística. Avaliando o crescimento de cada um dos microrganismos nos diferentes meios pode ser observado que para o *L. plantarum* a formação de biomassa no meio SES só foi igual estatisticamente ao crescimento no meio SPS e nestes meios houve a menor formação de biomassa do isolado. Os maiores valores de formação de biomassa para *L. plantarum* ocorreram nos meios MRS, SEYEP e SPYEP. Para *C. maltaromaticum* os maiores valores de UFC mL<sup>-1</sup> também foram observados nos meios MRS, SEYEP e SPYEP, contudo não houve diferença significativa

em relação aos meios SES e SPS. O mesmo foi observado para o *L. paracasei* subsp. *tolerans*. Os maiores crescimentos foram observados nos meios em que o soro de queijo foi complementado com outras fontes de nitrogênio evidenciando a importância da adição destes constituintes. Apesar dos dois meios SPYEP e SEYEP serem iguais, ao nível de confiança de 95 %, optou-se por trabalhar com o meio SPYEP na seqüência do trabalho, pois aumentando o nível de confiança em 1 % estes meios já se tornam diferentes estatisticamente para o crescimento de *C. maltaromaticum* e *L. paracasei* subsp. *tolerans* em relação ao crescimento de *L. plantarum* nos mesmos meios.

**Tabela 14: Tabela de diferenças significativas para avaliação da formação de biomassa dos isolados de *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *C. maltaromaticum*, *L. plantarum* por UFC mL<sup>-1</sup> para diferentes meios.**

	95 % de confiança	96% de confiança
57 - MRS	abc	abc
57 - SEYEP	abc	abc
57 - SES	a	a
57 - SPS	ab	ab
57 - SPYEP	abc	abc
88 - MRS	ab	abc
88 - SEYEP	a	a
88 - SES	a	a
88 - SPS	a	a
88 - SPYEP	abc	abc
117 - MRS	bc	bc
117 - SEYEP	c	c
117 - SES	a	a
117 - SPS	ab	ab
117 - SPYEP	bc	bc

Os valores obtidos neste experimento foram similares aos obtidos por Saguir, Campos e Nadra (2008). Os autores obtiveram para o meio MRS o valor de biomassa de  $3,5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. A retirada de extrato de levedura do meio causou a diminuição do número de células em 7 % e a omissão de peptona não causou nenhuma alteração em relação ao caldo MRS original. Quando extrato de levedura e peptona foram ambos removidos, os resultados foram iguais ao do meio com ausência de extrato de levedura o que indicou

que o efeito de diminuição no crescimento foi causado principalmente pela ausência de extrato de levedura.

### **4.2.3 Hidrólise das proteínas do soro de queijo**

O estudo da hidrólise enzimática das proteínas do soro de queijo foi realizado com o intuito de diminuir a precipitação destas durante a operação de esterilização do meio. Além disso, a hidrólise enzimática das proteínas promove a liberação de peptídeos, o que torna os compostos nitrogenados mais biodisponíveis para a utilização pelas LAB sem que haja tratamento térmico severo. Guerra, Rua e Pastrana (2001) propuseram um método de remoção das proteínas precipitadas durante a esterilização do soro de queijo. Contudo, neste método o meio passava por duas etapas de esterilização. A primeira esterilização era realizada para que as proteínas fossem coaguladas. O pH era ajustado para 4,5 e seguida esta etapa realizava-se a centrifugação das proteínas desnaturadas. Novo ajuste de pH era realizado (para 6,3) e a segunda esterilização era realizada. Este processo é bastante complexo e demanda a utilização de vários equipamentos e submissão do meio a dois tratamentos térmicos severos.

A Figura 12 apresenta um gráfico de barras com a formação de precipitado de proteínas do soro de queijo em relação aos diversos tratamentos enzimáticos realizados. Para verificar a diferença estatística entre as médias dos valores de precipitado formado nos diferentes tratamentos realizados aplicou-se o teste Tukey. As médias foram consideradas iguais ao nível de confiança de 95 %. O único tratamento que apresentou diferença significativa em relação a outros ensaios foi o que empregou 400  $\mu\text{L}$  de enzima por 3 h a

50 °C. Este foi diferente dos ensaios com 500 µL por 1 e 2 h a 50 °C e por 2 h a 40 °C; 600 µL por 1 h a 50 °C, por 2 h a 60 °C e 2 h a 40 °C; 400 µL por 1 e 2 h a 60 °C. Os demais ensaios foram iguais estatisticamente. Como pode ser observado na Figura 12, o ensaio com 400 µL de enzima por 3 h a 50 °C foi o que apresentou a maior formação de precipitado. Escolheu-se para o prosseguimento das atividades o tratamento que fosse diferente estatisticamente dele, com o menor volume empregado de enzima, pelo menor tempo e menor temperatura, sendo escolhido então o ensaio em que se empregou para a hidrólise de 70 g L<sup>-1</sup> de soro de queijo 500 µL de enzima por 1 h a 50 °C. A escolha foi realizada dessa forma, pois foi observado durante os ensaios que o aumento do tempo de hidrólise era o fator que ocasionava a maior variação do volume do material que estava sendo hidrolisado, além do que aumentava muito o tempo da preparação dos meios. A temperatura mais baixa admissível da hidrólise foi escolhida devido à demanda energética e ao aquecimento prolongado do meio. O aumento da concentração de enzima não impacta demasiadamente o custo do meio, visto que para a realização da hidrólise é utilizada baixa concentração desta enzima e seu custo é de US\$20/kg.

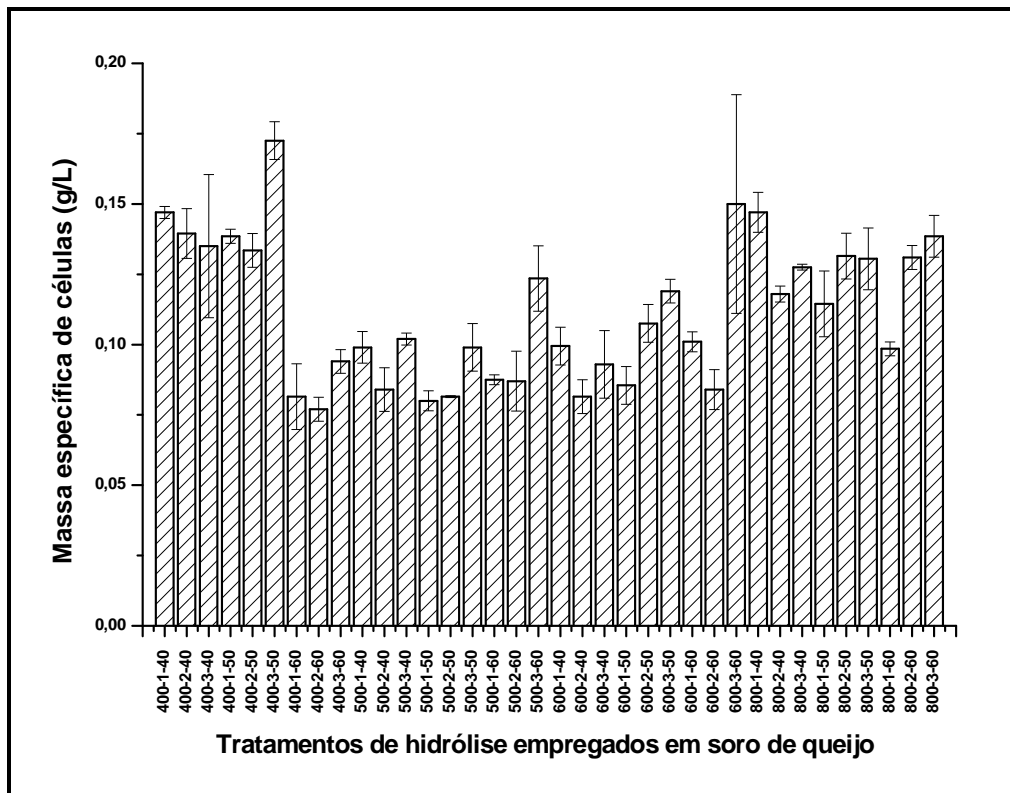


Figura 12: Diagrama de proteínas de soro de queijo precipitadas em diferentes condições de hidrólise.

Para os experimentos realizados na seqüência do trabalho em que foi determinado o peso seco de células, foi utilizado sempre um branco de meio (sem células) para realizar a correção do valor de biomassa formada. Considerou-se que este valor era constante ao longo de cada experimento.

#### 4.2.4 Estudo da cinética de crescimento em *shaker* de *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *C. maltaromaticum* e *L. plantarum*

Esta etapa do trabalho foi realizada com o objetivo de conhecer a cinética de crescimento dos microrganismos escolhidos no meio SPYEP em *shaker*. Para isso foram realizado experimentos em que determinou-se a biomassa através do peso seco de células, o consumo de lactose, a formação

de ácido láctico e a variação do pH do meio durante os cultivos. As Figuras 13, 14 e 15 apresentam as curvas obtidas neste estudo.

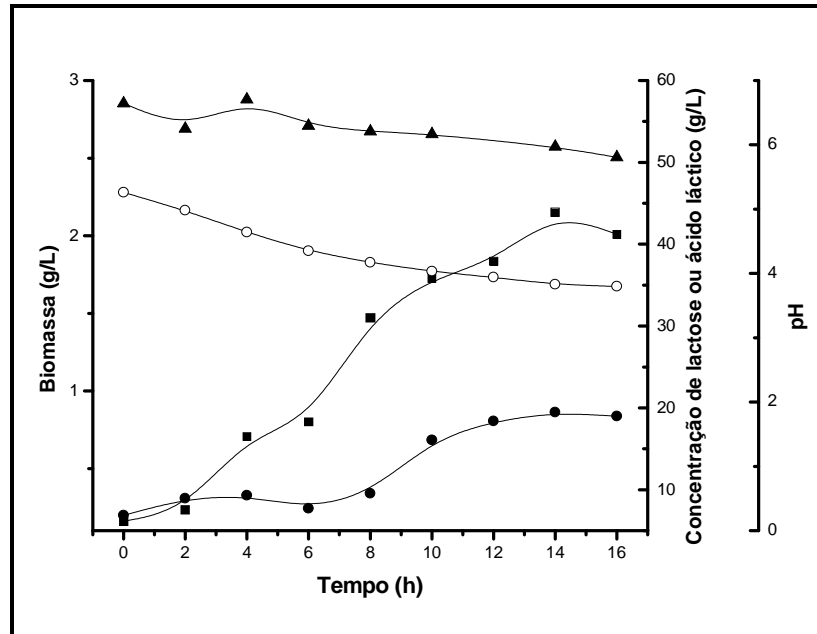


Figura 13: Cinética de crescimento no meio SPYEP em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C de *L. paracasei* subsp. *tolerans*.

-●- concentração de ácido láctico; -■- biomassa; -▲- concentração de lactose; -○- pH.

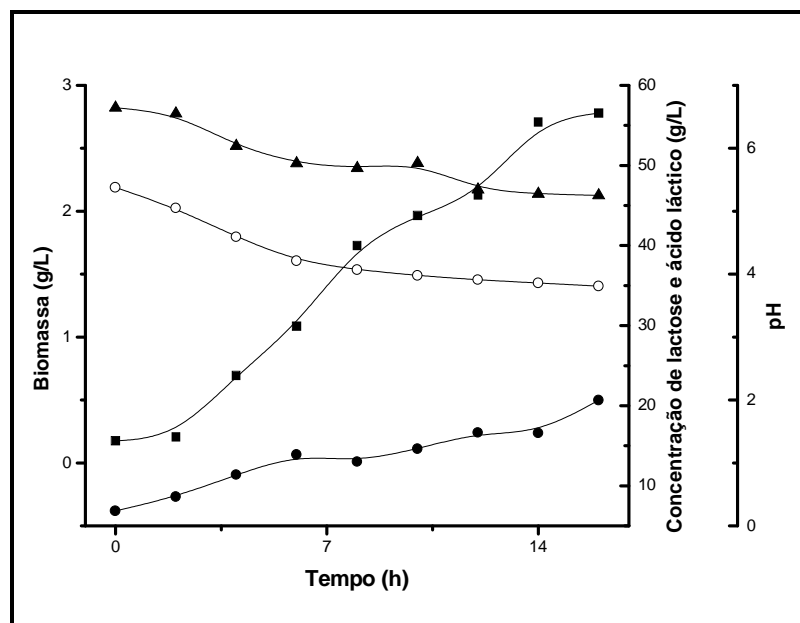


Figura 14: Cinética de crescimento no meio SPYEP em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C de *C. maltaromaticum*.

-●- concentração de ácido láctico; -■- biomassa; -▲- concentração de lactose; -○- pH.

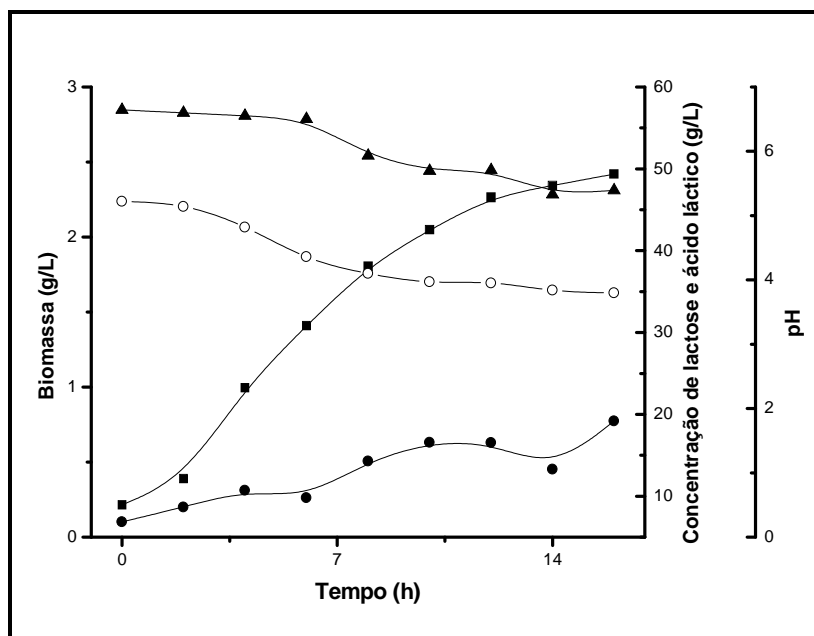


Figura 15: Cinética de crescimento no meio SPYEP em *shaker* rotatório a 180 rpm, 37 °C de *L. plantarum*.

-●- concentração de ácido láctico; -■- biomassa; -▲- concentração de lactose; -○- pH.

O máximo de biomassa obtido foi de 2,8 g L<sup>-1</sup> para o *C. maltaromaticum*. Para *L. plantarum* e *L. paracasei* subsp. *tolerans* foi de 2,4 e 2,0 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Tseng e Monteville (1990) obtiveram em seu estudo, sob condições aeróbias, com *L. plantarum* valores de 0,215 e 0,083 g L<sup>-1</sup> de peso seco de células, para os cultivos com pH 5,5 e 7,7, respectivamente. Em trabalho posterior, Tseng e Monteville (1992) continuaram obtendo valores similares de biomassa (0,229 g L<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos neste trabalho estão cerca de 10 vezes superiores aos obtidos por Tseng e Monteville (1990, 1992). Contudo, em relação aos dados obtidos por Fu e Mathews (1999), que apresentaram biomassa de *L. plantarum* na faixa de 10 – 12 g L<sup>-1</sup>, os mesmos resultados estão bastante inferiores.

O consumo de lactose do meio foi de apenas 11,5 % para *L. paracasei* subsp. *tolerans*, 17,1 % para *L. plantarum* e 19,1 % para *C. maltaromaticum*.



Acompanhando a evolução do pH ao longo do cultivo pode ser observado que ele decresce até valores de aproximadamente 3,8 para os três microrganismos, evidenciando a grande acidificação do meio. A queda do pH pode ter inibido o crescimento das LAB estudadas, fazendo com que as fontes de carbono não fossem exauridas. Apesar das LAB serem ácido tolerantes (AXELSSON, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 2001; SAVIJOKI, INGMER, VARMANEN, 2006) elas podem perder a capacidade de se multiplicar no meio caso o pH seja bastante baixo, como verificado no trabalho de McDonald, Fleming e Hassan (1990), no qual o crescimento de *L. plantarum* parou quando o pH interno do microrganismo alcançou valores entre 4,6 e 4,8, que correspondiam a faixa de 3,5 – 3,8 de pH do meio.

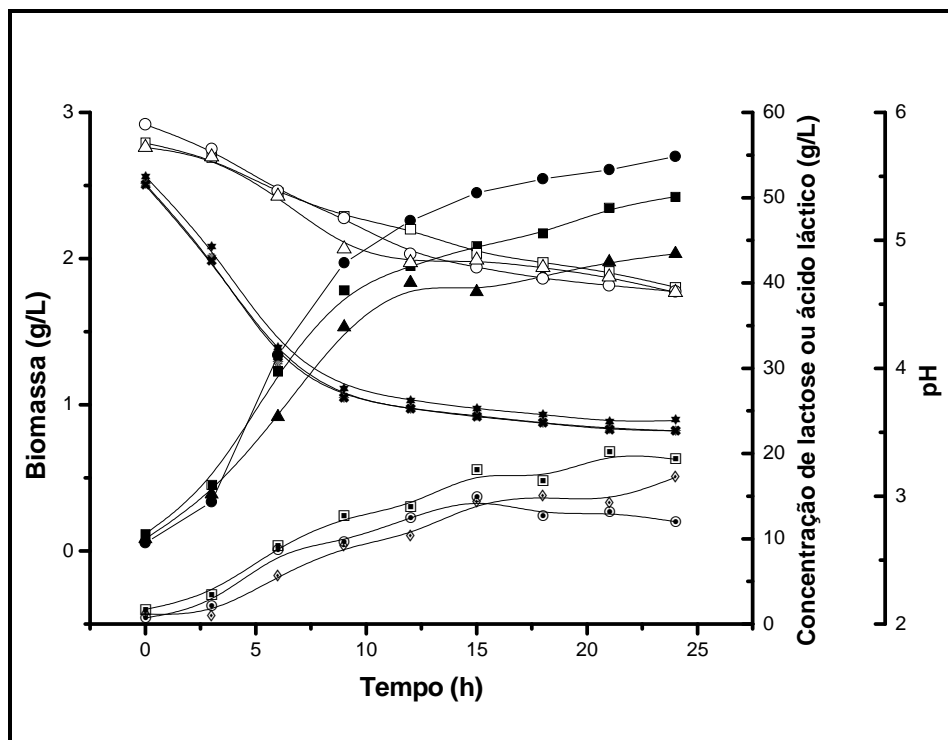
#### **4.2.5 Avaliação da adição de fonte de nitrogênio em *shaker***

Para avaliar novamente a influência da suplementação do meio com soro de queijo com fontes nitrogenadas foram realizados experimentos com *L. plantarum*. Esta etapa teve como objetivo verificar a influência da adição de peptona e amônia em um meio a base de soro já suplementado com extrato de levedura. Ela foi realizada, pois no primeiro estudo a avaliação da biomassa foi feita exclusivamente pela contagem de UFC mL<sup>-1</sup>. Aqui foram avaliadas a biomassa por densidade específica de células, consumo de lactose, produção de ácido láctico e pH. Este ensaio foi realizado paralelamente ao ensaio apresentado no item 4.2.6, e pelos resultados descritos neste item ele foi realizado unicamente com *L. plantarum*.

A Figura 16 apresenta as curvas de crescimento de *L. plantarum* nos diferentes meios. Os valores de produção de biomassa ficaram na faixa de

2,0 – 2,7 g L<sup>-1</sup> entre os diferentes meios. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos no estudo anterior para *L. plantarum*. Novamente, o consumo de lactose foi bastante baixo, aproximadamente 30 %. O pH continuou apresentando queda bastante acentuada, o que pode ter levado à parada de crescimento dos microrganismos.

Para verificar a diferença estatística entre as médias dos valores de biomassa produzidos nos diferentes tratamentos realizados aplicou-se o teste Tukey. As médias foram consideradas iguais ao nível de confiança de 95 %. O resultado da análise é apresentado na Tabela 15. Índices iguais indicam amostras iguais. Os meios com peptona e amônia foram iguais estatisticamente.



**Figura 16: Acompanhamento do crescimento de *L. plantarum* em meios com diferentes tipos de fontes de nitrogênio.**

Meio com peptona: -●- biomassa, -○- concentração de lactose, -★- pH e -□- concentração de ácido láctico; meio com amônia: -■- biomassa, -□- concentração de lactose, -✱- pH, -⊙- concentração de ácido láctico; meio SEM: -▲- biomassa; -△- concentração de lactose, -✱- pH, -◇- concentração de ácido láctico.

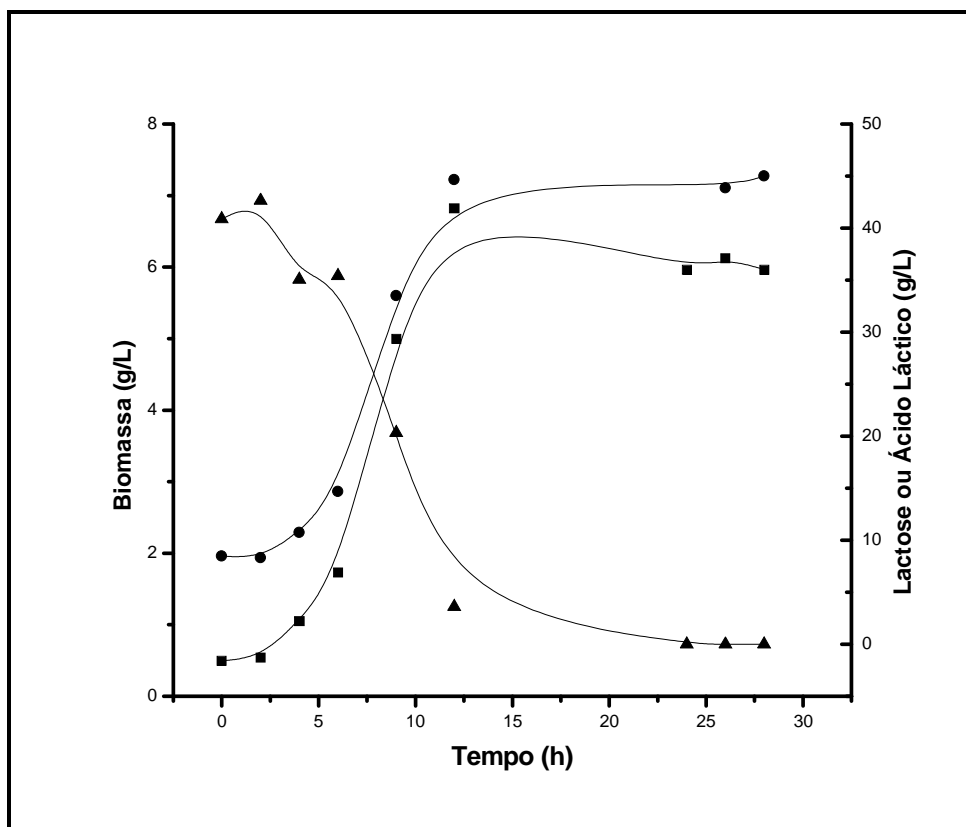
**Tabela 15: Resultado do teste de Tukey, com significância de 95%, para os meios com diferentes fontes de nitrogênio.**

Meio	Média da biomassa (g L <sup>-1</sup> )
Peptona	2,70 ± 0,15 <sup>a</sup>
Amônia	2,42 ± 0,18 <sup>ab</sup>
SEM	2,03 ± 0,08 <sup>b</sup>

Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey (p < 0,05).

#### **4.2.6 Ensaio preliminar em biorreator submerso**

Os testes de crescimento dos microrganismos em *shaker* indicaram que estes paravam de crescer apesar da fonte de carbono não ter sido totalmente consumida. Observando a evolução do pH do meio, havia um indicativo da possibilidade de que este estivesse influenciando a parada no crescimento microbiano, como observado por McDonald, Fleming e Hassan (1990). Com isso, foi conduzido um estudo do crescimento de *L. plantarum* no meio SPYEP em cultivo submerso em biorreator, no qual o pH do cultivo foi controlado. A Figura 17 apresenta a cinética de crescimento de *L. plantarum* em cultivo submerso em biorreator, com pH controlado em 6,1.



**Figura 17: Cinética de crescimento em biorreator do *L. plantarum*.**  
 -●- ácido láctico; -■- biomassa e -▲- concentração de lactose.

Acompanhando o consumo de lactose do meio verificou-se que ela foi exaurida em aproximadamente 24 h de cultivo. A concentração de biomassa ao final no meio foi de aproximadamente  $6 \text{ g L}^{-1}$ . Foi observado ao longo do cultivo o elevado volume de NaOH 5,0 M consumido, cerca de 200 mL. Isso indica, que a alta concentração de ácido láctico no meio ao final das 28 h de cultivo ( $45 \text{ g L}^{-1}$ ) ocasionou a necessidade da utilização de NaOH.

A partir das observações realizadas neste estudo, o trabalho foi reestruturado de forma que todos os demais estudos fossem conduzidos em cultivo submerso em biorreator no qual haveria a possibilidade de controle do pH. Com o número pequeno de biorreatores disponíveis no laboratório, o longo tempo gasto para o preparo e realização de cada experimento houve a

necessidade de optar-se por trabalhar com apenas uma das cepas. Dessa forma, o microrganismo escolhido para o prosseguimento dos trabalhos foi o *L. plantarum*. Ele foi escolhido pois, além de ser descrito como probiótico pela literatura, ele apresentou bons resultados de densidade de biomassa produzida. Soma-se a estas razões, o fato do *L. plantarum* ainda ser um microrganismo não presente na lista positiva da ANVISA (BRASIL, 2008), sendo interessante, dessa forma conduzir maiores estudos para atender aos critérios para esta cepa venha ser utilizada como probiótica no Brasil.

#### 4.3 PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *L. plantarum* EM CULTIVO SUBMERSO EM BIORREATOR

Como as pesquisas até o momento haviam sido desenvolvidas em *shaker*, e nestes podia estar ocorrendo a inibição do crescimento pela diminuição do pH ocasionada pela produção de ácido láctico durante o cultivo, optou-se por realizar uma nova seleção de variáveis que poderiam influenciar no crescimento de *L. plantarum*, sejam elas de composição do meio ou condições de cultivo. Com os resultados desta seleção de variáveis, realizou-se um delineamento composto central rotacional com o objetivo de maximizar a produção de biomassa. Os itens a seguir descrevem os resultados obtidos nestes experimentos.

##### **4.3.1 Delineamento experimental Plackett-Burman**

O planejamento Plackett-Burman foi realizado para avaliar o efeito das concentrações de lactose, peptona e extrato de levedura, da temperatura, do pH e da taxa de aeração na produção de biomassa de *L. plantarum*. A Tabela

16 apresenta o delineamento experimental P-B com 15 ensaios e a correspondente produção de biomassa em 48 h de cultivo no biorreator.

**Tabela 16: Matriz de delineamento experimental Plackett-Burman com a variável de resposta produção de biomassa em 48 h.**

Ensaio	Variáveis <sup>a</sup> / níveis <sup>b</sup>												Biomassa em 48 h (g L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> C
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>			
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	5,00	1,26	
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	3,43	1,26	
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	8,47	0,68	
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	4,21	1,07	
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	1,53	-	
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	0,00	0,00	
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	10,98	0,99	
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	14,97	1,04	
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	8,61	1,29	
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	2,98	1,23	
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	7,01	1,03	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,57	0,96	
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,52	0,80	
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,20	1,31	
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9,94	1,11	

<sup>a</sup> X<sub>1</sub> temperatura no nível superior de 42°C, central de 38 °C e no nível inferior de 34°C; X<sub>2</sub> pH no nível superior de 6,4, central de 5,8 e no nível inferior de 5,2; X<sub>3</sub> concentração de lactose no nível superior de 140 g L<sup>-1</sup>, central de 110 g L<sup>-1</sup> e no nível inferior de 80 g L<sup>-1</sup>; X<sub>4</sub> concentração de peptona no nível superior de 25 g L<sup>-1</sup>, central de 15 g L<sup>-1</sup> e no nível inferior de 5 g L<sup>-1</sup>; X<sub>5</sub> concentração de extrato de levedura bruto no nível superior de 15 g L<sup>-1</sup>, central de 10 g L<sup>-1</sup> e no nível inferior de 5 g L<sup>-1</sup>; X<sub>6</sub> agitação no nível superior de 400 rpm, central de 300 rpm e no nível inferior de 200 rpm; X<sub>7</sub> taxa de aeração no nível superior de 2 vvm, central de 1 vvm e no nível inferior de 0 vvm; D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> são variáveis inertes (*dummy*).

<sup>b</sup> (+) nível superior da variável; (-) nível baixo da variável e (0) nível central da variável.

<sup>c</sup> Y<sub>P/S</sub> rendimento, lactose convertido em ácido láctico

A produção de biomassa variou marcadamente entre os diferentes ensaios, com valores entre 0 – 14,970 g L<sup>-1</sup>, que reflete a importância da otimização para a obtenção de maiores produções. A temperatura parece ser a variável mais importante investigada. As menores produções de biomassa foram alcançadas quando a temperatura foi fixada no nível superior, com o maior valor de 5,0 g L<sup>-1</sup>. Diferentemente, para todos os ensaios em que a temperatura foi fixada no nível inferior, o mínimo valor obtido de biomassa foi de 7,0 g L<sup>-1</sup>, 40 % superior que o máximo valor alcançado nos experimentos a 42 °C. As produções de biomassa foram bem superiores àquelas obtidas por Kask *et al.* (1999) nos seus experimentos com *L. plantarum*, onde a máxima

densidade de células conseguidas foi de 2,5 g L<sup>-1</sup> de peso seco de células. Fu e Mathews (1999) reportaram valores de 11 g L<sup>-1</sup> aproximadamente de produção de biomassa de *L. plantarum* no seu trabalho, em que os experimentos foram conduzidos com controle de pH na faixa de 5 a 7. Este valor é similar à produção de biomassa do ensaio 11 e menor que o valor do ensaio 8. Já com pH 4 os autores observaram a possível ocorrência de efeito inibitório sobre a biomassa obtida. A máxima conversão teórica de lactose em ácido láctico é 1,05. Neste trabalho, Y<sub>P/S</sub> de 1,31 foi obtido, mostrando que *L. plantarum* pode converter eficientemente lactose a partir de soro, mas também usando outros ingredientes do meio de cultivo, como peptona e extrato de levedura, para seu crescimento e produção de ácido (FU e MATHEWS, 1999).

A Tabela 17 mostra a análise estatística das variáveis estudadas para a produção de *L. plantarum*.

**Tabela 17: Efeitos estimados para a produção de biomassa resultantes do delineamento P-B.**

Variáveis	Parâmetros	Efeitos	Valores de p
X <sub>1</sub>	Temperatura	-6,74250	0,00599
X <sub>2</sub>	pH	-1,98583	0,06315
X <sub>3</sub>	Concentração de lactose*	2,08250	0,05791
X <sub>4</sub>	Concentração de peptona*	2,11583	0,05625
X <sub>5</sub>	Concentração de extrato de levedura	-0,27250	0,65500
X <sub>6</sub>	Velocidade de agitação	-1,19750	0,14975
X <sub>7</sub>	Taxa de aeração	1,70083	0,08330

\*efeitos significativos a 90 % de confiança  
 Erro padrão = 0,524214; Valores de P ≤ 0,10; R<sup>2</sup> = 0,8949.

Como pode ser observado na Tabela 17, os fatores temperatura (X<sub>1</sub>), pH (X<sub>2</sub>), concentração de lactose (X<sub>3</sub>), concentração de peptona (X<sub>4</sub>) e taxa de aeração (X<sub>7</sub>) tiveram efeitos significativos com nível de confiança de 90 % na produção de biomassa. A temperatura e o pH influenciaram negativamente a produção de biomassa. As concentrações de lactose e peptona e a taxa de

aeração influenciaram positivamente a produção de biomassa. O máximo de células viáveis de *L. plantarum* obtidos por Laitila *et al.* (2004) com meio MSE-extra (meio extrato de broto de malte adicionado de 40 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g L<sup>-1</sup> de Tween 80, 5 g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O, 2 g L<sup>-1</sup> de citrato diamônia e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.1H<sub>2</sub>O, e 1 mg L<sup>-1</sup> de niacina e ácido pantotênico) na fermentação em biorreator foi com pH controlado a 5,0; valor este próximo ao nível mais baixo usado no PB (5,2).

Concentrações de lactose e peptona, taxa de aeração apresentaram influencia positiva na produção de biomassa. Soro de queijo (fonte da lactose) e peptona são ingredientes complexos que contêm uma série de aminoácidos essenciais e importantes minerais e vitaminas (PANESAR, *et al.*, 2007; SAGUIR, CAMPOS, NADRA, 2008; TANGO e GHALY, 1999). Bevilacqua *et al.* (2008) demonstraram que a produção de biomassa aumentou de uma forma não linear com o aumento da concentração de lactose até um valor limite de 20 g L<sup>-1</sup> e pH 6,0. O efeito positivo da aeração na produção de biomassa foi também observado por outros autores. Fu e Mathews (1999) demonstraram que o rendimento de biomassa sob condições anaeróbicas foi cerca de 80% do valor obtido em cultivos aeróbicos. Stevens *et al.* (2008) obtiveram valores de densidade de células aproximadamente 25% maiores em cultivos aeróbicos quando comparados a anaeróbicos. Uma influência similar da aeração na biomassa foi observada por Pintado, Raimbault e Guyota (2005) que obtiveram maiores densidades de células em aerobiose comparativamente a cultura anaeróbica quando diferentes polissacarídeos suplementaram um meio de cultura basal. *L. plantarum* é uma bactéria facultativa e pode usar o oxigênio como acceptor de elétrons para seu crescimento e metabolismo (de VRIES *et*



*al.*, 2006; FU e MATHEWS, 1999; PINTADO, RAIMBAULT e GUYOTA, 2005). O efeito positivo da taxa de aeração na produção de biomassa pode ser atribuído a diferenças nas rotas metabólicas sob condições aeróbicas e anaeróbicas, em particular, na geração de ATP que beneficia o crescimento celular na presença de oxigênio (AXELSSON, 1998; FU e MATHEWS, 1999; PINTADO, RAIMBAULT e GUYOTA, 2005).

A concentração de lactose foi fixada no nível superior usado nos experimentos P-B (140 g L<sup>-1</sup>) para a realização dos experimentos DCCR, pois se maiores concentrações de soro de queijo (lactose) fossem usadas, possivelmente haveria a saturação do meio, conforme testes realizados previamente. Apesar do efeito da concentração de peptona indicar a utilização desta no nível superior para os experimentos DCCR, ela foi fixada no ponto central devido ao seu elevado custo. O nível inferior do pH (5,2) foi selecionado como *set point* nos experimentos do DCCR. Quando pH é usado em níveis baixos as células de *Lactobacillus* permanecem resistentes e com alta produção de biomassa o que evita possíveis contaminações (FU e MATHEWS, 1999). A concentração de extrato de levedura e a velocidade de agitação, que não apresentaram efeito significativo, foram fixadas em 5 g L<sup>-1</sup> e 200 rpm, respectivamente. Laitida *et al.* (2004) também observaram que a aumento da concentração de extrato de levedura de 4 para 8 g L<sup>-1</sup> não aumentou o crescimento celular. Com estes resultados, foram escolhidas como variáveis para o DCCR a temperatura e a taxa de aeração.

### 4.3.2 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

Com base nos resultados obtidos no planejamento P-B, as influências da temperatura e da taxa de aeração foram testadas usando a metodologia DCCR para buscar a otimização da produção de biomassa de *L. plantarum* em cultivo submerso em biorreator. O planejamento composto central ( $k = 2$ ) com três repetições no ponto central e quatro pontos axiais foi realizado. A temperatura variou na faixa de 30 – 38 °C e a taxa de aeração na faixa de 2 – 5 vvm. A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos de produção de biomassa em 48 h de cultivo para cada um dos ensaios dados pelo DCCR.

**Tabela 18: Planejamento DCCR e resultados de biomassa de *L. plantarum* produzida em 48 h de cultivo**

Ensaio	Variáveis / níveis		Biomassa em 48 h (g L <sup>-1</sup> )
	X <sub>1</sub>	X <sub>7</sub>	
1	-1 (31)	-1 (2,5)	11,55
2	-1 (31)	+1 (4,5)	13,05
3	+1 (37)	-1 (2,5)	9,12
4	+1 (37)	+1 (4,5)	9,65
5	-1,41 (30)	0 (3,5)	12,27
6	1,41 (38)	0 (3,5)	8,93
7	0 (34)	-1,41 (2)	10,35
8	0 (34)	1,41 (5)	11,33
9	0 (34)	0 (3,5)	10,77
10	0 (34)	0 (3,5)	11,87
11	0 (34)	0 (3,5)	11,19

A produção de biomassa variou de 8,93 a 13,05 g L<sup>-1</sup> ao longo dos diferentes experimentos propostos pelo DCCR. As maiores produções de biomassa 13,05 e 12,27 g L<sup>-1</sup> foram obtidos em baixos níveis de temperatura, 30 e 31 °C, respectivamente, enquanto que as menores produções de biomassa 8,93, 9,12 e 9,65 g L<sup>-1</sup> foram obtidas com a temperatura nos níveis mais altos (37 e 38 °C), demonstrando a forte influência que esta variável tem no processo. As concentrações de biomassa obtidas nesta pesquisa foram

maiores que as reportadas pela literatura (FU e MATHEWS, 1999; HORN, ASPMO e EIJSINK, 2005; KASK *et al.*, 1999).

A Tabela 19 apresenta os coeficientes determinados pelo teste *t-Student's* e valores de *p* (*p-values*).

**Tabela 19: Coeficientes estimados pelo modelo de regressão no DCCR.**

Variáveis independentes (parâmetros)	Efeito	Coeficiente ( $\beta$ )	Erro padrão	Valor de <i>t</i>	Valor de <i>p</i>
Média	11,27833	11,27833	0,320953	35,14009	0,000809
X <sub>1</sub>	-2,64139	-1,32069	0,196543	-6,71961	0,021437 <sup>a</sup>
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	-0,61838	-0,30919	0,233933	-1,32171	0,317191
X <sub>7</sub>	0,85537	0,42769	0,196543	2,17605	0,161518
X <sub>7</sub> X <sub>7</sub>	-0,37568	-0,18784	0,233933	-0,80297	0,506250
X <sub>1</sub> X <sub>7</sub>	-0,48750	-0,24375	0,277954	-0,87694	0,473003

X<sub>1</sub> e X<sub>7</sub> são os valores reais das variáveis independentes temperatura e taxa de aeração, respectivamente.

O coeficiente de primeira ordem da temperatura dado pelo modelo foi significativo a 95 % de confiança e os demais coeficientes não foram significativos. Este efeito foi negativo indicando que a biomassa diminui inversamente com o aumento da temperatura. Não foi encontrado na literatura outro trabalho avaliando a influência da temperatura e taxa de aeração na produção de biomassa de *L. plantarum*, confirmando a importância deste estudo. Leal-Sánchez *et al.* (2002) quando otimizaram a produção de bacteriocina produzida por *L. plantarum* LPCO10, obtiveram as seguintes melhores condições: concentração de NaCl de 2,5%, faixa de temperatura de 22 a 27 °C e concentração de inóculo de 10<sup>7,4</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

Apesar de somente o coeficiente de primeira ordem da temperatura ter sido significativo, a análise de variância (ANOVA) empregada para determinar a significância do modelo polinomial de segunda ordem gerado, considerando todos os coeficientes, mostrou que o modelo foi altamente significativo (*p* < 0,0001), apresentando coeficiente de determinação R<sup>2</sup> = 0,95, ou seja 95%

da variação total é explicada pelo modelo. Isto sugere uma representação satisfatória do processo de produção de biomassa pelo modelo e uma boa correlação entre os valores experimentais e preditos. Dessa forma, foi proposto um modelo polinomial de segunda ordem:

$$Y = 11,27833 - 1,32069x_1 - 0,30919x_1^2 + 0,42769x_7 - 0,18784x_7^2 - 0,24375x_1x_7 \quad (3)$$

Onde  $Y$  é a resposta predita,  $x_1$  e  $x_7$  são os valores codificados da temperatura e taxa de aeração, respectivamente. O valor de  $F$  calculado (19,02) foi maior que o  $F$  tabelado (3,14), refletindo a significância estatística da equação do modelo. Isto demonstra que o modelo, como expresso pela equação (3) provê um modelo adequado para descrever a resposta de produção de biomassa de *L. plantarum* nas condições estudadas.

A Figura 18 apresenta as superfícies de contorno que foram geradas a partir do modelo apresentado na equação (3).

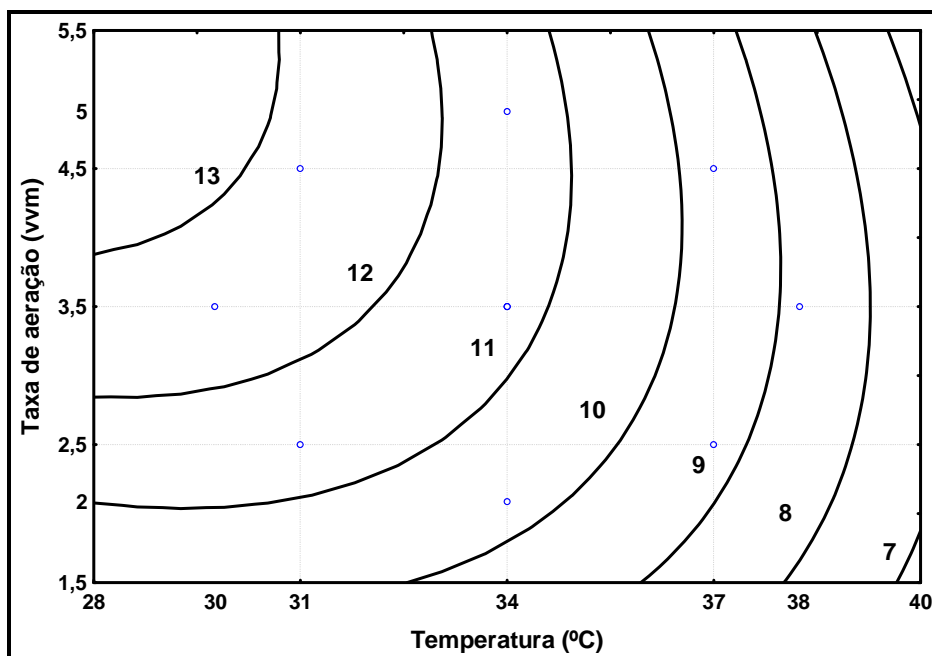


Figura 18: Superfícies de contorno da produção de biomassa de *L. plantarum* isolado de queijo Serrano.

O modelo predito indica como máxima produção de biomassa ( $14,30 \text{ g L}^{-1}$ ) um ponto fora da região estudada, com valores críticos codificados das variáveis estudadas dados por  $x_{1c} = 3,47$  e  $x_{7c} = 3,39$ . Esta resposta obtida pelo DCCR pode indicar que o alto valor negativo do efeito da temperatura obtido no planejamento P-B devia indicar uma diminuição ainda maior da temperatura do que foi utilizado no DCCR. Por esta razão, foi utilizado o método do caminho de ascendência máxima (MONTGOMERY, 1997), que permite procurar uma melhor região de estudo das variáveis independentes.

A Tabela 20 representa os experimentos dados pelo método do caminho de ascendência máximo.

**Tabela 20: Planejamento dos experimentos pela metodologia de caminho de ascendência máxima e resposta em 48 h de cultivo.**

Experimento	Temperatura (°C)	Taxa de aeração (vvm)	Produção de biomassa em 48 h ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	34	3,5	$11,75 \pm 0,07^a$
2	31	4,5	$9,83 \pm 0,85^{ab}$
3	28	5,5	$12,41 \pm 0,25^{ac}$
4	25	6,5	$10,80 \pm 0,30^a$
5	22	7,5	$11,71 \pm 0,05^a$
Ponto central DCCR	34	3,5	$11,26 \pm 0,56^a$

Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

O máximo de produção de biomassa atingido com este planejamento foi bastante similar ao do DCCR. Para verificar a diferença estatística entre as médias dos valores de biomassa produzidos nos diferentes tratamentos realizados aplicou-se o teste Tukey. As médias foram consideradas iguais ao nível de confiança de 95 %. O resultado da análise é apresentado na Tabela

20. Índices iguais indicam amostras iguais. Os únicos resultados de biomassa produzida que apresentaram diferença significativa entre si foram os experimentos a 28 e 31 °C. Nenhum tratamento foi estatisticamente diferente do ponto central do DCCR. Isto indica a importância da avaliação cautelosa do planejamento experimental aplicado a processos biológicos com o objetivo de evitar planejamentos inadequados. Por essa razão, não foi realizado um novo DCCR e mantiveram-se os valores do DCCR para o prosseguimento do trabalho.

Passos *et al.* (1994) que utilizaram extrato de pepino como base do substrato de fermentação para cultivo de *L. plantarum* a 30 °C e obtiveram valores de biomassa menores que 1 g L<sup>-1</sup>. Ha *et al.* (2003) investigaram as condições ótimas de concentração de extrato de levedura, milhocina e glicose para o crescimento de *L. casei* KH-1 através da metodologia de superfície de resposta. A concentração de glicose foi o fator que mais influenciou o crescimento, indicando que este era limitado pela fonte de carbono. O máximo de crescimento predito pelo modelo foi de 6,371 g L<sup>-1</sup> quando desejou-se otimizar a produção de biomassa e de 5,380 g L<sup>-1</sup> quando desejou-se otimizar a produção de ácido láctico. Youssef, Goma e Olmos-Dichara (2005) verificaram a influência de meios enriquecidos com diferentes concentrações de extrato de levedura e triptona no crescimento e na produção de ácido láctico por *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*. Os valores experimentais de biomassa obtidos foram de 1,4 a 4 g L<sup>-1</sup>. Fu e Mathews (1999) estudaram a produção de biomassa e ácido láctico por *L. plantarum* utilizando lactose de soro de queijo como meio fermentativo. As mais altas concentrações de biomassa foram de 12,0 g L<sup>-1</sup>. Estes valores são semelhantes aos obtidos no DCCR.

Para validar o modelo, foram realizados experimentos nas condições do ponto central do DCCR. A Figura 19 representa as curvas de produção de biomassa e ácido láctico, consumo de lactose e evolução da % pO<sub>2</sub>. A produção de biomassa nestes foi de (10,2 g L<sup>-1</sup>), de acordo com o valor predito pelo modelo (11,3 g L<sup>-1</sup>). O coeficiente de rendimento de biomassa e de rendimento de produto, medido em 48 h de cultivo, foram de 0,10 g de células g<sup>-1</sup> de lactose e 1,08 g de ácido láctico g<sup>-1</sup> de lactose (m/m), respectivamente. O coeficiente de rendimento de ácido láctico foi maior do que o teórico de 1,05, que é obtido considerando lactose como única fonte de carbono na produção de ácido láctico, indicando que o uso de soro de queijo (um ingrediente complexo) suplementado com peptona e extrato de levedura é um meio extremamente interessante, não somente para a produção de biomassa, como também para a produção de ácido láctico. A taxa de transferência volumétrica de oxigênio, k<sub>la</sub>, medida para este meio foi 16,3 h<sup>-1</sup>, indicando que em trabalhos futuros, esta condição de aeração pode ser mantida constante enquanto testa-se outras variáveis.

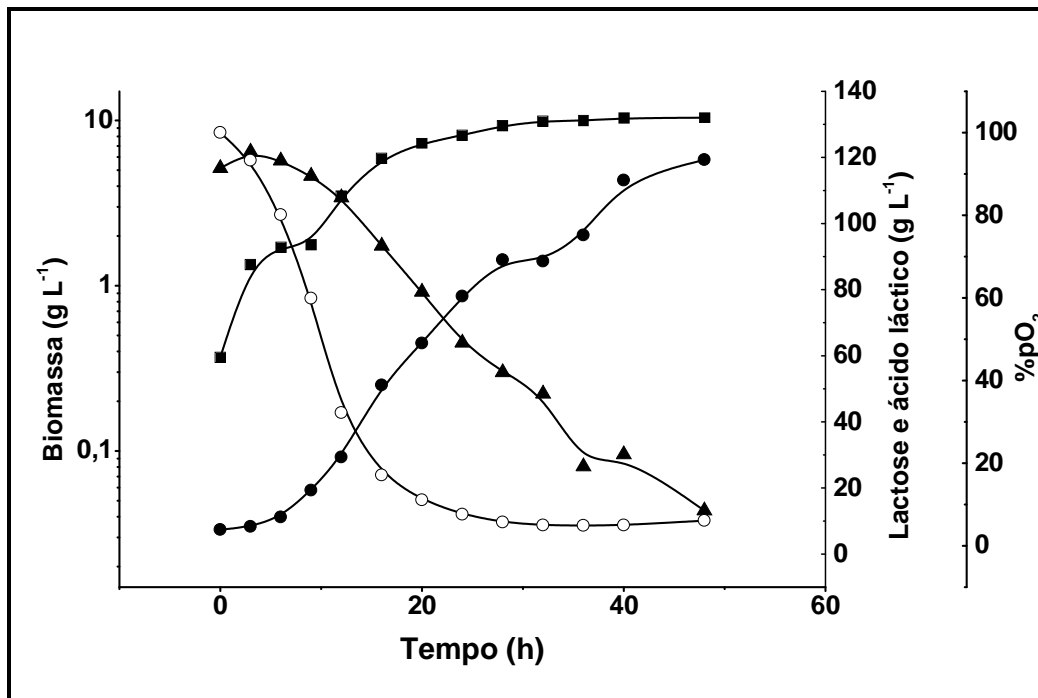


Figura 19: Cinética de crescimento de *L. plantarum* em biorreator submerso em meio base de soro de queijo, a 34 °C, 3,5 vvm.  
 -●- ácido láctico; -▲- lactose; -■- biomassa; -○- oxigênio dissolvido

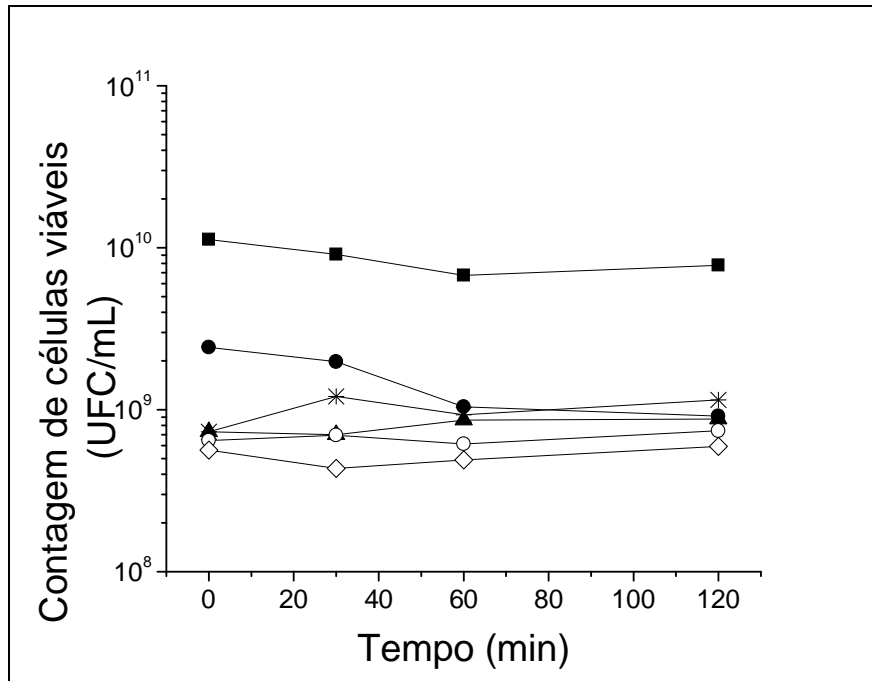
## 4.4 RESULTADOS IMOBILIZAÇÕES

### 4.4.1 Resistência aos meios gastrointestinais

Um dos principais critérios para seleção de probióticos é a avaliação da sua tolerância em relação ao pH estomacal, aos sais biliares e às enzimas presentes no trato gastrointestinal superior (CHAMPAGNE, GARDNER, ROY, 2005; STANTON *et al*, 2005). Dessa forma, foram realizados estudos para avaliar a viabilidade *in vitro* dos probióticos quando expostos aos SGS e SIS. O SGS apresentava em sua formulação pepsina e seu pH foi ajustado para dois. Já o SIS era composto por pancreatina, sais biliares e seu pH corrigido para oito.



A Figura 20 apresenta as curvas de sobrevivência do *L. plantarum*, na forma livre e imobilizada em ALG e ALPE, quando colocados em contato com o SIS. Nestes experimentos o SIS não apresentou diminuição na viabilidade dos microrganismos em relação ao controle, exceto para o experimento sem imobilização no qual houve uma ligeira diminuição, 0,2 e 0,4 ciclos logarítmicos para controle e SIS, respectivamente. Michida *et al.* (2006) verificaram que *L. plantarum* na forma livre resistiu à exposição ao suco intestinal simulado. Mandal *et al.* (2006) verificaram a diminuição na viabilidade dos probióticos livres de 9,45 para 7,29 log UFC mL<sup>-1</sup> e de 9,34 para 5,60 log UFC mL<sup>-1</sup> quando expostos a 1 e 2 % de sais biliares, respectivamente após 12 h. Quando estes autores utilizaram a imobilização em alginato, verificaram o aumento da viabilidade, que foi proporcional ao aumento da concentração de alginato utilizada. Dessa forma, para as demais imobilizações não foram realizados ensaios de resistência a suco intestinal já que este não diminui a viabilidade de *L. plantarum*.



**Figura 20: Variação de número de células viáveis de *L. plantarum* quando submetido à SIS com seus respectivos controles.**  
 (■) controle sem imobilização; (●) SIS sem imobilização; (▲) controle ALG; (\*) SIS + ALG; (○) controle ALPE; (◇) SIS ALPE.

Da mesma forma que não foram realizados demais ensaios com os diferentes materiais de imobilização, também não foram conduzidos mais ensaios em que foram avaliados a incubação seqüencial em SGS e posterior em SIS, já que não foi verificada a influência do SIS na perda de viabilidade dos microrganismos.

A Figura 21 apresenta a variação do número de células viáveis de *L. plantarum* durante a exposição à SGS. A exposição ao SGS ocasionou uma drástica diminuição do número total de sobreviventes sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos a 95 % de confiança. A imobilização com estes materiais não foi efetiva como técnica para proteger os microrganismos. Este resultado está em concordância com o observado por Sultana *et al.* (2000) que também verificaram queda expressiva quando os

probióticos foram expostos ao pH dois, sendo que a imobilização não os protegeu das condições adversas. Gbassi *et al.* (2009) também verificaram que após 90 min de incubação de 3 diferentes cepas de *L. plantarum*, encapsuladas em alginato de cálcio não houve sobreviventes. Já quando utilizaram o recobrimento com proteínas do soro de queijo, houve um incremento da sobrevivência, demonstrando que a técnica foi efetiva para a proteção das cepas probióticas utilizadas. Mandal *et al.* (2006) observaram grande diminuição na viabilidade das células livres quando submetidos ao pH 1,5, contudo houve um ligeiro aumento na viabilidade com os probióticos que foram imobilizados. Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004) verificaram que a encapsulação em alginato com recobrimento com quitosana foi o melhor tratamento para proteger os Lactobacilos estudados para todas as condições testadas, contudo nenhum tratamento promoveu a proteção de *B. bifidum* às condições ácidas. Mokarram *et al.* (2009) obtiveram como melhor proteção de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* em relação a solução de suco gástrico simulado o tratamento de encapsulação com alginato de cálcio com cobertura dupla de alginato e, justificaram que para tal situação há a redução do tamanho do poro e a difusão do suco gástrico nas esferas é limitada, dificultando assim a interação com o suco gástrico.

É importante ressaltar que os meios simulados usados nos testes podem diferir significativamente na literatura. Em relação ao meio gástrico simulado, a maioria dos autores utilizam somente a solução salina com pH corrigido ao ponto de estudo (LEE e HEO, 2000), poucos colocam em sua formulação enzimas (CHARTERIS *et al.*, 1998; MICHIDA *et al.*, 2006). O mesmo ocorre para suco intestinal simulado em que alguns trabalhos utilizam solução salina

com diferentes concentrações de sais biliares (MANDAL *et al.*, 2006). Já outros autores empregam a pancreatina associada aos sais biliares (MICHIDA *et al.*, 2006).

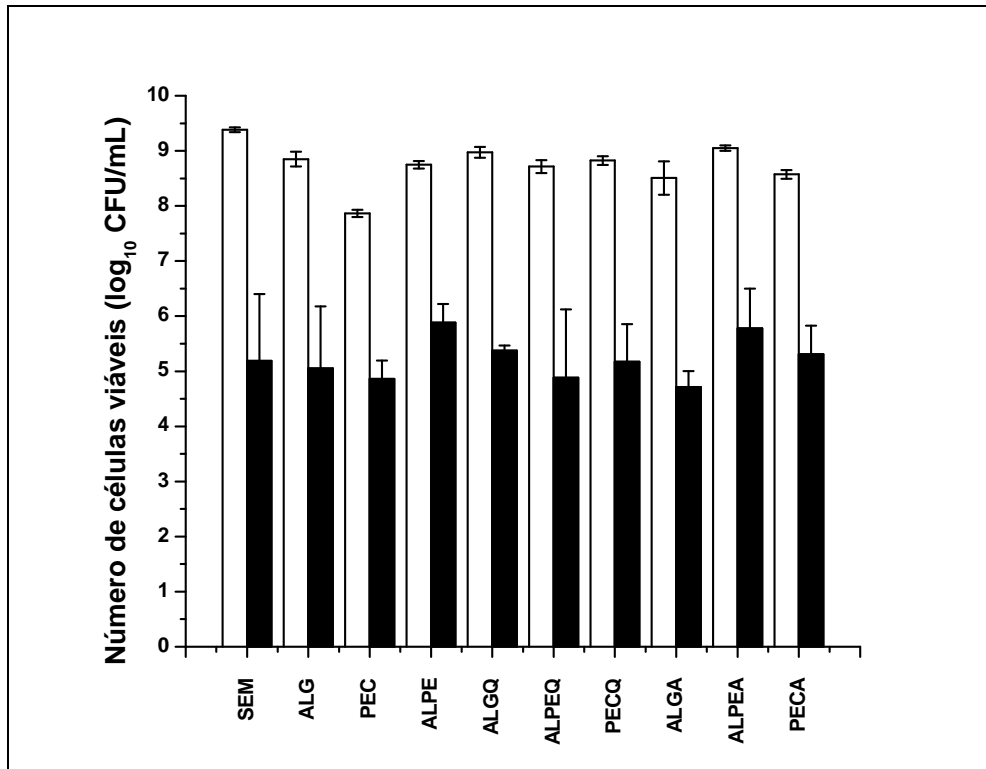


Figura 21: Variação do número de células viáveis de *L. plantarum* submetido a SGS entre tempo 0 e 120 min. (barra brancas) número inicial de células (barras pretas) número final de células.

Apesar das técnicas de imobilização utilizadas no presente trabalho não terem apresentado diferença significativa em relação às células livres quando submetidas ao SGS, verifica-se que de acordo com a Legislação do Brasil (BRASIL, 2008) poderia ser adicionada pequena quantidade de esferas com os microrganismos a uma porção de produto recomendada para atender a exigência mínima ( $10^8$  a  $10^9$  UFC por porção recomendada) já que não houve morte total do *L. plantarum*. Assim, uma das exigências para a comprovação e

utilização de cepas probióticas em alimentos, que é sua resistência às condições gastrointestinais, foi comprovada e permitiria o uso desta em produtos no futuro, bem como a liberação de tal microrganismo pela ANVISA.

#### **4.4.2 Resistência à condição de refrigeração**

Um dos parâmetros para que um determinado microrganismo seja considerado probiótico é a sua capacidade de resistir durante o período de estocagem do produto no qual estará inserido (FAO/WHO, 2001; KOSIN e RAKSHIT, 2006). Geralmente, os produtos fermentados adicionados de probióticos devem ser armazenados durante a sua vida-de-prateleira sob refrigeração (~ 4 °C). Com o objetivo de avaliar a eficiência da imobilização em diminuir as perdas durante a estocagem sob refrigeração de *L. plantarum*, foram realizados experimentos em que foi comparada a sobrevivência do microrganismo imobilizado em relação às células livres.

Na Tabela 21 é apresentada a sobrevivência de *L. plantarum* em geladeira por um período de 38 dias. Pode ser observado que, no final do período, as células imobilizadas em PEC e ALGQ tiveram as menores perdas de viabilidade nas condições testadas em relação às células não imobilizadas. Contudo, observou-se a instabilidade da imobilização com pectina 4 % durante o período de estocagem, ou seja, havia a solubilização das esferas e separação das células do material imobilizado. Já a imobilização com ALGQ apresentou boa estabilidade e também houve pequena perda de viabilidade do *L. plantarum* durante o período de estocagem. Krasaekoopt, Bhandari, e Deeth *et al.* (2003) comentam que tratamentos especiais, como cobertura das esferas, são utilizados para melhorar as propriedades das esferas. Nestes

processos a realização de ligações cruzadas com polímeros catiônicos, cobertura com outros polímeros, mistura com amido e incorporação de aditivos pode melhorar a estabilidade das esferas.

**Tabela 21: Redução de número de células viáveis de *L. plantarum* durante 38 dias de armazenamento sob refrigeração à 4 °C.**

Ensaio	Log <sub>10</sub> (N <sub>0</sub> /N)
PEC	1,95±0,08 <sup>a</sup>
ALGQ	2,17±0,49 <sup>a</sup>
ALPE	2,96±0,20 <sup>a,b</sup>
ALPEQ	3,62±0,22 <sup>b,c</sup>
PECQ	3,64±0,10 <sup>b,c</sup>
ALPEA	3,85±0,10 <sup>b,c</sup>
ALG	4,35±0,33 <sup>c,d</sup>
ALGA	5,28±0,92 <sup>d</sup>
PECA	5,40±0,71 <sup>d</sup>
SIMO	6,73±0,13 <sup>e</sup>

Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey (p < 0,05).

#### 4.4.3 Resistência à estocagem sob refrigeração em iogurte

A imobilização com ALGQ foi escolhida para verificação da manutenção da estabilidade de *L. plantarum* em iogurte. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10<sup>8</sup> a 10<sup>9</sup> UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008). A Figura 22 apresenta a viabilidade de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ em iogurte em condições de estocagem sob refrigeração. Como pode ser observado, neste sistema houve boa manutenção da viabilidade do probiótico, tendo havido somente 0,55 ciclos logarítmicos de perda de viabilidade. O número de UFC mL<sup>-1</sup> do produto manteve-se acima de 10<sup>9</sup>, indicando que este produto se enquadraria dentro da legislação brasileira podendo usar a alegação na embalagem de probiótico. Estes experimentos

demonstram a eficiência da técnica em aumentar a sobrevivência dos lactobacilos estudados durante o armazenamento.

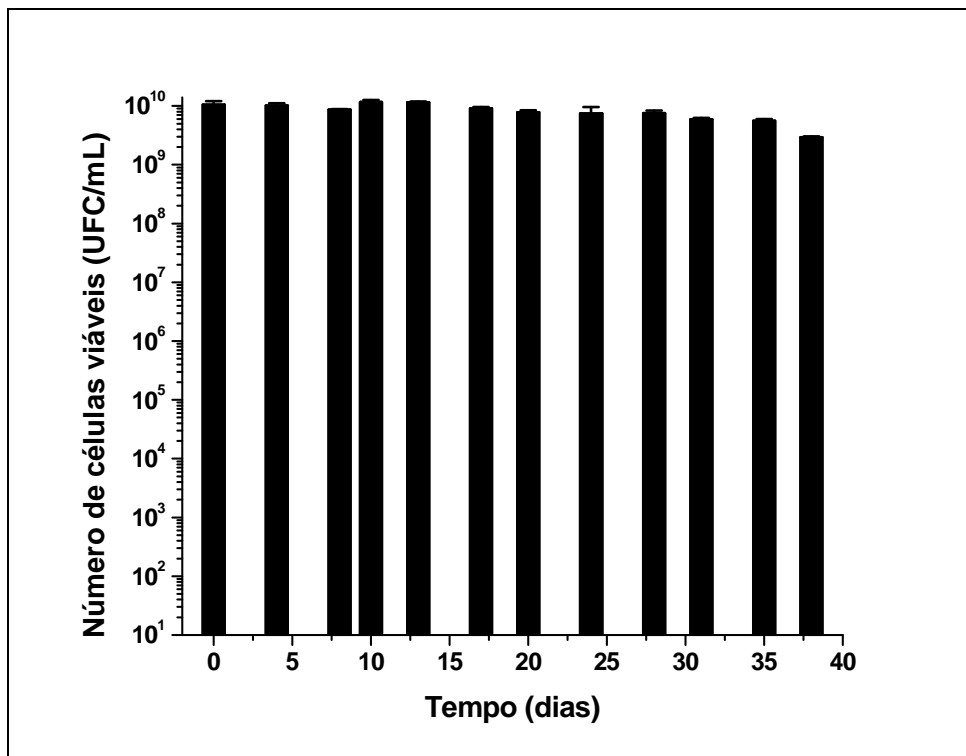


Figura 22: Viabilidade de *L. plantarum* imobilizado em ALGQ em iogurte em condições de estocagem sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Diversos trabalhos reportam a melhora da viabilidade de probióticos quando microencapsulados e submetidos às condições de estocagem sob refrigeração em iogurte (KAILASAPATHY, 2006; PICOT e LACROIX, 2004) e queijo (ÖZER, UZUN, E KIRMACI, 2008; ÖZER *et al.*, 2009).

Adhikari *et al.* (2000) verificaram em seu estudo com bifidobactérias encapsuladas em  $\kappa$ -carragena que a viabilidade destas em iogurte durante 30 dias de estocagem sob refrigeração apresentou uma diminuição de 78 e 70,5 % na população de *B. longum* B6 e *B. longum* ATCC 15708, respectivamente, para as bactérias livres, enquanto que para os tratamentos de encapsulação não houve diferença na população bacteriana.

O tratamento de encapsulação em alginato recoberto com quitosana também foi efetivo para aumentar a viabilidade de *L. acidophilus* 547 e *L. casei* 01 em aproximadamente 1 ciclo logarítmico em relação às respectivas células de probióticos livres no estudo realizado por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2006) quando aplicados em iogurte e colocados em condições de refrigeração a 4 °C por 4 semanas.



## 5 CONCLUSÕES

O soro de queijo se apresentou como um bom componente na base da formulação do meio de cultivo, apresentando rendimentos de biomassa semelhantes ao caldo MRS. A hidrólise enzimática do soro de queijo permitiu a diminuição da formação de precipitados durante a esterilização do meio.

A alta acidificação do caldo fermentado pelas LAB estudadas demonstrou que os estudos com estes tipos de meio devem ser conduzidos com controle de pH para que não haja a inibição pelos ácidos orgânicos formados.

A metodologia de Placket-Burman permitiu a escolha das variáveis que apresentavam maior influência na produção de biomassa, diminuindo assim o número de experimentos a ser realizados. Os resultados do DCCR levaram a uma produção de biomassa de 10,2 g L<sup>-1</sup> com seguintes condições de cultivos: 140 g L<sup>-1</sup> de lactose; 15 g L<sup>-1</sup> peptona; 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,04 g L<sup>-1</sup> de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, pH 5,2; velocidade de agitação de 200 rpm; 34 °C e 3,5 vvm.

A viabilidade de *L. plantarum* não foi afetada pelo SIS tanto na forma livre quanto imobilizada. Já o meio SGS diminuiu drasticamente a viabilidade do *L. plantarum* em todas as condições testadas. A imobilização em ALGQ foi eficiente na manutenção da estabilidade do probiótico sob condição de estocagem em temperatura de refrigeração e quando este método de imobilização foi usado em iogurte houve menor perda em relação ao meio salino previamente utilizado.

O presente trabalho demonstra a possibilidade de utilização comercial da cepa de *L. plantarum* estudada, uma vez que esta apresentou alto rendimento de biomassa, um aspecto determinante para que sua aplicação seja economicamente viável. Além disso, a cepa se mostrou resistente ao suco intestinal simulado e à condição de estocagem sob refrigeração outros dois aspectos necessários que devem ser atendidos para a sua implementação em produtos comerciais. A resistência ao suco gástrico simulado foi baixa, contudo ainda pequena população permaneceu viável, demonstrando certa resistência às condições ácidas testadas. Assim, os estudos em relação aos demais critérios para a seleção de probióticos devem ser realizados para que esta possa ser utilizada comercialmente.

## 6 PERPECTIVAS

Este trabalho permitiu o estudo da produção de *Lactobacillus plantarum* isolado de queijo serrano em cultivo submerso em biorreator, além de estudos da viabilidade da cepa frente a condições simuladas de trânsito gastrointestinal e sob armazenamento em condição de refrigeração. Os resultados demonstram a potencialidade da cepa em ser utilizada como probiótico e novas pesquisas em relação ao tema merecem ser realizadas.

Quanto à seleção de cepas probióticas:

- Uma forma alternativa de realização da seleção de probióticos para serem resistentes as condições de estresse seria a utilização de um meio ácido diferenciado e verificação da eficiência da manutenção da viabilidade.

Quanto à produção do probiótico:

- Realizar estudo da produção submersa através da batelada alimentada, visto que esta técnica apresenta resultados promissores em relação à produção de biomassa.

- Estudo de outras configurações de biorreator para a produção de biomassa, como biorreator com membranas de eletrodialise para remoção constante do ácido láctico produzido.

- Estudo das atividades enzimáticas de enzimas associadas ao crescimento durante cultivo submerso em biorreator.

Quanto à imobilização:

- Utilização de outras técnicas de imobilização, como membranas de microfiltração que podem possibilitar a formação de uma matriz mais estável.

- Estudo da estabilidade da cepa de probiótico em outros sistemas alimentícios, como sorvete (verificação da estabilidade frente ao congelamento), misturas em pó (verificação da estabilidade frente ao baixa atividade de água).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, K. *et al.* Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1946-1951, 2000.

ANGELOV, A. *et al.* Development of a new oat-based probiotic drink. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 75-80, 2006.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiolog and Funcional Aspects**. Ed. Marcel Dekker: New York, 2ª Ed, 1998.

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and Probiotic Action. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiolog and Funcional Aspects**. Ed. Marcel Dekker: New York, 2ª Ed, 1998.

BERNARDEAU, M. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278-285, 2008.

BEVILACQUA A, *et al.* Combined effects of pH, yeast extract, carbohydrates and di-ammonium hydrogen citrate on the biomass production and acidifying ability of a probiotic *Lactobacillus plantarum* strain, isolated from table olives, in a batch system, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p.1721–1729. DOI 10.1007/s11274-008-9666-x. 2008.

BHATIA, S.R.; KHATTAK, S.F.; ROBERTS, S.C. Polyelectrolytes for cell encapsulation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 45-51, 2005.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup> -Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089-1096, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567>. Acesso em: dezembro de 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos / Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos . Atualizado em julho de 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: dezembro de 2008.

BUJALANCE C. *et al.* A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 572–575, 2006.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v. 39, p. 203-211, 2006.

CASTALDO, C. *et al.* Surface displaced alfa-enolase of *Lactobacillus plantarum* is a fibronectin binding protein. *Microbial Cell Factories*, v. 8, p.14-23, 2009.

CENCI-GOGA, B.T. *et al.* Use of starter cultures of dairy origin in the production of *Salame nostrano*, an Italian dry-cured sausage. **Meat Science**, v. 78, p.381-390, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 61-84, 2005.

CHAPLIN, M.F. Monosaccharides. In: CHAPLIN M.F.; KENNEDY, J.F. (eds). *Carbohydrate Analysis*. IRL Press, Oxford, 1986, p.1-3.

CHARTERIS, W.P.; *et al.* Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic

*Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n., p.759-768, 1998.

CHEN, K-N; CHEN, M-J; LIN, C-W. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 313-320, 2006.

CONNELLY P. *Lactobacillus plantarum* - a literature review of therapeutic benefits. **Journal of the Australian Traditional-Medicine Society**, v. 14, n.2, p. 79-82, 2008

DE MAN, J.C; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DE SOUZA, C.H.B. *et al.* Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 871-877, 2008.

DE VRIES, M. C. *et al.* *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1018-1028, 2006.

ENOMOTO, M. *et al.* Oral administration of *Lactobacillus plantarum* NRIC0380 suppresses IgE production and induces CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> cells in vivo. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 457-460, 2009.

FAO/WHO: Report on joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).

Acesso em: setembro de 2005.

FU, W; MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, p. 163-170, 1999.

GBASSI, G.K. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

GEREZ, C.L. *et al.* *Lactobacillus reuteri* CRL 1100 as starter culture for wheat dough fermentation. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 253-259, 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J.A. *et al.* Influence of a defined-strain starter and *Lactobacillus plantarum* as adjunct culture on volatile compounds and sensory characteristics of Manchego cheese. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 1, p. 181-190, 2008.

GRAFF S. *et al.* Increased Intestinal Delivery of Viable *Saccharomyces boulardii* by Encapsulation in Microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1290-1296 , 2008.

GUERRA, N.P.; RUA, M.L.; PASTRANA, L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 267-281, 2001.

HA, M-Y. *et al.* Kinetics Analysis of Growth and Lactic Acid Production in pH-Controlled Batch Cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 Using Yeast Extract/Corn Steep Liquor/Glucose Medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 134-140, 2003.

HEENAM, C.N. *et al.* Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 461-466, 2004.

HENG, P.W.S; CHAN, L.W.; WONG, T.W. Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique. **Journal of Microencapsulation**, v.20, n.3, p.401-413, 2003.

HEINEMAN, P.G. Orla-Jensen's classification of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 3, p. 143-155, 1920.



HOLZAPFEL, W.H. *et al.* Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American journal of clinical nutrition**, v.73(suppl.), n.2, p. 365s-373s, 2001.

HORN, S.J.; ASPMO, S.I.; EIJSINK, V.G.H. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1082-1089, 2005.

HUJANEN, M. *et al.* Optimization of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 126-130, 2001.

HUJANEN, M.; LINKO, S. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+) – lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 307-313, 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 6<sup>a</sup> Edição, 711p., 2005.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT**, v. 39, p. 1221–1227, 2006.

KASK, S.; *et al.* A study on growth characteristics and nutrient consumption of *Lactobacillus plantarum* in A-stat culture. **Antonie van leeuwenhoek**, v. 75, p.309–320, 1999.

KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, p. 232-237, 2003.

KOSIN, B.; RAKSHIT, S.K. Microbial and Processing Criteria for Production of Probiotics: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 371-379, 2006.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126-139, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737–743, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT**, v. 39, p. 177-183, 2006.

KUSHAL, R.; ANAND, S.K.; CHANDER, H. Effect of feeding micro-entrapped co-culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on the immune response and protection of mice infected with *Salmonella typhimurium*. **Lait**, v.86, n.5, p. 387–399, 2006.

LAITILA, A. *et al.* Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 336-340, 2004.

LEAL-SÁNCHEZ M.V. *et al.* Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4465–4471, 2002.

LEE, K-Y; HEO, T-R. Survival of *Bifidobacterium longum* Immobilized in Calcium Alginate Beads in Simulated Gastric Juices and Bile Salt Solution. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869-873, 2000.

LIM, S-M.; AHN, D-H.; IM; D-S. Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* K11 on the Adhesion of *Escherichia coli* O157 to Caco-2 Cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 343-349, 2009.

- LIU, X.D. *et al.* Characterization of structure and diffusion behaviour of Calcium alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 6, p. 775-782, 2002.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Review: Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.
- MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n.4, p. 1199-1208, 2007.
- MANDAL, S.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1190-1195, 2006.
- MARAGKOUidakis, P.A. *et al.* Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 189-199, 2006.
- McDONALD, L.C.; FLEMING, H.P.; HASSAN, H.M. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2120-2124, 1990.
- METCHNIKOFF, E: **Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction**. In: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London: 161-183, 1907.
- MICHIDA, H. *et al.* Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006.
- MILLER, A.; MORGAN, M.E.; LIBBEY, L.M. *Lactobacillus maltaromicus*, a New Species Producing a Malty Aroma. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 346-354, 1974.
- MOKARRAM, R.R. *et al.* The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Research International**, v. 42, p. 1040–1045, 2009.

MONTGOMERY, D. C. Design and analysis of experiments. NEW YORK: JOHN WILEY & SONS, 5TH ED, 689p., 1997.

MORA, D. *et al.* Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller *et al.* 1974) DSM 20342T and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins *et al.* 1987) DSM 20730T and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 675-678, 2003.

ÖZER, B. *et al.* Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 22-29, 2009.

ÖZER, B.; UZUN, Y.S.; KIRMACI, H.A. Effect of Microencapsulation on Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 During Kasar Cheese Ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 3, p. 237-244, 2008.

PANESAR, P.S. *et al.* K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p.1-14, 2007.

PASSOS, F.V. *et al.* Modeling the specific growth rate of *Lactobacillus plantarum* in cucumber extract. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 40, p. 143-150, 1993.

PASSOS, F.V. *et al.* Kinetics and modeling of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2627-2636, 1994.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505–515, 2004.

PINTADO, J.; RAIMBAULT, M.; GUYOTA, J-P. Influence of polysaccharides on oxygen dependent lactate utilization by an amylolytic *Lactobacillus plantarum* strain, **International Journal of Food Microbiology** ,v. 98, p. 81– 88, 2005.

PLACKETT, R.L.; BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v.33, p.305–325, 1946.

QIN, H. *et al.* *L. plantarum* prevents *Enteroinvasive Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 63-71, 2009.

SAGUIR, F.M.; CAMPOS, I.E.L.; NADRA, M.C.M. Utilization of amino acids and dipeptides by *Lactobacillus plantarum* from orange in nutritionally stressed conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1597-1604, 2008.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, p.394-406, 2006.

SHEU, T.Y.; MARSHALL, R.T. Microentrapment of Lactobacilli in alginate gels. **Journal of Food Science**, v.54, n.3, p.557-561, 1993.

SILVA, C.M. *et al.* Microencapsulation of hemoglobin in chitosan-coated alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **AAPS JOURNAL**, v.7, n.4, p.E903-E913, 2005.

SIMPSON, N.E. *et al.* NMR properties of alginate microbeads. **Biomaterials**, v.24, n.27, p.4941-4948, 2003.

SINCLAIR CG, CANTERO D. Fermentation modelling. In: McNeil B, Harvey LM, editors. Fermentation: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1990. p. 65–112.

SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 1-11, 1996.

SOUZA, C.F.V. Evolução das características microbiológicas durante a elaboração e maturação do queijo serrano. Dissertação de mestrado, UFRGS, Faculdade de Agronomia, PPGMAA, Porto Alegre, 139f., 2002.

STANTON, C. *et al.* Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

STEVENS, M.J.A. *et al.* Improvement of *Lactobacillus plantarum* aerobic growth as directed by comprehensive transcriptome analysis, **Applied Environmental Microbiology**, v. 74, p.4776–4778, 2008.

SULTANA, K. *et al.* Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p.47-55, 2000.

TANGO, M.S.A.; GHALY, A.E. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions, **Biomass Bioenergy**, v. 16, p. 61-78, 1999.

TEUSINK, B.; SMID, E.J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 46-56, 2006.

THO, I.; SANDE, S.A.; KLEINEBUDDE, P. Cross-linking of amidated low-methoxylated pectin with calcium during extrusion/spheronisation: Effect on particle size and shape. **Chemical Engineering Science**, v. 60, p. 3899 – 3907, 2005.

THU, B. *et al.* Alginate polycation microcapsules: I. Interaction between alginate and polycation. **Biomaterials**, v.17, n.10, p.1031-1040, 1996.

TOLONEN, M. *et al.* Formation of nisin, plant-derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 167-179, 2004.

TSENG, C-P.; MONTVILLE, T.J. Enzyme activities affecting end product distribution by *Lactobacillus plantarum* in response to changes in pH and O<sub>2</sub>. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 56, n.9, p. 2761-2763, 1990.

TSENG, C-P.; MONTVILLE, T.J. Enzymatic regulation of glucose catabolism by *Lactobacillus plantarum* in an aerobic chemostat. **Biotechnology Progress**, v.8, n.2, p.126-131, 1992.

TSENG, C-P.; TSAU, J-L; MONTVILLE, T.J. Bioenergetic consequences of catabolic shifts by *Lactobacillus plantarum* in response to shifts in

environmental oxygen and pH in chemostat cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n.14, p. 4411-4416, 1991.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1427-1430, 2006.

YOUSSEF, C.B.; GOMA, G; OLMOS-DICHAHA, A. Kinetic modelling of *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* growth and lactic acid production in batch cultures under various medium conditions. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1785-1789, 2005.