



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ELINALVA MACIEL PAULO

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) POR
BACTÉRIAS LÁTICAS VISANDO ENCAPSULAÇÃO DE
Lactobacillus acidophilus La-5 PELO PROCESSO DE
SPRAY DRYING**

Feira de Santana, BA

2010

ELINALVA MACIEL PAULO

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) POR
BACTÉRIAS LÁTICAS VISANDO ENCAPSULAÇÃO DE
Lactobacillus acidophilus La-5 PELO PROCESSO DE
SPRAY DRYING**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque (UFBA)
Coorientadora: Profa. Dr^a. Sandra Aparecida de Assis (UEFS)

Feira de Santana, BA

2010

Ofereço esta tese a minha mãe Juventina Maciel Paulo (*in memóriam*) e ao meu pai Antônio Paulo (*in memóriam*), por terem sido responsáveis pela minha formação moral, psíquica e intelectual. E aos meus irmãos (Evangivaldo, Eliana, Eloina, Elenice, Wellington, Ivana e Antônio Paulo) por estarem sempre torcendo por mim e pelo bom convívio que temos entre família.

Dedico esta tese ao meu companheiro José Ferreira Sena Neto (Ferreirinha) pelo amor, carinho e dedicação que tem me ofertado desde que nós nos conhecemos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço esta tese, primeiramente a Deus, por ter sido gerada por pais que cumpriram bem a sua missão, construindo uma família harmoniosa;

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram e me apoiaram na construção deste trabalho como:

Ao meu companheiro José Ferreira pelo apoio, paciência e tolerância nas minhas horas difíceis;

Ao meu orientador Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque, pela confiança depositada em mim, e por deixar o meu trabalho fluir sem pressão;

A minha co-orientadora Prof. Dra. Sandra Aparecida de Assis pelo acompanhamento técnico durante toda a execução deste trabalho, e pela amizade firmada no decorrer destes anos;

Aos meus estagiários Murilo Vasconcelos, Ivelise Santiago e Helen Affe, pela imensa ajuda que me deram na fase experimental;

Ao Pesquisador Itamar Soares de Melo, por ter me convidado para realizar uma parte experimental deste trabalho na Embrapa Meio Ambiente e pelo apoio, estímulo e exemplo de competência;

A Claudia Medugno, também pesquisadora da Embrapa, uma pessoa muito especial, solidária e humana, que me ajudou de forma incondicional na execução deste trabalho;

Aos técnicos da Embrapa João Luis, Márcia Parma, Rosely, Sereda e Elke e às meninas (os) da pós-graduação que compartilharam comigo o laboratório da Embrapa, e que me proporcionaram dias agradáveis. A Suikinai, Miriam, Ruth e Guta que me acolheram na república;

Agradeço também às meninas do laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências e Saúde da UFBA, Josilene, Bethânia, e Lílian e ao prof. Paulo Almeida;

Agradeço a profa. Nádia, Danilo Hansen, Ângela Valente e Elisângela Boffo, pela ajuda que me deram na química analítica e ao prof Sérgio Ferreira e Lindomar Portugal pela grande ajuda no planejamento experimental;

Não posso esquecer da minha colega do LAMASP, profa. Dr. Suzi Barboni, pela amizade e pelo pontapé inicial para a realização deste curso, e por estar sempre torcendo pelo meu sucesso.

E finalmente agradeço os participantes da banca Prof. Dr. Alexandro Branco, Profa. Dra. Maria Inês Ré, Profa. Dra. Ângela Valente e Profa. Dra. Samira Abdallah Hanna pelas contribuições para o arremate final deste trabalho.

“O importante não é aprender cada vez mais sem fazer,
e sim, fazer cada vez mais com o pouco que se
aprendeu”

Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas, visando encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 pelo processo de spray drying

RESUMO

As células bacterianas quando estão em ambientes agressivos para a sua sobrevivência desenvolvem um sistema de proteção, constituído principalmente por exopolissacarídeos. Este processo foi desenvolvido artificialmente pela microencapsulação. O passo inicial na microencapsulação é a seleção do polímero adequado. Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas não constam na literatura como polímeros utilizados para o processo de microencapsulação. Assim, este estudo teve como objetivo produzir exopolissacarídeos de bactérias lácticas, visando a sua utilização na microencapsulação dos *L. acidophilus* La-5 pelo processo do *spray drying*, para fins de preservação. As bactérias lácticas foram isoladas de alimentos provenientes da região do semi-árido baiano. Foi realizada, triagem e seleção de bactérias lácticas produtoras de EPS, A linhagem selecionada como maior produtora deste biopolímero o *Leuconostoc pseudomesenteroides*, apresentando 60,2 g/L de rendimento em EPS bruto. Dois tipos de exopolissacarídeos (EPS I e EPS II) foram produzidos por esta linhagem sendo ambos identificados como dextrana (1-6). O EPS I foi utilizado na encapsulação de células de *L. acidophilus* La-5 utilizando o processo de *spray drying*, utilizados três tipos de materiais encapsulantes: dextrana, alginato e mistura de alginato + dextrana. Os estudos morfológicos e granulométricos nas micropartículas demonstraram a formação de partículas heterogêneas nos três tratamentos com tamanho médio de 8 µm de diâmetro. As percentagens de sobrevivência das células

nas microcápsulas de dextrana, alginato e alginato/dextrana, armazenadas a 4 °C durante 120 dias, foram 69,7%, 77,2% e 56,3%, respectivamente. Os resultados mostraram que a dextrana poderá servir como mais uma alternativa de polímero encapsulante de micro-organismos.

Palavras-chave: Microencapsulação. *Lactobacillus acidophilus*. Dextrana, Bactérias láticas.

**Production of exopolysaccharides (EPS) by lactic acid bacteria in order
encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by the process of spray
drying**

ABSTRACT

The bacterial cells when they are in harsh environments for survival develops a protection system, consisting primarily of exopolysaccharides. This process was developed artificially by microencapsulation. The initial step in the microencapsulation is the selection of appropriate polymer. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria do not appear in the literature as polymers used for the microencapsulation process. This study aimed to produce exopolysaccharides from lactic acid bacteria, aiming its use in the microencapsulation of *L. acidophilus* La-5 by the process of spray drying for preservation purposes. Lactic acid bacteria were isolated from foods from the region of the semi-arid region. Was performed, screening and selection of lactic acid bacteria producing EPS, The strain selected as the largest producer of this biopolymer pseudomesenteroides *Leuconostoc*, with 60.2 g / L of gross income in EPS. Two types of exopolysaccharides (EPS I and EPS II) were produced by this strain were both identified as dextran (1-6). EPS I was used in the encapsulation of cells of *L. acidophilus* La-5 using the spray drying process, used three types of encapsulating materials: dextran, alginate and alginate + dextran mixture. The morphological and granulometric in the microcapsules showed the formation of heterogeneous particles in the three treatments with an average size of 8 mm in diameter. The percentages of survival of cells in dextran

microspheres, alginate and alginate / dextran, stored at 4 ° C for 120 days were 69.7%, 77.2% and 56.3% respectively. The results showed that the dextran can serve as an alternative method of encapsulating polymer micro-organisms.

Keywords: Microencapsulation. *Lactobacillus acidophilus*. Dextran. Lactic acid bacteria.

	INTRODUÇÃO GERAL	1
	REFERÊNCIAS	3
	OBJETIVO GERAL	5
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
	CAPÍTULO 1. Bactérias láticas - Uma abordagem geral.	6
1.1	INTRODUÇÃO	7
1.2	Bactérias láticas	8
1.3	Estudos taxonômicos das bactérias láticas	9
1.4	Principais gêneros de bactérias láticas	13
1.5	Características metabólicas	21
1.5.1	Fermentação de carboidratos	21
1.5.2	Condições ótimas de crescimento	23
1.6	Isolamento e identificação de bactérias láticas	25
1.7	Manutenção das bactérias láticas	27
1.8	Importância tecnológica	28
1.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO 2. Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo da microencapsulação de bactérias: Uma revisão.	44
2.1	INTRODUÇÃO	45
2.2	Microencapsulação	46
2.3	Processos da microencapsulação	47
2.3.1	Coacervação	47
2.3.2	Polimerização interfacial	48
2.3.3	Gelificação iônica	48
2.3.4	Incompatibilidade polimérica	49
2.3.5	Polimerização <i>In situ</i>	49
2.3.7	Lipossomas	49
2.3.8	Extrusão	50
2.3.9	<i>Spray drying</i>	50
2.4	Principais polímeros utilizados na microencapsulação	50
2.4.1	Alginatos	51
2.4.2	Quitosana	53
2.4.3	Pectina	53

2.4.4	Agarose	54
2.4.5	Carragenana	55
2.4.6	Goma arábica	55
2.4.7	Amido	56
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS	58
	CAPÍTULO 3. Estudo de biopolímeros: Enfoque em exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas.	65
3.1	INTRODUÇÃO	66
3.2	Polímeros microbianos	67
3.3	Exopolissacarídeos	70
3.3.1	Estrutura dos EPS	72
3.3.2	Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas	73
3.3.3	Biossíntese de EPS de bactérias lácticas	75
3.4	Condição de cultivo para produção de EPS	77
3.4.1	Linhagem bacteriana	77
3.4.2	Composição do meio	77
3.5	Recuperação e identificação de EPS	80
3.6	Identificação e caracterização de polímeros	82
3.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
	REFERÊNCIAS	83
	CAPÍTULO 4. Isolamento e triagem de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos de alimentos coletados da região do semi-árido baiano.	95
4.1	INTRODUÇÃO	97
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	99
4.2.1	Isolamento dos micro-organismos	99
4.2.2	Purificação dos isolados	100
4.2.3	Manutenção dos isolados	100
4.2.4	Reativações dos isolados	100
4.2.5	Triagem das bactérias lácticas produtoras de EPS	101
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
4.3.1	Isolamento e seleção de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos	102

4.3.2	Triagem das bactérias lácticas produtoras de EPS	103
4.4	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	107
	CAPÍTULO 5. Aplicação da metodologia de superfície de resposta (MSR) na otimização da produção de exopolissacarídeos pelas bactérias lácticas isoladas de alimentos coletados da região do semi-árido baiano.	112
5.1	INTRODUÇÃO	113
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	115
5.2.1	Micro-organismos testados	115
5.2.2	Planejamento Fatorial Completo $k = 2^4$	115
5.2.2.1	Preparo do pré-inóculo	116
5.2.2.2	Recuperação do EPS	116
5.2.3	Planejamento Fatorial Completo $k = 3^2$	117
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
5.3.1	Planejamento Fatorial Completo 2^4	118
5.3.2	Planejamento Fatorial Completo de Três Níveis: 3^2	124
5.4	CONCLUSÃO	140
	REFERÊNCIAS	140
	CAPÍTULO 6. Produção, extração e caracterização de exopolissacarídeos produzidos pela linhagem nativa <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> R2.	147
6.1	INTRODUÇÃO	149
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	150
6.2.1	Micro-organismo produtor do EPS	150
6.2.2	Produção de exopolissacarídeos	150
6.2.3	Extração dos exopolissacarídeos	150
6.2.4	Identificação estrutural dos exopolissacarídeos	151
6.2.4.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	151
6.2.4.2	Ressonância magnética nuclear	151
6.2.5	Caracterização dos EPS	152
6.2.5.1	Análise termogravimétrica (TGA)	152
6.2.5.2	Viscosidade aparente	152
6.2.5.3	Solubilização	153
6.2.5.4	Densidade aparente de livre empacotamento	153

6.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	154
6.3.1	Extração e purificação de exopolissacarídeos produzidos pelo <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> R2	154
6.3.2	Identificação dos exopolissacarídeos	156
6.3.2.1	Precipitado EPS I	156
6.3.2.2	Precipitado EPS II	164
6.3.3	Caracterização das dextranas produzidas pelo <i>L. pseudomesenteroides</i> R2	167
6.3.3.1	Análise termogravimétrica	167
6.3.3.2	Densidade aparente de livre empacotamento	168
6.3.3.3	Determinação da viscosidade	166
6.3.3.4	Solubilização dos exopolissacarídeos	170
	CONCLUSÃO	170
	REFERÊNCIAS	171
	CAPÍTULO 7. Estudo da utilização da dextrana nativa produzida pelo <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> R2 na formação de micropartículas de <i>Lactobacillus.acidophilus</i> La-5 pelo método da atomização em <i>spray drying</i>.	177
7.1	INTRODUÇÃO	179
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS	182
7.2.1	Micro-organismo microencapsulado	182
7.2.2	Polímeros utilizados	182
7.2.3	Preparo da bactéria para a formação das microcápsulas	183
7.2.4	Preparo da suspensão	183
7.2.5	Formação das microcápsulas	183
7.2.6	Análises morfológicas das microcápsulas	185
7.2.6.1	Análise da distribuição de tamanho das microcápsulas	185
7.2.6.2	Análise das partículas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	185
7.2.7	Viabilidade das células durante o período de estocagem	186
7.2.8	Dissolução das microcápsulas	186
7.2.9	Delineamento estatístico	187
7.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	187
7.3.1	Microencapsulação das células de <i>L. acidophilus</i>	187
7.3.2	Análise microscópica das microcápsulas	189
7.3.3	Distribuição dos tamanhos das microcápsulas	190
7.3.4	Viabilidade das células de <i>L. acidophilus</i> nas microesferas formadas	192

7.3.5	pelo <i>spray drying</i> . Dissolução das microcápsulas	198
7.4	CONCLUSÃO	199
	REFERÊNCIAS	200
	CONCLUSÃO GERAL	205
	ANEXO I	206
	Identificação do isolados de bactéria láctica R2 pelas características morfológicas e pelo kit API 20 (Biomérieux)	
	ANEXO II	209
	Identificação molecular isolado de bactéria láctica R2	
	ANEXO III	212
	Teste de patogenicidade <i>in vitro</i> do <i>Leuconostoc. pseudomesenteroides</i> R2	

INTRODUÇÃO GERAL

Este trabalho foi dividido em 7 capítulos, sendo os três primeiros de revisão bibliográfica para dar suporte teórico aos capítulos restantes que são de pesquisa experimental. No Capítulo 1 foram abordadas as características gerais de bactérias lácticas. O ecossistema da região do semi-árido do nordeste brasileiro abriga uma microbiota que apresenta uma biodiversidade ainda pouco explorada, tornando interessante o isolamento de micro-organismos potencialmente produtores de metabólitos de interesse biotecnológico. Entre estes micro-organismos encontram-se as bactérias ácido lácticas ou simplesmente bactérias lácticas (BL), cuja denominação vem do fato de fermentarem os carboidratos gerando como principal produto final o ácido láctico. Estas bactérias são quimiorganotróficas fastidiosas, possuindo habilidade biossintética limitada (RIVAS, et al., 2004). São isoladas principalmente de vegetais fermentados, mas podem ser encontradas em carnes, leite, plantas, solo e fazendo parte da microbiota normal do hospedeiro (MAGNUSSON, et al., 2002).

Se aconselha que a identificação das BL seja realizada pela taxonomia polifásica, pois a percentagem de identificação pelo sistema fenotípico tradicional e pelos kits API 20 STREP e API 50 CHL possuem uma pobre correlação com o PCR (KULWICHIT et al., 2007).

As bactérias lácticas possuem interesse industrial, pois são grandes produtoras de ácido láctico e muitas espécies possuem a capacidade de produzir biopolímeros de diferentes estruturas, e com diferentes aplicações (LAWS et al., 2001). Este assunto é discutido no Capítulo 2. Os biopolímeros sintetizados de maior aplicação industrial são constituídos principalmente por polissacarídeos extracelulares, também denominados exopolissacarídeos (EPS), devido ao fato de apresentarem um processo de extração e purificação simples (PORTILHO, 2002). Os EPS de BL têm grande aceitação no mercado e são utilizados principalmente na indústria de alimentos como estabilizantes, espessantes e gelificantes (MATOS; ROZENFELD, 2005).

O Capítulo 3 aborda, na forma de revisão, polímeros utilizados no processo da microencapsulação. A microencapsulação é um processo de formação de micropartículas, podendo ser realizada por diferentes métodos. O método de atomização em *spray drying* é o mais utilizado para microencapsular bactérias e consiste em obter micropartículas pela aspersão de um fluido em uma corrente de ar quente (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

Diversos polímeros já foram testados na microencapsulação de micro-organismos utilizando o processo de secagem pelo *spray drying*, mas muitos destes polímeros não conseguem manter uma alta percentagem de sobrevivência das células, logo após o processo ou manter as células viáveis nas microcápsulas por um período de tempo prolongado (O'RIORDAN et al., 2001). Por isso, faz-se necessário o estudo de novos polímeros visando manter o máximo possível a sobrevivência dos micro-organismos quando submetidos ao processo de *spray drying*.

O Capítulo 4 consiste de experimentos realizados com isolamento e triagem de bactérias láticas provenientes de amostras de leite e vegetais obtidas da região do semi-árido baiano e produtoras de EPS. Muitas espécies de bactérias láticas produzem EPS, mas em pequena quantidade, necessitando, portanto otimizar esta produção para que se torne viável comercialmente. No Capítulo 5 são descritos experimentos de otimização para a produção destes biopolímeros em bactérias ácido láticas. Em experimentos de maximização na produção de EPS está sendo bastante utilizado o planejamento de multivariáveis, tendo como ferramenta estatística a metodologia de superfície de resposta (KIM; DAY, 2008). O Capítulo 6 refere-se a experimentos de produção e extração de exopolissacarídeos produzidos pela linhagem de bactéria ácido lática com rendimento expressivo de EPS pelo processo da otimização. Para que este biopolímero seja identificado e caracterizado se faz necessário a sua purificação (SÁNCHEZ, et al, 2006) e aplicação de técnicas analíticas. As rotineiramente utilizadas são a espectroscopia por infravermelho, ressonância magnética nuclear, cromatografia em gel, difração em raios-X e análises termogravimétricas (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

O Capítulo 7 diz respeito aos experimentos de microencapsulação da bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* La-5 (fornecida pela Christian Acém), utilizando EPS extraído de caldo fermentativo de bactérias láticas, visando à preservação desta linhagem para fins comerciais. Esta linhagem bacteriana é

bastante sensível às condições ambientais, perdendo logo a sua viabilidade quando não estão sob qualquer processo de preservação. As microcápsulas atuam como barreira protetora, quando formadas por matriz polimérica resistente. (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002). Assim, é imprescindível que sejam realizados estudos da integridade das microcápsulas e da viabilidade das células microencapsuladas logo após o processo de microencapsulação e durante todo o tempo de armazenamento, para demonstrar a eficácia do processo de microencapsulação e conseqüentemente do polímero de imobilização destas células.

REFERÊNCIA

FAVARO-TRINDADE, C. S. ; GROSSO C. R. F. Microencapsulation of *Lactobacillus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bili. *Journal of Microencapsulation*,9, 485-494, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008.

KIM, M. D.; DAY, D. F.; Optimization of Oligosaccharide Synthesis from Cellobiose by Dextranase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Volume 148, Numbers 1-3 / March, 2008

KULWICHIT, W.; NILGATE, S.; CHATSUWAN, T.; KRAJIW, S.; UNHASUTA, C.; and CHONGTHALEONG, A. Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *Biomed Central Infectious Diseases*, 7, 69, 2007.

LAWS, A.; GU, Y. ; MARSHALL. V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*,19, 597-625, 2001

LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de polímeros*. Editora E-paper, Rio de Janeiro, 2001, 366p.

MAGNUSSON, J.; JONSSON, H.; SCHNULRER, J.; ROOS, S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, p. 831–834, 2002.

MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de albumina humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 21:4, 2005.

O'RIORDAN, K.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal Applied Microbiology*, 91, 1059-1066, 2001.

PORTILHO, M. *Avaliação da produção de exopolissacarídeos insolúvel por duas linhagens de Agrobacterium sp.* 2002. 86 f. Tese (doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; JUAN C. PARAJÓ, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 1, 93-98, 2004.

SÁNCHEZ, J. I.; MARTÍNEZ, J. B.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RODRÍGUEZ, A.. Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:12, 7495–7502, 2006.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Utilizar exopolissacarídeos de bactérias lácticas isoladas da região do semi-árido baiano na microencapsulação de células de *Lactobacillus acidophilus* La-5, pelo processo de *spray drying*, visando manter a sua preservação durante o período de comercialização.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias lácticas de alimentos fermentados provenientes da região do semi-árido baiano;
- Realizar triagem de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos;
- Selecionar uma linhagem produtora de EPS, através do melhor rendimento obtido no processo de otimização pelo Método de Superfície de Resposta (MSR);
- Produzir, extrair e purificar exopolissacarídeos da linhagem selecionada de BL;
- Identificar e caracterizar os exopolissacarídeos extraídos da BL láctica selecionada;
- Microencapsular células de *L. acidophilus* La-5 pelo processo de *spray drying*, utilizando a matriz exopolissacarídica;
- Realizar estudos morfológicos das micropartículas formadas pelo processo de *spray drying*;
- Acompanhar a viabilidade das células de *L. acidophilus* La-5 microencapsuladas durante 120 dias de armazenamento sob condição de refrigeração.

CAPÍTULO 1

BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS- UMA ABORDAGEM GERAL

Elinalva Maciel Paulo¹, Murilo Pinho Vasconcelos², Ivelise Santiago Oliveira³ Milton
Ricardo de Abreu Roque⁴

1 Docente do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), (elinalvamaciel@yahoo.com.br); ²Discente do curso de Ciências Biológicas – UEFS; ³Discente do curso de Tecnologia de Alimentos – UEFS; ⁴ Docente do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, UFBA.

RESUMO

Bactérias lácticas são caracterizadas por fermentar os carboidratos originando ácido láctico como principal produto final. São bactérias bastante exigentes nutricionalmente, apesar de serem encontradas em todos os ambientes. Normalmente não são patogênicas, e ao contrário, muitas espécies promovem benefícios à saúde humana e animal. Os seus metabólitos são de grande interesse tecnológico, consistindo em um mercado bastante expressivo em vários setores da indústria. Através da taxonomia polifásica as bactérias ácido lácticas foram reclassificadas em 16 gêneros. Alguns deles serão estudados nesta revisão, assim como, outros aspectos deste grupo como características, metabolismos e importância tecnológica.

Palavras-chave: Bactérias lácticas, taxonomia polifásica, importância tecnológica

LACTIC ACID BACTERIA: A GENERAL APPROACH

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are characterized by catabolized carbohydrates producing lactic acid as main end product. Bacteria are nutritionally very demanding, although they are found in all environments. Usually are not pathogenic, and unlike many species beneficially affect human and animal health. Its metabolites are of great technological interest, consisting of a very significant market in various sectors of industry. Through the polyphasic taxonomy of lactic acid bacteria have been reclassified in 16 genera. Some of them will be studied in this review, as well as other aspects of this group as characteristics, metabolism and technological importance.

Key words: Lactic acid bacteria, polyphasic taxonomy, technological importance

1.1 INTRODUÇÃO

A denominação das bactérias ácido lácticas ou simplesmente bactérias lácticas (BL) vem do fato de que a energia na forma de Adenosina Trifosfato (ATP) é obtida através da fermentação de carboidratos, produzindo ácido láctico como principal produto final (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). As primeiras definições de bactérias lácticas estavam relacionadas à capacidade que alguns grupos de bactérias tinham de fermentar o leite, atribuído à presença da lactose em grandes quantidades. Por isso, dentro deste grupo de bactérias constavam tanto os *Lactobacillus* quanto a *Escherichia coli*. Hoje é de conhecimento que algumas bactérias lácticas não fermentam a lactose (FERREIRA, 2003). Com o decorrer do tempo foi-se aprimorando as técnicas de identificação destas bactérias, acumulando-se mais conhecimentos sobre elas. Este artigo consiste em uma revisão sobre as bactérias lácticas abordando os principais tópicos da sua biologia, assim como a sua importância tecnológica.

1.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

O Manual Bergey's que trata da sistemática bacteriana (HOLT et al., 1989), define bactérias lácticas como sendo bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, desprovidas de citocromos, crescimento em condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose facultativa, com temperatura variando entre 35 °C a 40 °C. Salminen, Wright, e Ouwehand (2004), acrescentam outras características como: apresentam a morfologia cocos ou bacilos, possuem baixo teor de guanina + citosina (G-C), na sua maioria são imóveis, ácido tolerantes, não pigmentadas, não reduzem o nitrato, não liquefazem a gelatina e nem produzem sulfeto de hidrogênio. A maioria das bactérias lácticas é inativada em temperaturas superiores a 70 °C.

Como resultado de sua extrema especialização fisiológica, as bactérias lácticas são consideradas como bactérias fastidiosas, por isso confinadas a poucos ambientes naturais característicos. Algumas vivem em associação com vegetais e crescem às custas dos nutrientes liberados através da morte e da decomposição de tecidos vegetais. Outras podem ser encontradas em solos (MAGNUSSON, et al., 2002). As bactérias lácticas ocorrem em alimentos e bebidas preparadas a partir da fermentação de materiais vegetais: *pickles*, *chucrute*, silagem, vinho e cerveja. Em cerveja e vinho as bactérias lácticas são agentes deterioradores potenciais, que crescem e produzem uma acidez indesejável. Algumas bactérias lácticas fazem parte da microbiota normal do corpo animal, ocorrendo em número considerável na nosofaringe, trato intestinal e geniturinário.

Normalmente as BL não são patogênicas, exceto no gênero *Streptococcus* no qual podem ser encontrada algumas espécies com potencial de causar doenças no hospedeiro (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). Outro habitat característico das bactérias lácticas é o leite, para o qual elas têm acesso através do corpo do animal ou por materiais vegetais. A acidificação normal do leite é causada principalmente pelos *Lactococcus*, e tanto bactérias lácticas na forma de cocos ou bastonetes, desempenham importantes papéis na preparação de produtos lácteos fermentados (manteiga, queijos, iogurte, etc.) (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

1.3 ESTUDO TAXONÔMICO DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Em 1901 Beijerinck separou as bactérias lácticas em Gram-positivas e Gram - negativas por achar que a *Escherichia coli* pelo fato de fermentar o leite, também pertencia a este grupo (FERREIRA, 2003). No entanto quem primeiro tentou classificar as bactérias lácticas foi Orla - Jensen em 1919, apoiando-se em características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (quadro 1).

Nomenclatura	Morfologia/Gram	Fermentação	Catalase	Redução do nitrato	Gêneros correntes
<i>Betabacterium</i>	Bacilo / G +	Hetero	-	-	<i>Lactobacillus</i> <i>Weissella</i>
<i>Betacoccus</i>	Cocos / G +	Hetero	-	-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i>
<i>Microbacterium</i>	Bacilo / G +	Homo	+	+	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Cocos / G +	Homo	+	+	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bacilo / G +	Homo	-	-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bacilo / G +	Homo	-	-	<i>Lactobacillus</i> <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Cocos / G +	Homo	-	-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>

Quadro 1: Grupo de bactérias lácticas segundo Orla-Jensen.

Fonte: Holzapfel, 2001

Posteriormente houve uma reclassificação das bactérias lácticas, o que originou os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* constituindo o núcleo principal da sua classificação por várias décadas. As revisões taxonômicas destes gêneros através das medições das relações filogenéticas com seqüências de bases das frações 16S ou 23S de RNA ribossômico (RNAr) permitiram uma classificação em grupos filogenéticos (SCHLEIFER et al., 1991; HOLZAPFEL et al., 2001), dando origem a 16 gêneros incluídos ao filo Firmicutes: *Aerococcus*, *Alloicoccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. O gênero

Bifidobacterium normalmente é considerado como uma bactéria láctica, mas filogeneticamente não tem relação alguma com este grupo (RODRIGUEZ, 2003).

Tradicionalmente as bactérias lácticas têm sido classificadas com base nos critérios taxonômicos fenotípicos que incluem a aparência morfológica, em cocos, bacilos ou bastões. Os cocos são de forma esférica apresentando diâmetros entre 0,5 e 2,0 μm , se apresentam em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os bastões podem ter um diâmetro variável entre 0,5 e 2,0 μm e comprimento até maior que 10 μm , apresentando-se isolados, em pares ou cadeias longas (AXELSSON, 1993; HOLZAPFEL et al., 2001).

Os *Lactobacillus* e *Carnobacterium* são bacilos, os demais gêneros são cocos. Outras características fenotípicas das BL incluem o tipo de fermentação dos carboidratos (homofermentativos ou heterofermentativos), configuração levógira L(+) ou dextrógira D(-) do ácido láctico produzido, crescimento em diferentes temperaturas, tolerância ao sal (halotolerantes e não halotolerantes), tolerância ao meio ácido ou alcalino. Os marcadores quimiotaxonômicos, bem como a composição de ácidos graxos, também podem ser úteis para sua classificação (AXELSSON, 1993; HOLZAPFEL, 2001; RODRIGUEZ, 2003; MORAIS, 2004).

Estudos baseados na análise comparativa do RNA ribossomal 16S, no entanto mostram que alguns grupos taxonômicos gerados com base nas propriedades fenotípicas não correspondem com as relações filogenéticas sugeridas. Assim, algumas espécies não são distinguidas pelas características fenotípicas, e cada vez mais são utilizadas novas ferramentas da biologia molecular como a reação de polimerização em cadeia (PCR) e outros métodos genotípicos para a identificação dos micro-organismos em nível de espécie (HOLZAPFEL, et al., 2001), ocorrendo constantes modificações na taxonomia e nomenclatura das bactérias lácticas.

Atualmente a taxonomia não é mais baseada exclusivamente em critérios fisiológicos. Abordagens taxonômicas modernas empregam metodologias mais complexas e centram-se no estabelecimento da composição estrutural das bactérias. Isto freqüentemente envolve abordagens baseadas na biologia molecular ou na química analítica. As técnicas fenotípicas e genotípicas vêm sendo aplicadas em combinações nos estudos para a classificação bacteriana, originando a taxonomia polifásica (VANDAMME et al., 2002). Esta metodologia já vem sendo utilizada há alguns anos (COLWELL, 1970) e visa integrar os diferentes tipos de

dados e informações dos micro-organismos, sendo capaz de diferenciar espécies fenotipicamente muito similares, mas completamente diferentes genotipicamente. Para tais resultados a taxonomia polifásica passa por três processos; primeiro faz-se à realização da hibridação de DNA-DNA para obter o delineamento das espécies (WAYNE et al., 1987, STACKEBRANDT; GOEBEL, 1994.), segundo se aplica a análise comparativa da seqüência de macromoléculas conservadas, tais como DNAr 16S para deduzir a filogenia bacteriana e em terceiro são utilizados estes dados para descrever as bactérias em níveis taxonômicos diferentes (VANDAMME et al., 2002; BOTELHO, 2005). Este tipo de classificação é baseado em muitas características, uma vez que a similaridade pode ser irreal quando se utilizam poucos caracteres (SNEATH; SOKAL, 1973, appud SANCHEZ, et al., 2006). Nesse ponto, difere da taxonomia clássica que elege poucas características consideradas importantes (BEBLO, 2003). Esta taxonomia tornou-se um método de uso comum e de sucesso para classificação e identificação bacteriana (FUSCONI et al, 2006a).

Diferentes ferramentas da biologia molecular para a identificação de BL são utilizadas. As mais rotineiras são as provas do ácido nucléico, o uso da seqüência genética parcial RNAr utilizando a reação da cadeia de polimerase (PCR), polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e caracterização das proteínas da parede celular (GATTI, FORNASARI, NEVIANI, 1997; JICHAN, et al., 2003; RODRIGUEZ, 2003, FUSCONI, et al 2006b).

Estudos realizados por De Angelis, et al., (2001) demonstram que a análise da RAPD e principalmente a caracterização das proteínas da parede celular foram bastante úteis para obter informações sobre a diversidade das bactérias lácticas não iniciadoras (não *starter*), isoladas de queijos. Diversos outros trabalhos utilizaram RAPD e outras ferramentas da biologia molecular para confirmar a identificação fenotípica das bactérias lácticas (MARTINIS, 2002; GIRAFFA, et al., 2003; VÁSQUEZ, et al., 2005; ALBANESE, et al., 2006; DE ANGELIS et al., 2006).

A ferramenta de identificação de micro-organismos através da química analítica também vem sendo bastante utilizada (OSTERHOUT; SHULL; DICK, 1991; MARTINEZ, et al., 1991; WALCOTT et al.; 2000; COENYE et al, 2001; ISLAM, et al., 2009). Este é um método pelo qual se faz o estudo de alguns compostos estruturais da bactéria, como ácidos graxos, carboidratos e ubiquinona ou metabólitos secretados como ácidos voláteis.

Por muitos anos os ácidos graxos voláteis foram usados para identificar bactérias anaeróbicas. Posteriormente passou-se a usar os ácidos graxos de cadeia longa para caracterizar gêneros e espécies de bactérias, especialmente as bactérias Gram negativas não fermentativas. Com o surgimento das colunas capilares de sílica fundida que permite a recuperação de ácidos hidroxi e aumenta a resolução de muitos isômeros, tornou-se possível o uso da cromatografia gás-líquida (CGL) na caracterização de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) de células inteiras, o que auxiliou na identificação de várias espécies de micro-organismo (ARUN et al., 2009; SASSER. 2001; PARVATHI et al, 2009).

Os ácidos graxos podem ser definidos como derivados carboxílicos de moléculas alifáticas de cadeia longa. Os ácidos graxos com dez a vinte e quatro carbonos têm fornecido maiores informações taxonômicas e estão presentes em uma grande variedade de micro-organismos como demonstrado do quadro 2 (SUZUKI et al. 1982).

Kunitski et al. (2007) afirmam que a composição dos ácidos graxos é bem conservada geneticamente, servindo como um bom critério na identificação de micro-organismos.

Ácidos saturados	
Ácido de cadeia linear	ácido n-octadecanóico (n-18: 0)
Ácido iso-ramificado	ácido 14-metil pentadecanóico (i-16: 0)
Ácido anteiso-ramificado	ácido 14-metil hexadecanóico
Ácido w-cíclico	ácido w-ciclohexilundecanóico
Ácidos insaturados e seus derivados	
Ácido monoenóico	ácido 11-o ctadecenóico (18:1 (D11))
Ácido polienóico	ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenóico
Ácido ciclopropano	ácido 11,12-metileno o ctadecanóico (ciclo-19:0)
Ácido 10-metil	ácido 10-metil o ctadecanóico (t-19: 0)
Ácidos hidróxi	
Ácido 3-hidróxi	ácido 3-hidróxi decanóico (3OH-10:0)
Ácido 2-hidróxi	ácido 2-hidróxi hexadecanóico(2OH-16:0)

Quadro 2: Ácidos graxos encontrados em bactérias.

Fonte: Suzuki et al., 1982.

1.4 PRINCIPAIS GÊNEROS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICO

Aerococcus – são cocos com forte tendência a formar tétrede, mas podem apresentar aglomerados ou em pares. São anaeróbios facultativos, preferencialmente microaerófilos, catalase negativa (algumas cepas são fracamente catalase positiva), oxidase negativa, produzindo ácido pela fermentação anaeróbia da glicose (exceto *Aerococcus suis*), sensíveis a vancomicina, não produz acetoina, não hidrolisa a arginina (exceto *Aerococcus suis*). São capazes de crescer na presença de NaCl 6,5%, incapazes de crescer a 10 ou 45 °C, produzem alfa-hemólise em agar sangue de cavalo desprovido de antígeno do grupo de Lancefield. (BOSLEY et al., 1990; CHRISTENSEN et al., 1991; FELIS, TORRIANI e DELLAGLIO, 2005). Possuem características de crescimento e bioquímica parecidas com os *Streptococcus* e *Enterococcus*. Diferenciam deste último por não sobreviverem em temperaturas de 60 °C por 30 minutos, não utilizarem a arginina e serem mais sensíveis aos antibióticos (COLMAN, 1967).

Em 1953 era conhecida somente a espécie *Aerococcus veredas*. Bosley et al. (1990) realizaram hibridações DNA-DNA de 11 cepas de *Aerococcus viridans*, originando dois grupos: Um primeiro grupo reunindo as cepas que apresentam, nas condições ótimas de crescimento, pelo menos 75 % homologia com a cepa típica da espécie com uma instabilidade térmica dos híbridos inferior a 4 °C; um segundo grupo reunindo as cepas que apresentam 60 a 70% de homologia com a cepa típica da espécie com uma instabilidade térmica do híbrido compreendida entre 7,0 e 11,5 °C. Estes dois grupos constituem duas genomaespécies diferentes, mas que não podem ser distinguidas pelos seus caracteres fenotípicos. Os resultados da homologia de seqüência do DNAr 16S revelam uma percentagem de homologia de 98,8% entre as cepas dos dois grupos o que revela um estreito parentesco entre as duas genomaespecies.

Os *Aerococcus* são encontrados em diferentes ambientes: água doce, água salgada, solo, sedimentos marinhos, vegetais, produtos de origem animal e principalmente em locais de criação intensiva de suínos. Mas o seu principal reservatório é o ar (COLMAN, 1967).

Normalmente são considerados contaminantes de culturas clínicas. Determinadas cepas podem ser isoladas em exames de urocultura, coprocultura e hemocultura do homem e animais. Ocasionalmente têm sido notificados como causadores de infecção sistêmica como bacteremia. São de baixa virulência, sendo

patogênico somente em pessoas imunodeprimidas (CHRISTENSEN et al., 1991; COLLINS et al., 1993; DEVRIESE et al. 1999).

Weissella - pertence à família Leuconostocaceae. A morfologia das espécies do gênero *Weissella* varia de células esféricas ou lenticulares para bastões irregulares e ocorrem isolados ou aos pares. As células no par são frequentemente diferentes de tamanho. Possuem um peptidoglicano do tipo A-3alpha (presença da L-lysine em posição 3 da unidade tetrapeptídica), catalase negativa (*Weissella paramesenteroides* pode produzir uma pseudocatalase quando cultivada em meio pobre de glicose). Após crescimento anaeróbico a 30 °C por dois dias, as colônias no agar MRS possuem 1 mm de diâmetro, são brancas, lisas e convexas. O crescimento no agar MRS ocorre tanto em aerobiose como em anaerobiose. São heterofermentativas obrigatórias e produzem principalmente ácido D-lático. Crescem entre 4 e 40 °C, tendo o ótimo em 15 °C, não crescem em 42 °C. Produz dextrana da sacarose. A relação G-C no DNA é 43mol%. (Magnusson et al., 2002).

Collins et al em 1993, realizaram um estudo taxonômico de alguns isolados de *Leuconostoc sp.* Os estudos da seqüência do DNAr 16S levou à reclassificação destes micro-organismos originando a espécie *Leuconostoc pseudomesenteroides* e cinco espécies de lactobacilos heterofermentativos. Baseado nos resultados deste estudo e de estudos anteriores, estes pesquisadores resolveram transferir estas espécies para um novo táxon, criando o gênero *Weissella*. Eles propuseram a criação de seis novas combinações (*Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella viridescens* e *Weissella paramesenteroides*). Para reclassificar *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus halotolerans*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens* e *Leuconostoc pseudomesenteroides* eles criaram uma nova espécie (*Weissella hellenica*). Posteriormente, cinco novas espécies *Weissella cibaria*, *Weissella kimchii*, *Weissella koreensis*, *Weissella soli* et *Weissella thailandensis*, foram acrescentados dentro do gênero *Weissella*. Estes novos táxons foram originados dos resultados obtidos da homologia DNA-DNA e da seqüência dos RNAr 16S. Ennahar e Cai (2004) mostraram que *Weissella cibaria* e *Weissella kimchii* constituíam uma única espécie, que pela regra da prioridade passou a ser denominada de *Weissella cibaria*.

As *Weissella* sp. são isoladas de diferentes fontes: vegetais frescos ou fermentados silagem em fase inicial, produtos fermentados à base de mandioca, arroz e milho, produtos fermentados à base de carnes, peixes e leite, embutidos, solo, mandioca e intestino do homem e animais (TANASUPAWAT et al., 2000; OLANO et al., 2001; WALTER, et al. 2001; BJÖRKROTH et al., 2002; LEE et al., 2002; JANG, et al., 2002; KANG et al., 2006; SHIN et al., 2007). Bactérias pertencentes a este gênero apesar de terem sido encontradas associadas com outros micro-organismos em pacientes com patologia crônica, normalmente não são consideradas como patogênicas. Porém Olano, 2001, isolou a espécie *W. confusa* resistente a vancomicina em culturas de sangue de pacientes com sinais clínicos de bacteremia. Ele considerou esta espécie como potencialmente patogênica. Outros pesquisadores também encontraram a *W. confusa* como causadora de patologias, principalmente em endocardite (FLAHERTY et al., 2003; SCHIN et al., 2007).

Oenococcus - pertence à família Leuconostaceae. É encontrado com frequência em sucos de frutas e vinho. Este gênero só possui duas espécies: *Oenococcus oeni*, que era conhecido até 1995 como *Leuconostoc oeni* (classificado por Garvie em 1967). A outra espécie é o *Oenococcus kitaharae*, identificada em 2006 (DICKS; DELLAGLIO; COLLINS, 1995).

O. oeni, é anaeróbio fermentativo, representa uma das bactérias lácticas mais tolerantes ao álcool e ao ácido. Distinguem-se dos *Leuconostoc* por crescerem em meio ácido (o suco de tomate é um excelente meio de cultivo) e por fermentar diferentes tipos de carboidratos. *O. oeni* é utilizado na fabricação de vinho, para realizar a conversão do malato, um importante produto secundário da fabricação de vinho, em lactato (conversão malolática). Este processo envolve a quebra do malato, envolvendo a sua descarboxilação originando L – ácido láctico e CO₂. A conversão malolática gera energia para a célula na forma de força próton motora (VERSARI, PARPINELLO e CATTANEO, 1999; MATTHEWS et al., 2004).

Streptococcus – são cocos com arranjo em par ou cadeias, apresentando a reação da catalase negativa e da oxidase positiva. A maioria dos estreptococos é anaeróbia facultativa e alguns são anaeróbios obrigatórios (PATTERSON, 1996). Algumas espécies causam infecções, incluindo a febre reumática, a febre da

escarlatina, faringite, endocardite, erisipela e meningite (RYAN e RAY, 2004). Outros, exemplificando os *Streptococcus thermophilus* são usados como culturas iniciadoras (*starter*) comerciais para a produção da manteiga, leite fermentado e de determinados queijos (STARR, et al., 1981). Os estreptococos são classificados com base na morfologia das colônias, reações hemolíticas e bioquímicas e especificidade sorológica. Eles são divididos em três grupos pelo tipo de hemólise no agar sangue - -hemolítica (hemólise completa), -hemolítica (hemólise incompleta) e -hemolítica (não hemolítica). Como a hemólise não era suficiente para distinguir estreptococos causadores de doença, a Dra. Rebecca Lancefield em 1918, desenvolveu um método sorológico para a distinção dos estreptococos beta hemolíticos. A classificação dos estreptococos em grupos sorológicos denominados de Lancefield (que se distinguem pelas letras do alfabeto que vai de A a V), baseia-se nas características antigênicas de um polissacarídeo de composição variável chamado carboidrato C, localizado na parede da célula, que pode ser detectado por diferentes técnicas imunológicas (DO CHEZ, AVERY e LANCEFIELD, 1919; PATTERSON, 1996).

Em 1985, diversas espécies do gênero *Streptococcus* foram reclassificadas baseadas nas características bioquímicas e moleculares originando os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, e *Streptococcus* (SCHLEIFER et al, 1985; HOLZAPFEL et al., 2001).

Enterococcus - Esse gênero era classificado como *Streptococcus* do grupo Lancefield D até 1984, quando análise do DNA genômico mostrou pertencer a outro gênero. Os enterococos estão entre o grupo de bactérias lácticas dominantes da microbiota intestinal de mamíferos e outros animais, já os estreptococos constituem parte da complexa microbiota oral dos mamíferos (DOMAN et al, 2007; NES, DIEP e HOLO, 2007). Enterococos são cocos Gram-positivos que podem ocorrer em pares (diplococos), o que dificulta distingui-los do gênero *Streptococcus*. São anaeróbios facultativos, exibem tipicamente uma gama hemólise em meio de agar sangue (FISCHETTI, et al 2000). Os enterococos constituem o *S. faecalis* e *S. faecium* e certas subespécies afins. *S. faecalis* e *S. faecium* são muito parecidos entre si, mas podem ser diferenciados através de provas fisiológicas. *S. faecalis* é em geral, mais resistente ao calor e são encontrados normalmente em humanos, podendo causar infecções que

incluem infecção do trato urinário, bacteremia, endocardite bacteriana, diverticulite e meningite. Já os *S. faecium* procedem principalmente dos vegetais (MARQUES, 2004).

Os enterococos são utilizados com freqüência em produtos probióticos associados com os *Lactobacillus acidophilus*, ocorrendo um sinergismo entre eles beneficiando a saúde do hospedeiro, seja pela exclusão competitiva ou pela produção de bacteriocinas.

Especula-se que as bacteriocinas são mais encontradas nos enterococos e estreptococos do que nos outros gêneros de bactérias lácticas (NES; DIEP; HOLO, 2007).

Pediococcus - normalmente ocorrem aos pares ou tétrade e são as únicas bactérias lácticas em forma de cocos que tem dois planos de divisão. Eles são homofermentativos, catalase negativa, anaeróbio facultativo, produzem somente ácido láctico isômeros D(-) e L(+) na proporção 50:50 da fermentação da glicose. Crescem à temperatura de 7 a 45 °C, tendo o crescimento ótimo entre 25 e 32 °C. Crescem bem em salmouras de cloreto de sódio em uma concentração de 5,5% e pobremente quando a concentração está próximo a 10%. Crescem em 6,5% de etanol e em pH 3.5 (FELIS, TORRIANI, DELLAGLIO, 2005; FRANZ et al, 2006; LIU et al., 2006). Normalmente considerados contaminantes de cerveja e vinho embora, sua presença seja desejada em alguns tipos de cerveja como as Lambic, típica de Bruxelas que possui fermentação espontânea, diferente das outras cervejas (OEVELEN; VERACHTERT, 1979). São utilizados como cultura *starter* de produtos cárneos (BALDUINO; OLIVEIRA; HAULY, 1999) e como probióticos (SILVA et al., 2006). Também são utilizados em silagem. (ZANINE et al., 2007).

Leuconostoc - pertence à família Leuconostocaceae (juntamente com, *Oenococcus* e *Weissella*). Muitas linhagens aparecem no meio líquido, como cocos ou cocobacilos, ocorrendo isolados, em pares ou em cadeias curtas, contudo sua morfologia pode mudar de acordo com as condições de cultivo; células cultivadas em meio sólido contendo glicose podem-se apresentar na forma de bastonetes alongados. Todas as espécies desse gênero são heterofermentativas em condições microaerófilas. Apresentam geralmente colônias "slime" (SALMINEN, VON WRIGHT, OUWEHAND, 2004; BJÖRKROTH, HOLZAPFEL, 2006).

Os *Leuconostoc* são bactérias epífitas que estão largamente distribuídas na natureza e desempenham um importante papel nas indústrias de alimentos fermentados. São capazes de produzir polímeros viscosos de polissacarídeos do tipo dextrana e levana a partir da sacarose, ocasionando grandes perdas no processo de fabricação de açúcar e prejuízos em outras indústrias de alimentos (VIEIRA, 2003; CALIARI, SOARES. JR., GOMES, 2004; AQUINO, 2006). Mas as dextransas também são de importância econômica, sendo usadas na manufatura de extensores do plasma de sangue, de substitutos da heparina para a terapia do anticoagulante, de cosméticos, e de outros produtos. Outro uso das dextransas é a manufatura dos géis ou dos grânulos de Sephadex, que são usado para separações industriais e laboratoriais de proteína (TALLGREN, 1999). A espécie mais comumente associada à produção da dextrana é o *Leuconostoc mesenteroides*. Essa espécie é encontrada normalmente em caldo de cana e é bastante heterogênea tanto sorologicamente quanto bioquimicamente. Pode ser classificada em quatro tipos de acordo com a característica da colônia, quando cultivados em condições específicas (10% de sacarose entre 20 °C a 28 °C), dando origem a muitas linhagens diferentes envolvidas na produção de dextransas com propriedades físico-químicas diferentes (VIEIRA, 2003).

A linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL- B-1355 produz os polissacarídeos dextrana e alternana. Este último é semelhante a dextrana, que difere desta por conter ligações glicosídicas alternadas 1,6 e 1,3 (LEATHERS; COTE, 2008).

Os *Leuconostoc* também têm importância clínica, pois é considerado um patógeno emergente de humanos. Os fatores de risco da infecção incluem a resistência a antibióticos e sistema imunológico deprimido. As espécies de interesse clínico apresentam colônias com hemólise alfa e gama e são naturalmente resistentes a vancomicina com concentração mínima inibitória (MIC) 256 µg/ml, mas podem ser tratados com sucesso com penicilina com MIC 0.25 a 1.0 unit/ml (KULWICHIT, et al., 2007).

Lactococcus - são esféricos, 0,5-1,5 µm, ocorrem em pares e em pequenas cadeias, são mesófilos. Eram antigamente conhecidos como *Streptococcus* do grupo lácteo (Lancefield grupo N) e constituídos pelos *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus diacetylactis* Em 1985 estes estreptococos foram

reclassificados em duas subespécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (previamente *Streptococcus lactis*) e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (previamente *Streptococcus cremoris*) para distingui-los dos estreptococos que contêm os patógenos humanos (SCHLEIFER et al., 1985).

Atualmente existem sete espécies e subespécies de *Lactococcus*, as quais podem ser identificadas por reações fisiológicas (AZEVEDO et al., 2000). Diferem das outras bactérias lácticas por tolerarem um pH baixo, alta concentração de sal e alta temperatura. Lactococos são bastante utilizados como cultura *starter* em produtos lácteos fermentados e podem ser utilizado isoladamente ou como cultura mista com outras bactérias lácticas, tais como *Lactobacillus* e *Streptococcus*. Estima-se que o homem consome anualmente cerca de 10^{18} Lactococos provenientes de produtos industrializados. Devido ao seu grande interesse industrial, este micro-organismo normalmente são utilizados como modelo em pesquisas com bactéria láctica (VLIEG et al, 2006).

Os *L. lactis* são considerados organismos *GRAS* (geralmente reconhecidos como seguro). Os *Lactococcus* correspondem a um dos gêneros de bactéria láctica mais intensivamente estudados no mundo pela sua grande utilização nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Entretanto estes micro-organismos não são habitantes naturais do trato gastrintestinal e não sobrevivem às condições fisiológicas do trato digestivo do hospedeiro, necessitando ser manipulados geneticamente para se adaptarem a tais condições (DE VOS, HUGENHOLTZB, 2004; VANDENBROUCKE, et al., 2004; MIERAU, KLEEREBEZEM, 2005).

Vários pesquisadores (MADIGAN, et al., 2004; WEGMANN et al., 2007) descreveram a seqüência genética de linhagens específicas de *Lactococcus* visando a utilização desta linhagens em diversos processos biotecnológicos, principalmente no que se refere à produção de vacinas de DNA. Linhagens de *L. lactis* derivados de plantas são geneticamente similares às derivadas de leite, ambas podem ser utilizadas como culturas *starter* de produtos lácteos fermentados. Os *L. lactis* derivados de plantas possuem várias capacidades adaptativas, tais como habilidade de fermentar muitos tipos de carboidratos e maior tolerância ao estresse, quando comparadas com as cepas derivadas do leite (NOMURA et al., 2006).

Lactobacillus - Este gênero compreende, 56 espécies oficialmente reconhecidas (GOMES e MALCATA, 2002). São ubíquos na natureza e em humanos, exercem um papel bastante significativa na manutenção da saúde do hospedeiro. Morfologicamente são bacilos, podendo-se apresentar como co cobacilos. São caracterizados como microaerófilos, estritamente fermentativos, catalase negativa, algumas linhagens são pseudocatalase. Nos meios usuais de crescimento, os lactobacilos raramente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo, possuem menos de 45% mol de G-C na molécula de DNA. São comumente benignos. Nos humanos estão presentes na vagina e no trato gastrintestinal. Algumas espécies estão presentes em material deteriorado de plantas (BOTELHO, 2005).

O Conhecimento da diversidade dos lactobacilos em diferentes ambientes ficou limitado por vários anos, devido à utilização das técnicas culturas-dependentes. Em geral dezessete testes fenotípicos são requeridos para identificar um isolado de lactobacilos em nível de espécie (TANNO CK, 2005). Com a introdução das técnicas da biologia molecular muitas das espécies foram descobertas e/ou reclassificadas. A maioria das técnicas moleculares para identificação de lactobacilos é baseada na seqüência nucleotídeos-nucleotídeos da região V2-V3, que corresponde à primeira metade do RNAr 16S, embora a identificação seja mais exata se todo os genes forem sequenciados (ANUKAM et al., 2005). Diversos membros deste gênero já têm o seu genoma totalmente seqüenciado, validado e armazenado no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.), o que facilita a identificação de novos isolados de diferentes fontes.

A utilização das técnicas moleculares para a identificação bacteriana, levou a divisão do gênero dos *Lactobacillus* em três grupos, baseados na habilidade das espécies em fermentar os açúcares (KANDLER e WEISS, 1986; DICKS et al., 2000).

Grupo I – espécies homofermentativos obrigatórias degradam as hexoses quase que completamente a ácido láctico. A aldolase está presente, não fermentam as pentoses ou gluconato. Crescem a 45 °C, mas não a 15 °C, normalmente formam bastonetes longos. Tem como principais representantes *L. delbrueckii* e *L. acidophilus*.

Contém 21 espécies, dividido em dois subgrupos, baseado na hibridação DNA-DNA (KANDLER e WEISS, 1986).

Grupo II são heterofermentativos facultativos, produzem ácido acético e em condições limitadas de glicose também produzem ácido fórmico e etanol. Usualmente fermentam as pentoses. Crescem a 15 °C e crescimento variável a 45 °C, formam bastonetes mais curtos. Tem como principais representantes *L. casei*; *L. plantarum*.

Grupo III são heterofermentativos obrigatórios, fermentam hexoses originando ácido lático, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Pentoses são fermentadas em ácido lático e acético. A aldolase está ausente neste grupo, porém possui a fosfoacetolase. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. beifir*, são os principais representantes.

1.5 CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS

1.5.1 Fermentação de carboidratos

As bactérias lácticas são incapazes de sintetizar ATP por meio de respiração, devido à sua incapacidade de sintetizar citocromos e enzimas contendo o grupo heme (uma porfirina que é o grupo prostético de algumas enzimas e proteínas) (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). Elas obtêm energia através de fosforilação ao nível de substrato, sendo estritamente fermentativas, não gerando poder redutor, razão pelo quais estes micro-organismos devem oxidar grandes quantidades de substrato para poderem se desenvolver (FRIONI, 1999; CARVALHO et al., 2005). Estas bactérias são classificadas de acordo com as vias de fermentação de carboidratos. Bactérias lácticas homofermentativas em condições de excesso de glicose e baixa concentração de oxigênio utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), em que cataboliza um mol de glicose para produzir dois moles de piruvato (VAKIL; SHAHANI, 1970). O Balanço redox intracelular é mantido devido à oxidação do NADH concomitantemente com redução do piruvato a ácido lático. Este processo produz dois moles de ATP por glicose consumida (ROMANO; TRIFONE; BRUSTOLON, 1979) Gêneros de bactérias lácticas representantes desta via de fermentação incluem *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus, *Pediococcus* e lactobacilli grupo I. (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

As bactérias lácticas heterofermentativas não produzem as enzimas da via glicolítica (aldolase e triosefosfato isomerase). A degradação da glicose se realiza pela via oxidativa das pentoses fosfato, ou via de Dickens, onde um mol de Glicose-6-fosfato é inicialmente desidrogenada para 6 – fosfogluconato e subsequentemente descarboxilado para produzir um mol de CO₂. A liberação do carbono um (C1) como dióxido de carbono é característica dos organismos heterofermentativos). A molécula de pentose-5-fosfato resultante é clivada pela fosfocetolase originando um mol de gliceraldeído fosfato e um mol de acetilfosfato. Gliceraldeído fosfato é posteriormente metabolizado para lactato como na via homofermentativas, tendo como intermediários o acetilfosfato reduzido para etanol via acetil-CoA e acetaldeído.

Teoricamente os produtos finais, incluindo a Adenosina Trifosfato (ATP), são produzidos em quantidades equimolares do catabolismo de um mol de glicose (PANHOTA, 2007). Bactéria lácticas heterofermentativas obrigatórias incluem os *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, lactobacilli grupo III (FRIONI, 1999; SALMINEN, WRIGHT e OUWEHAND, 2004). Finalmente, as bactérias lácticas homofermentativas produzem no mínimo 1,8 moles de ácido láctico (70 a 80%) por mol de glicose fermentada e as bactérias lácticas heterofermentativas produzem aproximadamente um mol de ácido láctico (50%) por mol de glicose e quantidades apreciáveis de produtos secundários, principalmente gás carbônico, etanol e ácido acético (MORAIS, 2004). Algumas linhagens podem chegar a produzir ácido fórmico ou succínico. Nenhuma bactéria láctica é capaz de produzir ácidos voláteis com mais de dois átomos de carbono (TORO, 2005). A fermentação realizada pelas bactérias lácticas se completa entre 1 a 7 dias, mas a média é de 5 a 7 dias.

O pH do meio de fermentação também pode afetar o padrão de fermentação exibido pelas bactérias lácticas, dependendo da espécie considerada. Por exemplo: *Lactobacillus bulgaricus* é homofermentativo em pH ácido, porém se torna heterofermentativo em pH alcalino. Além disso, as bactérias lácticas podem desviar o fluxo do metabolismo de açúcares em direção à formação de exopolissacarídeos como resposta a variações no pH do meio (LIU et al., 2003). O ácido

lático é o nome comum do ácido 2-hidroxi propiônico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$), com peso molecular de 90,08 g/mol. Este composto possui um carbono assimétrico apresentando atividade ótica. Existem dois isômeros óticos ativos, o dextra rotatório D (-) Lático e o levo rotatório L(+) Lático e uma forma racêmica (oticamente inativa) constituída por frações equimolares das formas L(+) e D(-) (LIMA, AQUARONE, BORZANI, 1975; SERNACOCK; RODRIGUEZ-DE-STOUVENEL, 2005). Estas formas isoméricas podem ser utilizadas na síntese de polímeros de diferentes propriedades.

Sob o ponto de vista nutricional, o uso ou a formação (por fermentação) de ácido D(-) lático é indesejável em alimentos por não ser facilmente metabolizado por mamíferos, incluindo os humanos, principalmente crianças. A proporção entre os isômeros L (+) e D (-) obtidos durante a fermentação varia com o gênero e dentro do mesmo gênero com a espécie do micro-organismo. Ácido L (+) lático é produzido por *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, e *Vagococcus*. Ácido D (-) lático é produzido por *Leuconostoc* e *Oenococcus*.

Micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Weissella* produzem ambas as formas isoméricas, isolada ou conjuntamente, dependendo da espécie considerada e das condições de cultivo (LIU, 2003; CARVALHO et al., 2005).

1.5.2 Condições ótimas de crescimento

As bactérias lácticas são nutricionalmente muito exigentes por possuírem habilidade biossintética limitada, necessitando de requerimentos nutricionais complexos de fatores de crescimento como as vitaminas do complexo B. A riboflavina (B2) é uma vitamina necessária ao bom desenvolvimento da fermentação láctica. O ácido pantotênico (B5) é essencial para algumas espécies lácticas. O ácido nicotínico (B3) estimula o crescimento e a produção de ácido de alguns gêneros. Elas requerem também um considerável número de aminoácidos e bases purínicas e pirimidínicas (HAULY; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2003; RIVAS, et al., 2004). Devido a isto, elas são normalmente cultivadas em meios contendo peptona, extrato de levedura (rico em proteínas, vitaminas e nucleotídeos) ou outros materiais vegetais ou animais digeridos.

Estes devem ser suplementados com um carboidrato fermentável para prover uma fonte de energia, normalmente glicose, lactose e sacarose. As bactérias láticas são incapazes de utilizarem hidratos de carbono complexo (MORAIS, 2004). Substratos amiláceos como de milho, batata e mandioca podem ser empregados, desde que pré-hidrolisados enzimaticamente (SILVA; MANCILHA, 1991). A concentração dos açúcares empregada é ajustada na faixa de 5 a 20% de acordo com o micro-organismo (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). Em muitas espécies de micro-organismos o catabolismo do açúcar não é somente utilizado para a obtenção de energia ou biomassa, mas também para a produção de exopolissacarídeos (BOELS et al 2001).

De maneira geral, experimentos com bactérias láticas têm indicado que enzimas adaptativas não existem nesses organismos para produção da maioria das vitaminas. Entretanto desde pesquisas realizadas por Vernon e Nygaard em 1951 já existem evidências que a adaptação ocorre para síntese de tiamina, ácido p-aminobenzóico, vitamina B12, ácido fólico e B6-fosfato. Se forem realizadas transferências sucessivas destes micro-organismos em meios de cultura, eles crescem abundantemente em meio base. Mesmo crescendo em meios muito ricos, as colônias de bactérias láticas sempre permanecem relativamente pequenas. Raramente são pigmentadas, como resultado da ausência de citocromos. O tamanho reduzido das colônias é atribuído principalmente ao baixo rendimento de crescimento, uma consequência do seu metabolismo exclusivamente fermentativo (LIMA, AQUARONE, BORZANI, 1975; STANIER, 1986). Algumas bactérias láticas crescendo em meio sólido, suplementado com sacarose conseguem produzir grandes quantidades de polissacarídeos e, em consequência, produzem colônias grandes, translúcidas, compostas principalmente dos polissacarídeos excretados (VIEIRA, 2003 ; AQUINO, 2006).

Uma característica fisiológica diferenciadora das bactérias láticas é sua alta tolerância à acidez, sendo consideradas como acidófilas. Mas de uma maneira geral, o pH deve ser mantido entre 5,5 e 6,0 para que ocorra uma maior produção de massa bacteriana. As bactérias láticas na forma de cocos iniciam o crescimento em meios com pH neutros ou alcalinos, mas a maioria das formas bastonetes não pode crescer em meios com um pH inicial maior que 6,0, neste caso o pH ótimo é em torno de 4,5 (CARVALHO et al, 2005). O controle do pH pela adição de álcalis (carbonato de cálcio,

hidróxido de amônio) ao meio é tradicionalmente empregado. Por outro lado, a remoção simultânea do ácido à medida que é produzido, por meio de técnicas de extração, adsorção ou eletrodialise, também vem sendo realizada (HOFVENDAHL; HÄHN-HAGERDAL, 2000). Alguns gêneros das bactérias lácticas podem sobreviver em pH relativamente baixo (3,5) diferentemente de outros micro-organismos com metabolismo respiratório (SMULDERS et al., 1986). As bactérias lácticas transportam simultaneamente ácido láctico e prótons ao exterior celular, o que além de contribuir para a homeostase do pH interno, também originam energia (TSENG; MONTVILLE, 1993). A capacidade das bactérias de produzir e tolerar uma concentração relativamente alta de ácido láctico é de grande valor seletivo, já que as capacitam a eliminar a competição da maioria das outras bactérias em ambientes ricos em nutrientes (STANIER, 1986).

As bactérias lácticas são todas anaeróbias aerotolerante, crescendo bem na superfície de um meio sólido exposto ao ar. São catalase-negativas e, portanto não catalisam o peróxido de hidrogênio. A ausência de atividade de catalase é um dos mais úteis testes para o reconhecimento destes organismos, já que são as únicas bactérias que não possuem a enzima catalase e crescem na presença de ar. Certas bactérias lácticas adquirem atividade de catalase quando desenvolvidas na presença de uma fonte de heme (ex., em meio contendo hemácias). Tais espécies sintetizam uma enzima denominada superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) manganês ou pseudocatalase que pode combinar-se com heme suprido exogeneamente para produzir uma enzima com as propriedades da catalase (ENGESSER e HAMMES, 1994). Pseudocatalase é uma enzima contendo manganês que apresenta fraca atividade de catalase mesmo na ausência de heme (KONO; F'RIDOVICH, 1983). Tem sido demonstrado que essa enzima prolonga a viabilidade das células em fase estacionária, incubadas sob condições aeróbias. Quando crescem nesta condição, são produzidas substâncias oxidantes tóxicas ao metabolismo: peróxido de hidrogênio, superóxidos e radicais hidroxilas. Mas a produção da catalase não parece ser importante para as células em crescimento ativo (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). Devido à característica de formar a pseudocatalase presentes em algumas bactérias lácticas, especificamente o

gênero *Lactobacillus*, ocorre confusão na identificação destas bactérias (ROCHAT et al., 2006).

A classificação das bactérias lácticas segundo a sua temperatura ótima de crescimento divide-os em mesófilos, que crescem a uma temperatura de 10 – 40 °C com um ótimo de 30 °C. Neste grupo estão principalmente os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*. O grupo dos termófilos apresenta uma temperatura ótima de crescimento entre 40-45 °C. As bactérias termófilas mais utilizadas na indústria de alimentos são *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus herméticos* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis*. Muitas das bactérias lácticas sobrevivem ao processo da pasteurização (TURNER; LAWRENCE; LEVRIERE, 1986).

1.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

O grupo das bactérias lácticas possui espécies de diferentes perfis metabólicos e de diferentes condições ambientais de cultivo. De uma maneira geral são utilizados como meios de isolamentos o caldo seletivo para lactobacilos MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARP, 1960) e APT - *All Purpose Tween* (Apt Agar, 2008). A temperatura e as condições atmosféricas ótimas de incubação vão depender da espécie que se deseja isolar.

A identificação é realizada utilizando os critérios fenotípicos e genotípicos. Para a identificação fenotípica são utilizados os ensaios clássicos e os kits *Analytical Profile Index systems* (API 20 STREP e API 50 CHL, Biomérieux, Inc., Lyon, France) (Kulwichit, et al, 2007).

A identificação genotípica pode ser utilizada através de diferentes métodos de marcadores moleculares. A identificação de isolados de lactobacilo pelo método fenotípico normalmente requer dezessete testes fenotípicos para identificar um isolado em nível de espécie. Ela se torna difícil porque em diversos casos requer além dos testes de fermentação, outras análises como, o estudo da parede celular e a mobilidade eletroforética da lactato desidrogenase (TANNO CK, 2005). No entanto este método o custo é menor quando comparado à identificação genotípica.

Outro método fenotípico de identificar as bactérias lácticas consiste no estudo do perfil metabólico dos ácidos graxos que compõem os lipídeos das membranas das bactérias. Segundo Sasser (2001) o perfil de ácidos graxos mais estáveis e reprodutíveis é conseguido regulando as condições de crescimento. Alguns artigos científicos relatam o efeito da temperatura de incubação e do meio de cultura na composição dos ácidos graxos das bactérias (VANCURA et al.; 1987; SUUTARI, LAAKSO, 1992; EMBLEY, WAIT, 1994).

Para minimizar estas variáveis foi selecionada uma temperatura de incubação e um meio de cultura específico para cada biblioteca. A maioria das bactérias aeróbicas crescem melhor no agar tripticase de soja (TSBA), que consiste de 30 g de caldo de tripticase de soja e 15 g de agar. As bactérias que não crescem bem em TSBA são semeadas no meio ótimo de crescimento como por exemplo, o meio MRS, que é propício para o crescimento de Lactobacilos (SUUTARI, LIUKKONEN; LAAKSO, 1990). As bactérias anaeróbicas crescem melhor em meio BHI (infusão cérebro coração) suplementado com sangue (Midi, Inc. 2001).

Pode-se utilizar o meio líquido com a turbidez típica da fase estacionária ou meio sólido com o tempo de incubação de 24h nas bactérias aeróbicas e 48h nas bactérias anaeróbicas. Bactérias de crescimento lento trabalham-se com o tempo em que elas atingem a sua fase estacionária. A temperatura escolhida como ideal para a maioria dos micro-organismos foi 28 °C, porém em algumas bactérias aeróbicas clínicas é utilizada a temperatura de 35 °C. Para bactérias anaeróbicas, utiliza-se a temperatura de crescimento 35 °C (OSTERHOUT; SHUL; DICK, 1991; Midi, Inc. 2001).

Para a aplicação deste método se utiliza um sistema de software (Microbial ID. Inc. Newark, Dall) e hardware (Hewleh-Packard Co.) combinados e identificados como Sistema de Identificação Microbiana (MIS), disponível comercialmente. Este sistema é um método rápido de identificação de bactérias e leveduras baseado no perfil traçado da cromatografia gasosa de alta-resolução, que envolve a separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) extraídos da membrana celular destes micro-organismos. Com a identificação de cada componente através de seu tempo de retenção, faz-se uma comparação com o tempo de retenção de misturas padrão de

ácidos graxos encontrados em bibliotecas disponíveis no *Microbial ID* (SASSER, 2001; MELO; PARMA, 2007).

Com a introdução das técnicas da biologia molecular muitas das espécies foram descobertas e/ou reclassificadas. A ribotipagem é um método que pode identificar e classificar bactérias baseado nas diferenças existentes entre o RNAr. Essa técnica gera uma alta reprodutibilidade e identificação precisa que pode ser usada para classificar a bactéria ao nível de espécie, embora a identificação seja mais exata se todos os genes forem sequenciados (ANUKAM et al., 2005). Diversos membros de bactérias láticas já tem o seu genoma totalmente sequenciado, validado e armazenado no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.), o que facilita a identificação de novos isolados de diferentes fontes (DICKS et al., 2000).

1.7 MANUTENÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

Culturas bacterianas devem ser preservadas para utilização com fins didáticos e de pesquisa. O organismo deve ser mantido vivo pelo maior período possível e por um método que não permita ou minimize a ocorrência de mutações ou de variabilidade quanto a patogenicidade, virulência ou características básicas da cultura original (ROMEIRO, 2001). Vários métodos são utilizados para preservação de bactérias, tais como: repicagem periódica, preservação por secagem, água destilada esterilizada, dessecação em papel de filtro, congelamento a -20 ou -80 °C, óleo mineral, nitrogênio líquido, preservação em solo, contas de vidro ou porcelana, liofilização (ROMEIRO, 2001; MARIANO, ASSIS, 2005) e microencapsulação (KAILASAPATHY, 2006; ANAI, SINGH, 2007; ANN, et al.; 2007; LISERRE, RÉ, FRANCO, 2007).

As bactérias láticas como todas as outras, quando estão em ambientes desfavoráveis perdem a sua viabilidade. Os produtos que contêm bactérias láticas necessitam estarem armazenadas em condições que as mantenham viáveis. Eles podem estar sob forma refrigerada, congelada ou desidratada (BARBOSA, et al. 2001). Os produtos cujas bactérias estejam em forma desidratada são os que apresentam maior tempo de prateleira no mercado. O processo da liofilização é o que mantém as células por mais tempo viáveis, porém é de alto custo. O processo da

microencapsulação também mantém as bactérias protegidas, podendo ficar armazenadas na temperatura ambiente por um determinado tempo a depender da espécie microencapsulada.

1.8 IMPORTÂNCIA TECNOLÓGICA

As bactérias láticas podem ser usadas pelo homem para obtenção de produtos oriundos de processos biotecnológicos com grande valor econômico. O principal deles é o ácido lático. Apesar da estrutura do ácido lático ter sido descoberta em 1780 pelo farmacêutico Schelle, foi somente a partir de 1881 que passou a ter uma maior importância industrial. Ele é obtido por fermentação normalmente sob forma racêmica, existindo, no entanto *Lactobacillus* que produzem formas opticamente ativas (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). O ácido lático atualmente é bastante utilizado nas indústrias para diferentes finalidades como em processos de fermentação, produtos farmacêuticos, cosméticos, indústria química. Na alimentação é utilizado como acidulante em produtos de confeitaria, na fabricação de extratos, essências, sucos de frutas, refrigerantes, etc. Pode ser empregado também na conservação de carne, de vegetais e de pescado. Na indústria têxtil é usado como mordente para estampar a lã. É empregado também no preparo de couro e pele, na fabricação de plástico, utiliza-se ácido lático transparente, que é de qualidade superior. Seus ésteres são utilizados na fabricação de tintas e vernizes, de plastificantes e também como solventes. (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975). Como uso veterinário pode ser utilizado como promotor de crescimento (PAULO, 1993) e como preventivo na mastite bovina (BODDIE , NICKERSON, 1992; SILVA, 2002; NASCIF-JÚNIOR, 2005).

As bactérias láticas desempenham um papel importante na conservação de alimentos, estando principalmente associadas aos produtos lácteos fermentados, como iogurtes e queijos e em produtos cárneos embutidos. Atualmente, um número crescente de produtos alimentícios que resultam em benefícios à saúde, denominados de alimentos funcionais, assim como preparações farmacêuticas são considerados por seus benefícios à saúde, com base nas características de determinadas linhagens de bactérias ácido láticas (SALMINEN; WRIGHT; OUWEHAND, 2004). É utilizada também

na obtenção de enzimas de grande interesse econômico como as pectinases produzidas pelos *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* (MENEZES; SARMENTO; DAIUTO, 1988). Também podem ser citadas as enzimas maloláticas, proteases, peptidases, glicosidases, enzimas degradadoras de polissacarídeos, esterases, uréases, fenoloxidase e lípases (MATTHEWS et al., 2004).

As bactérias lácticas são imprescindíveis no processo da ensilagem, A dominância destas bactérias assegura o rápido aumento na formação do ácido láctico, que em poucas horas reduz o pH da massa ensilada para o nível ideal, situado em torno de 4,0. Nesse ponto, a atividade dos micro-organismos indesejáveis cessa, estabilizando a fermentação, originando um alimento rico em nutrientes e palatável para o gado (ANDRADE; MELOTTI, 2003; PEDROSO, et al, 2007; ZANINE et al., 2007; MENDES et al, 2008).

Um grande mercado de produtos oriundos das bactérias lácticas são os biopolímeros, principalmente os exopolissacarídeos (EPS), que são utilizados em diversas finalidades como: espessantes, emulsificantes, expansor plasmático, dietéticos e veículos de produtos farmacêuticos (MATOS; ROZENFELD, 2005), apresentando-se também como potencial na utilização de encapsulantes de micro-organismos.

1.9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias lácticas representam um grupo de micro-organismos de grande interesse, seja na área acadêmica ou industrial. O conhecimento aprofundado sobre a sua biologia e seu metabolismo, aliado à utilização das ferramentas da taxonomia polifásica, torna mais confiável a identificação das espécies pertencentes a este grupo. Apesar destas bactérias serem exigentes nutricionalmente, o procedimento adequado no seu cultivo proporciona um grande rendimento celular, com consequente aumento de seus produtos metabólicos, o que viabiliza a sua utilização em nível industrial.

REFERÊNCIAS

ALBANESE et al. Molecular Identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a Cause of Brain Abscess in an Immunocompromised Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44(8) p. 3044–3045, 2006.

ANAL, A. SINGH, K. Review:Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, v 18, Issue 5, Page 240-251, 2007.

ANDRADE, S. J. T; L MELOTTI, L. Ino culantes bacterianos na ensilagem do capim-elefante (*Pennisetum purpurem*, Schum). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v .40 suppl.3, 2003.

ANN, E.Y, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 42 Issue 4 Page 411-419, 2007.

ANUKAMI, K. C, et al. 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the vagina of healthy Nigerian women. *African Journal of Biotechnology*, v.. 4 (11), p. 1222-1227, 2005.

APT AGAR. Disponível: <http://www.neogen.com>. Acesso em 16 de novembro de 2008.

AQUINO, D.S. *Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas de cana-de-açúcar*. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, SP. 74p. 2006.

ARUN, A.B. et al. *Parvularcula lutaonensis* sp. nov., a moderately thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 2009.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, , p.1 -63.1993.

AZEVEDO , P. A. et al. Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. *Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul*, 44 (1,2) 81-84,2000.

BALDUINO, R. et al. Mixed lactic culture with potential application as starter culture in meat products. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* , vol.19, 1999.

BARBOSA, F.H.F. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de Bifidumbacterium bifidum BB12 e Bifidumbacterium bifidum longun BB46. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 1, no 2, 2001.

BEBLO , C. et al. Alternative Methods Of Classifying The Proteobacteria. *Journal of systematic Biology at Susquehanna University*, v. 10, n. 2, 2003.

BJÖRKROTH, K. J. ; HOLZAPFEL, W. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, vol. 4, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY. p.267 -319, 2006.

BJÖRKROTH, K. J. et al. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 141-148, 2002.

BODDIE, R. L. ; NICKERSON, S. C. Evaluation of Postmilking Teat Germicides Containing Lauricidin®, Saturated Fatty Acids, and Lactic Acid. *Journal of Dairy Science*, 75: 6 1725-1730, 1992.

BOELS, I.C et al Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied Environment Microbiology*. 67:3033–3040, 2001.

BOSLEY, G.S. Phenotypic characterization, cellular fatty acid composition, and DNA relatedness of *aero co cci* and comparison to related genera. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, p. 416-421, 1990.

BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro*. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas SP, 2005.

CALIARI, M.; SOARES –JR, M.S. ; R.J, GOMES, C. Efeito de ondas ultra-sônicas sobre a população de *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 34 (3), p.139-146, 2004.

CARVALHO, W. et al. Aditivos Alimentares produzidos por via fermentativa. Parte I ácidos orgânicos. *Revista Analytica*. nº 18, 2005.

CHRISTENSEN, J. J. et al. *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *Journal Clinical Microbiology*, v. 29, p. 1049-1053, 1991.

COENYE, T. et al. Genotypic and chemotaxonomic evidence for the reclassification of *Pseudomonas woodsii*(Smith 1911) Stevens 1925 as *Burkholderia andropogonis* (Smith 1911) Gillis et al. 1995. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 183-185, 2001.

COLLINS, M. D. et al. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc pseudomesenteroides* group of species. *Journal Applied Bacteriology*, 75, 595-603, 1993.

COLMAN, G. *Aerococcus*-like organisms isolated from human infections. *Journal of Clinical Pathology*, v. 20, p. 294, 1967.

COLWELL, R. R. et al. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*. numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.104, p.410-433, 1970.

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

DE ANGELIS, M. et al. Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Italian Ewe Cheeses Based on Phenotypic, Genotypic, and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, no. 5, 2001. p. 2011–2020.

DE VOS. W. M.; HUGENHOLTZ J. Engineering metabolic highways in Lacto co cci and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnology*, v.22(2) p.72-9, 2004.

DEVRIESE, L. A. et al. Identification of aesculin-hydrolyzing strepto co cci, lacto co cci, aero co cci and entero co cci from subclinical intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 70, p. 87-94, 1999.

DICKS, L. M. T. *Lactobacillus fornicalis* sp. nov., isolated from the posterior fornix of the human vagina. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, p. 1253–1258 , 2000.

DICKS, L. M. T; DELLAGLIO, F. ;COLLINS, M. D. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*[corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* , v. 45, p.395-7, 1995.

DO CHEZ, A. R. ; AVERY, O. T; LANCEFIELD, R. C.. Studies on the Biology of Streptococcus: I. Antigenic Relationships between Strains of Streptococcus Haemolyticus. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol 30, 179-213, 1919.

DOMANN, E. et al. Comparative genomic analysis for the presence of potential entero co ccal virulence factors in the probiotic Enterococcus faecalis strain Symbioflor. *International Journal of Medical Microbiology*. 297(7-8):533-9, 2007.

ENGESSER, D. M. ; HAMMES, W. P. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Systematic Applied Microbiology*, 79:763–76 1994.

ENNAHAR, S; CAI, Y. Genetic evidence that *Weissella kimchii*Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Björkroth et al. 2002. . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 54, p. 463-465, 2004.

FELIS, G. E, TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. Reclassification of *Pediococcus urinaeequi*(*ex*Mees 1934) Garvie 1988 as *Aerococcus urinaeequi*comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, p.1325-1327, 2005.

FERREIRA, C. L. F. Grupo de bactérias ácido lácticas– caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In:Prebióticos e Probióticos: Atualização e prospecção. Editor . Célia L. L. F. Ferreira. Viçosa, MG, 2003, 206p.

FISCHETTI, V. A. Surface proteins on gram-positive bacteria. //n. The Gram Positive Pathogens. V.A. Fischetti, R.P. Novick, J.J. Ferretti, D.A. Portnoy and J.I. Rood eds., ASM Publications, Washington, Chapter 2. pp 11-24, 2000.

FLAHERTY, J. D, et al. Fatal Case of Endo carditis Due to *Weissella confuse*. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, No. 5 , p. 2237–2239, 2003.

FRANZ , C. M. A. P. et al. *Pediococcus stilesii*sp. nov., isolated from maize grains. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56 (Pt2), p. 329-33, 2006.

FRIONI, L. Procesos Microbianos. Ed. Fundacion Universidad Nacional de Rio cuarto Argentina. Rio cuarto, Argentina, 1999. 332p.

FUSCONI R. et al. *Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 168-174, 2006a.

FUSCONI, R. et al. Molecular Identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a Cause of Brain Abscess in an Immuno compromised Patient. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:168-174, 2006b.

GATTI, M, FORNASARI, E; NEVIANI, E. Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli. *Letters Applied in Microbiology*, v., 25, p. 345–348, 1997.

GIRAFFA, G. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal Food Microbiology*, v. 25;82(2) p.163-72. 2003.

GOMES, A. M. P; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, bio chemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, v.10, p.139-157, 1999.

GÓMEZ, J. A. M. Caracterización de los exopolisacaridos producidos por microorganismo shalófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. 2006. Tesis (Do ctoral) - Universidad de Granada, Facultad de Granada. Departamento de Microbiología, Granada 2006.

HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R. ;Oliveira, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. *Semina: Ciências Agrárias*, 24:1,133-142, 2003.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 87-107, 2000.

HOLT, J. G. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, BLtimore: Willians and Wilkins, v. 4, 1989.

HOLZAPFEL et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms . e cryopreservation of microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 73, n. 2. p. 365S-373S, 2001.

ISLAM, M. R. et al. Evaluating the effect of fertilizer application on soil microbial community structure in rice based cropping system using fatty acid methyl esters (FAME) analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 25, Number 6 , p. 1115-1117, 2009.

- JANG, J. et al. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiology Letter*, vol. 212, n°1, p. 29-34, 2002.
- JICHAN, J. et al. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, no.1, p. 295-302, 2003.
- KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt, *LWT - Food Science and Technology*, V. 39, Issue 10, , Pages 1221-1227, 2006.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1209–1234. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986.
- KANG, M. S. et al. Effect of *Weissella cibaria* isolates on the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Caries Research*, vol. 40, n° 5, pp. 418-425, 2006.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Isolation and Characterization of the Pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 258, n°10 . pp. 6015 – 6019, 1983.
- KULWICHIT, W. et al. A. Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *Biomedical Central Infectious Diseases*, v. 7, p. 69. 2007.
- LEATHERS, T. D.; GL CÔTÉ, G. L. Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-1355. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1025-1031, 2008.
- LEE, J.S. et al. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 1257-1261. 2002.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia: Tecnologia das fermentações*. V.1, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 286p. 1975.

LISERRE, A. M, RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. *Food Biotechnology*, v. 21 Issue 1 , p. 1 – 16, 2007.

LIU, L. et al. *Pediococcus ethanolidurans* sp. nov., isolated from the walls of a distilled-spirit-fermenting cellar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 2405-2408, 2006.

MADIGAN, M. T, ; MARTINKO, J. M. ; PARKER, J. *Bro ck. Biología de los Microorganismos*, 10th ed., Madrid: Pearson Educaciòn S.A. 2003, 1011p.

MAGNUSSON, J. et al. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 831–834. 2002.

MARQUES, E. B. *Estudo da formação de biofilme em superfícies abióticas : influência de cátions divalentes e a ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de Enterococcus faecalis*. 2004,133f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2004.

MARTÍNEZ, A. T. Fatty acid composition and taxonomic status of *Ganoderma australe* from Southern Chile. *Mycology Research*, 95: 782-784, 1991.

MARTINIS, E. C. P. Identification of meat isolated bacterio cin-producing lactic acid bacteria using biotyping and ribotyping. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, nº.6, p. 659-661. 2002.

MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de albumina humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 21, n°.4, 2005.

MATTHEWS, A. Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied Environment Microbiology*, 70(10):5715-31, 2004.

MENDES, C. Q. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 37, 12, 2191-2198, 2008.

MENEZES, T. J. B.; SARMENTO, S. B. S.; DAIAUTO, E. R. Influência de enzimas de maceração na produção de puba. *Ciências e Tecnologia de Alimentos.*, v.18 n. 4 Campinas, 1998.

MIERAU, I.; KLEEREBEZEM, M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 68(6), p.705-17, 2005.

MORAIS J. *Estudio de adecuacion de cepas lacticas auto ctonas aisladas de leche cruda de oveja Guirra para la elaboration de queso*. 2004, Tese (Do ctor em Veterinária) Universitat Autônoma de Barcelona. Barcelona (Espana). 2004.

NASCIF-JUNIOR, I. A. *Avaliação da eficácia do ácido láctico frente ao iodo na anti-sepsia dos tetos após a ordenha na prevenção da mastite bovina*. 2005, Tese 150 f. (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil, 2005.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HOLO, H. Minireviews: Bacterio cin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 189, No. 4, p. 1189–1198, 2007.

NOMURA, M. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*, v.101 (2) p. 396-405, 2006.

OEVELEN, D. V.; VERACHTERT, H. Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 27, pp. 34-37, 1979.

OLANO, A. *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia: a Case Report. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, no, 4, p. 1604-1607, 2001.

OSTERHOUT, G. J, SHULL, V.H., DICK, J. D. Identification of Clinical Isolates of Gram-Negative Nonfermentative Bacteria by an Automated Cellular Fatty Acid Identification System. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 29, No. 9, p. 1822-1830, 1991.

PANHOTA, R.S.; BIANCHINI-JR, I.; VIEIRA, A. A. H. Glucose uptake and extracellular polysaccharides (EPS) produced by bacterioplankton from an eutrophic tropical reservoir (Barra Bonita, SP–Brazil). *Hydrobiologia.*, 583:1 , 223-230, 2007.

PATTERSON, M. J. *Streptococcus*. In: Baron's Medical Microbiology (*Baron S et al, eds.*), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. 1996.

PAUL-GRBIN, P.; JIRANEK, V. MINIREVIEW. Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Applied And Environmental Microbiology*, vol. 70, No. 10, p. 5715- 5731, 2004.

PAULO, E. M. Probióticos: Ino culantes intestinais para produção animal. *Tecbahia, Revista Baiana de Tecnologia*. 1993.

PEDROSO, A.F. Efeito do tratamento com aditivos químicos e ino culantes bacterianos nas perdas e na qualidade de silagens de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36:3,558-564, 2007.

RIVAS, B. et al. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 1, 93-98.2004.

ROCHAT, T. Production of a heterologous nonheme catalase by *Lactobacillus casei*: an efficient tool for removal of H₂O₂ and protection of *Lactobacillus bulgaricus* from oxidative stress in milk. *Applied Environment Microbiology* 72, 5143–5149, 2006.

RODRIGUEZ, L.M.Z. *Isolamento, identificação y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de Microbiota contaminante de sangre de matadero*. (Tesis Doctoral) Departament d'Enginyeria Química Agrària y Tecnologia Agroalimentaria . Institut de Tecnologia Agroalimentaria. Universitat de Girona. Girona. Espan a. 2003.

ROMANO, A. H.; TRIFONE, J. D.; BRUSTOLON, M. Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria. *Journal of Bacteriology*. 139:1, 93-97, 1979.

ROMEIRO, R. S. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Romeiro, R.S. (Ed.) *Métodos em Bacteriologia de Plantas*. Viçosa. UFV. pp.87-96. 2001.

RYAN, K. J.; RAY, C. G. *Sherris Medical Microbiology*, 4th ed., McGraw Hill. 2004.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

SÁNCHEZ, I. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*, V. 107(3), p 265-273, 2006.

SASSER, M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. Technical note 101. Microbial ID Inc., Newark, Del., 2001.

SCHLEIFER, K. H. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov, *Systematic Applied Microbiology*. Vol. 6, no. 2, pp. 183-195. 1985.

SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic relationships of acid lactic bacteria and their identification with nucleic acid probes, In Lactic Acid Bacteria. Research and industrial applications in the agro-food industries. p: 23-32, 1991.

STARR, R, M. P. et al. 1981. Ed., The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria ,1981.

SERNA-CO CK, L.; RODRIGUEZ -DE-STOUVENEL, A. 2005. Produção Biotecnológica de ácido láctico Estado del arte. *Ciências y Tecnología Alimentaria*, v. 5 no 1 pp 54-65. 2005.

SHIN, J. H. Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on echo cardiography . *Journal of Infection*. v, 54 (3) p. 149-151, 2007.

SILVA, C. A. Avaliação de probióticos (*Pediococcus acidilactici* e *Bacillus subtilis*) após o desmame e efeitos no desempenho dos leitões. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 1, p. 133-140, 2006.

SILVA, K. C. N. C. *Utilização de probióticos, via oral e tópica, no controle da mastite subclínica bovina*. Monografia conclusão de curso Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia-Bahia, 2002.

SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: ácido láctico uma alternativa. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.37-40, 1991.

SMULDERS, F. J. M. Review: Lactic Acid: Considerations in Favour of its Acceptance as a Meat Decontaminant. *Journal of Food Technology*, 21, 419-436, 1986.

STACKEBRAND, T. E. GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, P.846-849, 1994.

STANIER, R. Y. The microbial world, Editora Prentice-Hall. 1986, 896p.

TALLGREN, A.H et al. Exopolysaccharide-Produzindo as bactérias dos sugarbeets. *Applied Environment Microbiology*. v. 65(2) p. 862 – 64, 1999.

TANASUPAWAT, S. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p.1479-1485, 2000.

TANNO CK, G. W. Probiotics And Prebiotics: Scientific Aspects. Ed. Caister Academic Press, Wymondham, UK, 2005, 230p.

TORO C.R. *Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune*. 2005. Tese doutorado 153 fls (Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

TSENG, C. T.; THOMAS, J.; MONTVILLE. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: Causes and consequences. *Biotechnology Progress.*, 9, 2, 113–121, 1993.

TURNER, K. W. R.; LAWRENCE, C.; LEVRIERE, J. A microbiological specification for milk for aseptic cheese making. N. Z. *Journal Dairy Science Technology*. 21:249–254, 1986.

VAKIL, J. R.; SHAHANI, K. M. Carbohydrate metabolism of lactic acid cultures IV. Glycolytic and HMS pathway enzymes in *Streptococcus lactis* and their sensitivity to antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 36:1, 285 – 295, 1970.

VANDAMME, P. A. R. Polyphasic Taxonomy in Practise: the *Burkholderia cepacia* Challenge. *WFCC Newsletter* v.34, p. 17–24, 2002.

VANDENBROUCKE, K. Active delivery of trefoil factors by genetically *modified Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology*, v. 127,(2) p. 502-513, 2004.

VÁSQUEZ, A. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*. v, 28(5), p. 430-41, 2005.

VERNON, H. C; NYGAARD, A.P. Adaptations in growth factor requirements for lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*. v. 61(4), p.489–495, 1951.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G.; CATTANEO, P. M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 6, p. 447-455,1999.

VIEIRA E. D. *Seleção de linhagens produtoras de goma isoladas de cana-de-açúcar*. 2003, Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia Química. Campinas, SP. 76p, 2003.

WALCOTT, R.R. et al. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathology*, 90, 191-196, 2000.

WALTER , J. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environment. Microbiology.*, v. 67, p. 2578-2585, 2001.

WAYNE, L. G. et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, 463–464, 1987.

WEGMANN, U. et al. 2007. The complete genome sequence of the lactic acid bacterial paradigm *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal. Bacteriology*, 1-57, 2007.

ZANINE, A. M et al.. 2007. Populações microbianas e componentes nutricionais nos órgãos do capim-tanzânia antes e após a ensilagem. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 1, p. 143-150.

CAPÍTULO 2

POLÍMEROS CONSTITUÍDOS POR CARBOIDRATOS UTILIZADOS NO PROCESSO DA MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS: UMA REVISÃO

Elinalva Maciel Paulo¹, Sandra Aparecida Assis², Vera Lucia C. S Santos³

¹Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, (UEFS), (elinalvamaciel@yahoo.com.br); ²Departamento de Saúde,(UEFS); ³Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

A formação de microcápsulas contendo micro-organismos com alto grau de desidratação constitui um grande potencial para a conservação dos micro-organismos. Esta técnica de empacotamento de elemento ativo desidratado consiste em um dos processos da microencapsulação. Atualmente existem diferentes processos de microencapsulação com a utilização de vários tipos de polímeros de origem natural e sintética. O objetivo desta revisão foi fazer um estudo dos polímeros mais utilizados no processo de microencapsulação de micro-organismos, visando à escolha do material de parede mais adequado para a microencapsulação de bactérias. Os sais de alginatos e a associação destes com outros polímeros orgânicos foram os mais utilizados nos trabalhos pesquisados.

Palavras-chave: Microencapsulação, polímeros, conservação, bactérias

POLYMERS CONTAINING CARBOHYDRATE TO BE USED E IN THE PROCESS OF MICROENCAPSULATION OF BACTERIA: A REVIEW

ABSTRACT

The formation of microcapsules containing microorganisms with high degree of dehydration is a great potential for the conservation of the microorganisms. This packaging technique of dehydrated active element consists in one of the processes of microencapsulation. Currently there are different processes of microencapsulation with the use of various types of both natural and synthetic polymers. The purpose of this review was to study the polymers used in the process of microencapsulation of compounds, aimed at the choice of wall material more suitable for the microencapsulation of bacteria. The salts of alginates and their association with other organic polymers have been the most used in the papers surveyed.

Key Words: microencapsulation, polymers, conservation, bacteria

2.1 INTRODUÇÃO

As bactérias são micro-organismos pro carióticos cosmopolitas, que se reproduzem facilmente em seus *habitats* naturais e quando cultivados em condições artificiais apropriadas. Muitas dessas bactérias são utilizadas para fins industriais, seja na área farmacêutica, de alimentos, de cosméticos, na agricultura, ambiental e outras. Quando esses micro-organismos estão em condições ambientais desfavoráveis, tais

como a exaustão de nutrientes e exposição a altas temperaturas ou potenciais redox, podem ser destruídos. Entretanto, certas bactérias, quando isso acontece, entram em estágio de dormência ou “repouso”, desenvolvendo uma estrutura protetora chamada de endósporo (TORTORA; FUNK; CASE, 2002).

A formação de endósporos é um mecanismo natural de conservação e preservação das bactérias, mas pouquíssimas espécies possuem esta capacidade. A maioria das espécies bacterianas só permanece na forma vegetativa, que é metabolicamente ativa, e facilmente inativada quando em condições desfavoráveis. Algumas técnicas de conservação de micro-organismos não esporulantes, foram desenvolvidas, visando, não só manter um estoque para fins de pesquisa, mas também para fins comerciais.

López e Fernandez (2005) afirmam que o princípio das técnicas de conservação se baseia na diminuição da atividade de água da célula microbiana. Essas técnicas são basicamente, o congelamento em substâncias crioprotetoras da cultura microbiana, a liofilização e a dessecação em solo, areia, sal, sílica gel e a microencapsulação.

Esta revisão teve como objetivo a realização de um estudo sobre os principais polímeros utilizados no processo de microencapsulação de compostos, visando à escolha do material de parede mais adequado para a microencapsulação de bactérias.

2.2 MICROENCAPSULÇÃO

A formação de cápsula com alto grau de desidratação constitui um grande potencial para a conservação dos micro-organismos. Esta técnica é chamada microencapsulação e é definida como a tecnologia do empacotamento de materiais sólidos, líquidos e gasosos, em miniaturas, lacrados em cápsulas que podem liberar seus componentes a velocidades controladas em condições específicas (SHAHIDI; HAN, 1993).

Desde que Chang, em 1988, se referiu à criação de estruturas artificiais protegendo as células vivas ou a tecidos com uma membrana polimérica se tem realizado muitos avanços na área de microencapsulação. Esta técnica permite que as cápsulas permaneçam estáveis durante longos períodos de tempo e apresente

superfície uniforme e lisa, de forma que se evite a ativação de componentes dos sistemas imune depois de uma administração “in vivo” (PONCE, 2003).

A cápsula é constituída pelo material de parede, ou encapsulante, e pelo núcleo formado pelo material ativo (encapsulado). Comercialmente as microcápsulas têm tipicamente um diâmetro entre 5 a 500 µm e contêm de 10 a 90% de núcleo (TRINDADE; GROSSO, 2003) Os propósitos gerais da microencapsulação são: fazer um líquido comportar-se como sólido, separar materiais reativos, reduzir toxidez do material ativo, controlar liberação do material, reduzir volatilidade ou flamabilidade de líquidos, mascarar gosto de componentes amargos, aumentar o tempo de prateleira dos produtos e proteger contra luz, calor e outros (SHAHIDI; HAN, 1993).

Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, incluem-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e micro-organismos (ARSHADY, 1993).

Os micro-organismos têm sido microencapsulados ou imobilizados para possibilitar a reutilização dos mesmos, na produção de metabólitos de interesse industrial (GROBOILLOT, et al., 1993), para elevar a concentração de células em reatores, aumentando a produtividade (YOO et al., 1996), para protegê-los contra presença de oxigênio (KIM et al., 1990), contra as baixas temperaturas de congelamento (SHEU; MARSHALI, 1993), contra efeito bactericida do suco gástrico e outros meios ácidos (CUI et al., 2000; TRINDADE et al., 2002), para retirá-los do produto, interrompendo a acidificação (CHAMPAGNE; CÔTE, 1987) e para aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura durante a estocagem do produto (HANSEN, et at., 2002).

2.3 Processos da microencapsulação

O passo inicial na encapsulação é a seleção do material de parede adequado. Substâncias de revestimento são basicamente materiais formadores de filme que podem ser selecionados a partir de uma variedade de polímeros naturais ou sintéticos, dependendo do material a ser revestido e das características desejadas nas microcápsulas (CUI, et al. 2000). O passo seguinte é a preparação das microesferas,

que podem ser produzidas por métodos químicos, físico-químicos e mecânicos (TRINDADE et al, 2002).

2.3.1 Coacervação

Consiste num método de separação de fases líquido/líquido, espontâneo, que ocorre quando são misturados polieletrólitos de cargas opostas em um meio aquoso. O soluto polimérico separado em forma de pequenas gotas constitui o coacervado. Usualmente se utiliza uma proteína, a gelatina, como encapsulante e gomas como a arábica que atuam como polímero de carga oposta para que a coacervação ocorra (TAKENAKA; KAWASHIMA; LIN, 1980). De acordo com Mulkeen (1998), a coacervação pode ser de dois tipos: simples, onde a separação da fase líquida ocorre pela adição de um eletrólito à solução coloidal ou complexa, que resulta da neutralização mútua de dois colóides carregados com cargas opostas em solução aquosa.

2.3.2 Polimerização interfacial

É um processo onde se polimeriza um monômero na interfase de duas substâncias imiscíveis, formando uma membrana que dará lugar à parede da microcápsula (THIES, 1996). A membrana de polímeros, tais como poliamida, náilon, poliéster, polifenilester, é produzida pela reação entre monômeros solúveis em água, tais como poliamina, 1,6-hexametilenediamina, piperidina, L-lisina, polifenol, e monômeros de solvente orgânicos, tais como *sebacoil cloro*, 2,2-dicloro éter (PARK; CHANG, 2000).

2.3.3 Gelificação iônica

É um processo que utiliza principalmente o alginato como componente da membrana e a combinação com íons divalentes como o cálcio, para induzir a gelificação. O alginato é um heteropolissacarídeo linear formado pelos ácidos D-

manurônico e L-gulurônico. Cátions divalentes como Ca^{2+} ligam-se preferencialmente ao polímero de ac. L-gulurônico. Estequiometricamente se requer 7,2% de cálcio (baseado no peso do alginato de sódio). Ao entrar em contato com os íons de cálcio, o alginato forma um gel instantaneamente. Os íons seguem difundindo-se no alginato, fazendo com que o gel vá endurecendo com o tempo (KING, 1995, ROCHA, GROSSO, 2001; MUKAI-CORREA et al., 2005).

2.3.4. Incompatibilidade polimérica

Neste método utiliza-se o processo de separação de fases em uma mistura de dois polímeros quimicamente diferentes e incompatíveis num mesmo solvente. Por isso pode ser chamado de método por emulsão ou sistema de duas fases. A incompatibilidade polimérica é o mecanismo que induz a separação de fases. O material a encapsular vai interagir somente com um dos polímeros o qual se adsorve na superfície do material a encapsular formando uma película que o engloba (THIES, 1996). O polímero incompatível só entra no sistema para propiciar a formação de duas fases. Este método difere da coacervação complexa onde os dois polímeros incompatíveis fazem parte da parede da cápsula (MULQUEEN, 1998).

2.3.5 Polimerização *in situ*

Encapsulação *in situ* é um termo usado para descrever dois diferentes processos de encapsulação. Em ambos o material encapsulado fica disperso na fase aquosa, o processo difere no tipo de parede da cápsula produzida e na fase em que ocorre a polimerização da parede (KIM; CHANG, 1990). Em um método, comumente chamado encapsulação uréia-formaldeído, a parede é formada da polimerização da poliamina e aldeído na fase aquosa. No outro, um monômero solúvel em óleo ou pré-polímero é convertido a polímero da parede pela reação da hidrólise do isocianeto que ocorre na água. Esse método é uma versão da polimerização interfacial, no qual o material de parede é predominantemente uma poliuréia (THIES, 1996).

2.3.6 Lipossomas

Lipossomas são estruturas compostas de uma bicamada de lipídeo que engloba um volume aquoso, originando as microcápsulas (KING, 1995). São elaboradas com moléculas anfipáticas, que possuem sítios hidrofóbicos (ácidos graxos, fosfolipídios, etc.) e sítios hidrofílicos (colina, serina, inositol, etc.). Na fase aquosa se coloca o material a ser encapsulado quando esse é hidrofílico ou então se agrega o solvente orgânico, onde se dissolve o material se esse for lipofílico (ISLAS, 2002).

2.3.7 Extrusão

Neste processo os micro-organismos são misturados em uma solução hidrocoloidal, sendo esta depois pulverizada na forma de gotículas em uma solução de endurecimento do hidrocolóide, normalmente o cloreto de cálcio. O polímero mais utilizado neste método é o alginato de sódio. A reação do alginato com o cálcio resulta na formação do alginato de cálcio que é insolúvel em água. (TRINDADE ; GROSSO, 2003).

2.3.8 *Spray drying*

Consiste em transformar um produto fluido em partículas secas. Este processo envolve a formação de uma suspensão ou emulsão, contendo material ativo e o agente encapsulante seguida da nebulização desta em uma câmara de secagem com circulação de ar quente (a água contida nas gotículas evapora em contato com o ar quente e os sólidos remanescentes do agente encapsulante envolvem o material ativo). O tamanho médio das partículas obtida com este método é de 5 a 500 µm (SANTOS, FERREIRA, GROSSO, 2000; TRINDADE; GROSSO, 2003).

2.4 PRINCIPAIS POLÍMEROS UTILIZADOS NA MICROENCAPSULAÇÃO

Segundo Bertolini (1999), os principais materiais utilizados na microencapsulação incluem carboidratos (amido, maltodextrinas, xarope de milho sacarose e ciclodextrinas), celulose (carboximetilcelulose e derivados), gomas (arábica, agar, alginato, agarose, carragenana), lipídeos (ceras, parafinas e ácidos graxos), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina, proteínas do soro do leite), fontes alternativas como a quitosana, materiais inorgânicos (sulfato de cálcio, silicatos, argila). O encapsulante ideal deve ter baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser de fácil manipulação durante o processo; ter baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos; deve ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o ingrediente ativo; não ser reativo com o material a ser encapsulado; deve ainda ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula (SHAHID; HAN, 1993).

2.4.1 Alginatos

Os alginatos extraídos de algas marrons, são os polímeros mais utilizados na imobilização e microencapsulação de células, eles são extraídos de algas marrons. Esses polímeros pertencem a uma família de polissacarídeos lineares não ramificados, e são constituídos por duas unidades monoméricas, o ácido D-manurônico e o ácido L-glucurônico (LASTA, 2005).

A composição e extensão das seqüências e o peso molecular determinam as propriedades físicas dos alginatos. Eles podem ser ligados a cátions multivalentes tais como Ca^{2+} ou Ba^{2+} . As micropartículas de alginato de cálcio são geralmente preparadas por dois métodos: a) por gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de um sal de cálcio; b) por gelificação do alginato em uma emulsão água/óleo (GOMBOTZ et al, 1998). A reação entre alginato e cátions multivalentes forma um pequeno corpúsculo de gel com uma porosidade na faixa de 5 a 200 nm (KLINKENBERG, 2001).

As micropartículas de alginato de cálcio são geralmente preparadas por dois métodos: a) por gotejamento de uma solução de alginato de sódio em uma solução de

um sal de cálcio; b) por gelificação do alginato em uma emulsão água/óleo (GOMBOTZ et al, 1998).

Os alginatos disponíveis no mercado são comercializados na sua maioria, em forma de sais hidrossolúveis, livres de celulose, branqueados e purificados, tais como: ácido algínico, alginato de sódio, alginato de potássio, alginato de amônio, alginato de cálcio, alginato de propilenoglicol e, também, na forma de compostos combinados, como alginato de amônio-cálcio e alginato de sódio-cálcio (LASTA, 2008).

O uso do alginato é favorável porque esse reagente é mais barato, mais simples e de maior biocompatibilidade comparação com outros polímeros. (KLEIN, STOCK, VORLOP, 1983; TANAKA, MASATOSE, VELERY, 1984, KRASACKOOPT, BHANDARI, DEETH, 2003). No entanto, o gel de alginato é suscetível à desintegração na presença de excesso de agentes quelantes de íons de Ca^{2+} e ambiente químico severo, como pH muito baixo (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH 2003). Policátions, tais como quitosana ou ácidos poli-amino (por exemplo, poli lisina), além de reduzirem a porosidade do gel, formam um complexo forte com alginatos que são estáveis na presença de agentes quelantes de Ca^{2+} (SMIDSRD ; SKJAK-BRAEK, 1990; GOMBOTZ et al., 1998).

Bregni et al. (2000) produziram microesferas de *Bacillus subtilis* na forma vegetativa e esporulada, utilizando alginato de sódio. Os resultados deste estudo mostraram que a encapsulação tanto de células microbianas, como de seus esporos foram satisfatórios, por manterem alta viabilidade destes micro-organismos por um período de 150 dias.

Klinkenberg (2001) utilizou alginato de sódio 4% (m/v) para imobilizar *Lactococcus lactis subsp. Lactis* para a realização de estudos sobre a interferência do pH na liberação e desenvolvimentos dos *Lactococcus* encapsulados.

A microencapsulação do *Aerococcus viridans* com catalase em 3% (m/v) de alginato de sódio mostrou uma conversão de 98,5%, devido à alta produção da enzima *Dihydroxyacetone phosphate* (STREITENBERGER, 2002) mostrando que a microencapsulação não interferiu na atividade enzimática da bactéria. Chandramoulia et al., (2003) realizaram experimentos sobre a viabilidade dos *Lactobacillus acidophilus* encapsulados em diferentes concentrações de alginato de cálcio (0,5; 1,8 e 2% m/v) em

presença do suco gástrico (pH 2,0) demonstrando a alta sobrevivência destes micro-organismos microencapsulados, principalmente, na concentração de 2% de alginato de cálcio. Park et al., (2002) realizaram estudos com a bactéria *Bifidobacterium bifidum*. Esta bactéria é estimuladora do anticorpo IgA, que protege as mucosas do hospedeiro contra a ação de micro-organismos. O *B. bifidum* é um micro-organismo anaeróbico e bastante sensível à acidez estomacal. A sua administração via oral no hospedeiro tornou-se possível após suas células terem sido microencapsuladas com alginato de cálcio 1,5 % (m/v), obtendo-se uma alta sobrevivência durante a passagem do trato gastrointestinal e conseqüentemente uma maior produção de IgA nas mucosas do hospedeiro.

As bactérias lácticas são normalmente microencapsuladas com alginato de cálcio, porém este processo apresenta problemas de dissolução de cápsulas, devido ao fato destas bactérias tornarem o meio ácido.

Yoo et al. (1996) utilizaram três fórmulas contendo alginato para microencapsular *Lactobacillus casei*, bactéria produtora de grande concentração de ácido láctico: na primeira formulação alginato de cálcio, na segunda alginato de bário e na terceira alginato na presença de quitosana. Obtiveram um melhor resultado com as cápsulas formadas com alginato de bário e com alginato na presença de quitosana, pelo fato destas cápsulas não terem sido destruídas no meio ácido.

No entanto, Iyer e Kailasapathy (2005) comparando a sobrevivência de *Lactobacillus spp* em condições *in vitro* de meio ácido (pH 2,0) e sais biliares e adicionado no iogurte, observaram uma melhor eficácia destas células microencapsuladas com o material de parede constituído por quitosana e amido de milho (1% m/v) do que com as células microencapsuladas com o alginato.

2.4.2 Quitosana

Quitosana é um biopolímero de elevada massa molar usualmente preparado pela purificação e acetilação da quitina, que apresenta grande possibilidade de formar filmes, fibras e membranas de microcápsulas. Possui habilidade para formar complexos com íons de metais de transição devido à presença de grupos amino da unidade 2-

amino-2-desoxi-D-glicose. A observação de que a quitosana possui uma afinidade por todos os íons metálicos do grupo III, cátions de metais de transição em concentrações na faixa de 20-40ppm; é bem conhecida. Quitosana é usualmente obtida na forma de flocos ou em pó, ambos não possuem uma porosidade elevada, e são solúveis em meio ácido. Esta solubilidade da quitosana em meio ácido limita seu uso. Mauro et al., (2000) realizaram trabalhos experimentais, com cápsulas de quitosana-álcool polivinílico, objetivando obter cápsulas porosas e insolúveis em meios ácidos.

A associação da quitosana com alginato de cálcio leva à formação de cápsulas mais estáveis (CALAMARIL, 2004). Alginato associado a quitosana é usado para formar uma dupla parede na microcápsula. Esse tipo de microcápsula não somente confere a proteína uma propriedade microambiental pela dupla proteção hidrofílica, mas também retarda a liberação do material encapsulado (MUZZARELLI; BARAONTINI; ROCCHETTI, 1976).

2.4.3 Pectina

Pectinas são polissacarídeos estruturais de um grupo complexo de polissacarídeos encontrados na parede celular primária e nas camadas intercelulares de plantas terrestres. Geralmente estão associadas à celulose, hemicelulose e ligninas e são mais abundantes em frutos e em tecidos jovens, tais como, cascas de frutas cítricas. Estruturalmente, as moléculas de pectina são constituídas de uma cadeia principal linear de unidades repetidas de (1 → 4) – -D-ácido galacturônico, sendo que parte destas unidades, apresenta-se esterificada, como éster metílico (BRANDÃO; ANDRADE, 1999). Este polímero é bastante utilizado em alimentos para produção de geléias e doces de frutas, mas, devido a sua propriedade gelificante também pode ser utilizado no processo de formação de microcápsulas bacterianas, como pode ser visto no trabalho realizado por Moretti et al. (2006). Estes autores concluíram que o conjugado pectina/caseína na constituição de microcápsulas é eficiente para prover proteção ao *L. acidophilus* em valores de pH semelhantes aos do estômago.

2.4.4 Agarose

É um polissacarídeo obtido de algas vermelhas *Rhodophyceae*, que podem ser considerados como um copolímero alternativo da unidade b-D-galactopyranosyl e 3,6-anidrogalactopiranosil ligados fortemente pela ligação glicosídica 1-3 e 1-4 respectivamente. Tem massa molar de 200 kDal. Os géis de agarose formam poros grandes. Tem sido usado extensivamente nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, devido a sua capacidade de formar gel. É usado geralmente em concentrações de 1 a 3%. A agarose forma gel termorreversível em concentrações baixas como 0,1% e em temperaturas consideravelmente abaixo da dissolução do gel ($T_{\text{gelação}} \sim 40^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{dissolução}} \sim 90^{\circ}\text{C}$) dependendo do substrato (GARCIA; VIDAL, 2000).

Trueba (2004) estudou a sobrevivência da bactéria patogênica *Leptospira interrogans* sorovar canicosa em dois meios aquosos carentes de nutrientes: água destilada (pH 7,2) e meio semi-sólido composto de água destilada adicionada de 0,5% de agarose purificado. As *Leptospiras* incubadas em água destilada conservaram a mobilidade durante 110 dias. Quando foram incubadas em água destilada contendo agarose, sobreviveram 347 dias. Com este resultado pode-se inferir sobre uma possível utilização da agarose no processo da microencapsulação. Zvitov, Zohar-Perez e Nussinovitch (2004) realizaram experimentos com *Escherichia coli* e *Serratia marcescens* objetivando observar a redução populacional destas bactérias microencapsuladas por alginato e agarose frente à aplicação de várias voltagens de corrente elétrica em 10 segundos. A redução do número de células foi menor nas bactérias encapsuladas pela agarose.

2.4.5 Carragenana

Carragenana, assim como as agaranas, constituem um grupo de polissacarídeos formados por galactanas, mas são altamente sulfatadas e fortemente aniônicas, ou seja, têm excesso de carga negativa. É preparada pela extração alcalina (e modificação) de algas vermelhas (*Rhodophyceae*) na maioria do gênero *Chondrus*, *Euclima*, *Gigartina* e *Irileaea*. Diferentes algas marinhas produzem diferentes carragenanas. Na sua estrutura molecular caracteriza-se como um polímero linear

contendo cerca de 25.000 derivados da galactose. Todas as carragenanas são altamente flexíveis, devido a sua conformação de dupla hélice. Com o aquecimento formam gel flexível e resistente quando misturadas com o íons de K^+ e Ca^{2+} (LAPASIN; PRICI, 1999 apud TONELI; MURR; PARK, 2005). Este polímero é utilizado na imobilização de células bacterianas. Tsen et al., (2007) utilizaram o k-carragenana em células de *Lactobacillus reuteri* para testar o seu efeito protetor em condições de armazenamento deste micro-organismo em baixa temperatura. Buyuhgungor (1992) utilizou este polímero para imobilizar células de *L. bulgaricus* e testar o seu efeito protetor em condições de refrigeração, mostrando uma excelente alternativa para esto car células bacterianas em baixas temperaturas.

2.4.6 Goma arábica

A goma arábica é preparada a partir de um exsudato de várias espécies de árvores de acácia. Quimicamente é um sal neutro ou levemente ácido de um polissacarídeo complexo que contém íons cálcio, magnésio e potássio em suas moléculas, sendo formado por seis carboidratos: galactose, ramnose, arabinopirranose, arabinofuranose, ácido glucurônico e ácido metilglucorônico (PROKASH; MANGINO, 1990).

Tradicionalmente a goma arábica tem sido utilizada em microencapsulação porque apresenta baixa viscosidade em solução, tem boa retenção de compostos voláteis e favorece a estabilidade das emulsões (ABURTO, TAVARES ; MARTUCCI, 1998). Os estudos de estabilidade indicaram uma boa proteção as microcápsulas constituídas pela goma arábica frente ao efeito da luz e da temperatura, mas não ao efeito do oxigênio o que deixa os compostos micoencapsulados sujeito à oxidação.

Lian; Hsiao e Chou (2003) encapsularam *Bifidumbacterium longum* e *B. infantis* em amido, goma arábica, gelatina e leite desnatado e ambos demonstraram uma maior sobrevivência ao suco gástrico pH 2.0 e a bile 2%, quando comparados com às células não encapsuladas. Isso implica num grande potencial de se utilizar estes materiais no preparo de produtos probióticos contendo bifidobactérias que resistem à passagem gastrointestinal e desta forma possam colonizar no intestino.

2.4.7. Amido

O amido é um polissacarídeo formado por moléculas de glicose ligadas entre si através de numerosas ligações (1,4) e ligações (1,6), sendo que estas últimas formam os "pontos de ramificação" da cadeia. Sua molécula é muito linear e forma hélice em solução aquosa (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). O grão de amido é uma mistura de dois polissacarídeos: amilose e amilopectina. A amilose é uma macromolécula constituída de 250 a 300 resíduos de D-glicopirranose, ligadas por pontes glicosídicas -1,4, que conferem a molécula uma estrutura helicoidal. A amilopectina, macromolécula menos hidrossolúvel que a amilose, sendo constituída por aproximadamente 1400 resíduos de -glicose ligadas por pontes glicosídicas -1,4; ocorrendo também por ligações -1,6. A amilopectina constitui, aproximadamente, 80% dos polissacarídeos existentes no grão de amido (CEREDA , 2001).

O amido é uma substância de alta propriedade higroscópica, por isso é bastante utilizado em processos industriais baseados na desidratação como na produção de sucos de frutas desidratados e na microencapsulação de diferentes produtos. Daiuto e Cereda (2003) citam como os mais utilizados: amidos ou féculas; dextrinas; maltodextrinas, ciclodextrinas e xaropes de milho. Porém, Santos; Ferreira e Grosso (2000) afirmam que as cápsulas de amido não oferecem adequada proteção a compostos sensíveis a oxidação por luz ou temperatura. Estudo, realizado por O`riordan, et al., (2001), indicou que o uso do amido como material de parede, não ofereceu proteção nas cepas microencapsuladas de *Bifidobacterium* quando armazenados por 20 dias em dois produtos de natureza ácida. O amido de milho modificado por inclusão de agrupamento lipofílico tem mostrado um melhor resultado na microencapsulação. O amido utilizado também pode ser de outras fontes, como mandioca, batata e trigo (CARDELLO; CELESTINO, 1996).

As ciclodextrinas (CDs) são substâncias obtidas a partir do amido, e são muito adequadas para microencapsulação por inclusão molecular. São formadas a partir da degradação controlada e posterior ciclização do amido por enzimas específicas como a ciclodextrina glicosil transferase (CARDELLO; CELESTINO, 1996). São constituídas por um número variável de unidades de glicose unidas entre si por ligações -1,4. As mais

comuns são α -CD (fig. 4) β -CD e γ -CD com 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente (BEJARANO; DIAS, 2004). Tem a forma de um cone truncado com uma cavidade hidrofóbica no centro. Externamente as CDs são hidrofílicas, sendo, portanto, solúveis em água. Devido a hidrofobicidade da cavidade interna das CDs, moléculas hidrofóbicas podem penetrar e se ligar no seu interior, desde que as dimensões das moléculas sejam compatíveis com o tamanho da cavidade (MARTIOLE; AMAYA, 2003).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Numerosos processos de microencapsulação já foram desenvolvidos e patenteados, porém existe a necessidade de mais estudos com relação ao material de parede ideal para a microencapsulação de micro-organismos. Apesar de alguns estudos mostrarem os sais de alginato e a sua associação com outros polímeros orgânicos, como ideal para o material de parede de microcápsulas bacteriana, estes compostos não formam uma barreira eficiente em algumas condições, sugerindo que ainda são necessários o desenvolvimento de novos polímeros para uma aplicação comercial.

REFERÊNCIAS

ABURTO, C. L.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18 n. 1, p. 45-48. 1998.

ARSHADY, R. Microencapsules for food.1993. *Journal of Microencapsulation*. v.10, n. 4, p. 413-435, 1993.

BEJARANO, R. O.; DIAZ, A. B. Sistemas de liberação controlada de fármacos. *Clon.*, v. 2 n. 1, p.73-81, Universidad de Pamplona, 2004.

- BERTOLINI, A. C. *Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalool e citral microencapsulados em goma arábica por atomização*. 1999. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 1999.
- BREGNI, C et al. Alginate microspheres of *Bacillus subtilis*, *Ars Pharmaceutica*. 41:3, p. 245-248, 2000.
- BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de Fatores Estruturais no Processo de Gelificação de Pectinas de Alto Grau de Metoxilação . *Polímeros: Ciência e Tecnologia* , p.38-44, 1999.
- BÜYÜKGÜNGÖR, H. Stability of *Lactobacillus bulgaricus* immobilized in kappa-carrageenan gels. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* . 53(2):173-5, 1992.
- CALAMARIL, S. Efecto del quitosan de alto peso molecular y del alginate de sodio sobre la proteinasa ácida secretoria de *Candida albicans*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*; 21, p. 206-208, 2004.
- CARDELLO, H. M. A. B.; CELESTINO, E. M. Encapsulação de aromas e sabores: Utilização de amidos com agentes encapsulantes. In: Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos , 30(2), p. 166-171, 1996.
- CARRAGEENAN. Disponível em: <<http://www.lsbu.ac.uk/water/hyeal.html>> acesso em 10 julho de 2005.
- CEREDAM, M. P. *Culturas de tuberosas Amiláceas Latino Americana*. In: Propriedades gerais do amido, Fundação cargill, São Paulo, v 1, p. 141-185, 2001.
- CHAMPAGNE, C. P; CÔTE, C. B. Cream fermentation by immobilized lactic acid bacteria. *Biotechnology Letters*, v. 9, n. 5, p 329-332, 1987.

CHANDRAMAOULIA, V. et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, p. 27-35, 2003.

CHANG, Y. I.; SCIRE, J.; JACOBS, B. Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil. In: Flavor Encapsulation. *Journal of the American Chemical Society*, 10, p. 87-102. 1998.

CUI, J. H et al. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine micro particles. *International Journal of Pharmaceuticals*, v. 210, p. 51-59, 2000.

DAIAUTO, E. R.; CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento. *Culturas Tuberosas Amiláceas Latino Americana*. In: Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americana. Botucatu. v. 3, p.499- 474, 2003.

GARCIA, R. B.; VIDAL, R. L. Preparation and structural characterization of o-acetil agarose with low degree of substitution. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, São Carlos, v. 10, n. 3, p. 155-161, 2000.

GOMBOTZ, W. R.; WU, S. F. Protein release from alginate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 31,267-285, 1998.

GROBOILLOT, A. F. et al. Membrane formation by interfacial crosslinking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Food Biotechnology and Bioprocessin*, v. 42, p. 1157-63, 1993.

HANSEN, L. T et al. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 19,p. 35-45, 2002.

SLAS, R. P. Alimentos Microencapsulados: *Particularidades de los Procesos para la Microencapsulación de Alimentos para Larvas de Especies Acuicola*. Avances em Nutrición Acuicola VI. Memórias del XVI – Simposium Internacional de

Nutrición Acuícola. 2 al 6 de septiembre del 2002, Cancún, Quintana Roo, México. 2002.

IYER , C.; KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt, *Journal of Food Science*, 70 (1): 18-23. 2002.

KIM, D.; CHANGHN, J. Enhanced shikonin production from *Lithodpermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, p. 460-466. 1990.

KING, A ; TRUBIANO, P; PERRY, P. Modified starch encapsulating agents offer superior emulsification, film forming and low surface oil. *Food Product Development*, p. 54-57, 1976.

KING , A. Encapsulation of food ingredients. En: *Encapsulation and controlled release of food ingredients* (ed. por S. Risch and G. Reyneccius), p. 26-39, 1995.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate bio catalysts. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 18(1), p. 86-91, 1983.

KLINKENBERG, G. et al. pH-controlled cell release and biomass distribution of alginate-immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 91, p.705-714, 2001.

KRASAEKOOPT, W.; HANDARI, B.: DEETH. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt: a review. *Internacional Dairy Journal*, 13 (1), 3-13, 2003. Lasta MSD. Alginato. 2005. Disponível em:

<<http://www.monográficos.com/trabajos12/alginate/alginate>> Acesso em 16 jun. 2005.

LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L; COX, M. M . *Princípios de Bioquímica*. Trad. Arnaldo Antônio Simões e Wilson Roberto N. Lodi. 2ª ed. São Paulo: Sarvier. 2000.

- LIAN, W.C; HSIAO , H.C; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology* 86, p. 293– 301, 2003.
- LOPÉZ , M. D. G; FERNANDEZ, F. V. Colección Española de cultivos tipo (CECT). Universitat de València. (Valência). Disponível em < <http://www.uuv.es/cect>>. Acesso em 17 jun. 2005.
- MARTIOLE, G; AMAYA, R. D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, Campinas, 23(supl), p. 102-105. 2003.
- MAURO A. V. C. M.; LARANJEIRA, C. M.; VALFREDO, S. F; FÁVERE, T. Processo alternativo para remoção de cobre e níquel (II) de soluções aquosas utilizando cápsulas de quitosana-álcool polivinílico. *Química Nova*, 23(1),13, 2000.
- MORETTI, T. S. et al. Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e avaliação da resistência deste ao processo empregado , ao armazenamento e pH ácido. Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC, 2006.
- MUKAI-CORREA, R. et al. Caracterização de microcápsulas contendo docaseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v.8, n. 1, jan./mar., p.73-80, 2005.
- MULQUEEN, P. J. *Chemistry and technology of agrochemicals*, In: formulations. Recent developments on safer formulations of agro chemicals. Editora D. A. Knoweles, Great Britain, 1998.
- MUZZARELLI, R. A. A; BARAONTINI, G; ROCCHETTIR. *Biotechnology and Bioengineering* , v. 18, p.1445, 1976.
- O`RIORDAN K et al. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage, *Journal of Applied Microbiology* , 91,p. 1059 -1066, 2001.

PARK, J. K et al. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cellular Immunology*, 219, p.22-27, 2002.

PARK, J. K; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18, p 303-319. 2000.

PONCE, S. Efecto del polícatión en la viabilidad celular y la estabilidad mecânica de microcápsulasde alginato. *Tecnología Farmacêutica*. España, p. 99-101, 2003.

PRAKASH, A.J. M; M.: MANGINO. The effects of added proteins on the functionality of gum arabic in soft drink emulsion systems. *Food Hydrocolloids*, v. 4, n.3, p. 177. 1990.

ROCHA, W. S; GROSSO, C. R. F. Permeação de solutos de diferentes massas moleculares em matrizes compostas de alginato de cálcio e acetofitalato de celulose. *Sitientibus*. Feira de Santana, 35, p.125-148. 2006.

SANTOS, B. A.; FERREIRA, V. P; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas, uma alternativa viável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, ano III, n. 16, p. 26-30, 2000.

SHAHIDI, F; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Review in: *Food Science and Nutrition*, v. 33, nº 6, p. 501-547, 1993.

SHEU, T. Y; MARSHALL, R. T. Micro entrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Dairy Science*, 54, n. 3,p. 557-61, 1993.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8(3), p. 71-78, 1990.

STREITENBERGER, S. A. Microencapsulation of *Aerococcus viridans* with catalase and its application for the synthesis of dihydroxyacetone phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58, p. 73-76, 2002.

TAKENAKA, H.; KAWASHIMA, Y.; LIN, S.Y. Micrometric properties of Sulfamethoxazole micro capsules prepared by gelatin-acacia coacervation. *Journal Pharmaceutical Science*, 69(5), p. 513-516, 1980.

TANAKA, H.; MASATOSE, M.; VELEKY, I. A. Diffusion characteristic of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(1), p. 53-58, 1984.

THIES, C. A survey of Microencapsulation processes. En: *Microencapsulation* (ed. Por S. Benita): Marcel Dekker, Inc.N.Y, EUA, ISBN 0-8247-9703-5, p. 1-20, 1996.

TONELI, J. T. C. L, MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Review: Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, Especial, v.7, n.2, p.181-204, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. *Microbiologia*. 7^o. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2002, 827p

TRINDADE, C. S. F.; GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas, 37(supl.), p. 88-93, 2003.

TRINDADE, C. S. F. ; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *Lactobacillus* (La-05) and *B. Lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bili. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n 4, p. 485-494, 2002.

TRUEBA, G. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*, v. 7, p. 35-40, 2004.

ZVITOV, R ; ZOHAR-PEREZ, C.; NUSSINOVITCH, A. Short-Duration Low-Direct-Current Electrical Field Treatment Is a Practical Tool for Considerably Reducing Counts of Gram-Negative Bacteria Entrapped in Gel Beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6): 3781–3784, 2004.

YOO, I. K et al. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for Lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, 428-433, 1996.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DE BIOPOLÍMEROS: ENFOQUE EM EXOPOLISSACARIDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS LÁTICAS

¹Elinalva Maciel Paulo, ²Sandra Aparecida Assis, ³Maria Cristina Rodrigues Santos,
⁴Milton Ricardo de Abreu Roque

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Av Transnordestina s/n Km 0 Ba116, Feira de Santana, tel./fax (75) 32248018. elinalvamaciel@yahoo.com, ²Departamento de Saúde - UEFS, ³Departamento de Tecnologia, – UEFS, ⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

Biopolímeros são compostos de alto peso molecular produzidos por seres vivos, podendo apresentar diferentes funções. Podem ser produzidos intracelularmente ou extracelularmente pelos micro-organismos, sendo neste último caso chamados de exopolissacarídeos. Estes produtos são de grande interesse industrial, principalmente nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Bactérias lácticas são grandes produtoras de exopolissacarídeos. Os gêneros mais envolvidos são *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, e *Lactococcus*, que produzem uma grande variedade de polímeros com diferentes estruturas, com peso molecular que varia de $4,0 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^6$. A estrutura química dos exopolissacarídeos vai depender do tipo dos carboidratos que os constituem, do perfil metabólico, da linhagem produtora e das condições de produção. Diferentes técnicas químicas, analíticas e imunológicas são utilizadas para identificar e caracterizar os biopolímeros, sendo necessárias no mínimo três técnicas para uma identificação confiável. Neste estudo será atribuído uma maior ênfase aos polímeros produzidos pelas bactérias lácticas.

Palavras-chave: Biopolímeros, bactérias lácticas, exopolissacarídeos.

STUDY OF BIOPOLYMERS: FOCUS ON EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY LACTIC BACTERIA

ABSTRACT

Biopolymers are composed of high molecular weight produced by living organisms and may have different functions. Can be produced intracellularly or extracellularly by microorganisms. In the latter case is called exopolysaccharides. These products are of great industrial interest, especially in the pharmaceutical and food industries. Lactic acid bacteria are large producers of exopolysaccharides. The genera most involved are *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Lactococcus*, which produce a wide variety of polymers with different structures, with molecular weights ranging from 4.0×10^4 to 6.0×10^6 . The chemical structure of exopolysaccharides will depend on the type of carbohydrates that constitute the metabolic profile, line producer and production conditions. Different chemical techniques, analytical and immunological are used to identify and characterize the polymers, requiring at least three techniques to arrive at a reliable identification. In this study was attributed to greater emphasis on polymers produced by lactic acid bacteria.

Key Words: biopolymers, lactic acid bacteria, exopolysaccharides

3. 1 INTRODUÇÃO

Um polímero é uma macromolécula composta por muitas unidades de repetição, denominadas de monômeros, ligadas por ligação covalente. Pode ser formado por material orgânico ou inorgânico. Possui alta massa molar (acima de dez mil, podendo chegar a dez milhões) (CANEVAROLO Jr., 2006). A reação pela qual os monômeros se unem para formar o polímero recebe o nome de polimerização. Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos. Os de origem naturais podem ser orgânicos ou inorgânicos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Os polímeros orgânicos, designados de biopolímeros, são sintetizados por organismos vivos, sob as mais diversas condições ambientais, com diferentes composições de monômeros, estrutura macromolecular e diferentes propriedades físicas (BASTOS, 2007). A terminologia biopolímeros assume dois significados: polímeros biologicamente ativos, neste caso as proteínas, ou polímeros utilizados em aplicações biológicas, como o silicone (CANEVAROLO Jr., 2006). A maioria dos biopolímeros não produz efeito tóxico e é biodegradável.

Os biopolímeros são também chamados de colóides hidrofílicos, hidrocolóides ou gomas. São polímeros de elevado peso molecular que se dissolvem ou se dispersam em água para agir como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes e encapsuladores. Além disso, mostram propriedades secundárias de emulsificantes. Por isso são bastante utilizados na indústria de alimentos. Essas propriedades funcionais são responsáveis pela textura (corpo, viscosidade, consistência) dos alimentos processados (GLICKSMAN, 1986). Muitos podem ser de origem vegetal, tais como: algas (alginato, agar, carragenana), sementes (gomas guar e locusta) ou exsudatos de árvores (gomas arábica e karaya); alguns são produtos de biossíntese de fungos e bactérias (xantana, gelana, dextrana, curdulana) e, outros, são produzidos por modificações químicas de polissacarídeos naturais (pectina, gelatina, amido, carboximetilcelulose de sódio) (GARCIA-CRUZ, 2001).

3.2 POLÍMEROS MICROBIANOS

Os polímeros microbianos podem ser sintetizados por bactérias, fungos filamentosos e leveduras. São constituídos principalmente por polissacarídeos, contendo pequenas quantidades de proteínas, lipídeos, glicoproteínas globulares e íons (PACE, 1992). Formam géis em meio aquoso, mesmo em baixa concentração. (MOREIRA; DEL PINO; VENDRUSCOLO, 2003). Os polissacarídeos de origem microbiana têm sido bastante estudados nos últimos anos, devido a grande variedade de propriedades que não são encontradas em polímeros originados de plantas, algas e animais (SUTHERLAND, 2002). Constituem uma alternativa aos polímeros de plantas (pectina, goma guar) ou algas (carragenana e alginato) usados normalmente como

agentes espessantes e gelificantes, pois, nem sempre estes estão disponíveis em qualidade e propriedades requeridas, devido à variabilidade estacional. Sendo às vezes, necessário que se façam modificações químicas na molécula destes polímeros, para melhorar a sua estrutura e suas propriedades reológicas. No entanto o uso destes compostos modificados fica restrito. Daí o interesse em pesquisar os polímeros microbianos (GÓMEZ, 2006).

Os polímeros microbianos apresentam algumas vantagens de sua obtenção quando comparados a estes polímeros tradicionais. Dentre elas, pode-se citar: grande versatilidade dos micro-organismos para sintetizar polissacarídeos neutros ou com cargas, com uma grande variedade de composição e propriedades funcionais, fonte de produção renovável e inesgotável, produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e produção em espaço relativamente pequeno (PARIKHI & AMWAR, 2006). Além de apresentarem maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas, devido à especificidade do micro-organismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura (FARIA, 2002). Outro aspecto positivo é a possibilidade de manipular geneticamente os micro-organismos produzindo polissacarídeos em maior quantidade e de melhores propriedades funcionais (VAN KRANENBURG, et al., 1999).

Por outro lado, é conveniente ressaltar que os polissacarídeos extraídos de plantas e algas ainda dominam o mercado de gomas devido ao baixo custo de produção. Polímeros bacterianos ainda representam uma pequena fração do atual mercado de biopolímeros. Os principais fatores limitantes para a utilização de polímeros microbianos estão associados ao seu custo de produção (STREDANSKY et al., 1999, DE VUYST; DEGEEST, 1999) e o baixo nível de produção, que pode variar de poucos miligramas a aproximadamente 1 g/L para micro-organismos considerados bons produtores e cultivados em meios suplementados (DE VUYST et al., 1999; LAWS et al., 2001).

Os polissacarídeos que constituem os polímeros microbianos são multifuncionais, podendo constituir como uma substância de reserva, encontrada no interior da célula como o glicogênio e o poli-hidroxialconalatos (PACE, 1992). Podem também formar substância estrutural como o peptídeoglicano e ácido lipoteicoico encontrados na parede celular de bactérias Gram-positivas e lipopolissacarídeos da parede celular das bactérias Gram-negativas, e substâncias mediadoras da interação dos micro-organismos com o meio ambiente, produzidas no interior da célula e secretadas para fora desta, originando polissacarídeo extracelular (KUMAR; MODY, 2006).

Os biopolímeros sintetizados por bactérias dividem-se em dois grupos segundo sua localização morfológica: intracelular e extracelular (este último incluindo os integrantes da parede celular). A pesquisa visando aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, pois apresentam um processo de extração e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Diferentemente dos polissacarídeos encontrados no interior da célula, os exopolissacarídeos normalmente não são usados como fontes de energia e de carbono pelo micro-organismo produtor. Exceto a curdulana sintetizada pela *Cellulomonas flavigena*, por produzir uma enzima extracelular capaz de degradar este EPS para utilizar como substrato (VOEPEL; BULLER, 1990).

Apesar das amplas possibilidades do uso de polímeros microbianos em alimentos, o mercado mais importante de consumo são as indústrias de petróleo, mineração, têxtil, termoquímica, tintas, papel, cosméticos, farmacêutica e de produtos agropecuários nas quais, além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão, são utilizados também por suas propriedades floculantes, adesivas, formadoras de filme, lubrificantes e redutoras de fricção (SCAMPARINI et al, 2000). Na indústria farmacêutica são bastante utilizados como veículos e como agentes complexantes para produção de medicamentos (CUNHA; PAULA; FEITOSA., 2009).

Polissacarídeos Microbianos	Micro-organismos
	Homopolissacarídeos
Celulose	<i>Acetobacter xylinum</i> , <i>Acetobacter sp.</i>
Curdilana	<i>Alcaligenes faecalis var. myxogenes</i> , <i>Agrobacterium spp.</i>
Dextrana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>
Elsinana	<i>Elsinoe leucospila</i>
Excleroglucano	<i>Rhizobium trifolii</i> J60, <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Schizophyllum commune</i>
Levana	<i>Bacillus polymixa</i> , <i>Erwinia herbicola</i> , <i>Streptococcus salivarius</i>
Pululana	<i>Aerobasidium pullulans</i>
	Heteropolissacarídeos
Ácido hialurônico	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus grupo A e C</i>
Alginatos	<i>Azobacter vinelandii</i> , <i>Azobacter chroococcum</i> , <i>Pseudomonas spp.</i>
Desulfatoheparina	<i>Escherichia coli K5</i>
Emulsana	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Esquizofilana	<i>Schizophyllum commune</i>
Gelana	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Ramsana	<i>Alcaligenes sp.</i>
Succinoglicana	<i>Sinorhizobium sp.</i> , <i>Agrobacterium spp.</i> , <i>Alcaligenes spp.</i>
Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>
XM6	<i>Enterobacter XM6</i>
Welana	<i>Sphingomonas sp.</i>

Quadro 3: Principais polímeros microbianos de interesse comercial

Fonte: GÓMEZ, 2006

A obtenção de biopolímeros microbianos destinados para alimentação humana é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que devem ser considerados seguros para o consumo e atender aos requisitos das legislações de alimentos em vigor. Apesar do grande número de pesquisas realizadas há mais de três décadas de polímeros microbianos apresentando interesse industrial (Quadro 3), até agora apenas três polissacarídeos estão aprovados para uso alimentar nos EUA: xantana produzida por *Xanthomonas campestris*, gelana por *Sphingomonas* e dextrana por *Leuconostoc* (STREDANSKY, et al, 1999).

EPS produzidos por BL são usados para melhorar as características reológicas de diversos produtos alimentícios. Estas bactérias produzem uma grande variedade de EPS estruturalmente diferentes, que possuem potencial para serem aplicados em

substituição a outros estabilizantes e espessantes (SUTHERLAND, 1998; BOELS et al., 2001).

3.3 EXOPOLISSACARÍDEOS

Vauquelin em 1822 foi quem primeiro observou a polimerização de polissacarídeos, através de experimentos realizados com caldo de cana. Quarenta anos depois, Pasteur descreveu observações semelhantes, demonstrando que essa polimerização era provocada por micro-organismos (BARBOSA, et al., 2002).

Sutherland em 1972 propôs o nome exopolissacarídeo a todo polissacarídeo que se encontra entorno da superfície de célula, também sendo denominado de glicocálice por serem constituídos por pequenas quantidades de glicoproteína (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 1997).

Os EPS são produzidos tanto por organismos procariontes (eubactéria e archeobactéria) como por eucariontes (fitoplancton, fungos, leveduras e algas), Tendo uma frequência maior em bactérias e microalgas do que em fungos e leveduras (BHASKAR, 2003). São considerados metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso pelos micro-organismos. São produzidos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento (MESOMO, 2005). EPS são produzidos pelos micro-organismos como forma livre ou associada com outros organismos (relação simbiótica) (ROSEN; CORNFORD 1971; COSTERTON et al., 1987; BHASKAR; BHOSLE, 2005).

EPS microbianos ficam no exterior da célula e são basicamente de dois tipos: camada limo íde que forma um agregado coloidal como uma substância amorfa e mucilaginosa ao redor da célula, de pouca ou nenhuma aderência celular (BOELS et al., 2001; PORTILHO, 2002) e cápsula (CPS) que forma uma camada coesiva e aderente à célula ligado covalentemente a um fosfodiéster ou a moléculas de lipídeos "A" da membrana celular (ROBERTS, 1996).

A presença de EPS associadas às células bacterianas se reconhece pela formação de colônias mucosas no meio de cultura sólido ou pelo aumento da viscosidade no meio de cultura líquido (GÓMEZ, 2006).

Os EPS são polímeros altamente hidratados, contendo 99% de água. São invisíveis quando observados diretamente no microscópio. Podem ser visualizados pela microscopia ótica mediante a utilização de corantes apropriados como tinta nanquim da índia, vermelho de rutênio ou azul *alcian*, devido à natureza aniônica de muitos EPS (DECHO, 1990). São realizadas reações tintoriais negativas para distinguir os EPS capsulares dos dispersos no meio (SUTHERLAND, 1998). Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) são revelados como uma matriz de fibras polissacarídicas (ROBERTS, 1996; WHITFIELD; ROBERTS, 1999; SILVA et al., 2001).

A habilidade dos micro-organismos produzirem exopolissacarídeos possuem aspectos positivos e negativos. Entre os aspectos negativos podem ser citados: deterioração de produtos cárneos, vegetais e frutas, produção de acidez e aromas indesejáveis (diacetil) em: vinhos, sucos, cervejas e outras bebidas destiladas (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005; MENEHIN, 2008), e na agroindústria sucroalcooleira, a presença de dextrana é um problema que afeta tanto a qualidade do açúcar como a eficiência industrial (ALVAREZ; CARDENTY, 1998). Alguns micro-organismos utilizam os EPS como fator de patogenicidade para o hospedeiro (TIBA; NOGUEIRA, LEITE, 2009).

Com relação aos aspectos positivos, os polissacarídeos associados à célula apresentam importância médica, através de elaboração de vacinas (SILVA; RICHTMANN, 2006) e muitos outros EPS têm amplo espectro de aplicações na indústria (SUTHERLAND, 1998; STREDANSKY, et al., 1999; CANILHA et al, 2005).

3.3.1 Estrutura dos EPS

Os EPS possuem peso molecular elevado, compreendendo entre 10^3 a 10^8 kDa sendo formados por cadeias longas, constituídas por ramificações contendo unidades repetidas de açúcares ou derivados de açúcares e alguns constituintes não carboidratados, tais como acetato, piruvato, succinato, fosfato, componente lipídicos, nitrogênio ou íons inorgânicos (PACE, 1992). Eles podem ser sintetizados no interior da célula durante o crescimento, não ficando permanentemente ligados na superfície da

célula microbiana (LAWS & MARSHALL, 2001), ou podem ser produzidos externamente à célula através de exoenzimas na presença de substratos específicos.

Os biopolímeros são constituídos quimicamente por monossacarídeos e outros componentes não carboidratos, principalmente os grupamentos acetila e piruvato, que conferem viscosidade às soluções aquosas destes polímeros. Podendo um destes polímeros produzir soluções altamente viscosas, e outros formarem géis semelhantes ao agar, pela adição de sais (SOUW; DEMAIN, 1979; CRESCENZI, 1995).

Os grupos acetila e outros substituintes não açúcares podem alterar grandemente as propriedades físicas, assim como conferir carga ao exopolissacarídeo. Na ausência de tais cargas a depender das ligações estruturais, as macromoléculas podem se tornar insolúveis. Grupos acetila geralmente impedem a associação sinérgica e sua remoção produz polímeros gelificantes em concentrações baixas (SUTHERLAND, 1997).

Os EPS são compostos principalmente por carboidratos, formando homo e heteropolissacarídeos, que podem conter diversos substituintes orgânicos e inorgânicos. Os Homopolissacarídeos são constituídos somente por um tipo de monossacarídeos que diferem em sua estrutura e propriedade. Estes EPS podem ser de origem bacteriana como a curdulana, ou fúngico como o esclerogucano. Os heteropolissacarídeos apresentam na sua estrutura de 2 a 5 monossacarídeos diferentes e predominam nos EPS microbianos (GÓMEZ, 2006).

Os EPS podem ser compostos por diferentes tipos de carboidratos. Os mais encontrados são os açúcares D-glicose, D-galactose e D-manose, L-fucose, L-raminose, e 6-desoxhexoses (LINDBERG, 1990). Outros monossacarídeos mais raros podem ser encontrados como L-hexoses ou a glicose e galactose em sua forma furanosa. Também podem ser encontrados os aminoaçúcares, entre os mais comuns se encontram as N-acetil-D-glicosamina, N-acetil-manosamina, fucosamina e talosamina. Estes monossacarídeos não possuem interesse industrial nem comercial. Os polímeros dos seres procariontes com raras exceções as cianobactérias e espécies de *Shinorhizobium* não possuem pentoses. Isto pode diferenciar os EPS produzidos pelos procariontes e eucariontes (OKUTANI; TANDAVANITJ, 1991.).

Os EPS microbianos podem ser polímeros de monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou derivados destes, sendo que a maior parte é de natureza polianiônica, devido à presença de ácidos hialurônicos. O mais frequentemente encontrado é o ácido D-glucurônico. Em menor frequência tem-se encontrado o ácido D-manurônico e D-galacturônico e L-idurônico. Os ácidos hexoaminurônicos têm sido identificados em vários EPS bacterianos (SUTHERLAND, 2001). Os EPS são hidrofílicos, mas podem ter propriedades hidrofóbicas (NEU; PORALLA, 1990).

3.3.2 Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas

A descrição de EPS formados pelas bactérias lácticas vem desde a época de Pasteur em 1861, onde ele observou que a formação de substâncias viscosas na deterioração do vinho era consequência da atividade microbiana. Orla-Jensen em 1943 descreveu a habilidade das BL de formarem polissacarídeos da sacarose, e atribuiu a formação destes polissacarídeos na deterioração de alimentos, assim como a formação da dextrana pelos *Leuconostoc* spp. na deterioração da beterraba (LEATHERS, 2002).

Os Micro-organismos denominados *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) como por exemplo as bactérias lácticas, propiônicas e bifidobactérias, são capazes de produzir EPS em grandes quantidades, oferecendo uma alternativa interessante para a produção de polissacarídeos em escala industrial, os quais podem ser utilizados pela indústria alimentícia (RICCIARDI ; CLEMENTI, 2000; LAWS et al., 2001).

EPS produzidas por BL incluem o gênero *Streptococcus Lactobacillus*, *Leuconostoc*, e *Lactococcus*, que produzem uma grande variedade de polímeros com diferentes estruturas, com peso molecular que varia de $4,0 \times 10^4$ a $6,0 \times 10^6$ Da (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Os EPS identificados pelas BL com mais frequência são dextrana, - glucana, - glucana , frutana, alternana, mutana levana e reuterana (MONSAN, et al, 2001; BOUNAIX, 2009).

A dextrana corresponde a uma classe de exopolissacarídeo do tipo homopolissacarídeo produzida extracelularmente através de uma glicosiltransferase, a enzima dextrana-sacarase (MONCHOIS et. al, 1999). A família Lactobacillaceae,

pertencentes as BL é a mais envolvida na produção deste biopolímero, especificamente os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, tendo como principais representantes os *Leuconostoc mesenteroide* e os *Leuconostoc dextranicum* em substrato de crescimento contendo sacarose (JEANES, 1974). O peso molecular desse polissacarídeo varia de 40.000.000 a 100.000.000 Dalton. São constituídos por unidades básicas de α -D-gluco-piranoses ligadas em (1 6) na cadeia principal e diferem quanto ao número de ramificações em (1 2), (1 3), (1 4) e no peso molecular. (ALSOP, 1983). A diversidade de aplicação da dextrana deve-se principalmente a massa molecular e ao grau de ramificação. São polissacarídeos quimicamente neutros e inertes, portanto não reagem com as substâncias encontradas na maioria dos alimentos. Geralmente são utilizados como agentes emulsionantes e estabilizantes de sistemas de emulsões constituídos de água em óleo. Mas também têm aplicações na indústria de petróleo, farmacêutica e na área médica (VIEIRA, 2003).

3.3.3 Biossíntese de EPS de bactérias lácticas

É importante o conhecimento dos processos biossintéticos da produção de EPS, para que se possa otimizar e adaptar os processos tecnológicos, obtendo assim um produto de qualidade desejada e diminuição do custo de produção.

A biossíntese de EPS bacterianos é bastante complexa. Os genes que codificam as enzimas e proteínas regulatórias requeridas para a síntese de EPS têm origem plasmidial em linhagens de LB mesófilas, como *Lactococcus*, ou basicamente cromossômica em linhagens termófilas de *Streptococcus* e *Lactobacilli* (VAN KRANENBURG et al., 1999; STINGELE et al., 1999; LAWS; GU; MARSHALL, 2001).

A produção de EPS normalmente ocorre durante a fase logarítmica, e em algumas bactérias, continua durante a fase estacionária de crescimento (LAWS et al., 2001). A síntese de EPS Homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos é diferente pelas bactérias: Homopolissacarídeos são compostos por somente um tipo de resíduo glicopiranosil que podem ser resíduo glicose (glucana, dextrana) ou frutose (frutana). Podem ser sintetizados no interior da célula ou no ambiente externo, sendo neste

últimocaso sintetizados pelas bactérias através de uma única enzima a dextrana-sacarase, que é uma glicosiltransferase, tendo como substrato a sacarose. Os homopolissacarídeos são produzidos em alta quantidade (g/L). Os heteropolissacarídeos são sintetizados no interior da célula através de precursores de açúcares nucleotídeos. São sintetizados em baixa quantidade (mg/L) e possuem vários blocos de configuração: ramnose, frutose, arabinose, glicose, xilose, manose, galactose, ácido glucurônico) (SUTHERLAND, 1997).

Nos homopolissacarídeos produzidos extracelularmente a reação de polimerização ocorre via glicosiltransferases como a dextrana, e glucana ou frutossiltransferase (frutana), que transfere o monossacarídeo do dissacarídeo para o crescimento da cadeia polissacarídea. Assim, essa produção é bastante simples, independente do metabolismo do carbono central, e ocorre pouca variação na estrutura. Nocaso da dextrana que consiste em um tipo de homopolissacarídeo bacteriano extracelular, contendo unidades de -D-glucopiranosil polimerizadas predominantemente por ligações do tipo α -(1-6) (SANKPAL et al., 2001), a sua síntese ocorre extracelularmente, sendo o substrato transformado em polissacarídeo sem penetrar no interior da célula. Este processo é realizado pela enzima dextrana-sacarase (α -1,6-glucana 6- -D-glicosiltransferase). Ela é uma enzima indutora sintetizada intracelularmente e excretada pelo micro-organismo, na presença de sacarose, agindo na molécula de sacarose, liberando a frutose e transferindo a glicose a uma molécula receptora moléculas, nocaso o polímero dextrana em expansão (PADMANABHAN; KIM, 2002).

Os homo e hetero polissacarídeos que são sintetizadas no interior da célula utilizam os precursores dos açúcares nucleotídeos (açúcar difosfato nucleotídeo) intracelular. Estes açúcares nucleotídeos fornecem as formas ativadas de monossacarídeos e também fornecem à célula bacteriana um meio de interconversão dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (HARDING et al., 1993).

Os EPS produzidos pelas BAL de açúcar nucleotídeos intracelular consistem de uma variedade de açúcares incluindo glicose, galactose, ramnose, ácido glucurônico, fucose, N-acetylglucosamina (GlcNAc), e N-acetilgalactosamina (GalNAc). Esses são

todos formados do processo intermediário do metabolismo do carbono central. A via biossintética pode ser dividida em 4 seqüências de reações separadas: as reações envolvidas com o transporte de açúcar para o citoplasma, a síntese de açúcar-1-fosfato, ativação e ligação de açúcares, e os processos envolvidos na secreção dos EPS (KLEEREBEZEM, HOLS, HUGENHOLTZ, 2000; DE VUYST et al., 2001; LAWS et al., 2001). O transporte de açúcares consiste em três diferentes processos (BOELS et al., 2001). No primeiro a hidrólise do ATP é acoplado a translocação do açúcar via uma ATPase transportadora do açúcar. No segundo sistema de transporte, a importação é acoplada ao transporte de íons e outros solutos, e no terceiro, o sistema de translocação ocorre via o sistema de transporte fosfoenolpiruvato (PEP) (FATH; KOLTER, 1993; POOLMAN, 1993; DE VOS, 1996). Neste sistema o grupo fosfato é liberado da conversão do PEP em piruvato, e transferido ao açúcar que entra envolvendo duas proteínas citoplasmática fosfocarreadora, Enzima I e HPr (POSTMA; LENGELER; JACOBSEN, 1993).

Na ligação dos açúcares ocorre a polimerização. Acredita-se que se processa na membrana citoplasmática e depois o EPS é transportado para fora da célula (SUTHERLAND, 1998). Após a polimerização das unidades dos monossacarídeos formando o polissacarídeo, este é excretado passando pelo periplasma, pelo complexo parede/membrana, sendo excretado para o ambiente extracelular (SUTHERLAND, 2002).

No exterior da célula microbiana os exopolissacarídeos podem permanecer soltos (como muco viscoso) ou podem estar aderidos à superfície da célula, formando a cápsula (SILVA et al., 2001).

A presença de polissacarases específicas que degradam o exopolissacarídeo consiste em um grande problema na produção de EPS produzido pelas bactérias. Caso ocorra lise da célula durante o cultivo, as enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular podendo ocorrer à degradação dos produtos poliméricos e a redução drástica da massa (GARCIA-CRUZ; SOUZA, 2001)

3. 4 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE EPS

A produção de exopolissacarídeos por linhagens que têm esta propriedade depende de vários fatores. Os parâmetros que mais influenciam são a linhagem bacteriana, a composição do meio de cultivo, o pH e a temperatura de incubação (FARIA, 2002; NAMPOOTHIRI et al.; 2003).

3.4.1 Linhagem bacteriana

As condições que influenciam a produção de EPS vão depender do perfil enzimático de cada micro-organismo. Varia de uma espécie a outra inclusive entre linhagens bacterianas da mesma espécie (FARRES et al, 1997).

3.4.2 Composição do meio

A produção de EPS pelas bactérias lácticas está relacionada com as condições de crescimento da linhagem, com a composição do meio de cultura e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos exopolissacarídeos. Meios de cultura sintéticos, tais como Man Rogosa Sharpe (MRS), All Purpose Tween (APT), e alguns meios complexos enriquecidos com leite ou soro de leite, são normalmente usados em estudos de produção de EPS. Muitos desses meios contêm extrato de levedura, extrato de carne, peptonas, proteínas e lactose (entre outros nutrientes), os quais, individualmente e em conjunto, podem interferir na composição da estrutura dos EPS (FARIA, 2002).

Apesar do meio MRS ser considerado seletivo para lactobacilos, outras bactérias lácticas também podem ser isoladas, assim como micro-organismos dos outros grupos como bactérias do gênero *Bacillus* e leveduras. Ainda assim, é o meio mais utilizado para o isolamento e enumeração de bactérias lácticas. O meio MRS suplementado com altas concentrações de açúcares é utilizado para o isolamento de bactérias lácticas produtoras de EPS. Van Geel-Schutten et al. (1999) isolaram várias linhagens de *Lactobacillus* produtoras de EPS de diferentes fontes (alimentos fermentados, trato gastrointestinal e placas dentárias humanas) utilizando o meio MRS contendo 10% de diferentes açúcares (glicose, frutose, maltose, rafinose, sacarose, galactose e lactose).

Smitinont et al. (1999) utilizaram agar MRS contendo 2% de glicose, frutose, sacarose e lactose, obtendo 70 linhagens isoladas de diferentes substratos produtoras de EPS das 104 isoladas (6,7%).

O equilíbrio entre os diferentes substratos e a deficiência em alguns nutrientes é de grande importância para a produção de EPS. Em geral a produção de polímero é favorecida pela alta relação carbono/nitrogênio. No entanto a relação inversa favorece o crescimento (LEE, et al., 2002). Uma exceção a este fato são as bactérias lácticas, na qual a deficiência de nitrogênio no meio não é um fator que venha favorecer a produção de polímeros (KIMMEL, et al, 1998). A utilização de diferentes fontes de carbono influencia não somente no tipo de polímero como também na sua qualidade e propriedades físicas. A bactéria *Pseudomonas syringae* var. *glycinae* quando o meio possui excesso de sacarose produz o levano, mas se o meio tiver excesso de glicose o polímero sintetizado é o alginato (CERNING, 1990; CERNING et al., 1990). As bactérias lácticas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus casei* CG11 apresentam uma máxima produção de EPS em um meio rico em glicose e menor quando os carboidratos são lactose e sacarose (CERNING, et al., 1994). *L. lactis* NIZO B40 produziu menos EPS quando cresceu no meio suplementado com frutose comparado com o meio suplementado com glicose.

Vários trabalhos (BONNET, SIMON-PUJOL, CONGREGADO, 1993; CERNING, et al., 1994; MOZZI, et al., 2006; GAMAR-NOURANI; BLONDEAU; SIMONET, 2004, SCHIAVÃO-SOUZA et al., 2007) indicam que a fonte de carbono adicionada no meio constitui uma importante forma de detectar a produção de EPS em bactérias lácticas. Não existe um açúcar mais indicado para o isolamento generalizado das bactérias produtoras de EPS. O Carboidrato utilizado é dependente da linhagem testada. Cerning et al. (1994) mostrou que a produção de EPS pelo *Lactobacillus casei*CG11 em meio base contendo glicose foi maior do que o mesmo meio com lactose ou galactose. No entanto Mozzi et al. (2001) observou que a produção de *L. casei*CRL87 foi maior quando se utilizou a galactose do que a glicose. Esta diferença de produção entre as linhagens está relacionada com a variação na atividade da enzima envolvendo a síntese dos açúcares nucleotídeos que atuam como precursores das unidades de repetição que constroem os heteropolissacarídeos. *Lactococcus lactis* spp. Cremoris

B40 produziu maior quantidade de EPS em glicose do que em frutose (LOOIJESTEIJN et al., 2000). Isto é explicado pela baixa atividade da enzima frutosebifosfatase, que canaliza a conversão da frutose-1-6-difosfato em frutose-6-fosfato, uma etapa essencial na biossíntese do açúcar nucleotídeo da frutose, mas não da glicose. Outras diferenças na produção do EPS têm sido atribuídas à presença de diferentes sistemas de transporte de açúcar de linhagens de bactérias lácticas, se a entrada de mono e dissacarídeos dentro da célula for o passo inicial para a síntese de EPS. (CHERVAUX et al., 2000). Ambos transportadores de açúcar e a síntese dos precursores do açúcar nucleotídeo são processos regulatórios que podem estar sob a repressão de catabólitos (BOELS et al., 2001; LAWS et al., 2001).

Tem sido demonstrado em vários trabalhos de pesquisa que quantidades superiores a 5% de açúcares aumentam notavelmente a produção de EPS, porém existe um limite, pois o excesso pode provocar uma inibição do crescimento dos micro-organismos e da síntese de EPS. Son et al. (2001) relatam que o cultivo de *Acetobacter xylinum*, em meios contendo glicose em porcentagens acima de 4% acarretam o acúmulo de gluconato, diminuindo o pH do meio, inibindo a produção da celulose.

A composição do EPS e suas propriedades físico-químicas pode variar grandemente, mas é geralmente independente da fonte de carbono (DECHO, 1990)

A fonte de nitrogênio é necessária para o crescimento dos micro-organismos e para a síntese dos exopolissacarídeos. Porém, o excesso deste nutriente pode diminuir a produção de EPS. A seleção de nitrogênio orgânico e inorgânico depende do seu efeito sobre a produção de EPS e da capacidade de tais micro-organismos em metabolizar estes substratos (SON, et al, 2001). A formação de polissacarídeo pela bactéria é bastante dependente da concentração de peptídeos e aminoácidos livres, (PINTADO; MALCATA, 2007).

Compostos nitrogenados mais complexos como peptonas, extrato de carne, extrato de levedura, hidrolisado de caseína e soja, permite aos micro-organismos além de um bom crescimento, uma produção mais rentável de EPS. No entanto micro-organismos com pouca atividade proteolítica não utilizam bem estes substratos, conseqüentemente não crescendo bem no meio e nem produzindo EPS (STREDANSKY, et al, 1999).

As condições de fermentação influenciam fortemente a produção de EPS. Estudos sugerem que as melhores condições para a produção de EPS são diferentes da condição ótima para o crescimento celular, principalmente em BL mesófilicas (GAMAR-NOURANI; BLONDEAU; SIMONET, 2004). A temperatura ótima para a síntese de EPS já foi determinada em algumas BAL e pode variar de 25°C para *Lactococcus lactis* até temperaturas acima de 45 °C para *Lactobacillus delbrueckii* (CERNING et al., 1992; LAWS et al., 2001).

O efeito do pH na produção de EPS está relacionado à atividade das enzimas glicosil-hidrolases, responsáveis pela degradação de EPS após fermentações longas. Como a degradação de EPS não é desejável, a influência que o pH do meio tem sobre o rendimento de EPS depende do pH ótimo para a atividade das glicosil-hidrolases. O pH ótimo para a produção de EPS será o pH no quais os efeitos opostos de produção e degradação estejam balanceados (PHAM et al., 2000; LAWS et al., 2001).

Os EPS presentes na cultura exibem um comportamento do tipo pseudoplástico, sendo pouco afetada pela variação de pH (entre 2 e 11) e de força iônica, e possui uma elevada termo estabilidade (PINTADO ; MALCATA ,2007).

A produção de exopolissacarídeos bacterianos em cultivo submerso é frequentemente acompanhada por um substancial aumento da viscosidade do caldo fermentado, o qual resulta em irregular distribuição do oxigênio no meio (WECKER; ONKEN, 1991).

3.5 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE EPS

Diferentes etapas são utilizadas para a obtenção dos EPS produzidos nos cultivos microbianos, os quais envolvem a combinação de técnicas de extração, purificação e quantificação. Basicamente o processo de recuperação primária dos exopolissacarídeos envolve remoção de células microbianas, precipitação do biopolímeros, secagem e moagem (GALINDO, et al., 1994). As células são removidas pelo processo da centrifugação. Os EPS podem ser recuperados de forma impura, secando diretamente o extrato viscoso (VIEIRA, 2003) ou podem passar por uma purificação inicial, utilizando técnicas como a formação de uma insolubilização do

polímero com a adição de certos sais ou modificação do pH . Podem também ser recuperados pelo processo da precipitação após tratamentos com solventes orgânicos solúveis em água. Os mais utilizados são o álcool etílico, acetona, metanol e isopropanol (MOREIRA et al., 2003; GÓMEZ, 2006).

Após a extração dos polímeros, estes são purificados e secos em estufa, a baixas temperaturas ou liofilizados (MOREIRA et al., 2003) e então, preparados para as análises de determinação da estrutura e caracterização.

O método de recuperação do polímero vai interferir na variação da sua massa molar média (NASCIMENTO, 2001)

O grau de purificação dos EPS vai depender da finalidade do uso destes. Geralmente em uma purificação simples são utilizadas lavagens sucessivas com subsequente precipitação em solventes, seguida pela diálise contra água deionizada (CHI; ZHAO, 2003; PÉANT et al, 2005). É utilizado ácido tricloroacético na proporção entre 4 a 14%, digestão com protease ou a combinação de ambos, para precipitação de proteínas, e clorofórmio para precipitação de lipídeos (VAN MARLE AND ZOON, 1995; RUAS-MADIEDO, REYES-GAVILÁN, 2005; SÁNCHEZ, et al, 2006). Em casos em que seja necessário um grau maior de purificação são utilizados detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos com a passagem pela coluna em cromatografia de permeação em gel, cromatografia de troca iônica ou em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). São utilizados também agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000). Na quantificação destes polímeros podem ser utilizados métodos químicos ou analíticos. Em ambos os casos, o material deverá ser de alta pureza.

Após as etapas de isolamento, é obtido o peso do pó seco moído ou liofilizado o que indica o rendimento do EPS (DE VUYST, et al., 1998; DE VUYST; DEGEEST, 1999, VAN GEEL-SCHUTTEN, et al.,1999; FRENGOVA, et al., 2000)

O método normalmente utilizado para a identificação do EPS é o método colorimétrico do fenol-sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) que mede a quantidade de açúcar total (AT). Para retirar a interferência de carboidratos de baixo peso molecular que possam estar presente no EPS, Ruijsenaars et al. (2000) determinou mais precisamente a quantidade de EPS fazendo-se concomitantemente a

determinação do açúcar total pelo método do fenol sulfúrico, e a determinação do açúcar redutor (AR) pelo método do ácido dinitrosalisílico (DNS) descrito por Miller, 1959. Depois se subtraem à concentração do açúcar total pela concentração do açúcar redutores ($EPS = AT - AR$) e assim faz-se a quantificação do EPS. Outro método colorimétrico utilizado envolve o uso do reagente de antrona (MORRIS, 1948).

Embora os métodos colorimétricos sejam de menor custo e mais simples, a técnica de maior sensibilidade para a determinação e quantificação dos EPS consiste no método analítico acoplado a um sistema de separação, como por exemplo, à cromatografia de permeação em gel no sistema CLAE. Este sistema separa os polímeros pela exclusão do tamanho, identificando assim cada fração (MARGOLLES; REYES-GAVILÁN, 2003). A detecção simultânea das moléculas do EPS pelo índice de refração (IR) também é utilizado para quantificar a produção de EPS (FABER et al., 1998; RUAS-MADIEDO et al., 2006).

O aumento da produção de EPS pode ser alcançado através de manipulação genética ou pelo controle da fisiologia microbiana, modificando a direção das rotas metabólicas. A determinação dos mecanismos responsáveis pelo controle e regulação da biossíntese de EPS, ao nível dos genes e das proteínas, é necessária para que a produção de EPS possa ser otimizada (DE VUYST; DEGEEST, 1999; BOELS, et al., 2001; LAWS et al., 2001).

3.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLÍMEROS

Para que os polímeros sejam identificados e caracterizados é necessário que eles estejam puros. A purificação é o processo de separar ou de extrair o composto alvo de outro composto ou contaminador. Para tal se utiliza técnicas simples de purificação como a utilização de um ou mais solvente ou técnicas mais sofisticadas como a cromatografia. A identificação e caracterização dos polímeros são baseadas nas suas propriedades físicas, químicas, mecânicas, térmicas e reológicas, no qual são determinadas, através das seguintes técnicas: cromatografia de permeação em gel, cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), difratômetro de raios-X (DRX), espectromicroscopia de

superfícies (XPS), microscópio eletrônico de varredura com espectroscopia por energia dispersa, calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia por infravermelho (IV), espectrofotometria por absorção atômica. análise termogravimétrica (ATG) e ressonância magnética nuclear (RMN). Também podem ser identificados pelas propriedades reológicas e por técnicas de ensaios imunológicos (patente PI9700705-6). Normalmente são utilizadas de 3 a 5 destas técnicas em conjunto para a caracterização dos polímeros.

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biopolímeros microbianos extracelulares têm apresentado como um grande mercado em diversos setores da indústria, agregando valor em vários produtos, principalmente os de origem alimentícia, por melhorar as características reológicas destes. A produção de biopolímeros pelos micro-organismos ainda é bastante inexpressiva quando comparada aos polímeros extraídos de plantas e animais, principalmente pelas bactérias lácticas. No entanto pelo fato das bactérias pertencentes a este grupo serem inócuas a saúde humana e animal, se torna cada vez mais interessante investir no processo de produção dos biopolímeros para uso industrial.

REFERÊNCIAS

ALSOP, L. Industrial Production of Dextran. *Progress in Industrial Microbiology.*, v.18, p.1-44, 1983.

ALVAREZ, F. J.; CARDENTY. Pratical aspects of the control of dextran at Atlantic Sugar Assocation. *International Sugar Journal*, 90:1078, 182-184, 1988.

BARBOSA, F. H. F. ; SILVA, A. M.; DUARTE, R. ; NICOLI, J. R. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Bifidumbavterium bifidum*BB12 e *Bifidumbacterium bifidum longun*BB46. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, 1: 2, 2001.

BASTOS, V. D. Biopolímeros e polímeros de matérias-primas renováveis. *Revista do Bndes*, Rio de Janeiro, 14:28, 201-234, 2007.

BHASKAR, P. V. Studies on some aspects of marine microbial exopolysaccharides. Thesis Doctor of Philosophy in Microbiology. National Institute of Oceanography Dona Paula, Goa, India, April, 2003.

BHASKAR, P. V.; BHOSLE, N. B.. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, 88:1,10 , 2005.

BOELS, I. C., RAMOS, A.; M. KLEEREBEZEM, M.; DE VOS. W. M. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:3033–3040. 2001.

BONNET, R., M. D.; SIMON-PUJOL, F.; CONGREGADO. Effects of nutrients on exopolysaccharide production and surface properties of *Aeromonas salmonicida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2437-2441, 1993.

BOUNAIX, M, S.; GABRIEL, V; MOREL, S ; ROBERT, H.; RABIER, P; REMAUD-SIMON, M.; GABRIEL, B.; FONTAGN-FAUCHER, C. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57(22), 10889-10897, 2009.

CANEVAROLO, Jr. S.V. *Ciência dos polímeros*. um texto básico para tecnólogos e engenheiros. São Paulo, 2º Ed. Edit. Artliber, 2006.

CANILHA , L.; SILVA ,D. D. V; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica* , 20 , 2006.

CERNING, J, RENARD CMGC, THIBAUT JF, BOUILLANNE C, LANDON M, DESMAZEAUD M, TOPISIROVIC L. Carbon source requirements for exopolysaccharide

production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 3914-3919, 1994.

CERNING, J.; BOULLANNE, C.; LANDON, M. AND DESMAZEAUD, M. J. Comparison of exo cellular polysaccharide production by thermophilic lactic acid bacteria. *Science Aliments*, 10, 443-451, 1990.

CERNING, J. Exo cellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 113-130, 1990.

CERNING, J., BOUILLANNE, C., LANDON, M. AND DESMAZEAUD, M.J. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Dairy Science*. 75, 692-699, 1992.

CHI, Z; ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 33, Issues 2-3, 13, Pages 206-211, 2003.

COSTERTON, J. W. ; CHENG, K.J.; GEESEY, G.G.; LADD, T.I. ; NICKEL, J.C.; DASGUPTA, M; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*. ;41: 435-464.1987.

CRESCENZI, V. Microbial polysaccharides of applied interest: ongoing research activities in Europe. *Biotechnology Progress*, New York, v.11, p.251-259, 1995.

CUNHA, P, L, R; PAULA, R, C, M; FEITOSA, J, P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Química. Nova* vol.32 no.3 São Paulo 2009.

DE VOS, W. M. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 70:223-242.1996.

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; VANINGELGEM, F.; DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria.

International Dairy Journal, 11, 687–707, 2001.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology, Reviews*, 23:2, 153-177, 1999.

DE VUYST, L.; VANDERVEKEN, F.; VAN DE VEN, S.; DEGEEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 6, 1059-1068, 1998.

DECHO, A.W. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 28:73–153, 1990.

DRUZIAN, J. I. *Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de Rhizobium e uma de Bradyrhizobium isolados de solo de cultivo de feijão de corda (Vigna unguiculata L.)*. 2000. Tese 179 f. (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2000.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3, 350-356, 1956.

FARIA, L. H. G. B. *Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo*. 2002. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Bio ciências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FARRES, J.; CAMINAL, G.; LOPEZ-SANTIN, J. Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48, 522–527. 1997.

FATH, M.J.; KOLTER, R. A. B. C exporters. *Microbiology Reviews* 57, 995–1017, 1993.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2005, 424p.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I. Production and monomer composition of exopolysaccharides by yogurt starter cultures. *Canadian Journal of Microbiology* ., 46, 1123-1127, 2000.

GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M.A. Preservation of *X. campestris* on agar slopes: Effects on xanthan production. *Microbiology Biotechnology*, 40:634-637, 1994.

GAMAR-NOURANI, L.; BLONDEAU, K.; SIMONET., J. M. Influence of culture conditions on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, 85:4, 664 - 672 . 2004.

GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de hidrocolóides em alimentos: Revisão. *Revista Higiene Alimentar*, USP - São Paulo, 15: 87, 19-29, 2001.

GLICKSMAN, M. Hydro colloid functionality in fabricated foods. *Food Technology, Chicago*, 38:1, 17-21, . 1986. .

GÓMEZ, J. A. M. *Caracterización de los exopolisacaridos producidos por microorganismo shalófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiominarina, Palleronia y Salipiger*. 2006. Tesis (Do ctoral) - Universidad de Granada, Facultad de Granada. Departamento de Microbiología, Granada 2006

HARDING, L. P., V. M.; MARSHALL, M.; GU, E, Y.; LAWS, A. P. Structural characterisation of a perdeuteriomethylated exopolysaccharide by NMR spectroscopy: Characterisation of the novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* EU23. *Carbohydrate Research* . 338:61–67, 2003.

JAY, J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JEANES, A. Extracellular Microbial Polysaccharides - New hydro colloids of interest to the food industry. *Food Technology*, 28 (5), 34-40, 1974.

KIMMEL, S.A., ROBERTS, R.F., ZIEGLER, G.R.. Optimization of exopolysaccharide production by *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR grown in a semi-defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 659–664. 1998.

KLEEREBEZEM, M, HOLS, P AND HUGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 9–10, 840–848. 2000.

KUMAR, A. S., MODY, K., JHA, B., Bacterial exopolysaccharides - a perception *Journal of Basic Microbiology*. Volume. 103 – 117, 2006.

LAWS, A.; GU, Y. ; MARSHALL. V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*,19, 597-625, 2001.

LEATHERS, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 62, Numbers 5-6 / October, 2003.

LEE, J.S.; LEE, K.C.; AHN, J.S. MHEEN, T.I., PYUN, Y.R.; PARK, Y..H. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Enzyme and Microbial Technology* ..,v. 52,1257-1261.2002.

LINDBERG, B. Components of bacterial polysaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry & Biochemistry*48,279-318, 1990.

LOOIJESTEIJN, P J; VAN CASTEREN, W .H; TUINIER ,R; DOESWIJK-VORAGEN ,C. H; HUGENHOLTZ, J. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 89:1,116-22, 2000.

LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de polímeros*. Editora E-paper, Rio de Janeiro, 2001, 366p.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 1997. Brock biology of microorganisms. 8a Ed. Caps. 15, 16 e 17. New Jersey: Prentice-Hall. p. 606-768, 1997.

MARGOLLES, A. ; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. . Purification and Functional Characterization of a Novel α -L-Arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9, 5096-5103, 2003.

MENEGHIN, M, C. Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de Dekkera contaminantes da fermentação alcoólica. 2008, Dissertação 85f. (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Piracicaba, São Paulo, 2008.

MESOMO, M. C. *Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo*. 2007, 80 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai da Missões – URI, Campos de Erechim- RS. 2007.

MILLER, G. L. A note on the use of dinitrosalicylic acid for determining the products of enzymatic reactions. enzymatic reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29:5, 494-496, 1988.

MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS Microbiology Reviews* . v. 23, p. 131-151, 1999.

MONSAN, P.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLEMOT, R.M.; REMAUND-SIMEON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*,11:675-685, 2001.

MOREIRA, A. N.; PINO, F. A. B. del; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,23:2, 300-305, 2003.

MORRIS, D. L. Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent. *Science*, 254-255, 1948.

MOZZI, F.,VANINGELGEM, F., HÉBERT, E. M., VAN DER MEULEN, R., MORENO, M. R. F., VALDEZ, G, F. AND VUYST. L. Diversity of Heteropolysaccharide-Producing Lactic Acid Bacterium Strains and Their Biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, 4431–4435, 2006.

MOZZI, F.; ROLLAN, G.; DE GIORI, G. S.; DE VALDEZ, G. F. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. *Journal of Applied Microbiology*, 91:1,160-167, 2001.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. *Process Biochemistry*, Kidlington, 38, 1513-1519, 2003.

NASCIMENTO, J. F. Estudo da processabilidade e da caracterização do poli-(ácido-3 hidroxibutírico) – PHB obtido a partir de cana-de-açúcar. 2001, Dissertação 75 f.(Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas-SP.74p. 2001.

NEU, T.R.; PORALLA, K.. Emulsifying agents from bacteria isolated during triagem for cells with hydrophobic surfaces. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 521-525,1990.

OKUTANI, K.; TANDAVANITJ, S. Isolation an characterization of a fucosamune-contaning polysaccharide from a marine strain of *Pseudomonas*. *Nippon Suison Gakkaishi*, 57, 2151-2156.1991

PACE, G. W. Polímeros microbianos. In: BU'LO CK, J.; KRISTIANSEN, B.
Biotecnología básica. Zaragoza: Acribia, 449-462, 1992.

PADMANABHAN, P. C., KIM, D. S. Production of insoluble dextran using cell-bound dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carbohydrate Research*, v. 337, p. 1529-1533, 2002.

PARIKHI, A; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 97,1822-1827, 2006.

PÉANT CHRISTENSEN, J.J.; VIBITS, H.; URSING, J.; KORNER, B. *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 1049-1053. 2005.

PHAM, P. L., I.; DUPONT, D.; ROY, G.; LAPOINTE; J. CERNING. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2302–2310.2000.

PINTADO, M.; MALCATA, X. F. Alguns contributos biotecnológicos recentes para a valorização do principal subproduto da indústria de laticínios. *Revista Engenharia química*, 5,2 -5, 2007.

POOLMAN, B. Energy transduction in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 512, pp. 125–128. 1993.

PORTILHO, M. *Avaliação da produção de exopolissacarídeos insolúvel por duas linhagens de Agrobacterium sp.* 2002. 86 f. Tese (doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

POSTMA, P. W.: LENGELER, G. R. JACOBSON. .Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological Reviews*. 57:543–594.1993.

- RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science*. 1: 23-45, 2000..
- ROBERTS, I. S. The Biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50: 285-315, 1996.
- ROSEN, M.W.; CORNFORD, N. E. Fluid friction of fish slimes. *Nature*, London, 234: 49-51. 1971.
- RUAS-MADIEDO, P AND REYES-GAVILÁN, C. G. *Invited Review: Methods for the Triagem, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Journal. Dairy Science*. 88:843-856, 2005.
- RUAS-MADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; ABELARDO MARGOLLES, A.; REYES-GAVILA, C.J.; SALMINEN, S. Exopolysaccharides Produced by Probiotic Strains Modify the Adhesion of Probiotics and Enteropathogens to Human Intestinal Mucus. *Journal of Food Protection*, 69,8, 2011–2015, 2006.
- RUIJSSENAARS, H. J., F. STINGELE, AND S. HARTMANS. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. *Current Microbiology*. 40:194–199, 2000.
- SÁNCHEZ, J. I.; MARTÍNEZ, J. B.; GUILLÉN, R; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RODRÍGUEZ, A.. Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:12, 7495–7502, 2006.
- SANKPAL, N.V. et al. Production of dextran by *Rhizopus* sp. Immobilized on porous cellulose support. *Process Biochemistry*, 37, 395-403, 2001.
- SCAMPARINI, A.R.P.; DRUZIAN, J.I.; MALDONADE, I.; MARIUZZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: K. NISHINARI (ed.), *Hydro colloids. Part 1. Physical Chemistry and Industrial Application of Gels, Polysaccharides and Proteins*. Osaka, Elsevier Science B.V., p. 169-178. 2000.

SCHIAVÃO-SOUZA, T. D.;YUHARA, T.T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.;GARCIA, S..
Produção de Exopolissacarídeos por Bactérias Probióticas: Otimização do Meio de
Cultura. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10:11, 27-34, 2007.

SILVA, L. J.; RICHTMANN, R. Vacinas em desenvolvimento: estreptococos do
grupo B, herpes-zóster, HIV, malária e dengue. *Jornal de Pediatria*,
vol.82 no.3, 2006.

SILVA, F.R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidium gum:
the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity.
FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 203,.165-171, 2001.

SMITINONT, T. et al. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from
traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharides
characterization. *International Journal Microbiology*. 51: 105-111, 1999.

SON, H. J. et al. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial
cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. 33, 1–5, 2001.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas*
campestris NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1186-
1192, 1979.

STINGELE, F.;VINCENT, D.; FABER, E.; NEWELL, J.; KAMERLING.; NEESER, J. R.
Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6
into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered
polysaccharide, *Molecular Microbiology*32, 287–1295, 1999.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L. E.; BERTO CCHI, C. Production of
bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 34,
11-16, 1999..

SUTHERLAND, I. A sticky business: microbial polysaccharides: current products
and future trends. *Microbiology Today*, [S.l.], 29, 70-71, 2002

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial exopolysaccharides. *TIBTech*, 16: 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. *Pure & Applied Chemistry*, Oxford, 69:9,1911-1917, 1997.

SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-neg-ative bacteria. *Int Dairy J* 11:663–674. 2001.

TIBA, M. R.; NOGUEIRA, G. P.; DOMINGOS DA SILVA LEITE, D. S. Estudo dos fatores de virulência associados à formação de biofilme e agrupamento filogenético em *Escherichia coli* isoladas de pacientes com cistite. *ournal*. vol.42 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2009

VAN KRANENBURG, R.; BOEIS, I. C. KLEREENBEZEN, M.; DE VOIS, W.M. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr. Opin. Biotech.* 10, .498-504, 1999.

VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; FABER, E. J.; SMITH, E.; BONTING, K.; SMITH, M. R.; B. TEM, B.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, F. J.; DIJKHUIZEN, L. Bio chemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wild-type strain and by mutant strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3008–3014. 1999,

VAN MARLE, M. E., P. ZOON. Permeability and rheological properties of microbially and chemically acidified skim-milk gels. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 49:47–65, 1995.

VIEIRA, E. D. *Seleção de linhagens produtoras de goma isoladas de cana-de-ácucar*. 2003. Dissertação 76 f. (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia Química. Campinas, SP., 2003.

VOEPEL, K. C.; BULLER, C. S. Formation of an extracellular energy reserve by *Cellulomonas flavigena* strain KU. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 5: 2-3, 131-138, 1990.

WECKER, A.; ONKEN, U. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* *Biotechnol. Lett.* 13, 3, 155–160, 1991.

WHITFIELD, C.; ROBERTS, I. S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 31:5, 1307-1319, 1999.

CAPÍTULO 4

ISOLAMENTO E TRIAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS PRODUTORAS DE EXOPOLISSACARIDEOS DE ALIMENTOS COLETADOS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

Elinalva M. Paulo*¹, Murilo P. Vasconcelos¹, Ivelise S. Oliveira.¹ Helen, M. J. Affe¹,
Sandra Assis², Rosely Nascimento³, Itamar S. de Melo³, Milton R. A. Roque⁴

¹Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Avenida Transnordestina, s/n., Bairro Novo Horizonte, BR 116, Feira de Santana, 44036-900, BA, Brazil.
²Departamento de Saúde - UEFS,³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Meio Ambiente, Jaguariúna - SP. ⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

Bactérias lácticas têm como característica principal a produção de ácido láctico como produto final do metabolismo dos carboidratos. São micro-organismos de exigência nutricional complexa, podendo ser encontrados em diversos habitats. Produzem metabólitos secundários de grande interesse econômico, principalmente os exopolissacarideos. Este trabalho teve como objetivo isolar bactérias lácticas provenientes de substratos coletados na região do semi-árido baiano, realizando triagem quanto à produção de exopolissacarideos. Foram utilizados cinco tipos de alimentos para o isolamento destes micro-organismos. A triagem foi realizada em discos de papel e os micro-organismos foram submetidos às diferentes condições de cultivo, variando o tipo de açúcar, pH e temperatura. A produção de exopolissacarideos foi visualizada pela presença de colônia densa sobre os discos, sendo confirmada pela formação de precipitado, desta colônia em álcool absoluto, e pela visualização na

microscopia eletrônica. Como resultados foram obtidos 187 isolados de bactérias lácticas produtoras de EPS. As condições onde houve maior número de isolados foram: sacarose 10%, pH 7,5 a 28°C. Os resultados indicam que a região do semi-árido baiano possui uma biodiversidade de bactérias lácticas de natureza extremófilas de grande interesse industrial, principalmente no que se refere à produção deste biopolímero.

Palavras chave: *Triagem*, exopolissacarídeos, bactérias lácticas, biopolímero

ABSTRACT

Lactic acid bacteria have most prominent feature production of lactic acid as end product of carbohydrate metabolism. They are micro-organisms of complex nutritional requirements and can be found in various habitats and produce secondary metabolites of great economic interest, especially exopolysaccharides. This study aimed to isolate lactic acid bacteria from substrates collected in the semi-arid environments, making triagem for the production of exopolysaccharides. We used five types of food for the isolation of these microorganisms. The triagem was performed on paper discs and micro-organisms were subjected to different growing conditions, varying the type of sugar, pH and temperature. The production of exopolysaccharides was visualized by the presence of dense colony on the discs, which were confirmed by the precipitate, when part of this colony was mixed in absolute alcohol and viewed under electron microscopy. As a result were obtained from 187 isolates of lactic acid bacteria producing EPS. The conditions where there was a higher number of isolates were: 10% sucrose, pH 7.5 at 28 ° C. The results indicate that the semi-arid environments have a biodiversity of lactic acid bacteria of great industrial interest, especially as regards the production of this biopolymer.

Keywords : *Triagem, exopolysaccharides, lactic acid bacteria, biopolymers*

4.1 INTRODUÇÃO

A denominação das bactérias ácido lácticas (BAL) ou simplesmente bactérias lácticas vem do fato de que a energia na forma de ATP é obtida através da fermentação de carboidratos, produzindo ácido láctico como principal produto final (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

O Manual Bergey's que trata da sistemática bacteriana (HOLT et al., 1989), define bactérias lácticas como sendo bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa, desprovidas de citocromos, crescimento em condições de aerobiose, microaerofilia ou anaerobiose facultativa, com temperatura variando entre 35°C a 40°C. Salminen, Wright, e Ouwehand (2004), acrescentam outras características como: apresentam a morfologia cocos ou bacilos, possuem baixo teor de guanina + citosina (G-C), na sua maioria são imóveis, ácido tolerantes, não pigmentadas, não reduzem o nitrato, não liquefazem a gelatina e nem produzem sulfeto de hidrogênio.

Como resultado de sua extrema especialização fisiológica, as bactérias lácticas são consideradas como bactérias fastidiosas, por isso confinadas a poucos ambientes naturais característicos. Algumas vivem em associação com vegetais e crescem à custa dos nutrientes liberados através da morte e da decomposição de tecidos vegetais. Outras podem ser encontradas em solos, alimentos, e bebidas preparados a partir da fermentação de materiais vegetais: *pickles*, *chucrute*, silagem, vinho e cerveja (MAGNUSSON, et al., 2002).

Algumas bactérias lácticas fazem parte da microbiota normal do corpo animal, ocorrendo em número considerável na nasofaringe, trato intestinal e geniturinário.

Outro habitat característico das bactérias lácticas é o leite, para o qual elas têm acesso através do corpo do animal ou por materiais vegetais (LIMA; AQUARONE; BORZANI, 1975).

Tradicionalmente as bactérias lácticas têm sido classificadas com base nos critérios taxonômicos fenotípicos que incluem a aparência morfológica, em cocos, bacilos ou bastões. Os cocos são de forma esférica com diâmetro entre 0,5 e 2,0 µm, se apresentam em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os bastões podem ter um diâmetro variável entre 0,5 e 2,0 µm e comprimento até maior que 10 µm,

apresentando-se isolados, em pares ou cadeias longas (AXELSSON, 1993; HOLZAPFEL et al., 2001).

Os *Lactobacillus* e *Carnobacterium* são bacilos, os demais gêneros são cocos (AXELSSON, 1993). Outras características fenotípicas das BAL incluem o tipo de fermentação dos carboidratos: homofermentativos ou heterofermentativos (SALMINEN, WRIGHT ; OUWEHAND, 2004)

Atualmente existe uma grande tendência de se utilizar produtos metabólicos de micro-organismos que venha agregar algum valor aos produtos. As bactérias lácticas consistem em um grupo de micro-organismos que atendem a esta demanda. Além de grande produtor de ácido láctico, este grupo de bactérias também é expressivo na produção de exopolissacarídeos.

Pelo fato das bactérias lácticas serem consideradas micro-organismos seguros para a saúde humana, os exopolissacarídeos produzidos por elas são utilizados em diversos setores da indústria, principalmente no setor alimentício e farmacêutico (RICCIARDI; CLEMENTI, 2000; LAWS et al., 2001).

Os exopolissacarídeos são produzidos por alguns micro-organismos quando estão em condições impróprias de sobrevivência ou em cultivos inadequados.

Os gêneros de bactérias lácticas envolvidos na produção deste biopolímeros são *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus* (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Exopolissacarídeos microbianos ficam no exterior da célula e são basicamente de dois tipos: camada limóide que forma um agregado coloidal como uma substância amorfa e mucilaginosa ao redor da célula, de pouca ou nenhuma aderência celular (BOELS et al., 2001) e cápsula (CPS) que forma uma camada coesiva e aderente à célula ligados covalentemente a um fosfodiéster ou a moléculas de lipídeos "A" da membrana celular (ROBERTS, 1996).

A identificação de bactérias produtoras de EPS é baseada em observações visuais em meio sólido onde se observa colônias com estiramento, mucóides ou filamentosas) em meio sólido (STREDANSKY, et al, 1999), em medida de viscosidade no meio líquido ou através de observações fisiológicas, quantificando-se o EPS produzido no meio (CERNING; BOUILLANNE; LANDON, 1992).

Os EPS são polímeros altamente hidratados, contendo 99% de água. São invisíveis quando observados diretamente no microscópio. Podem ser visualizados pela microscopia ótica mediante a utilização de corantes apropriados como tinta nanquim da índia, vermelho de rutênio ou azul *alcian*, devido à natureza aniônica de muitos EPS (DECHO, 2000). São realizadas reações tintoriais negativas para distinguir os EPS capsulares dos dispersos no meio (SUTHERLAND, 1998). Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) são revelados como uma matriz de fibras polissacarídicas (ROBERTS, 1996; WHITFIELD; ROBERTS, 1999). Este trabalho objetivou isolar bactérias lácticas de produtos fermentados provenientes da região do semi-árido baiano, e realizar triagem de linhagens produtoras de exopolissacarídeos, em diferentes condições de cultivo.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolamento e seleção de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos

Os microrganismos foram isolados de cinco produtos alimentícios adquiridos em Feira de Santana, cidade localizada na região do semi-árido baiano: leite cru de vaca (coletados de latões comercializados por vendedores de “porta”), leite cru de cabra (coletado diretamente do teto da cabra), mandioca, repolho e cana de açúcar (coletados em feira-livre).

No isolamento das bactérias das amostras de leite foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-7} em solução salina tampão fosfato pH $7.2 \pm 0,2$ (cloreto de sódio – 0,85%; fosfato de sódio bibásico – 0,19%; fosfato de sódio monobásico – 0,038%). De cada diluição foi retirada alíquota de 1 mL e inoculada em tubos contendo 9 mL do meio ESM (*Exopolysaccharides Selection Medium*) constituído por leite em pó desnatado – 9,0%; extrato de levedura - 0,35%; peptona – 0,35%; glicose – 5,0% (VAN DEN BERG et al. 1993). Os tubos foram incubados a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h. Após este período, alíquotas de cada diluição foram semeadas pela técnica de esgotamento por estrias em placas contendo meio MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARP, 1960) constituído por: peptona-10 g; extrato de levedura-10 g; glicose-20 g; Tween 80-1 mL; Fosfato de

potássio bibásico-2 g, acetato de sódio-5 g; citrato triamônia- 5 g; Sulfato de magnésio. 7H₂O-200 mg; Sulfato de manganês.4H₂O- 50 mg. H₂O destilada- 1 L. pH 6.0-6.5.

As amostras de produtos vegetais foram submetidas ao processo de fermentação baseado em experimentos realizados por Grizotto e Menezes (2004): 100 g dos vegetais picados foram colocados em frascos erlenmeyer contendo 200 mL de água mineral não esterilizada (pH da água ficava em torno de $6,5 \pm 0,2$), e incubado a 30 ± 2 °C por 72h. Após o período de incubação foi determinado o pH no pHômetro digital (marca Hanna), e realizadas diluições seriadas de 10^{-1} até 10^{-7} em solução salina tampão fosfato pH 7.2. Cada diluição foi semeada pela técnica de esgotamento por estrias, em placas contendo o meio base para produção de EPS otimizado por Guimarães (1999). As placas foram incubadas a 30 ± 2 °C por 48h. Foram retiradas 5 colônias isoladas de aspectos diferentes de cada placa, e semeadas em 2 mL do caldo MRS. Incubados a 35 ± 2 °C por 24h.

As culturas provenientes do caldo MRS (amostra de leite e de produtos vegetais) foram semeadas pela técnica de esgotamento por superfície em estrias no agar MRS e incubadas a 35 ± 2 °C por 48h, sendo realizados imediatamente o teste de coloração de Gram e o teste da catalase (KONEMAN, 2008).

4.2.2 Purificação dos isolados

Os Isolados que apresentavam perfil de bactérias Gram-positivas e catalase negativa, foram purificados, sendo semeados por esgotamento em estrias, em placas de Petri contendo agar MRS. As placas foram incubadas a 35 ± 2 ° C por 48h. Após a incubação, coletou-se uma colônia bem separada uma das outras, e esta foi semeada novamente no agar MRS, repetindo este processo mais uma vez. Este procedimento permitiu a obtenção de uma única colônia originada de uma única célula, garantindo a pureza do micro-organismo isolado.

4.2.3 Manutenção dos isolados

As culturas purificadas foram inoculadas, transferindo uma colônia bem

desenvolvida para criotubos contendo 1,5 mL do meio leite extrato de levedura - LEL (leite desnatado – 10%; extrato de levedura – 0,5%; glicose – 1,0%) acrescido de 10% de glicerol. O leite constitui um excelente meio para manutenção de bactérias lácticas a temperaturas abaixo de -18°C (VIEIRA, 2003). Os tubos foram imediatamente congelados em *freezer*-80° C com finalidade de preservar as culturas e diminuir o risco de alteração do perfil genético.

4.2.4 Reativações dos isolados

Culturas criopreservadas no meio LEL foram reativadas, inoculando-as no caldo MRS e incubado-as a 35 °C por 24h. Um mínimo de três repiques foi realizado até obter o inóculo. Este procedimento objetivou garantir a total reativação da linhagem que, quando conservada em baixas temperaturas, encontra-se em estado de atividade metabólica extremamente reduzida.

4.2.5 Triagem das bactérias lácticas produtoras de EPS

Neste trabalho foi desenvolvido um método prático, rápido e econômico de fazer o triagem de bactérias produtoras de EPS, utilizando discos de papel de filtro impregnados pela cultura teste. A grande vantagem consiste em testar em uma mesma placa vários isolados, diferente do método de estrias em placas, que normalmente só utiliza um isolado por placa, e da medição de viscosidade que necessita do viscosímetro, de 1 tubo para cada isolado e de maior quantidade de meio.

A triagem foi realizada no meio base (Guimarães, 1999), variando-se os açúcares (sacarose, glicose e lactose: 10%) o pH ($5,5 \pm 0,2$ e $7,5 \pm 0,2$) e a temperatura (28 ± 2 °C, 35 ± 2 °C e 45 ± 2 °C).

A técnica desenvolvida consistiu em inocular 5 uL da cultura ativa de cada isolado em discos de papel de filtro com diâmetro 5 mm (esterilizados) que estavam nas placas sobre o meio base (com os diferentes tipos de açúcares e as variações do pH). (Figura 1). As placas foram incubadas nas diferentes temperaturas por 48-72h. A leitura foi baseada na formação de uma colônia mucóide ao redor dos discos, e o resultado foi interpretado de acordo com o diâmetro da colônia como: (0 mm) sem produção de EPS; (< 7 mm) pouca produção de EPS e (> 8mm) alta produção de EPS. A produção deste biopolímeros pelos isolados foi confirmada pelo método químico, misturando uma alça de Platina impregnada pela colônia em 2 mL de álcool absoluto, e pela visualização dos discos na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

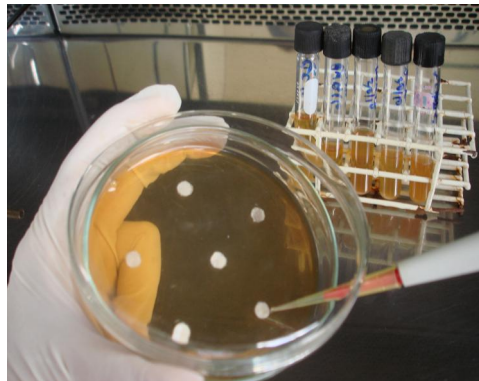


Figura 1. *Triagem* de bactérias produtoras de EPS pelo método dos discos

4.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.3.1 Isolamento e seleção de bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos

Foram obtidas 187 colônias de bactérias lácticas (quadro 2), sendo 87 provenientes dos substratos lácteos (leite de cabra e de vaca) isoladas no meio ESM (*Exopolysaccharides Selection Medium*) e 100 dos produtos vegetais (cana de açúcar, mandioca e repolho) isoladas no meio base, suplementado com 10% de sacarose. Todos os isolados apresentavam como características: bactérias Gram positivas, catalase negativa e não formadoras de esporos; características estas, preliminares para a identificação das bactérias lácticas. A morfologia variou de cocos (25,1%), bacilos

(41,2%) e co cobacilos (33,7%).

Nomenclatura dos isolados	Fonte de isolamento	Morfologia			Nº de isolados
		cocos	bacilos	cocobacilos	
LCMH	Leite de cabra	16	30	13	59
LVM	Leite de vaca	10	14	4	28
CC	Caldo de cana	11	10	22	43
R	repolho	4	8	20	32
PUB	mandioca	6	15	4	25
TOTAL	xxxxxxxxxxxxxxxx	47	77	63	187

Quadro 2: Resultado do isolamento de bactérias lácticas obtidas do leite e de produtos vegetais provenientes da região do semi-árido baiano.

O meio ESM normalmente é utilizado para isolar bactérias lácticas produtoras de EPS em substratos lácteos. Este meio possui a lactose como principal fonte de carboidrato para induzir a produção de EPS (VAN DEN BERG, et al., 1995; SANNI et al., 2002). Van Den Berg e colaboradores (1993) utilizaram o meio ESM contendo 1% de glicose para a obtenção de bactérias lácticas produtoras de EPS provenientes de queijos e outros produtos lácteos. Das 607 linhagens testadas, somente 30 (4,9%) produziram EPS. Ludbrook e colaboradores (1997) aumentaram a concentração de glicose para 5%, obtendo 14% de linhagens de BL produtoras de EPS. Adebayo-tayo e Onilude (2008) isolaram 191 linhagens de BL de alimentos fermentados utilizando o meio ESM; destas, somente 2 linhagens não produziram EPS.

Guimarães (1999) otimizou um meio base suplementado com 15% de sacarose para a produção de EPS, objetivando a produção do polímero dextrana pelo *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512-F, uma linhagem de bactéria láctica isolada do caldo de cana. Este meio contém alta concentração de sacarose, o que proporciona o isolamento de bactérias produtoras da enzima dextrana-sacarase. Esta enzima é uma glicosiltransferase extracelular que transfere o monossacarídeo do dissacarídeo para o crescimento da cadeia polissacarídica. É uma enzima adaptativa, ou seja, é necessário a presença da sacarose como substrato para induzir a sua produção. Sarwat, et al. (2008) visando selecionar espécies de *Leuconostoc* produtor de dextrana, utilizaram um

meio base contendo (g. L⁻¹): sacarose, 50,0; triptona, 10,0; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2, 5, acrescido de 0, 005% de azida de sódio, com pH do meio ajustado para 7,0.

4.3.2 Triagem das bactérias lácticas produtoras de EPS

A figura 2.a) ilustra a leitura dos ensaios realizados pelo método dos discos, onde se pode observar a avaliação qualitativa da produção de EPS pelos isolados de BL, em que a formação de substância mucóide ao redor do disco, indica produção de EPS pelo isolado testado, e disco não envolvido pela camada mucóide, indica não produção deste biopolímeros. Todos os isolados visualizados nesta placa produziram EPS com aspectos quantitativos diferentes e com características visuais diferentes; uns apresentavam um aspecto translúcido de cor amarronzada e outros um aspecto translúcido de cor mais clara e outros cremosos esbranquiçados. O disco situado no centro não possui inóculo bacteriano. A produção de EPS pelas colônias foi confirmada pela presença de precipitado no meio alcoólico. Colônias não produtoras de EPS, quando misturadas no meio alcoólico ficam em suspensão no meio, tornando o meio turvo (figura 2.b).

Segundo Harris (2001), o etanol é um agente desidratante, portanto diminui a camada de solvatação das moléculas, além de baixar a constante dielétrica do meio, o que promove a aproximação das moléculas de carboidratos através de atrações eletrostáticas e conseqüente precipitação. Os polissacarídeos são bem menos solúveis que substâncias de baixo peso molecular, fazendo com que se precipitem facilmente.

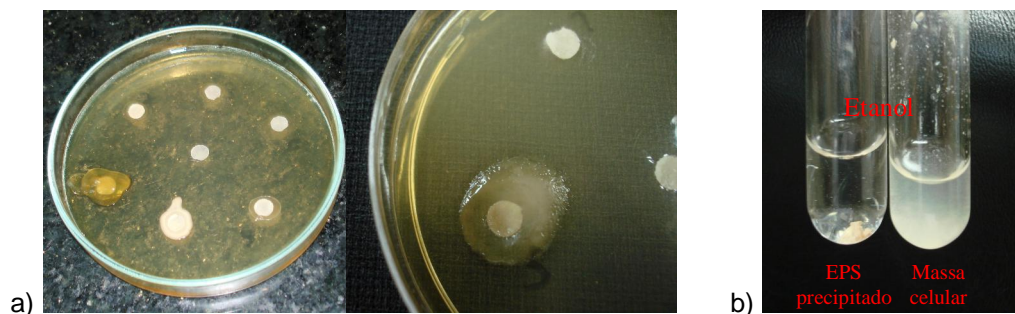


Figura 2: Triagem de BL produtores de EPS 2.a); Confirmação rápida de produção de EPS 2.b

As figuras 3. a) e 3. b) mostram fotomicrografias dos discos que contêm isolados produtores de EPS e não produtores de EPS, respectivamente. Pode-se observar no disco contendo EPS, os micro-organismos impregnados em uma matriz polissacarídica, e no disco onde não houve produção de EPS uma grande proliferação de células sem a presença da matriz polissacarídica. A figura 3. c) é a fotomicrografia do disco controle (sem inóculo bacteriano). As fibras visualizadas nesta figura são fibras de celulose componentes do papel de filtro.

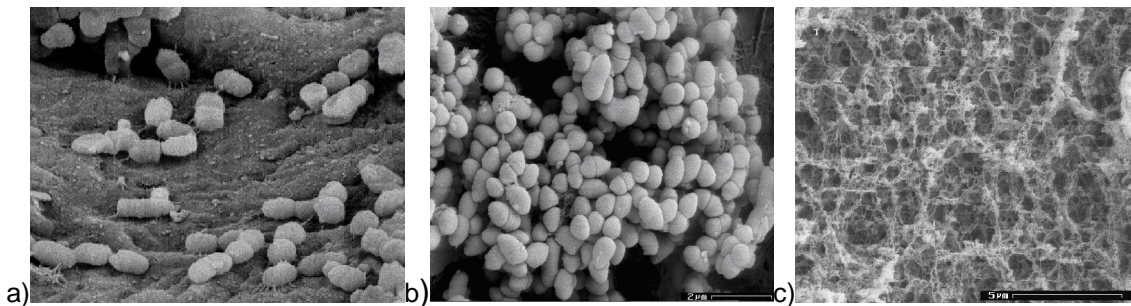


Figura 3: a) disco impregnado por EPS x 7000; b) disco sem EPS com crescimento bacteriano x 7000; c) controle negativo (disco sem inóculo x 1000).

O quadro 3 apresenta o resultado da triagem das bactérias lácticas produtoras de EPS no meio base nas diferentes condições de cultivo.

Açúcar	pH	T ^o C	Isolados de bactérias lácticas					
			LCMH	LVM	CC	R	PUB	Total*
Sacarose	5,5	28	0	5	1	6	0	12
		35	0	4	1	5	0	10
		45	0	3	0	1	0	4
	7,5	28	3	5	5	6	14	33
		35	0	4	1	5	0	10
		45	0	3	0	1	0	4
Glicose	5,5	28	0	2	1	1	0	4
		35	0	6	0	1	0	7
		45	0	1	0	0	0	1
	7,5	28	3	6	0	0	0	9
		35	0	6	0	1	0	7
		45	0	1	0	0	0	1
Lactose	5,5	28	0	5	0	0	0	5
		35	0	5	0	0	0	5
		45	0	1	0	0	0	1
	7,5	28	2	6	0	0	0	8
		35	0	2	0	0	0	2
		45	0	1	0	0	0	1

Quadro 3: Números de isolados de BL produtoras de EPS obtidas na triagem

* o mesmo isolado pode ter produzido EPS em diferentes condições de cultivo

A triagem de bactérias lácticas produtoras de EPS originou 124 resultados positivos, sendo que em alguns casos o mesmo isolado produziu EPS em diferentes condições de cultivo. A sacarose foi o açúcar onde houve maior produção de EPS, com 73 resultados positivos, onde aproximadamente 45,2% no pH 7,5 a 28 °C. Depois a glicose com 29 resultados positivos, tendo 39,7% nas mesmas condições de pH e temperatura do teste da sacarose, e por fim a lactose com 22 resultados positivos, sendo 30,1%, também nas mesmas condições de pH e temperatura dos outros açúcares.

As melhores condições de produção de EPS pelos isolados, utilizando o meio base, neste trabalho foram: meio suplementado pela sacarose, pH 7,5 e temperatura 28 °C.

Orla-Jensen em 1943 descreveu a produção de EPS pelos *Leuconostoc* sp. lactobacilos mesofílicos e pediococos através da sacarose (TIEKING, 2005). Outros pesquisadores também utilizaram este açúcar como indutor na produção de EPS (OEVELEN, V. D.; VERACHTERT, 1979, YAMAMOTO et al., 1993; SUTHERLAND, 1998; LAWS, MARSHALL, 2001; MACEDO, 2002; PADMANABHAN, KIM, 2002).

A sacarose e a glicose são os açúcares mais utilizados para o isolamento de bactérias produtoras de EPS, sendo os açúcares que proporcionam maior produção de biopolímeros na maioria das bactérias (SUTHERLAND, 2002; GÓMEZ, 2006; SARWAT, et al., 2008).

A quantidade total de EPS produzidos pelos micro-organismos é fortemente influenciada pelo açúcar presente no meio. No entanto não existe um açúcar que seja melhor do que o outro na produção de EPS, porque a produção deste polímero é dependente da linhagem testada e conseqüentemente do metabolismo enzimático de cada uma (RUAS-MADIEDO, REYES-GAVILÁN, 2005).

Bactérias aquáticas podem produzir EPS durante o seu crescimento no corpo d'água e durante limitação de carbono (DECHO, 2000) Assim, algumas espécies de micro-organismos podem utilizar substratos que não sejam açúcar na biossíntese de EPS (SUTHERLAND, 1972).

A temperatura é um fator crítico na síntese de polissacarídeos. O maior crescimento e a maior produção de polissacarídeo de bactérias lácticas ocorrem na faixa de 25-35 °C, onde cada espécie apresenta a sua temperatura ótima (VERMANI; KELKAR; KAMAT, 1995). Mas, linhagens de bactérias lácticas termófilas como *Streptococcus thermophilus* LY03 têm uma melhor produção de EPS a 42 °C (DE VUYST; VANDERVEKEN; VAN, DEGREEST, 1998) e os *Lactobacillus delbrueckii* em temperaturas acima de 45 °C (LAWS et al., 2001).

As enzimas glicosil-hidrolase são responsáveis pela degradação de EPS após as fermentações. Estas enzimas possuem um pH ótimo de atividade. Como a degradação de EPS não é desejável, o pH ótimo para a produção de EPS deverá ser diferente do pH de degradação. Desta forma, o efeito do pH na produção de EPS está relacionado à atividade destas enzimas (CANILHA et al., 2006).

Variando-se o tipo de açúcar e as condições de cultivo, o meio base pode selecionar diversos micro-organismos isolados de vegetais, com diferentes perfis enzimáticos para a produção de EPS.

4.4 CONCLUSÃO

O método utilizado neste trabalho para a obtenção de isolados bacterianos produtores de exopolissacarídeos mostrou-se bastante eficaz e rápido, sendo recomendado para a triagem de diferentes linhagens bacterianas produtoras desse composto. No presente trabalho foram encontrados aproximadamente 66% de bactérias lácticas produtoras de biopolímeros, indicando que a região do semi-árido baiano, representa um bom nicho para a obtenção de bactérias produtoras de exopolissacarídeos.

AGRADECIMENTOS:

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Meio Ambiente

REFERÊNCIAS

ADEBAYO-TAYO, B. C.; ONILUDE, A. A. Triagem of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Some Nigerian Fermented Foods for EPS Production. *World Applied Sciences Journal* 4 (5): 741-747, 2008.

APT AGAR. Disponível: <http://www.neogen.com>. Acesso em 16 de novembro de 2008.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, , p.1 -63, 1993.

BOELS, I. C., RAMOS, A.; M. KLEEREBEZEM, M.; DE VOS. W.M.. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis. *Journal*. 67:3033–3040. 2001.

CANILHA ,L.; SILVA ,D. D. V; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica*, 20 , 2006.

CERNING, J., C. BOUILLANNE, M. LANDON, M. DESMAZEAUD. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal. Dairy Science*. 75:692–699, 1992.

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

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology, Reviews*, 23:2, 153-177, 1999

DE VUYST, L.; VANDERVEKEN, F.; VAN DE VEN, S.; DEGEEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their grown-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 6, 1059-1068, 1998.

DECHO, A. W., Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research*, 20:10-11, 1257-1273, 2000.

GOMEZ, J. A. M. *Caracterización de los exopolisacaridos producidos por microorganismo halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. 2006. Tesis (Doctoral) - Universidad de Granada, Facultad de Granada. Departamento de Microbiología, Granada 2006.

GRIZOTTO, R. K.; MENEZES, H. C. Efeito da fermentação na qualidade de “chips” de mandioca. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 24:2: 170-177, 2004.

GUIMARÃES, D. P., COSTA, F., RODRIGUES, M. I., MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16:2, 129-139, 1999.

HOLT, J.G. IN: BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Group 17 gram-positive cocci., ED 9TH. BALTIMORE: WILLIAM & WILKINS. p. 529–541.1994.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R. BJORKROTH, J. and SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms . e cryopreservation of microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, 73, 2. 365S-373S, 2001

KONEMAN. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed Guanabara. 2008. 1600p

KONO, Y and F'RIDOVICH, I. Isolation and Characterization of the Pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 258, No. 10 May 25. pp. 6015 - 6019. 1983.

LAWS, A.; GU, Y. ; MARSHALL. V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*,19, 597-625, 2001.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI,W. *Biotechnologia: Tecnologia das fermentações*. V.1, Editora Edgard Blucher Ltda., São Paulo, 1975, 286p.

LUDBROOK, K. A.; RUSSELL, C. M.;GREIG, R. I. 1997. Exopolysaccharide production from lactic acid bacteria isolated from fermented foods. *Journal of Food Science - Wiley InterScience* 62:597–600, 1997

MACEDO, N. G. ; LACROIX, C; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12, 419–426, 2002.

MAGNUSSON, J.; JONSSON, H.; SCHNULRER, J.; ROOS, S. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 831–834, 2002.

OEVELEN , V. D.; VERACHTERT, H. Slime production by brewery strains of *Pediococcus cerevisiae* . *Journal of the American Society of Brewing Chemists.*, 27, 34-37, 1979..

PADMANABHAN, P. C., KIM, D. S. Production of insoluble dextran using cell-bound dextransucrase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carbohydrate Research*, 337,1529-1533. 2002.

RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science* . 1: 23-45, 2000.

ROBERTS, I. S. The Biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50: 285-315, 1996.

RUAS-MADIEDO, P AND REYES-GAVILÁN, C. G. *Invited Review: Methods for the Triagem, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria.* *Journal Dairy Science.* 88:843-856, 2005..

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.* 3rd. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. 633p.

SANNI, A, I ; ONILUDE, A.A. ; OGUNBANWO, S. T.; FADAHUNSI, I. F. ; AFOLABI, R. O. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods in Nigeria, *European Food Research and Technology*, v. 214 (5),405-407, 2002..

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L. E.; BERTO CCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 34, 11-16, 1999.

SUTHERLAND, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial exopolysaccharides. *TIBTech*, 16: 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiology Today*, [S.I.], 29, 70-71, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. *Advances In Microbial Physiology*, 8: 143-213, 1972.

TIEKING, M. Production of prebiotic exopolysaccharides by lactobacilli. 2005, Doctoral thesis 11p f., (Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung), Alemanha, Freising 2005.

VAN DEN BERG, D. J. C.; SMITS, A.; POT, B.; LEDEBOER, A. M.; KERSTERS, K.; J. VERBAKEL, J. M. A.; VERRIPS, C. T. Isolation, triagem and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. *Food Biotechnol.* 7:189–205, 1993.

VAN DEN BERG, D.J.C., ROBIJN, G.W., JANSSEN, A.C., GIUSSEPIN, M.L.F., VREEKER, R., KAMERLING, J.P., Vliegenthart, J.F.G. "Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide" *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2840-2848, 1995.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Osaka, v.80, n.6, p.599- 602, 1995.

VIEIRA, E. D. Seleção de linhagens produtoras de goma isoladas de cana-de-ácucar. 2003. Dissertação 76 f. (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia Química. Campinas, SP., 2003.

YAMAMOTO, K., YOSHIKAWA, K., OKADA, S. (1993). Detailed action mechanism of dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57, 47-50, 1993.

CAPÍTULO 5

APLICAÇÃO DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR) NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS PELAS BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE ALIMENTOS COLETADOS DA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO.

Elinalva Maciel Paulo¹, Sandra Aparecida Assis², Lindomar Portugal³, Sergio costa Ferreira⁴, Milton Ricardo de Abreu Roque⁵

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Av. Transnordestina s/n Km 0 Ba116, Feira de Santana, tel/fax (75) 32248018. elinalvamaciel@yahoo.com, ²Departamento de Saúde – UEFS, ³Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia- UFBA, Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia – UFBA, ⁵Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

Bactérias lácticas são micro-organismos pertencentes a um grupo fisiológico que fermenta carboidratos, tendo como produto final ácido láctico. Seus produtos metabólitos estão sendo utilizados em escalas expressivas na indústria farmacêutica e de alimentos. Um dos produtos de grande interesse biotecnológico produzido pelas BL são os exopolissacarídeos. Porém, a sua produção em condições normais geralmente é baixa, necessitando de buscar parâmetros físicos químicos e nutricionais adequados para aumentar o rendimento. Este trabalho objetivou maximizar a produção destes biopolímeros pelas bactérias lácticas, através da aplicação da metodologia de superfície de resposta. Foram testados cinco isolados de BL produtoras de EPS, provenientes de alimentos coletados da região do semi-árido baiano, com os seguintes rendimentos máximos: BL R2 (50,0 g/L), BL LCMH21 (41,7 g/L), BL. CC3 (40,2), BL PUB 16 (25,4 g/L), g/L), BL LVM16 (6,3 g/L). Estas linhagens representam uma das diversas linhagens bacterianas que pertencem ao acervo da biodiversidade microbiana da região

do semi-árido baiano, que possui potencial de produção de compostos de interesse comercial, como na produção de exopolissacarídeo demonstrado neste trabalho.

Palavras-chave: Metodologia de superfície de resposta, exopolissacarídeos, bactérias lácticas.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are micro-organisms belonging to a group that ferment carbohydrates to form lactic acid as a final metabolite that can be used on a significant scale in the industry pharmaceutical and food industries. One of the products of great biotechnological interest produced by lactic acid bacteria are exopolysaccharides. However, its production under normal conditions is generally low and need to seek chemical and physical parameters and appropriate nutritional to increase production. This study aimed to maximize the production of these biopolymers by lactic acid bacteria by applying the methodology of response surface. We tested five strains of lactic acid bacteria producing EPS, from food collected from the semi-arid environments, obtaining the following levels: LAB R2 (50,0 g/L), LAB LCMH21 (41,7 g/L), LAB CC3 (40,2 g/L), LAB. PUB 16 (25,4 g/L), g/L, LAB LVM16 (6,3 g/L). These strains represent one of several bacterial strains belonging to the collection of microbial biodiversity in the semi-arid environments, which has potential to produce compounds of commercial interest, as in the production of exopolysaccharides demonstrated in this study.

Keywords: Methodology Response Surface, exopolysaccharides, lactic acid bacteria.

5.1 INTRODUÇÃO

As bactérias lácticas podem ser usadas pelo homem para obtenção de produtos biotecnológicos com grande valor econômico. Um grande mercado de produtos oriundos das BL são os biopolímeros, principalmente os exopolissacarídeos (EPS), que são utilizados com diversas finalidades como espessantes, emulsificantes, expensor plasmático e produtos cosméticos e dietéticos (MATOS; ROZENFELD, 2005).

A produção de exopolissacarídeos por linhagens que têm esta propriedade depende de vários fatores. Os parâmetros que mais influenciam são a linhagem

bacteriana, a composição do meio de cultivo, o pH e a temperatura de incubação (NAMPOOTHIRI et al. 2003; LEE, GILMORE, 2005).

A taxa de produção de EPS em BL em condições naturais é relativamente baixa (40 – 800 mg/L) comparado à produção de xantana pela *Xanthomonas campestris*, que é de 10 – 25 g/L (BECKER et al., 1998).

A quantidade de EPS produzida pelas BL depende do perfil metabólico de cada linhagem. Normalmente elas produzem EPS em pequenas quantidades em condições naturais e, raramente ultrapassam 30% do seu peso seco. Em linhagens selecionadas em condições otimizadas de fermentação, esta produção pode chegar a 70% (NASCIMENTO, 2001).

Dentro de condições laboratoriais a produção de EPS se torna instável devido à instabilidade genética, que pode ser resultado da deleção ou rearranjos com o gene dentro do conjunto de genes EPS ou pela perda do plasmídeo EPS inteiro (MARSHALL, 2001).

Os exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas possuem várias aplicações industriais, principalmente nas indústrias farmacêuticas e de alimentos.

Uma das técnicas rotineiramente utilizadas para otimizar a síntese de compostos metabólicos pelos micro-organismos consiste na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) (GUIMARÃES, et al. 1999; MARCOS, et al., 2002; KIM; DAY, 2008).

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é um método estatístico utilizado na otimização de processos produtivos para solucionar equações multivariadas. Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser usadas para descrever como as variáveis em teste afetam as respostas, para determinar as inter-relações entre as variáveis e para descrever efeitos combinados de todas as variáveis sobre a resposta. O processo da MSR segue quatro etapas: 1. identificação dos fatores; 2. definição dos níveis; 3. escolha do desenho experimental adequado; 4. análise dos dados através de um sistema computacional (BARROS-NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007).

De acordo com o que foi exposto, este trabalho objetivou otimizar as condições para a produção de EPS pelas bactérias lácticas isoladas de produtos vegetais da região do semi-árido baiano.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Micro-organismos testados

Foram utilizados cinco isolados de bactérias lácticas produtoras de EPS provenientes de leite e produtos vegetais, coletados na região do semi-árido baiano (BL R2, BL LCMH21, BL CC3, BL PUB 16 e BL LVM16).

5.2.2 Planejamento Fatorial Completo $k = 2^4$

Primeiramente realizou-se uma modelagem inicial como ensaio preliminar para determinar a região de máxima produção de EPS. Nesta metodologia um prévio conhecimento do objeto em estudo é de grande valia para a definição dos níveis e dos fatores. Por isso, estes elementos foram escolhidos baseados em dados de literatura (DE VUYST, DEGEEST, 2001; MACEDO, et al., 2002; RUAS-MADIEDO, 2005; YUKSEKDAG; ASLIM, 2008, TUNÇTÜRK, 2009).

Utilizou-se um isolado de BL para a realização do planejamento preliminar, Foi delineada uma matriz de planejamento fatorial completo com 2 níveis (-1, +1), 4 variáveis independentes (% sacarose, pH, aeração e temperatura), adicionando-se um ponto central (0) com 4 replicatas, sendo $k=2^4 + 4$, totalizando 20 ensaios. Os ensaios foram conduzidos por ordem de sorteio, o que caracterizou uma escolha aleatória, evitando a distorção estatística nos resultados. A resposta avaliada (variável dependente) foi rendimento de biopolímero.

Tabela 1. Variáveis independentes e níveis de variação para rendimentos em EPS de bactérias lácticas

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Valores codificados</i>		
	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
	Valores reais		
λ_1 Sacarose (%)	5,0	7,5	10,0
λ_2 pH	5,5	6,5	7,5
λ_3 Aeração (RPM)	0	90	180
λ_4 Temperatura (°C)	25	31	37

A significância dos efeitos das variáveis e das possíveis interações entre elas foi checada pela aplicação da análise de variância (ANOVA) e com base nos gráficos de Pareto. As informações obtidas após a construção de superfície de resposta, também foram utilizadas na interpretação dos resultados.

5.2.2.1 Preparo do pré-inóculo

Inoculou-se 1% de uma cultura ativa, selecionada pela análise qualitativa em 10 mL de caldo MRS. A cultura foi incubada por 18h a 35 ± 2 °C, apresentando absorbância de $1,92 \pm 0,01$ em 600 nm. Também foi realizada a contagem de células, utilizando o método de semeadura por profundidade, neste mesmo período de crescimento, correspondendo o número de células a $4,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Inoculou-se 1% do pré-inóculo em frasco Erlenmeyer (capacidade 100 mL), contendo 30 mL (1/3) do meio base otimizado por Guimarães para produção de EPS (50 g/l sacarose, 20 g/l extrato de levedura, 20 g/l MgSO₄, 0.01 g/l NaCl, 0.01 g/l FeSO₄, 0.01 g/l Mn SO₄, 0.02 g/l CaCl₂ e 20 g/l k), variando a concentração da sacarose e do pH. Os frascos Erlenmeyer foram incubados por 30h em condições de temperatura e aeração determinadas para cada ensaio.

5.2.2.2 Recuperação do EPS

Inicialmente foi determinado o pH de todos os ensaios, logo em seguida as

amostras das culturas foram aquecidas em forno micro-ondas (marca Eletrolux cap. 18 L) na condição de potência média (50), por 3 minutos, o que levou à inativação das células. O aquecimento em microondas evita a formação da melanoidina (polímero escuro não microbiano) resultante da reação de Maillard (DIAS, 2009).

Foram pesadas em tubos Falcon com capacidade 50 mL, amostras de 15 g de cultura provenientes de cada ensaio, e acrescentados em cada tubo 15 mL da solução de ácido tricloroacético a 10%. Os tubos ficaram na incubadora Shaker (marca Marconi modelo MA420) a 90 rpm por 30 minutos. Este procedimento visa precipitar as proteínas (CERNING, 1992, CERNING, 1995; CORTEZI, 2004; RUAS-MADIEDO; REYES-GAVILAN, 2005). Em seguida as culturas tratadas com o ácido tricloroacético foram centrifugadas (centrífuga eppendorff) a 8150 x g por 20 minutos a uma temperatura de 4 °C. O material sedimentado de cada tubo foi descartado e o sobrenadante, recolhido em béquer.

Nos béqueres contendo o sobrenadante, foram adicionados 30 mL de álcool absoluto (1:2) para precipitação do EPS. Os béqueres ficaram armazenados a 4°C por 24h. Após este período todo o conteúdo foi centrifugado a 8150 x g por 20 minutos, para recuperação do EPS precipitado. Os sobrenadantes foram descartados. Os sedimentos de EPS foram transferidos para placas previamente pesadas e colocados para secar em estufa a 40 ± 2 °C, e pesados até obter massa constante, sendo depois calculado o peso seco do sedimento de cada ensaio e atribuindo o resultado como rendimento bruto de EPS, convertendo o valor para g/L (RUAS-MADIEDO; REYES-GAVILAN, 2005; MESOMO, 2007). Todas as substâncias químicas utilizadas foram de alto grau analítico.

5.2. 3 Planejamento Fatorial Completo $k = 3^2$

Foram obtidos através do programa Statistica® 6.0, os valores dos efeitos e da interação resultante dos experimentos da quantificação do precipitado bruto do EPS na modelagem inicial. Estes valores visam determinar os fatores com seus respectivos níveis que mais afetam a resposta de produção de EPS. A partir destes dados foram fixados os valores de alguns fatores (não significativos ou de grande significância) e

deslocando o nível dos demais fatores, dando prosseguimento à segunda etapa do experimento com a realização do planejamento fatorial completo de 3 níveis e 2 variáveis ($k = 3^2$), sendo adicionado 1 ponto central com 2 replicatas (tabela 2).

As análises foram realizadas de forma aleatória, por ordem de sorteio de cada ensaio.

Tabela 2: Variáveis independentes e níveis de variação para rendimentos em EPS de bactérias lácticas

<i>Variáveis independentes</i>	<i>Valores codificados</i>		
	<i>-1</i>	<i>0</i>	<i>+1</i>
	Valores reais		
λ_1 Sacarose (%)	7,5	10,0	12,5
λ_2 pH	5,5	6,5	7,5

A inoculação das bactérias e a quantificação do rendimento bruto de EPS foram realizadas conforme os ensaios preliminares. Os resultados foram lançados em planilhas do programa Statistica® 6.0 para a obtenção dos gráficos e dos valores críticos de cada isolado.

5.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.3.1 Planejamento Fatorial Completo 2^4

Inicialmente realizou-se uma modelagem inicial utilizando planejamento fatorial completo de 2 níveis para chegar ao domínio experimental e selecionar as variáveis significativas que mais afetam a resposta na produção de EPS (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007).

Ensaio*	Sacarose (%)		pH		Aeração (RPM)		Temperatura °C		Rendimento EPS g. L ⁻¹
	v.c	v.r	v.c	v.r	v.c	v. r	v.c	v.r	
1	+ 1	10,0	+ 1	7,5	+ 1	180	+ 1	37	14,2
2	+ 1	10,0	+ 1	7,5	+ 1	180	- 1	25	42,8
3	+ 1	10,0	+ 1	7,5	- 1	0	+ 1	37	4,7
4	+ 1	10,0	+ 1	7,5	- 1	0	- 1	25	42,3
5	+ 1	10,0	- 1	5,5	+ 1	180	+ 1	37	10,5
6	+ 1	10,0	- 1	5,5	+ 1	180	- 1	25	13,2
7	+ 1	10,0	- 1	5,5	- 1	0	+ 1	37	6,3
8	+ 1	10,0	- 1	5,5	- 1	0	- 1	25	19,3
9	- 1	5,0	+ 1	7,5	+ 1	180	+ 1	37	3,9
10	- 1	5,0	+ 1	7,5	+ 1	180	- 1	25	18,3
11	- 1	5,0	+ 1	7,5	- 1	0	+ 1	37	8,6
12	- 1	5,0	+ 1	7,5	- 1	0	- 1	25	14,1
13	- 1	5,0	- 1	5,5	+ 1	180	+ 1	37	4,7
14	- 1	5,0	- 1	5,5	+ 1	180	- 1	25	8,7
15	- 1	5,0	- 1	5,5	- 1	0	+ 1	37	8,3
16	- 1	5,0	- 1	5,5	- 1	0	- 1	25	4,4
17	0	7,5	0	6,5	0	90	0	31	17,9
18	0	7,5	0	6,5	0	90	0	31	18,3
19	0	7,5	0	6,5	0	90	0	31	17,7
20	0	7,5	0	6,5	0	90	0	31	17,6

*ordem padrão do ensaio; v.c = valores codificados; v.r = valores reais

Quadro 5: Planejamento fatorial completo 2⁴ para o cultivo do isolado BL R2, avaliando o rendimento em EPS.

O quadro 5 apresenta os resultados do rendimento dos ensaios, podendo observar que o ensaio n° 2 onde se utilizou o maior nível de sacarose, pH e aeração com o menor nível de temperatura, obteve-se maior rendimento de EPS. Porém, somente através da análise estatística é que pode ser verificado o grau de significância de cada fator com suas respectivas interações.

A significância dos efeitos estimados foi avaliada através da análise de variância (ANOVA), apresentado na tabela 3. Como há somente dois níveis para cada variável, um modelo linear pode explicar a correlação entre a resposta e as variáveis independentes ou fatores. Assim, os testes ANOVA indicam que o modelo linear descreve adequadamente o rendimento de EPS, apresentando um coeficiente de regressão múltipla ($R^2 = 0,97972$), implicando que aproximadamente 98% da variação total na atividade residual é explicado pelo modelo matemático representado pela equação 1.

$$= 0 + 1X_1 + 2X_2 + 3X_3 + 4X_4 + 12X_1X_2 + 13X_1X_3 + 14X_1X_4 + 23X_2X_3 + 24X_2X_4 + 34X_3X_4 + 123X_1X_2X_3 + (X_1X_2X_3X_4). \quad (1)$$

Onde: \hat{Y} é a estimativa da resposta (rendimento em EPS), β_0 são os coeficientes (estimadores das variáveis), cujos valores devem ser determinados, "0" é a média de todas as respostas do planejamento, X_1, X_2, X_3 e X_4 são as variáveis que representam os fatores sacarose, pH, aeração e temperatura, respectivamente e ϵ é um termo de erro aleatório associado à resposta (BARROS- NETO, SCARMÍNIO; BRUNS, 2007).

O efeito significativo de cada coeficiente foi determinado através do valor p ($p < 0,05$), considerando 95% de intervalo de confiança (BUSSAB.; MORETTIN, 2002). Baixos valores de p indicam um coeficiente muito significativo, como o que aconteceu com os efeitos temperatura, concentração de sacarose e pH, com maior grau de significância, respectivamente. Já o efeito aeração apresentou maior valor de p quando comparado com os outros fatores, mostrando ter menor significância estatística. Normalmente é esperado que os efeitos principais sejam mais significativos. Somente as interações (aeração x temperatura), e (pH x aeração x temperatura) não foram significativas ($p > 0,05$), indicando não afetarem a produção de EPS no domínio estudado. A falta de ajuste do modelo mostrou-se significativa ($p < 0,05$), possivelmente devido à variância não ser homogênea.

Tabela 3: ANOVA , Rendimento EPS g/Lⁱ da BAL R2, R² =0,97972; S. Q. Erro puro=0,2958333

F. V	Efeito estimado	S.Q.	G. L.	Q.M	F	P
(1) Sac. (%)	10,3650	429,733	1	429,7329	1452,618	0,000040*
(2) pH	9,0975	331,058	1	331,0580	1119,069	0,000059*
(3) RPM	1,1300	5,108	1	5,1076	17,265	0,025342*
(4) T °c	-12,8025	655,616	1	655,6160	2216,167	0,000021*
1 by 2	4,5800	83,906	1	83,9056	283,625	0,000456*
1 by 3	0,9125	3,331	1	3,3306	11,258	0,043884*
1 by 4	-7,6700	235,316	1	235,3156	795,433	0,000098*
2 by 3	1,4300	8,180	1	8,1796	27,649	0,013400*
2 by 4	-8,8375	312,406	1	312,4056	1056,019	0,000064*
3 by 4	0,3950	0,624	1	0,6241	2,110	0,242311 ^{ns}
1*2*3	1,5925	10,144	1	10,1442	34,290	0,009929*
1*2*4	-3,7550	56,400	1	56,4001	190,648	0,000822*
1*3*4	4,4475	79,121	1	79,1210	267,451	0,000497*
2*3*4	-0,2050	0,168	1	0,1681	0,568	0,505733 ^{ns}
Falta de ajuste		44,892	2	22,4461	75,874	0,002699*
Erro puro		0,888	3	0,2958		
Total		2256,889	19			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); ns- não significativo ($p \geq .05$)

O gráfico de Pareto (Figura 4) gerado no modelo de planejamento experimental confirma os dados apresentados na ANOVA, no qual pode ser observado pelas barras representativas de todos os fatores principais e de algumas interações que ultrapassam a linha de significância ($p < 0,05$).

O gráfico de Pareto é uma forma especial do gráfico de barras verticais, que dispõe os itens analisados desde o mais freqüente até o menos freqüente. (WERKEMA, 1995). É uma ferramenta estatística, muito útil para o gerenciamento de qualquer processo. Através dos dados representados neste gráfico pode-se estabelecer os fatores que interferem no processo produtivo com o seu grau de significância.

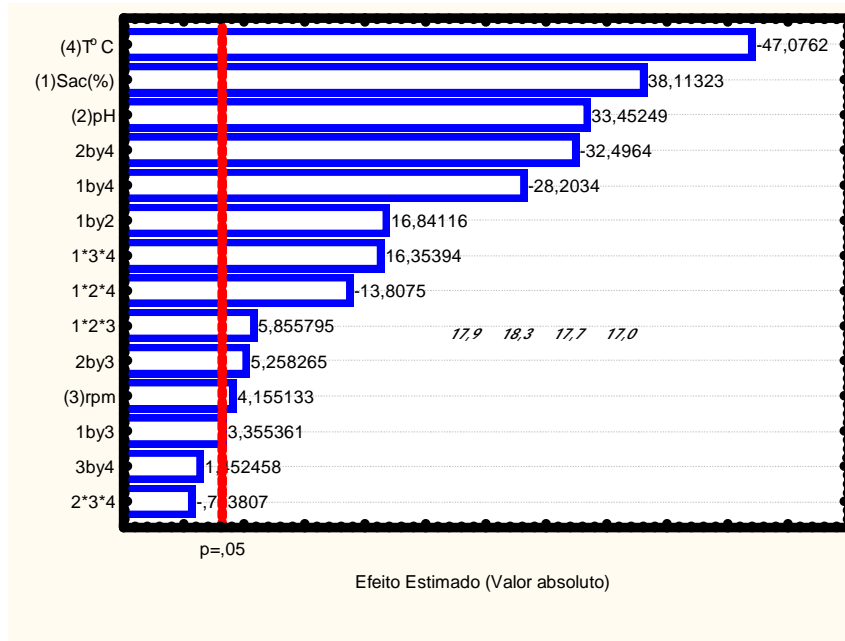


Figura 4: Gráfico de Pareto, planejamento fatorial completo 2^4 , Rend. EPS g/L da BL R2.

Analisando o gráfico de Pareto do experimento realizado, constata-se que o efeito temperatura foi negativo e mais significativo, indicando que a melhor resposta no rendimento em EPS pela BL R2 ocorreu em temperaturas mais baixas. Sacarose e pH mostraram efeitos positivos e bastante significativos, ambos com o deslocamento para o maior nível. No entanto apesar do efeito da aeração ter sido positivo, foi pouco significativo, contradizendo alguns trabalhos sobre a produção de biopolímeros pelas bactérias lácticas, em que a aeração com a suplementação de oxigênio favorece a produção de EPS (MICHELENA, et al., 2003).

Os fatores de interações também foram significativos, exceto as interações de dois fatores 3x4 (aeração x temperatura) e as interações de 3 fatores 2x3x4 (pH x aeração x temperatura).

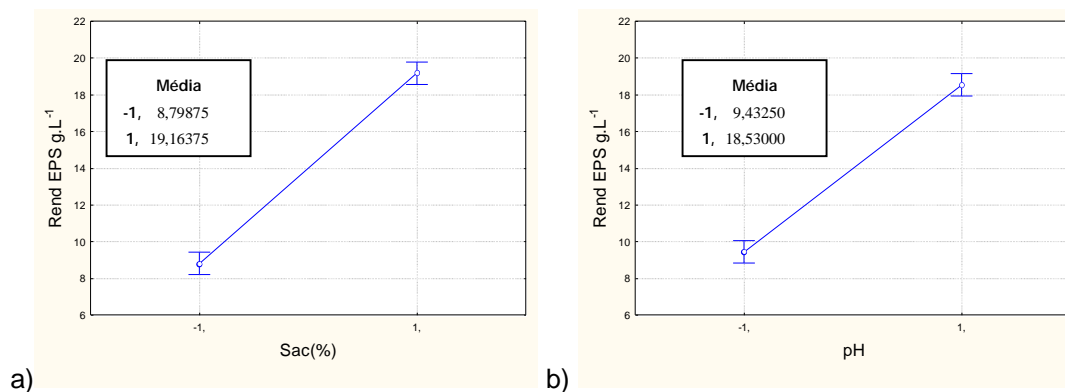
Estes resultados constataam que a condução de experimentos de produção de EPS pela BL R2 pode ser realizada com ou sem aeração, pois este fator afeta pouco o sistema. Esta informação é importante, pois na produção de EPS em grande escala, não haverá necessidade de investir em equipamentos para a aeração da cultura, o que acarretará menor custo na produção deste polímero.

Ajongwen e Barker (1993) citam que a fermentação em batelada alimentada, levemente agitada e não aerada pode influenciar positivamente na produção de EPS pela BAL R2.

Goyal et al., (1995) utilizaram a linhagem comercial de *L. mesenteroides* NRRL B 512 (F) em experimentos de otimização da ativação da enzima dextrana-sacarase para produção de EPS, sem aeração, obtendo 4,4 UDS/mL de atividade. Valor superior de produção (5,67 UDS/mL) foi obtido por Cortezi (2004), o qual trabalhou com a linhagem nativa de *L. mesenteroides* FT 045 B com agitação (132 rpm) e taxa de aeração 0,05 wm., porém em condições experimentais diferentes.

Segundo Souza e Garcia-Cruz (2004) o oxigênio é necessário para a síntese dos monômeros do polímero ou para a oxidação e redução dos nucleotídeos. Entretanto, há pouca informação na avaliação do efeito do oxigênio dissolvido e do oxigênio utilizado para o crescimento e produção de polissacarídeo durante a fermentação.

A figura 5 nos ajuda a visualizar os resultados dos efeitos no experimento. Os efeitos do pH, sacarose e aeração mostraram o deslocamento do menor nível para o maior nível na obtenção de maior resposta no rendimento em EPS, proporcionando um aumento de 118%, 96% e 8,4%, respectivamente. Já no efeito temperatura este deslocamento foi inverso, o que pode ser observado pela mudança da inclinação da reta, sendo o mais significativo, proporcionando um aumento de 169% na produção de EPS, coincidindo com os resultados do gráfico de Pareto (Figura 4).



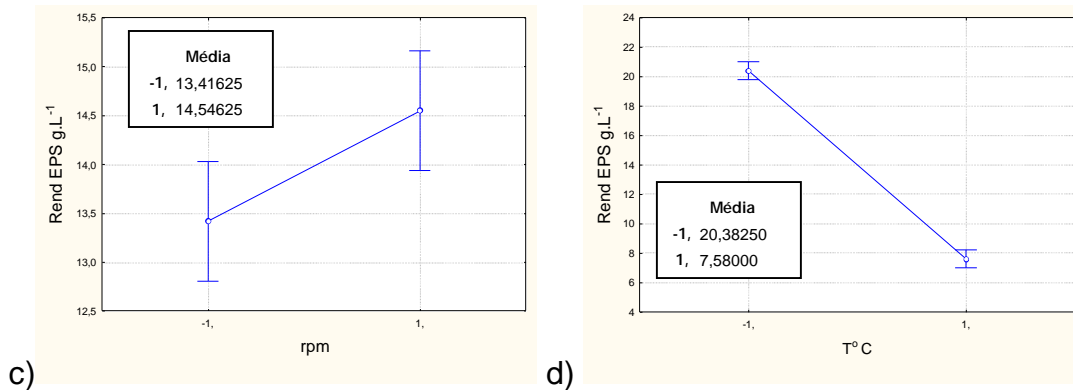


Figura 5: Variação da resposta com níveis dos 4 fatores (rendimento de EPS – BL R²).

A modelagem inicial indicou a região de superfície de máximo e de mínimo, além de selecionar os fatores e as interações significativas na produção de EPS. Apesar da temperatura de 25 °C ter sido indicada como bastante significativa, se fixou à temperatura 28 °C. Foi fixado também o parâmetro agitação (0 rpm), com permanência dos níveis de pH e deslocamento para níveis maiores da concentração de sacarose.

Sarwat et al. (2008) encontraram nos seus experimentos de otimização a temperatura de 30 °C como ótima na produção de dextrana, um exopolissacarídeo produzido pela linhagem de *Leuconostoc mesenteroides* CMG713.

5.3.2 Planejamento Fatorial Completo de Três Níveis: 3²

Realizado a primeira triagem e conhecendo o domínio experimental através de experimentos realizados com uma linhagem representante de bactérias lácticas, prosseguiu-se para o segundo planejamento experimental (GOLDFARB, et al., 2004). Esta fase foi realizada com os cinco isolados de bactérias lácticas. Neste segundo planejamento foi adicionado mais um ponto, tornando um planejamento fatorial completo de três níveis (-1, 0, 1). Este ponto correspondeu a mais um ponto central para não afetar as estimativas usuais dos efeitos. A adição de um terceiro nível permite que a relação entre a resposta e os fatores sejam feitas através de um modelo quadrático, contendo efeitos lineares e quadráticos (VADDE.; SYROTIUK.; MONTGOMERY, 2006). Assim, um modelo de regressão para um delineamento de 3² correlacionando a resposta às variáveis independentes x_1 e x_2 , é dado na equação 2.

$$= 0 + 1X_1 + 2X_2 + 12X_1X_2 + 11X_1^2 + 22X_2^2 + \dots, (2)$$

No qual: \hat{Y} é a estimativa da resposta (rendimento em EPS), \bar{Y} são os coeficientes cujos valores devem ser determinados, “0” média de todas as respostas do planejamento, X_1 , X_2 são as variáveis que representam os fatores concentração de sacarose e pH, respectivamente, e ϵ é um termo de erro aleatório (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Tabela 4: Resultados de um planejamento fatorial $k = 3^2$ para estudar o efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL R2.

<i>Er. saios</i>	<i>Sacarose (%)</i>	<i>pH</i>	<i>Rendimento EPS (g. L⁻¹)</i>
1	-1	-1	8,76
2	-1	0	34,76
3	-1	+1	35,76
4	0	-1	9,76
5	0	0	23,36
6	0	+1	46,76
7	+1	-1	9,56
8	+1	0	44,76
9	+1	+1	50,01
10	0	0	24,96
11	0	0	20,26

Tabela 5: ANOVA do planejamento experimental $k = 3^2$ para o estudo do efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS do BL R2.

<i>F.V</i>	<i>S.Q.</i>	<i>G.L.</i>	<i>Q.M.</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Sac. % (L + Q)	155,522	2	77,7611	13,6184	0,06847 ^{ns}
pH (L + Q)	1947,168	2	973,5840	170,5051	0,005831*
1 x 2	282,082	4	70,5205	12,3504	0,076305 ^{ns}
Erro puro	11,420	2	5,7100		
Total	2366,070	10			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); ns- não significativo ($p \geq .05$); $R^2 = 0,99517$

Pela análise de variância dos coeficientes dos fatores (tabela 5) e pelo gráfico de Pareto (figura 6) , observa-se que o fator pH é significativo ($p < 0,05$) pelos dois modelos, linear e quadrático. O fator concentração de sacarose não apresentou

significância estatística em nenhum desses modelos, assim como, a sua interação com o pH, indicando que o controle do pH no meio é fundamental para obter um maior rendimento de EPS pela linhagem testada.

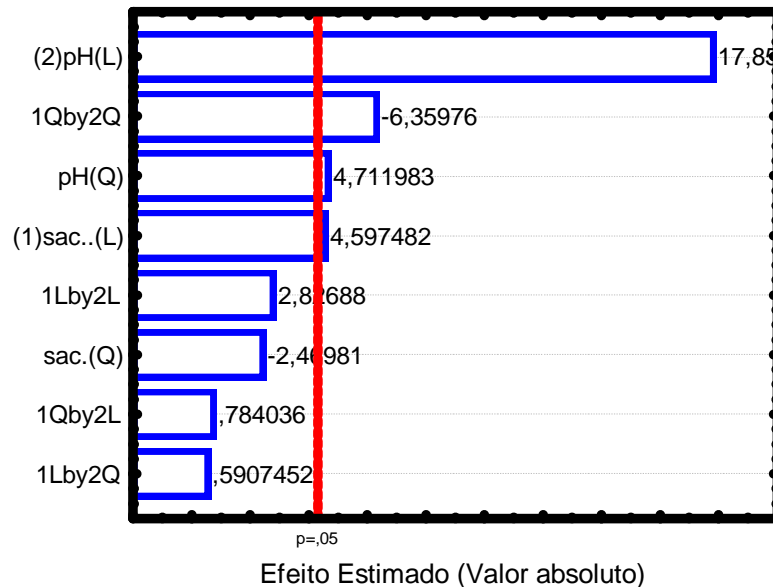


Figura 6: Gráfico de Pareto: Rendimento EPS da BL R2.

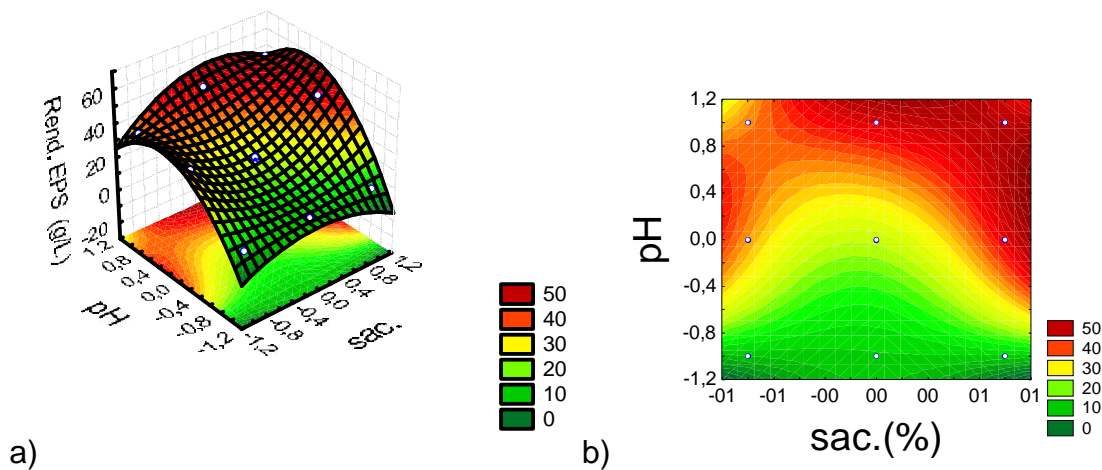


Figura 7: Previsão do rendimento em EPS da cultura da BL R2 gerada através de análise fatorial por RSM a) gráfico superfície de resposta, b) gráfico de contorno.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo modelo foi de 0,99. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o rendimento bruto de EPS pelo isolado BL R2, e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 7a e 7b), gerando a equação 3.

$$\text{Rendimento em EPS} = 22,8 + 5,3 * x_1 + 16,6 * x_1^2 + 18,5 * x_2 + 5,4 * x_2^2 + 3,3775 * x_1 * x_2 - 1,2225 * x_1 * x_2^2 - 1,6225 * x_1^2 * x_2 - 19,1225 * x_1^2 * x_2^2 + 0; \quad (3)$$

** Todos os componentes da equação com asteriscos são significativos.*

A tabela 6 apresenta os valores ótimos determinados pelo planejamento experimental, com seus valores codificados e reais. Os valores críticos ou níveis ótimos preditos são obtidos através da diferenciação da equação do modelo gerado. O valor ótimo do pH apresentou fora do domínio experimental, significando que o valor do pH neste experimento tende para um nível maior do estipulado. Neste caso é aconselhável realizar outro experimento com as condições ótimas estabelecidas, para validar as condições ótimas geradas pelo programa.

Tabela 6: Valores experimentais e valores preditos obtidos no planejamento experimental $k= 3^2$ da BL R2.

<i>Fatores</i>	<i>Valores do rendimento de EPS g/L</i>		
	Observação mínima	Valor crítico	Observação máxima
Sacarose (%)	- 1 (7,5)	0,86 (10,7)	+ 1 (12,5)
pH	- 1 (5,5)	1,10 (8,2)	+ 1 (7,5)

Os números entre parênteses correspondem ao valor real

Tabela 7: Resultados de um planejamento fatorial $k = 3^2$ para estudar o efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL LCMH21.

<i>Ensaio</i>	<i>Sacarose (%)</i>	<i>PH</i>	<i>Rendimento EPS (g. L⁻¹)</i>
1	-1	-1	2,0
2	-1	0	10,7
3	-1	+1	11,5
4	0	-1	2,4
5	0	0	12,0
6	0	+1	32,4
7	+1	-1	1,4
8	+1	0	29,4
9	+1	+1	41,7
10	0	0	10,0
11	0	0	13,1

Tabela 8: ANOVA do planejamento experimental $k = 3^2$ para o estudo do efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL LCMH21.

F. V	S.Q.	G.L	Q.M	F	p
Sac. (%) (L + Q)	389,708	2	194,8539	78,8882	0,012517
pH (L + Q)	1071,047	2	535,5235	216,8111	0,004591
1 x 2	335,885	4	83,9713	33,9965	0,028778
Erro puro	4,940	2	2,4700		
Total	1803,847	10			

*significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); $R^2 = 0,99726$,

Erro puro – 2,47

Pela análise de variância dos coeficientes dos fatores (tabela 8) e gráfico de Pareto (figura 8), observa-se que o fator sacarose e o fator pH, assim como a interação entre estes fatores são significativos ($p < 0,05$) pelos modelos linear e quadrático. Entretanto a interação entre estes fatores não apresentaram significância estatística.

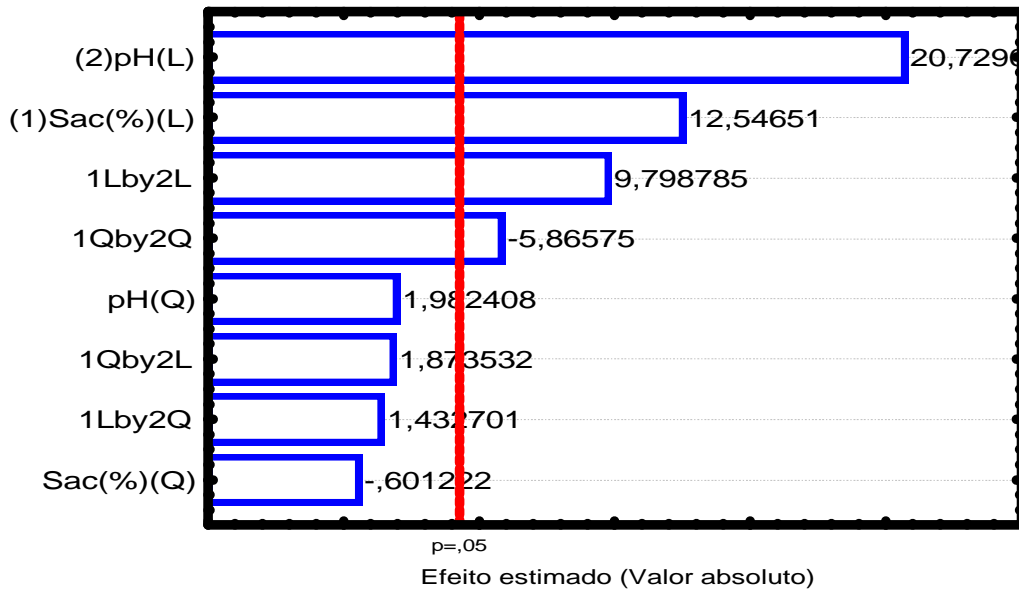


Figura 8: Gráfico de Pareto: Rendimento EPS da BL LCMH21.

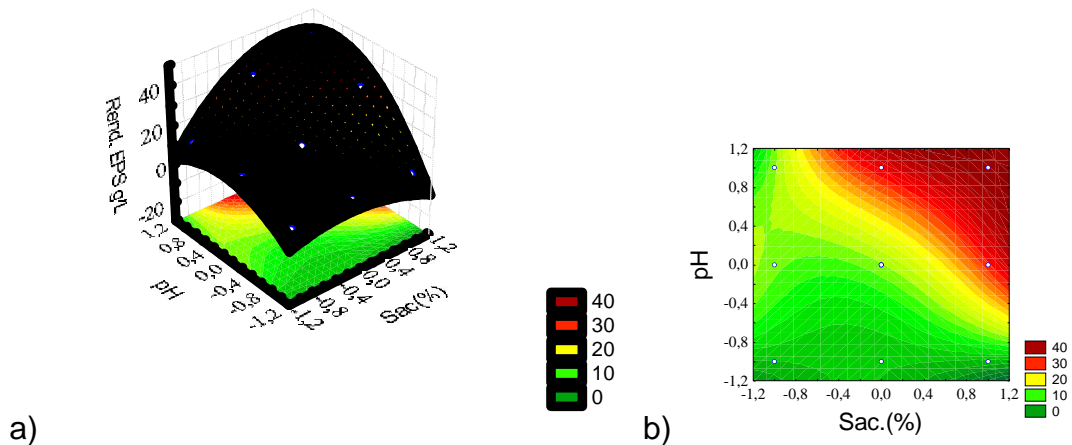


Figura 9: Previsão do rendimento em EPS da cultura de BL LCMH 21 gerada através análise fatorial por RSM.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo modelo foi de 0,99. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o rendimento bruto de EPS pelo isolado BL LCMH21, e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 9a e 9b), gerando a equação 4

$$\text{Rendimento bruto em EPS} = 11,7 + 9,35 \cdot x_1 + 8,35 \cdot x_1^2 + 15,7 \cdot x_2 + 5,7 \cdot x_2^2 + 7,7 \cdot x_1 \cdot x_2 - 1,95 \cdot x_1 \cdot x_2^2 - 2,55 \cdot x_1^2 \cdot x_2 - 11,6 \cdot x_1^2 \cdot x_2^2 + 0. \quad (4)$$

Tabela 9: Valores experimentais e valores preditos obtidos no planejamento experimental k = 3² da BL LCMH21.

Fatores	Valores do rendimento de EPS g. L ⁻¹		
	Observação mínima	Valor crítico	Observação máxima
Sacarose (%)	-1 (7,5)	0,86 (10,72)	+ 1 (12,5)
pH	-1 (5,5)	1,06 (7,9)	+ 1 (7,5)

Os números entre parênteses correspondem ao valor real.

Tabela 10: Resultados de um planejamento fatorial k = 3² para estudar o efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento em EPS da BL PUB16

Ensaio	Sacarose (%)	pH	Rendimento EPS (g/L)
1	-1	-1	17,2
2	-1	0	14,9
3	+1	+1	12,0
4	0	-1	9,0
5	0	0	19,7
6	0	+1	25,4
7	+1	-1	13,1
8	+1	0	24,7
9	+1	+1	23,8
10	0	0	16,9
11	0	0	18,6

Tabela 11: ANOVA do planejamento experimental k = 3² para o estudo do efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL PUB16

Fator	S.Q	G.L	Q.M	F	P
(1)sac.(%) L+Q	51,0423	2	25,52116	12,82470	0,072334 ^{ns}
(2) pH L+Q	95,6035	2	47,80174	24,02097	0,039966*
1*2	139,8302	4	34,95754	17,56660	0,054585 ^{ns}
Erro puro	3,9800	2	1,99000		
Total SS	288,3473	10			

significativo ao nível de 5% de probabilidade (.01 =< p < .05); ns- não significativo (p >= .05 , R² = 0,9862).

Pela análise de variância dos coeficientes dos fatores (tabela 11) e pelo gráfico de Pareto (figura 10) , observa-se que o fator pH é significativo pelo modelo linear e quadrático, enquanto que o fator sacarose e a sua interação com o pH não são significativos ($p < 0,05$) pelo modelo linear e quadrático. Este isolado demonstrou o mesmo comportamento do isolado BL R2 quanto a estas variáveis na produção de EPS.

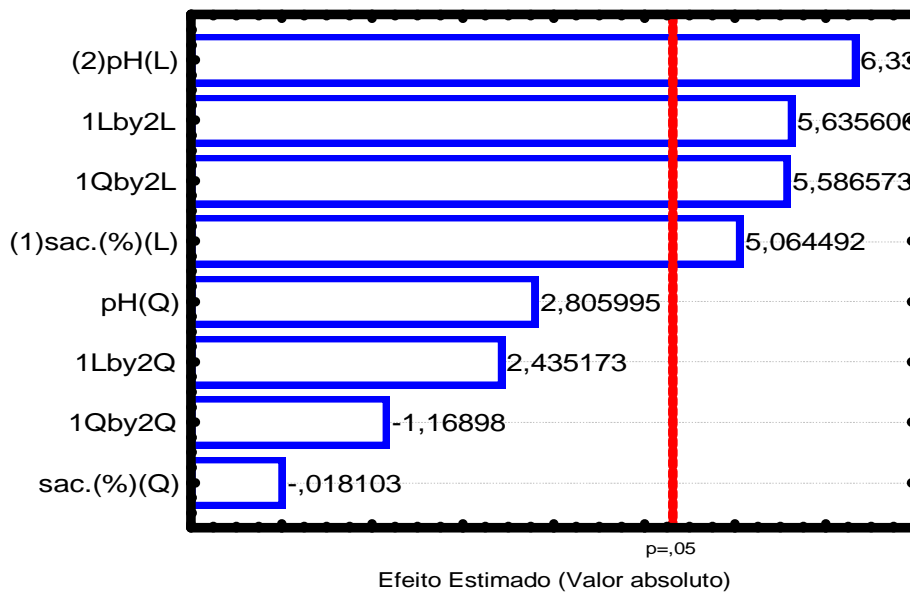


Figura 10: Gráfico de Pareto: Rendimento EPS da BL PUB 16

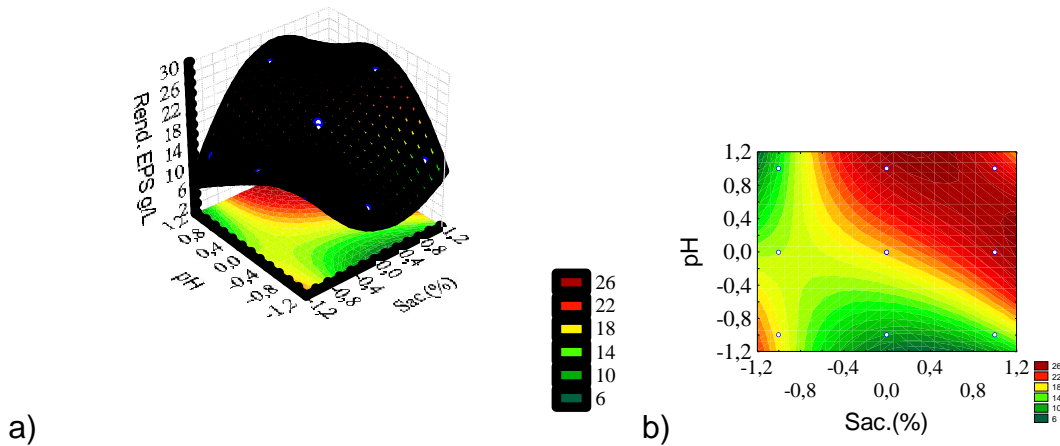


Figura 11: Previsão do rendimento em EPS da BL PUB 16 gerada através de análise fatorial por RSM.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo modelo foi de aproximadamente 0,99. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o rendimento bruto de EPS pelo isolado BL PUB 16, e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 11a e 11b), gerando a equação 4

$$\text{Rendimento em EPS} = 18,4 + 4,9 * x_1 + 1,4 * x_1^2 + 8,2 * x_1 - 1,2 * x_2^2 + 3,975 * x_1 * x_2 - 2,975 * x_1 * x_2^2 - 6,825 * x_1^2 * x_2 - 2,075 * x_1^2 * x_2^2 + 0. \quad (5)$$

Tabela 12: Valores utilizados e valores preditos obtidos no planejamento experimental $k = 3^2$ da BL. PUB 16.

<i>Fatores</i>	<i>Valores do rendimento de EPS g/L</i>		
	Observação mínima	Valor crítico	Observação máxima
Sacarose (%)	-1 (7,5)	0,50 (6,25)	+1 (12,5)
pH	-1 (5,5)	0,67 (5,02)	+1 (7,5)

Os números entre parênteses correspondem ao valor real

Tabela 13: Resultados de um planejamento fatorial 3^2 para estudar o efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL CC3.

<i>Ensaio</i>	<i>Sacaros e (%)</i>	<i>pH</i>	Rendimento EPS (g. L ⁻¹)
1	-1	-1	8,4
2	-1	0	28,3
3	-1	+1	29,6
4	0	-1	7,2
5	0	0	22,1
6	0	+1	40,2
7	+1	-1	7,4
8	+1	0	34,0
9	+1	+1	48,1
10	0	0	19,3
11	0	0	21,3

Tabela 14. ANOVA do planejamento experimental $k = 3^2$ para o estudo do efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL .CC3.

	S.Q	G.L	Q.M	F	p
(1)sac.(%) L+Q	113,803	2	56,9015	26,1352	0,036853*
(2) pH L+Q	1543,343	2	771,6714	354,4329	0,002813*
1*2	169,887	4	42,4716	19,5075	0,049357*
Pure Error	4,354	2	2,1772		
Total SS	1826,755	10			

significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); $R^2 = 0,99762$, erro puro- 2,1772

Pela análise de variância dos coeficientes dos fatores (tabela 14) e pelo gráfico de Pareto (figura 12), observa-se que o fator pH e sacarose foram significativos pelo modelo linear e quadrático. A interação destes fatores também foi significativa.

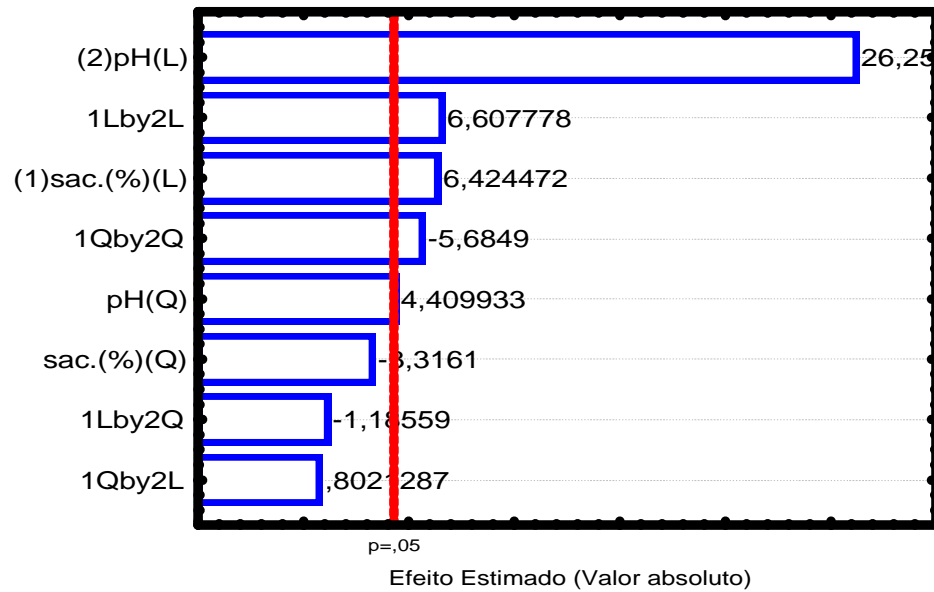


Figura 12: Gráfico de Pareto: Rendimento EPS da BL CC3.

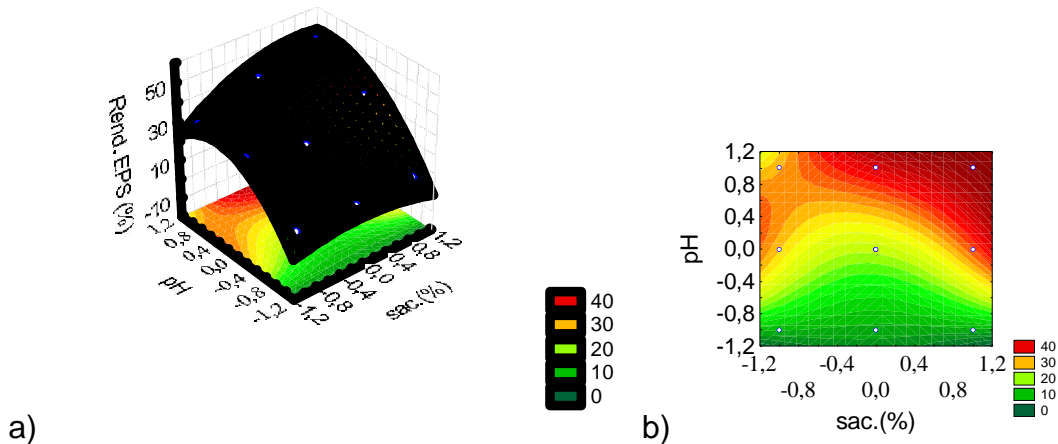


Figura 13: Previsão do rendimento em EPS da cultura da BL CC3 gerada através de análise fatorial por RSM.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) obtido pelo modelo foi de 0,99. A partir da validação dos parâmetros de estudo, obteve-se o modelo quadrático que representa o rendimento bruto de EPS pelo isolado BL CC3, e que descreve superfície de resposta e as curvas de contorno (Figuras 13a e 13b), gerando a equação 6.

$$\text{Rendimento bruto em EPS} = 20,91 + 2,86 * x_1 + 10,23 * x_1^2 + 16,5x_2 + 2,79 * x_2^2 + 4,875 * x_1x_2^2 + 1,515 * x_1 * x_2^2 - 1,025 * x_1^2 * x_2 - 10,555 * x_1^2 * x_2^2 + 0. \quad (6)$$

Tabela 15: Valores utilizados e valores preditos obtidos no planejamento experimental k= 3² da BL.CC3.

<i>Fatores</i>	<i>Valores do rendimento de EPS g. L⁻¹</i>		
	Observação mínima	Valor crítico	Observação máxima
Sacarose (%)	-1 (7,5)	0,76 (9,5)	+1 (12,5)
pH	-1 (5,5)	1,11 (8,3)	+1 (7,5)

Os números entre parênteses correspondem ao valor real.

Tabela 16: Resultados de um planejamento fatorial k = 3² para estudar o efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL LVM16.

<i>Ensaio</i>	<i>Sacarose (%)</i>	<i>pH</i>	Rendimento EPS (g. L⁻¹)
1	-1	-1	6,33
2	-1	0	1,53
3	-1	+1	1,33
4	0	-1	2,07
5	0	0	3,13
6	0	+1	2,67
7	+1	-1	0,87
8	+1	0	1
9	+1	+1	1,80
10	0	0	1,87
11	0	0	2,93

Tabela 17. ANOVA do planejamento experimental $k = 3^2$ para o estudo do efeito da concentração da sacarose e do pH sobre o rendimento de EPS da BL.LVM16.

Fator	S.Q.	G.L.	Q.M.	F	P
(1) Sac (%) L+Q	5,82000	2	2,910001	6,34632	0,136122 ^{ns}
(2) pH L+Q	2,81251	2	1,406255	3,06685	0,245890 ^{ns}
1*2	8,79123	1	8,791225	19,17249	0,048403*
Falta de ajuste	5,19985	3	1,733284	3,78006	0,216232
Erro puro	0,91707	2	0,458533		
Total	23,21529	10			

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$); ns- não significativo ($p \geq .05$)

R^2 0,73651.

Pela análise de variância dos coeficientes dos fatores (tabela 17) e pelo gráfico de Pareto (figura 12), observa-se que o fator pH e sacarose não foram significativos em nenhum dos modelos; linear e quadrático. No entanto a interação destes fatores foi significativa, porém apresentando o valor de p alto (baixa significância). A falta de ajuste foi significativa, indicando que não existe concordância entre os valores experimentais estudados e o modelo de resposta predito. Isto é confirmado pelo coeficiente múltiplo de determinação (R^2) que apresentou valor inferior a 0,75.

O coeficiente múltiplo de determinação (R^2) é a percentagem da variação da variável dependente que é explicada pela equação de regressão múltipla, medindo, portanto, a eficiência do ajuste na equação de regressão estimada (ANDERSON, 2003). Normalmente em trabalhos experimentais quando o R^2 fica abaixo de 0,75. o modelo não é adequado para o que se propõe.

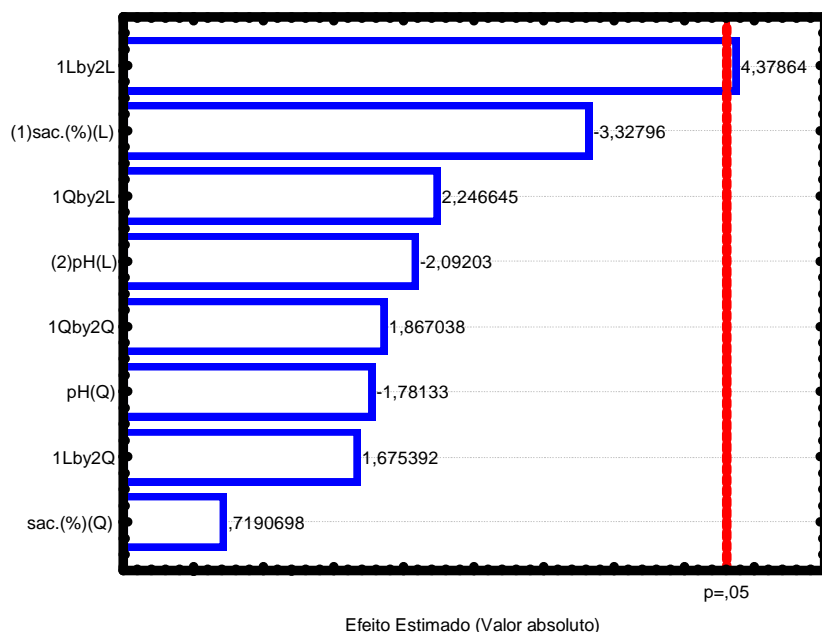


Figura 12: Gráfico de Pareto: Rendimento EPS da BL LVM16.

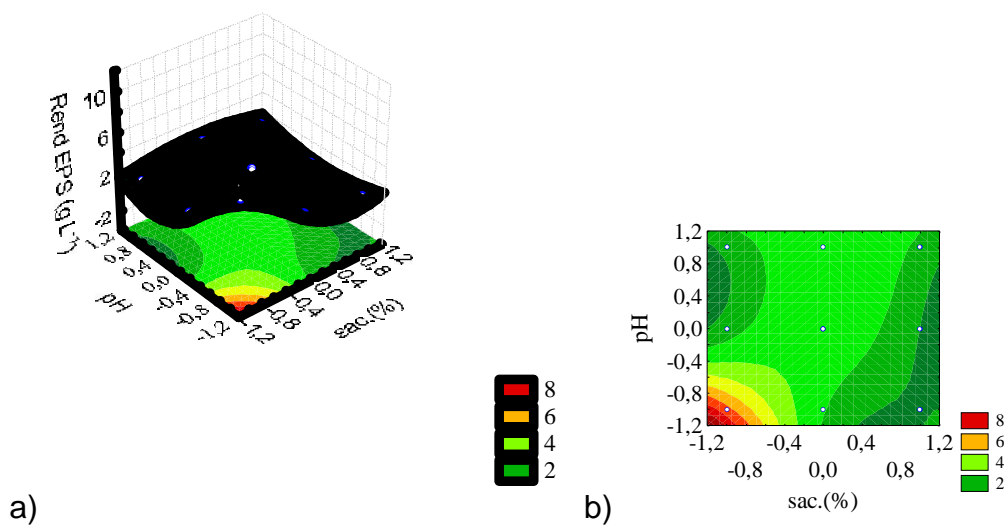


Figura 14. Previsão do rendimento em EPS da cultura da BL LVM16 gerada através de análise fatorial por RSM.

O gráfico de superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 14a, 14b) geraram a equação polinomial quadrática (equação 7).

$$=2,6433333333333333 \cdot 265 \cdot x_1 - 1,3783333333333333 \cdot x_1^2 + 3 \cdot x_2 - 2733333333333334 \cdot x_2^2 + 1,4825 \cdot x_1 \cdot x_2 - 9825 \cdot x_1 \cdot x_2^2 - 1,3175 \cdot x_1^2 \cdot x_2 + 1,5908333333333333 \cdot x_1^2 \cdot x_2^2 + 0; (7)$$

Tabela 18. Valores experimentais e valores preditos obtidos no planejamento experimental da BL. LVM16.

Fatores	Valores do rendimento de EPS, g. L ⁻¹		
	Observação mínima	Valor crítico	Observação máxima
Sacarose (%)	-1 (7,5)	1,01 (7,6)	+1 (12,5)
pH	-1 (5,5)	- 0,99 (5,4)	+1 (7,5)

Os números entre parênteses correspondem ao valor real

Pelo gráfico de Pareto de todos os ensaios constata-se que o fator pH foi o mais significativo em todos as linhagens, exceto para os BL LVM16. No entanto o fator interação (sacarose x pH) mostrou-se pouco significativo. Logo, na produção de EPS por esta linhagem os fatores sacarose e pH são dependentes um do outro. Somente a BL R2 mostrou a interação entre o pH e a sacarose como não significativa. Nos demais isolados esta interação foi significativa, o que leva a afirmar que na produção de EPS pela BL R2 os fatores açúcar e pH atuam de forma independente.

As cinco linhagens de BL usadas no planejamento experimental apresentaram respostas diferentes com relação às condições ótimas de produção de EPS. É de se esperar, pois a síntese de polímeros pelos micro-organismos é dependente de cada espécie e conseqüentemente das condições ótimas da atuação de suas enzimas (RUAS-MADIEDO, REYES-GAVILÁN, 2005; CANILHA et al., 2006; SARWAT, et al., 2008). A BAL R2 (tabela 6) e BAL LCMH21 (tabela 9) produziram EPS com rendimento melhor na concentração de sacarose 10,7. As outras linhagens apresentaram o seu ótimo de rendimento em EPS com concentrações mais baixas de sacarose.

No planejamento da BL LVM16, pela análise da ANOVA, todos os fatores mostraram-se não significativos, razão do baixo rendimento do EPS no experimento. Provavelmente o domínio experimental aplicado a este experimento não foi adequado, não devendo ser aplicado o modelo gerado para otimizar a produção de EPS.

Sarwat, et al.(2008) estudaram o efeito das diferentes concentrações de

sacarose, que variou de 5% a 25%, para a produção da dextrana. A resposta máxima do rendimento foi com 20% de sacarose. Acima desta concentração eles observaram o decréscimo na produção deste polímero. Segundo Martinez-Espindola e Lopez-Munguia (1985) altas concentrações de sacarose no meio têm efeito inibitório sobre as enzimas, mecanismo conhecido como efeito inibitório do substrato sobre a enzima. Ui-Qader (2001), realizou estudos relacionados com o efeito da concentração da sacarose no meio para a produção de dextrana pelo *L. mesenteroides* (PCSIR-3). Os resultados mostraram que a linhagem testada apresentava menor rendimento em massa de dextrana quando fermentado em meio a 10% de sacarose. Resultados similares foram observados por Kim et al., 2003, sendo que eles utilizaram somente 5% de sacarose como concentração máxima. Estudos mais detalhados do efeito da sacarose sobre a produção da dextrana revelaram que alta concentração de sacarose no meio origina polímero com maior peso molecular (TSUCHIYA, et al, 1953 *apud* VAN HIJUM, 2006).

O pH ótimo para a produção de EPS, também variou entre as linhagens de BL. O valor predito pelo RSM indicou a condição ótima para produção de EPS no pH 8,2 (Tabela 6) , 7,9 (Tabela 9) e 8,3 (Tabela 15) para a BL R2, BL, LCMH21, BL CC3, respectivamente. Na BL PUB16 o seu pH ótimo foi 5,4 (Tabela 12) e BL LVM16 foi pH 5,4 (Tabela 18) ambos com a enzima atuando em pH mais baixo.

O valor de pH ótimo para a produção de EPS varia de uma espécie bacteriana a outra e entre a mesma espécie, pois o pH ótimo é específico para cada micro-organismo (LAWS, GU, MARSHALL, 2001).

Sarwat et al. (2008) observaram a produção da dextrana no meio contendo o pH inicial entre 6,0 e 8,0, concluindo que no pH 7,0 é onde ocorre maior produção de EPS. Outros pesquisadores também obtiveram alta produção de dextrana pelos *Leuconostoc* em meio com o pH inicial 7,0 e 7,5 (GOULAS, FISHER.; GRIMBE, 2004; NAESSENS, et al., 2005; PURAMA., GOYAL, 2008). No entanto Santos et al. (2000) encontraram um máximo para a ativação de dextrana-sacarase pelo *L. mesenteroides* NRRL B512F no pH 5,5, coincidindo com Tiekling (2005) que cita a produção de EPS pelos *L. sanfranciscensis* no pH entre 5,0 e 5,5. Kaboli e Reilly (1980) encontraram o pH 5,2 como ótimo para a atividade da dextrana-sacarase.

O isolado BL R2 foi selecionado para validar os valores ótimos preditos pela MSR, em função de sua alta estabilidade genética e reprodutibilidade das características fermentativas, além de um ótimo desempenho em termos de rendimento. Assim, foi realizado novo experimento para produção de EPS, desta vez utilizando os seguintes parâmetros: rpm 0, temperatura 28°C, sacarose 10,7% e pH 8,2, obtendo-se uma média de rendimento de $60,2 \pm 0,4$ g/L. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Normalmente as bactérias lácticas produzem pouco EPS quando comparadas com outros grupos bacterianos. Egan (1971) mostrou que em cana colhida e estocada por mais de um dia as bactérias lácticas produziram entre 0,9 a 4,7 g/L de EPS. Mas em condições otimizadas podem produzir uma quantidade maior. No presente trabalho, o isolado de bactéria láctica que apresentou maior rendimento de EPS com os experimentos de otimização foi a BL R2 ($60,22 \text{ g.L}^{-1}$), nas condições de 10,7% de sacarose e pH 8,2, sem aeração, a 28° C em 30h de incubação. Este isolado foi identificado pelo método fenotípico como *Leuconostoc mesenteroides* (kit API, Biomerieux) (anexo I), e confirmado pelo método molecular (RNAr 16S) como *Leuconostoc pseudomesenteroides* (anexo II).

Experimentos realizados por Lucca et al., (1992) com linhagens de *Leuconostoc* isoladas de caldo de cana produziu 58 g/L de EPS do tipo dextrana. Negro (1999) determinou a produtividade de EPS de 10 culturas lácticas diferentes, em meio base contendo 7% de sacarose, a 23° C/ 36h sem aeração, encontrando valores que variaram de 11,0 g/L a 80,1 g/L.

Alguns isolados perderam a propriedade de produzir EPS após sucessivas repicagens ou quando congeladas a -20°C , a exemplo da BL LCMH21 e da BL LVM16, que perderam a capacidade de produzir EPS depois de congeladas a -20°C . A explicação pode estar relacionado com a localização do gene produtor de EPS. Os genes que codificam as enzimas e proteínas regulatórias requeridas para a síntese de EPS têm origem plasmidial em linhagens de LB mesofílicas, como *Lactococcus*, ou basicamente cromossômica em linhagens termofílicas de *Streptococcus* e *Lactobacilli* (VAN KRANENBURG et al., 1997; STINGELE et al., 1999). Os genes plasmidiais são menos estáveis, podendo ser perdidos durante repiques sucessivos ou durante o congelamento (LAWS; GU; MARSHALL, 2001).

5.4 CONCLUSÃO

Os modelos matemáticos obtidos pela Metodologia de Superfície de Resposta aplicados nos experimentos determinaram os fatores com os seus respectivos níveis significativos, otimizando o processo de fermentação, conduzindo para obtenção de maior rendimento na produção de exopolissacarídeos pelas bactérias lácticas isoladas de produtos coletados na região do semi-árido baiano.

As bactérias lácticas apesar de produzirem exopolissacarídeos em baixas concentrações no ambiente natural, quando otimizados os parâmetros de produção, constituem uma grande fonte de obtenção deste biopolímero.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à pesquisa da Bahia (FAPESB), EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) Meio Ambiente,

REFERÊNCIAS

- AJONGWEN, N.L.; BARKER, P.E. Scale-up studies of non-aerated fed-batch fermentation of dextranase and the industrial synthesis of dextran using the enzymatic route. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 56, n.1, p. 113-118, 1993.
- ALBANESE, A. ; SPANU, T.; SALI, M. ; NOVEGNO, F. ; D'INZEO, T. ; SANTANGELO, R.; MANGIOLA A., ; ANILE, C. ; FADDA, G. Molecular identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a cause of brain abscess in an immunocompromised patient. *Journal of clinical microbiology*, 44: 8, 3044-3045, 2006.
- ALBANESE, A. ; SPANU, T.; SALI, M. ; NOVEGNO, F. ; D'INZEO, T. ; SANTANGELO, R.; MANGIOLA A., ; ANILE, C. ; FADDA, G. Molecular identification of *Leuconostoc mesenteroides* as a cause of brain abscess in an immunocompromised patient. *Journal of clinical microbiology*, 44: 8, 3044-3045, 2006.
- ANDERSON, D. R.; SWEENEY, D. J. ; WILLIAMS, T.A. *Estatística Aplicada à Administração e Economia*. São Paulo: Pioneira. 2003.
- BARROS-NETO, B; SCARMINIO, I, S.; BRUNS, R. E.; *Como fazer experimentos*. Ed Unicamp, 2007, 480p.
- BECKER, A.; KATZEN, F.; PUHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 145–152, 1998.
- BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P. *Estatística básica*. 5.ed. São Paulo: Saraiva, 2002. 321p.

CANILHA ,L.; SILVA ,D. D. V; CARVALHO, W.; MANCILHA, I. M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa parte 3: polissacarídeos e enzimas. *Revista Analytica*, 20 , 2006.

CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75:463–472, 1995.

CERNING, J., C. BOUILLANNE, M. LANDON, M. DESMAZEAUD. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. *Journal Dairy Science*. 75:692–699, 1992.

CORTEZI, M. Estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides FT 045 B*. 2004. 95 f Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Área de concentração: Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista. Campos de Rio claro. Rio claro, SP. 2004..

CUERVO, A.I.M.; CORTÉS. J. L.; RODRÍGUEZ , E.R.; HORMAZA, N.A.Y; VARGAS, E. S. *Leuconostoc* sp en pacientes con cáncer: Estudio descriptivo. *Revista chilena de infectología*, 25 (3): 184-188, 2008..

DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23,130-135, 1960.

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; VANINGELGEM, F.; DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 687–707, 2001.

DEL PAPA, M. F, HANCO CK, L. E, THOMAS V. C, PEREGO , M. Full activation of *Enterococcus faecalis* gelatinase by a C-terminal proteolytic cleavage. *ogy*189 (24):8835-43. O ct 5, 2007.

DIAS, A. F. *A Reação de Maillard* no Alimentos e Medicamentos. Traditional Copyright, 2009, 61p..

EGAN, F. . Lactic acid of meat and meat products. Antonie Van Leeuwenhoek, *Journal of Microbiology Serology*, v. 49, p. 327-336, 1983.

GOLDFARB, H. B; ANDERSON-COOK.; BORROR, C. M.; MONTGOMERY., D. C.
Fraction of Design Space plots for Assessing Mixture and Mixture-Pro cess Designs.
Journal of Quality Tehcnology. V. 36 (2), 2004.

GOULAS, A.K.;COOPER,J. M.;GRANDISON, A. S;. RASTALL, R. A. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Biotechnology and Bioengineering* . 88(6): 778 – 787, 2004.

GOYAL, A.; NIGAN, M.;KATIYAR, S. S. Optimal conditions for productions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F and its properties. *Journal Basic Microbiology*, v 36, n. 6, p. 375-384, 1995.

GUIMARÃES, D. P. et al. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by susface response analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 16:2, 129-139, 1999.

KABOLI, H; REILLY, R. J. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 22:1055-1069, 1980.

KIM, M. D.; DAY, D. F.; Optimization of Oligosaccharide Synthesis from Cellobiose by Dextransucrase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V. 148 (1-3), 2008.

KONEMAN. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed Guanabara. 2008. 1600p

KULWICHIT, W.; NILGATE, S.; CHATSUWAN, T.; KRAJIW, S.; UNHASUTA, C.; and CHONGTHALEONG, A. Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*, 7, 69, 2007.

LAWS, A.; GU, Y. ; MARSHALL. V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*,19, 597-625, 2001.

LEE. J.S.; LEE, K.C.; AHN, J.S. MHEEN, T.I., PYUN, Y.R.; PARK, Y..H. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52,1257-1261.2002.

MACEDO, N. G. ; LACROIX, C; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*, 12, 419–426, 2002.

MARCOS, J. C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL. J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of *penicillin acylase* purification in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 1006-014, 2002.

MARTINEZ-ESPINDOLA, J. P.;LOPEZ-MUNGUIA, C. A. On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactors. *Biotechnology Letter*, 7: 483-486, 1985.

MATOS, G. C.; ROZENFELD, S. Avaliação do uso de albumina humana em hospital do Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 21:.4, 2005.

MESOMO, M. C. *Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo*. 2007, 80 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai da Missões – URI, Campos de Erechim- RS. 2007.

MICHELENA, G. L.; MARTINEZ, A.; BELL, A.; CARRERA, E.; VALENCIA, R. Scale-up of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* in fed batch fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46:3 : 455-459, 2003..

NAESSENS, M.; CERDOBBEL, A.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E.J. *Leuconostoc* dextransucrase and dextran: production, properties and applications. *J. Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80: 845-860, 2005.

NASCIMENTO, J. F. Estudo da processabilidade e da caracterização do poli-(ácido-3 hidroxibutírico) – PHB obtido a partir de cana-de-açúcar. 2001, Dissertação 75 f.(Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas-SP.74p. 2001.

NOMURA, M. L. N.; PASSINI JÚNIOR, P.; OLIVEIRA, U.M.; ROSELI CALIL, R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* vol.31 no.8 Rio de Janeiro Aug. 2009.

PURAMA, R. K.; GOYAL, A. Dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides*, 2: 89-101, 2005.

RUAS-MADIEDO, P AND REYES-GAVILÁN, C. G. *Invited Review: Methods for the Triagem, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. Journal Dairy Science.* 88:843-856, 2005..

SANTOS, M .; TEIXEIRA, J.A.;LOPRETTI, M.;RODRIGUES. .Dextran and Fructose production using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL.B512(F) with sucrose as substrate *Biochemical Engineering Journal*, 4:3, 177-188, 2000.

SARWAT, F; QADER, S. A. U.; AMAN, A.;AHMED, N. Production & Characterization of a Unique Dextran from an Indigenous *Leuconostoc mesenteroides*CMG713.*International Journal of Biological Sciences* .; 4(6): 379–386, 2008.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, 25 (4), 331-340, 2004.

STINGELE, F.; VINCENT, D.; FABER, E.; NEWELL, J.; KAMERLING.; NEESER, J. R. Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: production and characterization of an altered polysaccharide, *Molecular Microbiology* 32, 287–1295, 1999.

TEMPLIN, K. S.; CROOK, T. ; RILEY ,T. ; WHITENER, C. ; ABER, R. C. Spontaneous bacterial peritonitis and bacteraemia due to *Leuconostoc* species in a patient with end-stage liver disease: A case report. *The Journal of infection* , 43, 2, 155-157, 2001..

TIEKING, M. Production of prebiotic exopolysaccharides by lactobacilli. 2005, Doctoral thesis 11p f., (Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung), Alemanha, Freising 2005...

TUNÇTÜRK, Y. Influence of starter culture strains, pH adjustment and incubation temperature on exopolysaccharide production and viscosity in whey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (17), pp. 4222-4228, 2009..

UI-QADER, S.A.; IQBAL, L.; RIZVI, H.A.; ZUBERI,R. Production of dextran from sucrose by a new isolated strain of *Leuconostoc mesenteroides* (PCSIR-3) with reference to *L. mesenteroides* NRRL Bp512F. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. V. 34, p.93-97, 2001.

VADDE, K. K.; SYROTIUK, V. R.; MONTGOMERY, D. C.; "Optimizing Protocol Interaction Using Response Surface Methodology," *IEEE Transactions on Mobile Computing*, vol. 5, no. 6, pp. 627-639, 2006.

VAN KRANENBURG, J. D. MARUGG, N.J. WILLEM, I.I. VAN SWAM ; W.M. DE VOS, Molecular characterization of the plasmid-encoded *eps* gene cluster essential for exopolysaccharide production in *Lactococcus lactis*, *Molecular Microbiology*. 24, 387–397. 1997.

VAN HIJUM, S. A. F. T.; KRALJ, S. OZIMEK, L.K.; DIJKHUIZEN, L.; INEKE G. H. VAN GEEL-SCHUTTEN, I. G. H. Structure-Function Relationships of Glucansucrase and

Fructansucrase Enzymes from Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 70, No. 1 p. 157-176, 2006.

WERKEMA, M. C. C. *As ferramentas estatísticas básicas para o gerenciamento de processos*. Belo Horizonte: UFMG: Fundação cristiano Ottoni, (Ferramentas de Qualidade, 2) 1995. 290p.

YUKSEKDAG, Z. N; ASLIM, B. Influence of Different Carbon Sources on Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *Bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 51, n. 3 : pp.581-585, 2008.

CAPÍTULO 6

PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARIDEOS PRODUZIDOS PELA LINHAGEM NATIVA

Leuconostoc pseudomesenteroides R2

Elinalva Maciel Paulo¹, Sandra Aparecida de Assis², Alexandro Branco², Ângela
M. M. P. Valente³, Elisangela F. Boffo⁴, Maria Inês Ré⁵, Milton Ricardo de Abreu
Roque⁶

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Av Transnordestina s/n Km 0 Ba116, Feira de Santana, tel/fax (75) 32248018. elinalvamaciel@yahoo.com; ² Departamento de Saúde – UEFS; ³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Meio ambiente; ⁴Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia – UFBA; ⁵ Ecole des Mines d'Albi, France; ⁶ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

O gênero *Leuconostoc* pertence ao grupo de bactérias lácticas, sendo normalmente isolados de produtos vegetais fermentados, possuindo espécies envolvidas na produção de exopolissacarideos (EPS). Tais biopolímeros possuem grande interesse comercial. Devido a grande diversidade de aplicações industriais dos EPS, este trabalho teve por objetivo produzir e caracterizar exopolissacarideos da linhagem nativa *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, isolada de repolho coletado na região do semi-árido baiano. Foram utilizadas as seguintes condições para a produção de EPS: meio base suplementado com 10,7% de sacarose, pH 8, 2, sem agitação e incubação a 28 °C durante 30 horas. O Caldo fermentativo foi tratado com etanol gerando dois tipos de

substâncias polissacarídicas (EPS I e EPS 2). A identificação dos EPS I e EPS II foi realizada por métodos espectroscópicos tais como infravermelho, RMN 1H, RMN 13C e DEPT. As duas substâncias polissacarídicas foram identificadas como dextrana linear (1 6), apresentando características diferentes com relação a análise termogravimétrica, densidade aparente de livre empacotamento, viscosidade aparente e tempo de solubilização. Ambas as dextranas são de baixa densidade, possuem alta estabilidade térmica e mostraram-se um comportamento de característica de polímero pseudoplástico.

Palavras-chave: *Leuconostoc pseudomesenteroides*, exopolissacarídeos, polímero, dextrana

Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by strain native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2

ABSTRACT

The genus *Leuconostoc* belongs to the group of lactic acid bacteria, usually isolated from fermented vegetable, possessing species involved in the production of exopolysaccharides (EPS). These biopolymers have great commercial interest. Because of the wide variety of industrial applications of EPS, this study aimed to produce and characterize exopolysaccharide native strain *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, isolated from cabbage collected in semi-arid region of Bahia. We used the following conditions for the production of EPS: base medium supplemented with 10.7% sucrose, pH 8, 2, without agitation and incubation at 28 ° C for 30 hours. The fermentation broth was treated with ethanol, generating both types of polysaccharide (EPS I and EPS 2). The identification of EPS I and EPS II was carried out using infrared, 1H NMR, 13C NMR and DEPT. The two substances were identified as polysaccharide dextran linear (1 6), showing different characteristics with respect to thermal analysis, density of free

packaging, viscosity and time of solubilization. Both dextrans are of low density, have high thermal stability and showed a characteristic behavior of pseudoplastic polymer.

Keywords: *Leuconostoc pseudomesenteroides*, exopolysaccharide, polymer, dextran

6.1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são metabólitos secundários produzidos quando alguns micro-organismos estão em condições não favoráveis a sua proliferação (MESOMO, 2005). São compostos por monossacarídeos, podendo ter alguns constituintes não carboidratados como acetato, piruvato, succinato e fosfato (PACE, 1992). Formam longas cadeias lineares ou circulares, por ramificações, razão de possuírem alto peso molecular (LAWS et al., 2001).

Os exopolissacarídeos são produzidos intracelularmente e extracelularmente. A pesquisa visando uma aplicação industrial está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, que têm processos de extração e purificação mais simples e de maior produtividade (SUTHERLAND, 2002).

Na sua maioria, as bactérias lácticas são inócuas à saúde humana e muitas espécies são capazes de produzir EPS em grandes quantidades, quando em condições otimizadas, oferecendo uma excelente alternativa na utilização deste polímero em produtos destinados ao consumo humano (RICCIARDI; CLEMENTI, 2000; LAWS et al., 2001).

Diferentes etapas são utilizadas para a obtenção dos EPS produzidos nos cultivos microbianos, os quais envolvem a combinação de técnicas de extração, purificação e quantificação (GALINDO, 1994).

A identificação e caracterização dos polímeros são baseadas nas suas propriedades físico-químicas, mecânicas e térmicas. Também podem ser identificados pelas propriedades reológicas e por técnicas de ensaios imunológicos (ROHM HAAS COMPANY, 2002). Normalmente são utilizadas de 3 a 5 destas técnicas em conjunto para a caracterização dos polímeros (NASCIMENTO, 2001; LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001; SILVA et al., 2003).

Há uma forte tendência em se explorar comercialmente polissacarídeos microbianos, devido às suas propriedades específicas de grande interesse biotecnológico, como a sua utilização em alimentos como espessante e gelificantes e na clínica médica como suspensor plasmático (BOHN, BEMILLER, 1995; BEROVI et al., 2003). No entanto, a atividade biológica de um EPS está relacionada aos fatores físico-químicos (LEUNG et al., 2006; YOUNG, JACOBS, 1998).

Em decorrência da grande aplicabilidade dos biopolímeros, este trabalho teve como objetivo produzir exopolissacarídeos da linhagem nativa de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, identificá-los e caracterizá-los, visando utilizá-los com finalidades industriais.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Micro-organismo produtor do EPS

Foi utilizado uma linhagem bacteriana isolada do repolho coletado na região do semi-árido baiano e identificada pelo método molecular (RNAr 16S) como *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Esta linhagem não apresenta os fatores de virulência hemolisina e gelatinase, presentes em bactérias cocos Gram-positivos patogênicos.

6.2.2 Produção de exopolissacarídeos

Inóculo: Foram utilizadas alíquotas de 1% da cultura ativa da linhagem de *L. pseudomesenteroides* R2 proliferada no caldo MRS, com densidade ótica $1,92 \pm 0,01$ em abs 600 nm, correspondendo aproximadamente a $4,0 \times 10^8$ UFC/mL da bactéria.

Condições de cultivo: Foram utilizadas as condições previamente otimizadas para a produção de EPS pela linhagem *L. pseudomesenteroides* R2: meio mínimo (Guimarães, 1999), 10,7% de sacarose, pH 8,2, sem aeração, temperatura de incubação 28°C, tempo de incubação 30h.

6.2.3 Extração dos exopolissacarídeos

Após o período de incubação a cultura foi tratada com ácido tricloroacético a 10% (1:1), homogeneizada por 30 minutos na incubadora Shaker (marca Marconi modelo MA420) a 90 rpm, 25 ± 2 °C, centrifugada a 8150 x g por 20 minutos (centrífuga refrigerada marca Sorval, rotor GS-3). O material sedimentado foi descartado, adicionado ao sobrenadante álcool absoluto (1:2) e acondicionado no refrigerador (4 °C) por 24h (CERNING, 1995).

Os precipitados de EPS foram separados pelo balão de decantação. Cada precipitado foi parcialmente purificados realizando-se três lavagens sucessivas em água destilada, seguindo de reprecipitação em álcool absoluto (PACE, 1991). Posteriormente estes foram submetidos à diálise, em água destilada (300 vezes o volume da amostra), sob agitação em membranas com limite de exclusão de 15 kDa (ASHTAPUTRE, SHAM, 1995; DILTZ, ZELLER, 2001; CHI, ZHÃO, 2003). Os precipitados de EPS foram secos em estufa a 40 ± 2 °C até peso constante, sendo depois triturados no moinho analítico marca Splabor, modelo Q298A21. Os EPS em forma de pó foram armazenados em frascos de vidros herméticos a 4 °C para a realização das análises.

Os EPS foram quantificados utilizando os procedimentos de Ruijssenaars et al. (2000), onde foram determinados concomitantemente o açúcar total pelo método do fenol sulfúrico (DUBOIS, 1956), e o açúcar redutor (AR) pelo método do ácido dinitrosalisílico (DNS) descrito por Miller (1959). Para a realização destes ensaios foram dissolvidos 0,001g de cada tipo de precipitado (EPS I e EPS II) em 100 mL de água.

Os EPS nos concentrados foram determinados subtraindo-se à concentração do açúcar total pela concentração do açúcar redutor (EPS= AT – AR).

6.2.4 Identificação estrutural do exopolissacarideo

Para a identificação estrutural dos exopolissacarideos, amostras foram enviadas para o Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), para realização das análises de infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN ¹H e RMN de ¹³C) e DEPT.

6.2.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Utilizou-se o equipamento Spectrum One – FIT – IR Spectrometer – Perkin Elmer. Os espectros foram obtidos sob forma de pastilha de Brometo de Potássio (KBr) e obtidos na região de 4000 a 450 cm^{-1} .

6.2.4.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,21 MHz para a frequência do hidrogênio, utilizando uma sonda de 5 mm de diâmetro externo com detecção direta (BBO), sendo esta equipada com gradiente de campo no eixo z e a temperatura de 298 K.

Os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135 utilizados na elucidação estrutural foram adquiridos em um equipamento Varian UNITY *plus* de 9,4 Tesla (100,58 MHz para a do carbono), utilizando-se uma sonda de 10 mm com detecção direta em temperatura de 298 K.

6.2.5 Caracterização dos EPS

6.2.5.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, utilizando a termobalança, TGA-50, marca *Shimadzu*, com placas de Pt, fluxo de N_2 de 50 mL min^{-1} , com taxa de aquecimento de 20 $^\circ\text{C/min}$ de 20 a 600 $^\circ\text{C}$ e com massas entre 7,0 a 8,0 mg. Os dados obtidos foram analisados, aplicando-se o método de *Freeman-Carroll*, para a obtenção dos parâmetros cinéticos referentes à degradação do material polimérico, o qual requer o cálculo de diversas derivadas, as quais foram obtidas graficamente com programas computacionais (software).

6.2.5.2 Viscosidade aparente

As amostras desidratadas dos EPS foram dissolvidas em 10 mL de água destilada na proporção de 1% e 5% (m/v). Utilizou-se 8 mL das preparações aquosas dos EPS para a determinação da viscosidade, que foram realizadas no reômetro digital marca Brookfield modelo DV-III, acoplado a um banho-maria estabilizado a uma temperatura de 25 °C, utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, haste SC4-18. A determinação da viscosidade foi realizada em 30 pontos a intervalos de 1 minuto com duração de leitura de 10 segundos e taxa de cisalhamento entre 1 a 15,5 s⁻¹ com velocidade variando entre 1 a 12 rpm. As medidas da viscosidade foram realizadas em função da força de cisalhamento (*shear stress*) e taxa de cisalhamento (*shear rate*) aplicados nas amostras. As leituras foram interpretadas como mili Pascal por segundo (mPa^s).

6.2.5.3 Solubilização

O teste da solubilização dos EPS foi determinado de acordo com o método utilizado por Astolfi-Filho, et al. (2005) com algumas modificações. Foi adicionado 1 g dos polímeros triturados (pó) em 100 mL de água destilada. As misturas foram agitadas no Shaker (marca Marconi modelo MA420) a 25 °C em 150 rpm. Foi medido o tempo necessário para a dissolução de cada amostra ao ponto em que não fossem mais visualizadas partículas sólidas. A ausência de grumos foi checada no microscópio ótico.

5.2.5.4 Densidade aparente de livre empacotamento

A densidade aparente de livre empacotamento foi avaliada, medindo-se o volume ocupado por aproximadamente 10 g de EPS triturado (pó) depositado em uma proveta graduada de 100 mL. Foram aplicadas leves batidas da proveta contra uma superfície plana de uma altura de 2,5 cm até que o volume ocupado pelo pó atingisse um valor constante, o qual foi utilizado no cálculo da densidade, através da seguinte fórmula: $Dap = \text{massa(g)} / \text{volume aparente (mL)}$ (ASTOLFI-FILHO, et al., 2005),

Onde: Dap é densidade aparente (densidade bruta) em que corresponde ao

volume ocupado por uma determinada massa de sólido (pó ou granulado), incluindo o ar contido nos poros intragranulares.

6.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

6.3.1 Extração e purificação de exopolissacarídeos produzidos pelo *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2.

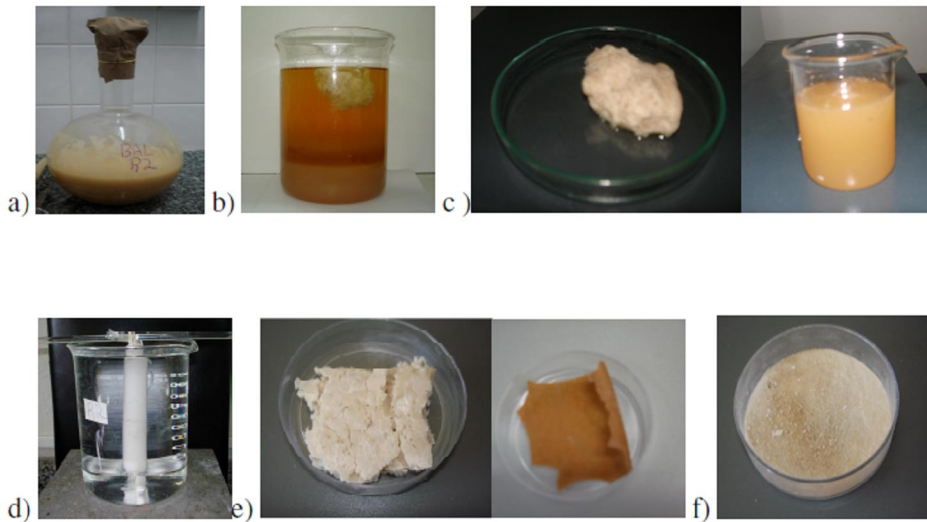


Figura 2: Estágios da obtenção do EPS: a) produção da biomassa; b) extração; c) separação; d) purificação; e) secagem; f) moagem.

A figura 2 ilustra os passos da extração dos EPS. O Caldo fermentado do *L. pseudomesenteroides* R2 com 30h de incubação, apresentou-se como uma substância em forma de gel, viscosa, de cor clara com bastante produção de gás. Na extração com etanol absoluto, além do meio fermentativo formaram-se duas fases uma na superfície (EPS I), e outra sedimentada no fundo do béquer (EPS II). O EPS I consistia de uma substância aglomerada, de aspecto esponjosa e cor esbranquiçada (Figura 3.a), apresentando maior peso seco (97%) quando comparado com o EPS II (83%), que consistia de um líquido viscoso e de cor amarronzada (Figura 3.b). A concentração

precisa do exopolissacarídeo na massa seca do EPS I foi $83,0\% \pm 9,6$ e do EPS II $82,5\% \pm 4,6$.

Jeanes et al. (1954) classificaram exopolissacarídeo do tipo dextrana, produzidas por 96 linhagens bacterianas, não só pela caracterização estrutural e reológica, como também pela aparência física após a precipitação com álcool.

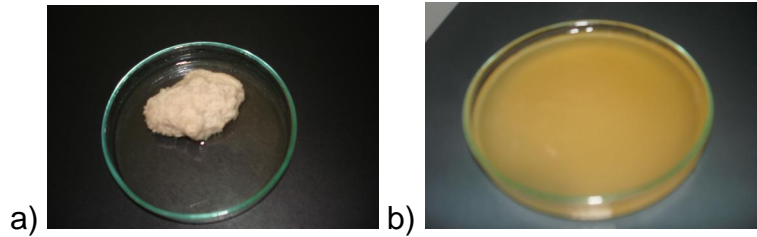


Figura 3: a) polímero obtido da superfície (EPS I); b) polímero sedimentado (EPS II).

Na microscopia eletrônica de varredura o EPS I apresentou-se como uma substância compacta, e o EPS II, como um filme quebradiço (figura 4).

Polímeros de alto peso molecular formam soluções bastante viscosas e evaporação do solvente dessas soluções viscosas resulta na formação de filmes ou películas (MISAKI, et al., 1980).

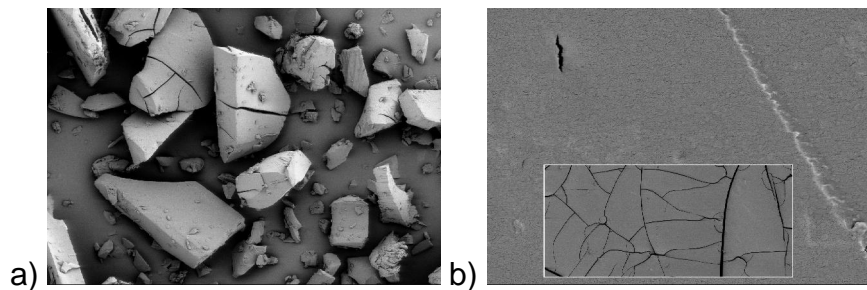


Figura 4: Microfotografia dos polímeros extraídos (150x): a) EPS I; b) EPS II.

O EPS I, desidratado, moído e dissolvido em água em baixas concentrações, forma um gel, característico de um polímero hidrocolóide ou hidrogel. Os hidrogéis apresentam forte afinidade pela água devido à presença de grupos hidrofílicos, tais como: $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-SO_3H$, entre outros (AOUADA, et al., 2008).

Os EPS quando desidratados, apresentaram diferentes aspectos (Quadro 1).

Exopolissacarídeos precipitados	Aspecto
Polímero 1*	Película marrom, transparente, quebradiça
Polímero 2**	Compacto, esbranquiçado, rígido, poroso
Polímero 3	Película transparente, flexível.
Polímero 4	Compacto, esbranquiçado, rígido, não poroso
Polímero 5	Compacto, marrom, rígido
Polímero 6	Película transparente, rígida

Quadro 1: Tipos diferentes de precipitados de polímeros desidratados

* EPS II, ** EPS I

6.3.2 Identificação dos exopolissacarídeos

6.3.2.1 Precipitado EPS I

A espectrofotometria na região do infravermelho é uma técnica utilizada para investigar os grupos funcionais presentes na molécula, além da sua natureza em termos de unidades monoméricas e suas ligações (SHINGEL, 2002).

O espectro do exopolissacarídeo (EPS) (Figura 5) produzido pela bactéria *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 apresentou uma banda de absorção intensa na região de 3413 cm^{-1} , referente à vibração de alongamento das ligações dos grupos hidroxila (O-H), indicando a presença de um composto polihidroxilado (LIU et al., 2007). As bandas na região de 2920 cm^{-1} e 1645 cm^{-1} são devido às vibrações de estiramento das ligações C-H (CAO et al., 2006, LIU et al., 2007).

No entanto, as principais bandas de absorção que caracterizaram o exopolissacarídeo, dextrana (1 6) foram encontradas nas regiões de 1150 cm^{-1} , referente às vibrações da ligação glucosídica C-O-C e, em 912 cm^{-1} , indicando a existência dessa ligação glucosídica e, na conformação alfa (). A presença do pico de absorção em 1010 cm^{-1} , relativo à grande flexibilidade da cadeia da dextrana presente nas ligações glucosídicas (1 6) também confirma a estrutura do EPS I, segundo SHINGEL (2002).

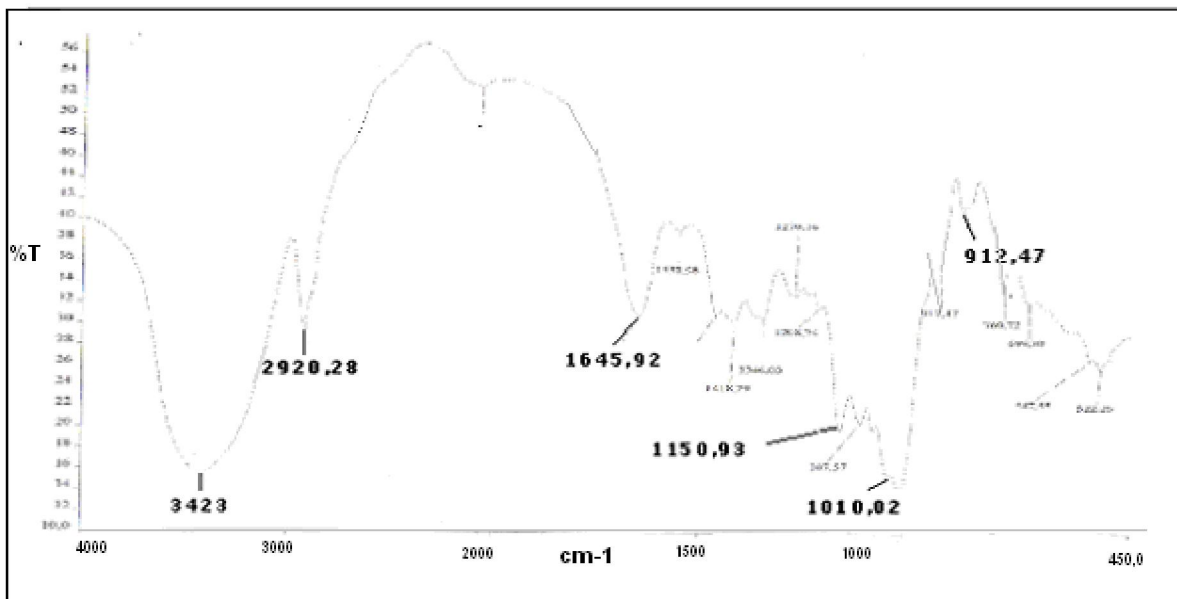


Figura 5: Espectro de infravermelho (IV) (KBr) da Dextrana (1 6) produzida por *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2.

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é a técnica mais utilizada na elucidação de compostos orgânicos, sejam oriundos de produtos naturais (PN) ou da síntese orgânica.

As amostras foram dissolvidas em 0,6 mL de solvente deuterado (CD_3OD , CDCl_3 , D_2O , DMSO e outros) conforme a sua solubilidade. Os compostos como o TMS (tetrametilsilano) e TMSP-2, 2, 3,3- d_4 (tetrametilsililpropionato de sódio) foram utilizados como referência interna para calibrar o deslocamento químico das substâncias presentes na amostra, uma vez que os seus deslocamentos químicos são iguais a zero (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Os espectros de RMN de hidrogênio são os mais comumente utilizados como uma técnica rápida que se obtêm informações fundamentais para a determinação estrutural da molécula, como os tipos de heterogêneos presentes na amostra (aromáticos, carbinólicos, olefínicos, alifáticos) em quantidades detectáveis pela técnica, o valor do deslocamento químico (dependente do ambiente químico em ele se encontra), constantes de acoplamento e número de heterogêneos contidos em cada

sinal (integral). Além disso, ele também nos fornece informações sobre a pureza da amostra, ou seja, se a amostra contém uma única substância ou várias em mistura.

O espectro de RMN de ^{13}C fornece o número de carbonos e o deslocamento químico, dentre outras informações, porém é um experimento que demanda muito tempo de análise, devido à abundância natural do carbono-13, que é 1,1% em relação ao isótopo do carbono-12 e não detectável por RMN, mas muitas vezes fundamental para a determinação estrutural da substância (SILVERSTEIN: WEBSTER, 2000).

Os precipitados de EPS foram analisados por essas duas técnicas, RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , sendo que as técnicas bidimensionais não foram utilizadas, devido à grande quantidade de dados encontrados na literatura sobre a estrutura química da mesma.

O espectro de RMN de ^1H do exopolissacarídeo (EPS I) produzido pela bactéria *Leuconostoc pseudomesenteroides* (Figura 6) apresentou sinais intensos de hidrogênios, correspondentes ao resíduo glucosil, unidade de repetição do biopolímero. Os hidrogênios carbonílicos da D-glucopiranosose foram observados como: um *triplete* ($\ddot{\eta}$) em 3,53 ppm (H-4) com uma constante de acoplamento de 9,4 Hz, em 3,58 ppm um *duplo dubleto* (H-2) com uma constante de acoplamento de 10,0 e 3,4 Hz, um *duplo dubleto* ($d\ddot{\alpha}$) em 3,74 ppm ($J = 9,8$ e $9,4$ Hz) referente ao H-3, em 3,92 ppm um *dubleto largo* ($d\ddot{\eta}$), referente ao hidrogênio H-5 ($J = 7,87$ Hz) e um *dubleto largo* em 3,99 ppm referente ao H-6 ($J = 7,50$ Hz). Finalmente, em 4,99 ppm um *dubleto*, referente ao hidrogênio anomérico (H-1) com uma constante de acoplamento de 3,10 Hz, constante esta, característica da conformação alfa (α) da D-glucopiranosose.

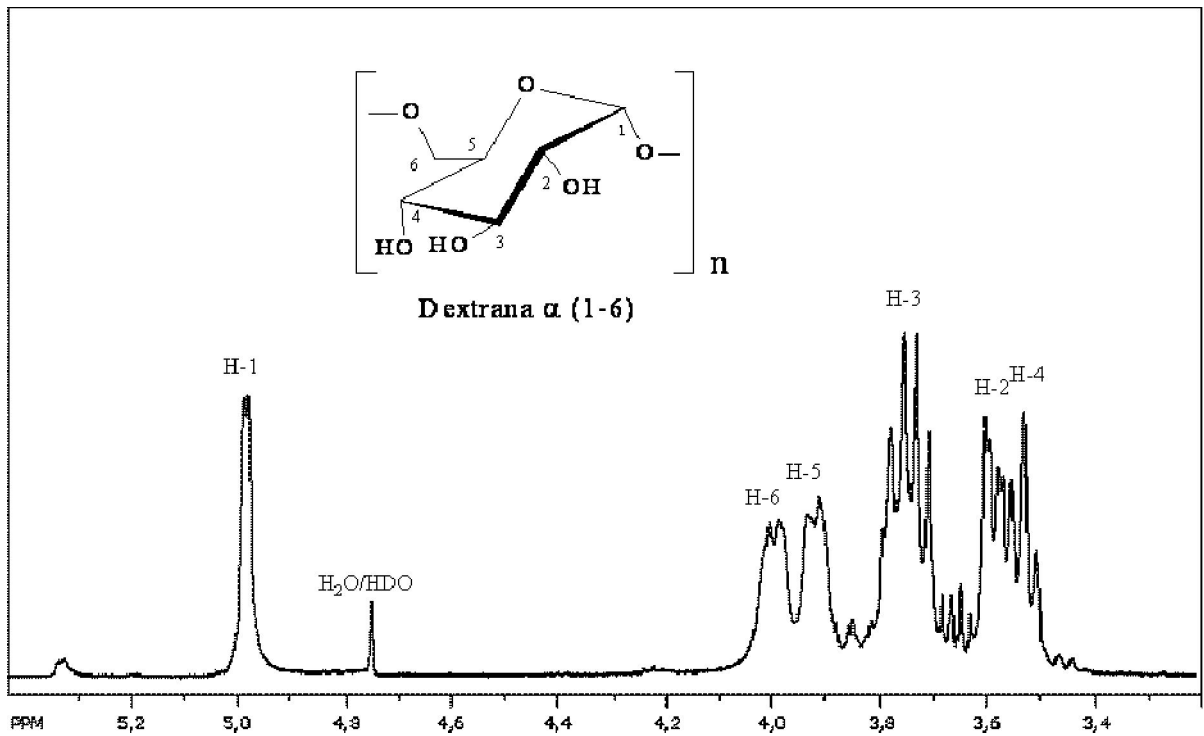


Figura 6 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) do EPS I produzido por *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 em D_2O

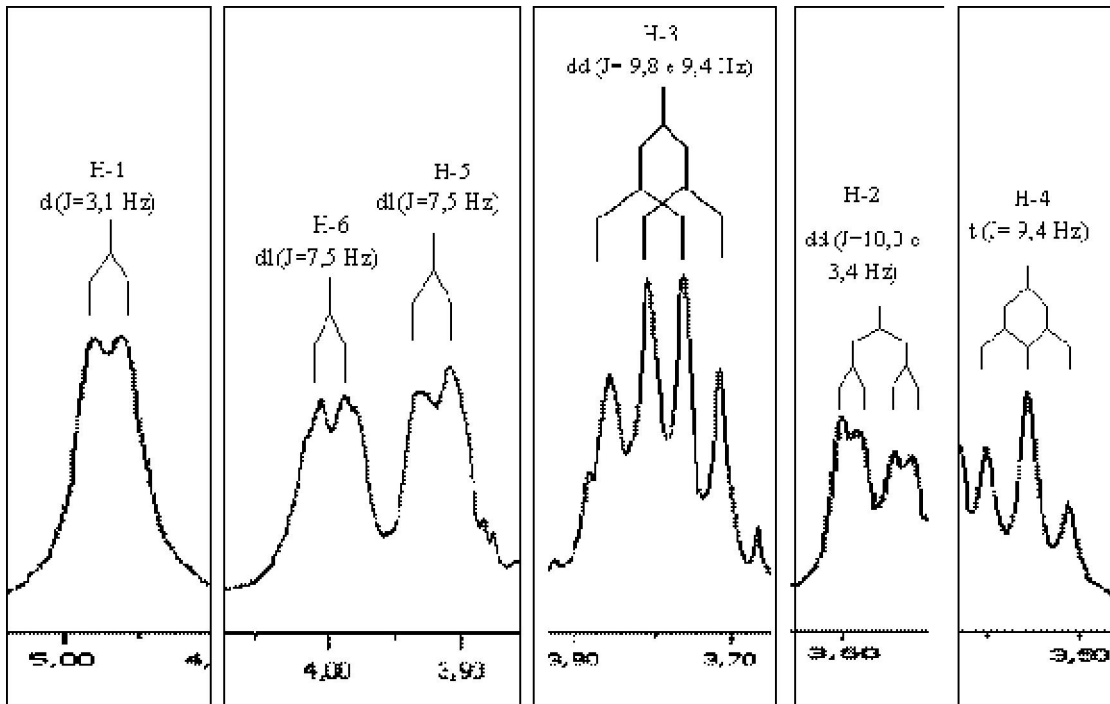


Figura 7 Ampliação das regiões do espectro de RMN de ^1H , multiplicidades e constantes de acoplamentos (dado de literatura)

Na Figura 7 estão representados os hidrogênios da α -D-glucopiranosose, suas multiplicidades e constantes de acoplamento.

Os deslocamentos dos carbonos no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 8) em 97,60 ppm (C-1), 73,29 ppm (C-3), 71,30 ppm (C-2), 70,07 ppm (C-4), 69,41 ppm (C-5) e 65,42 ppm (C-6) são característicos do esqueleto da α -D-glucopiranosose, dextranas de cadeia linear, de acordo com Seymour, 1979 e Uzochukwu et al. (2002).

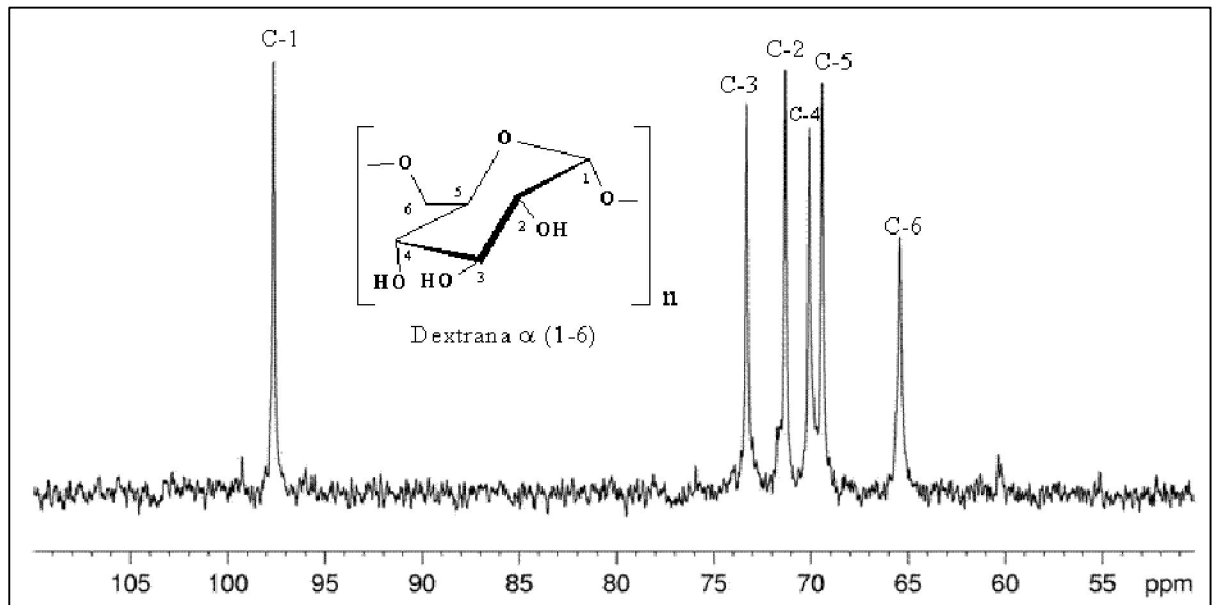


Figura 8 Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz), do exopolissacarídeo (Dextrana α 1-6) produzido por *Leuconostoc pseudomesenteroides* em D_2O

Além dos dados da literatura utilizados para confirmação da estrutura do EPS como sendo dextrana, também foi realizado o experimento de RMN de ^{13}C da D-glucose com grupos hidroxil (O-H) livre, para comparação dos seus deslocamentos químicos com os da unidade de repetição glucosil (C-O-) do polímero.

A Figura 9 apresenta o experimento de RMN de ^{13}C da alfa () e beta () D-glucopiranosose. Nesta figura também é mostrado os carbonos das duas conformações da D-glucose em solução, a α -D-glucopiranosose e a β -D-glucopiranosose, porém com intensidades diferentes, sendo esta intensidade dos sinais característico de isômeros conformacionais em equilíbrio dinâmico.

O espectro de RMN de ^{13}C da glucose mostra os deslocamentos químicos dos carbonos em 92,31 ppm (C-1); 71,70 ppm (C-2); 73,00 ppm (C-3); 69,88 ppm (C-4), 71,64 ppm (C-5) e 60,86 ppm (C-6) para a α -glucopiranosose (isômero conformacional), utilizado somente para comparação com a dextrana (1-6), já que as duas substâncias apresentam os mesmos sinais no espectro de RMN de ^{13}C .

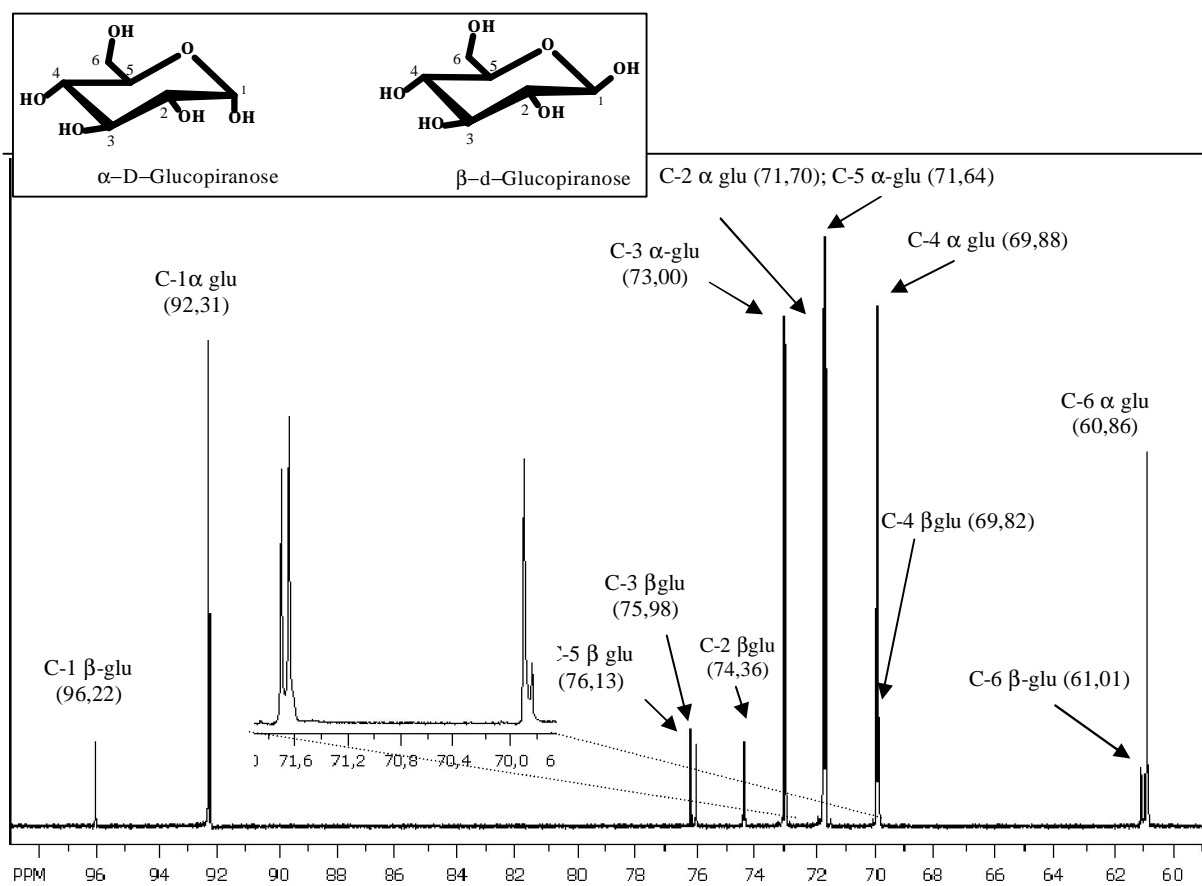


Figura 9. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) da α -D-Glucopiranosose e β -D-glucopiranosose em D_2O

Comparando-se os espectros da α -D-glucopiranosose (Figura 9) com o do resíduo glucosil (dextrana (1-6)) (Figura 8) observa-se diferenças de

aproximadamente 5 ppm entre os valores dos deslocamentos químicos para os carbonos em C-1 e C-6 da α -glucopiranosose (92,31 ppm e C-6 (60,86 ppm) em relação aos da dextrana (16) (C-1 97,60 ppm e C-6 65,4 ppm). Esta diferença nos valores dos deslocamentos dos carbonos (tabela 1) é devido aos diferentes ambientes químicos em que estes se encontram nos determinados compostos. Na molécula de glucose o C-1 e C-6 estão ligados a grupos hidroxilados (O-H) e, na dextrana (16), eles estão ligados a grupos glucosílicos (C-O-), ou seja, ligação glucosídica (16). Enquanto, que para os demais carbonos (C-2, C-3, C-4 e C-5) os valores dos deslocamentos químicos são muito próximos, pois estes se encontram no mesmo ambiente químico nas duas substâncias (ligados a grupos hidroxilados (O-H)).

Tabela 1: Deslocamentos químicos dos carbonos da α -D-glucopiranosose e da Dextrana (16)

<i>Posição</i>	<i>α-D-Glucopiranosose ()</i>	<i>Dextrana (16) ()</i>
1	92,31 ppm	97,60 ppm
2	71,70 ppm	71,30 ppm
3	73,00 ppm	73,29 ppm
4	69,88 ppm	70,07 ppm
5	71,64 ppm	69,41 ppm
6	60,86 ppm	65,42 ppm

Os deslocamentos dos carbonos foram confirmados através da análise de espectro DEPT (135).

Na Figura 10 está mostrado o espectro de DEPT-135, no qual observaram-se cinco carbonos metínicos (CH), referentes aos carbonos C-1, C-2, C-3, C-4 e C-5 no plano superior do eixo espectral e, um único carbono (C-6), referente ao grupo metilênico (CH₂), no plano inferior.

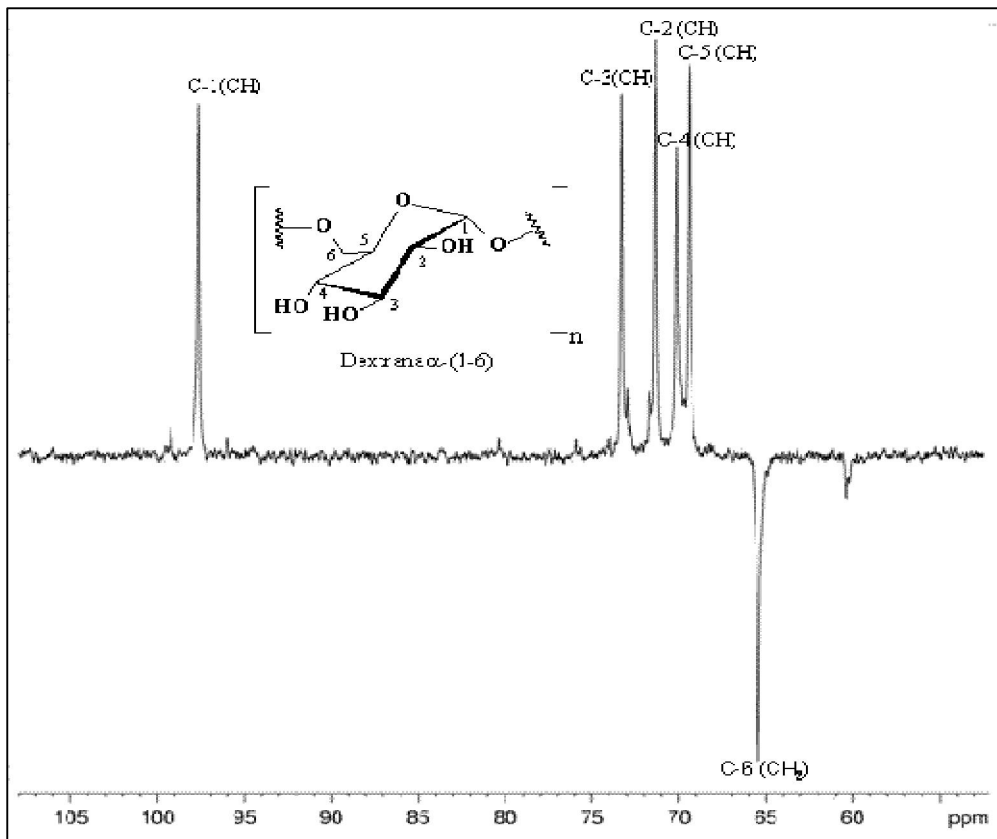


Figura 10 Ampliação da região de 50,0 a 110,0 ppm do espectro de DEPT-135, da dextrana (1-6) em D_2O

Tabela 2: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C e DEPT-135 da Dextrana (1-6) produzida por *Leuconostoc pseudomesenteroides* e literatura (PURAMA et al., 2009).

Posição	RMN de ^1H (- ppm, J - Hz)	RMN de ^{13}C (- ppm)	DEPT-135	*RMN de ^1H (- ppm)	*RMN de ^{13}C (- ppm)
1	4,99 (d, J= 3,1 Hz)	97,61	CH	4,98	97,81
2	3,58 (dd; J = 10,0 Hz e J = 3,4Hz)	71,30	CH	3,58 (J = 10,0)	71,56
3	3,74 (dd; J = 9,8 Hz e J = 9,4 Hz)	73,29	CH	3,73 (J = 9,6)	73,56
4	3,53 (t; J = 9,4 Hz)	70,07	CH	3,54 (J = 9,6 Hz)	69,68
5	3,92 (dl; J = 7,5 Hz)	69,41	CH	3,92 (J = 7,6 Hz).	70,30
6	3,99 (dl; J = 7,5 Hz)	65,42	CH ₂	3,99 (J = 7,2 Hz)	65,70

* dados da literatura

Multiplicidades: d – *dublete*; dl – *dublete largo*; dd – *duplo dublete*; t – *triplete*

J - Constante de acoplamento, Hz – Hertz, - deslocamento químico, ppm – unidade do deslocamento químico em relação ao TMS (tetrametilsilano = 0,00 ppm)

Através dos dados obtidos com os experimentos realizados (IV, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT-135) e comparados com os da literatura (tabela 2), pode-se concluir que a substância polissacarídica I (EPS I) produzido pela bactéria *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 corresponde a um polímero linear, constituído por repetições de unidades residuais de 6- -D-glucosil, dextrana (1-6).

6.3.2.2 Precipitado EPS II

O espectro de RMN de ^1H do EPS II produzido pela bactéria *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 Figura 11 também apresentou sinais intensos de hidrogênios, correspondentes ao resíduo glucosil, sendo eles: em 4,97 ppm um *dublete*, referente

ao hidrogênio anomérico (H-1) com uma constante de acoplamento de 3,75 Hz, em 3,57 ppm um *duplo duplete* (H-2) com uma constante de acoplamento de 9,6 e 3,3 Hz, um *duplo duplete* (*dd*) em 3,72 ppm ($J = 9,6$ e $9,2$ Hz) referente ao H-3, um *triplete* (*t*) em 3,51 ppm (H-4) com uma constante de acoplamento de 9,6 Hz, em 3,90 ppm, um *dupleto largo* (*dl*), referente ao hidrogênio H-5 ($J = 9,16$ Hz) e um *dupleto largo* em 3,98 ppm referente ao H-6 ($J = 7,92$ Hz). Os dados mostram que este expolissacarídeo também é constituído por unidade de resíduos glucosil, dextrana (1-6), porém apresenta algumas diferenças nos deslocamentos, devido, calibração, que pode ser feito através do sinal do solvente (D₂O) ou pelo TMS (Tetrametilsilano).

No entanto, a pequena diferença nos valores das constantes de acoplamento em comparação com as do EPS-I (Figura 6) mostra que os dois tipos de EPS apresentam um arranjo espacial um pouco diferente, e que isto deve estar relacionado com a massa molecular de cada um.

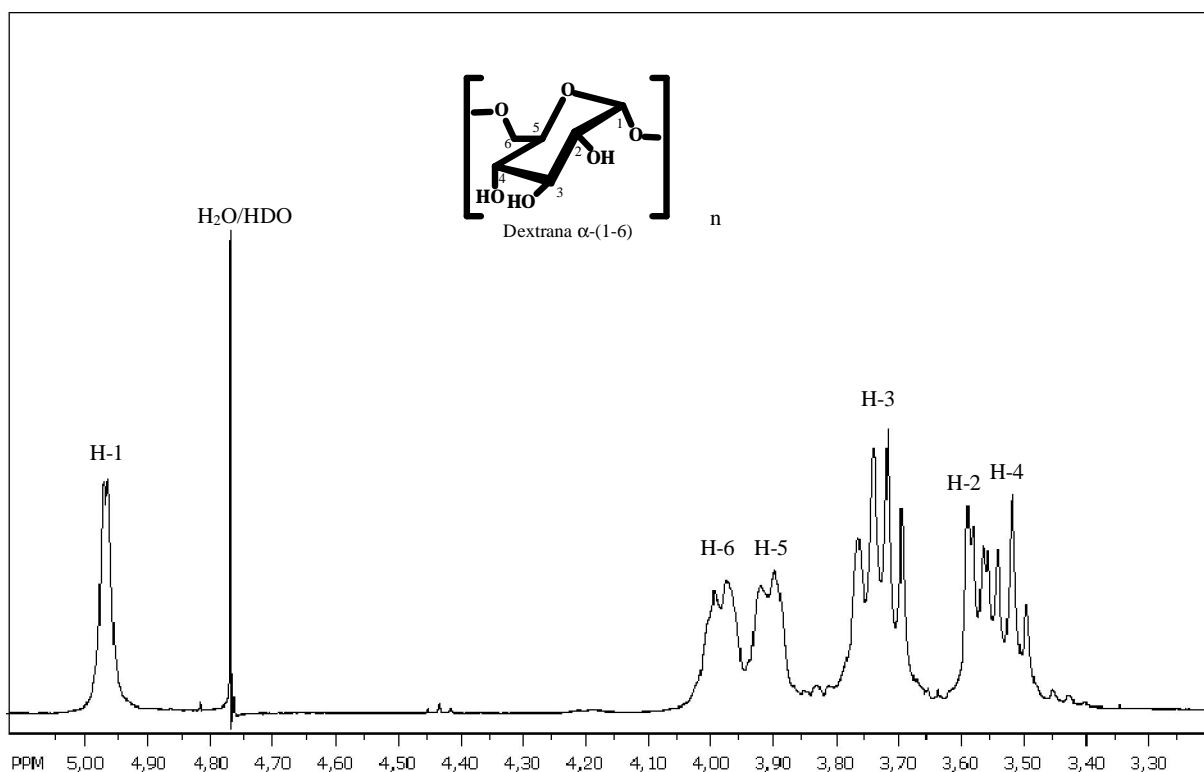


Figura 11 Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) do EPS-II (Dextrana 1-6) produzido por *Leuconostoc pseudomesenteroides* em D₂O.

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 12) em 101,64 ppm (C-1), 76,34 ppm (C-3), 74,34 ppm (C-2), 73,12 ppm (C-4), 68,42 ppm (C-5) e 65,42 ppm (C-6). Estes resultados também confirmam o EPS II, como dextrana (1 6).

Neste espectro de carbono (figura 12) também encontramos uma diferença nos valores dos deslocamentos dos carbonos em relação aos do EPS-I (tabela 2), mas esta diferença é devido à calibração do espectro (A) ter sido feito pelo TMS, padrão interno, cujo deslocamento é igual a zero (0,00 ppm). Porém, a diferença entre os deslocamentos de todos os carbonos do EPS-1, com os respectivos carbonos do EPS-2 é de aproximadamente 3,0 ppm.

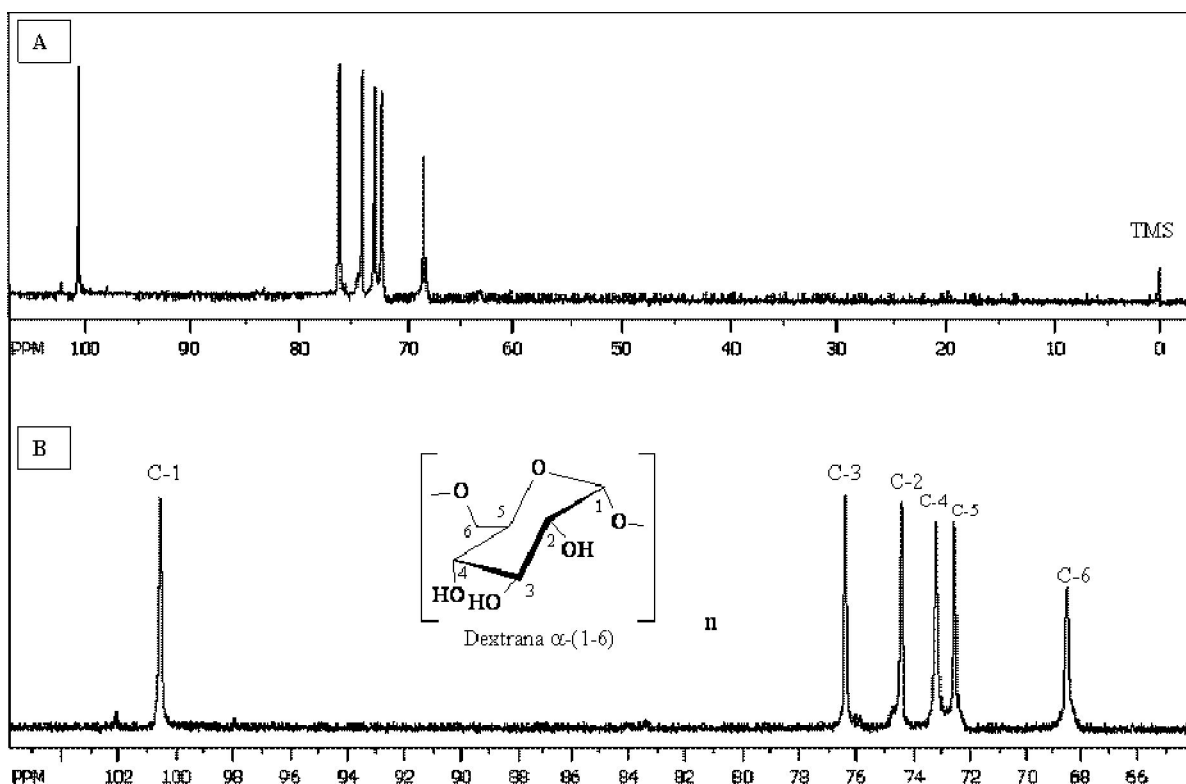


Figura 12 (a) Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz), calibrado pelo TMS. (b) Espectro de RMN de ^{13}C com ampliação da região de 104,0 a 65 ppm do EPS-2 (Dextrana) produzido por *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 em D_2O

Não foram realizadas as análises de infravermelho e DEPT no EPS II, visto que pela ressonância magnética, os dois precipitados possuem a mesma estrutura.

As análises dos exopolissacarídeos produzido pela linhagem *Leuconostoc*

pseudomesenteroides R2 pelo infravermelho, RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT, apontaram para a dextrana, confirmando a produção deste polímero pela linhagem *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2.

O termo dextrana é utilizado para designar uma grande classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares. A diversidade dentro desta classe de biopolímero é devido a grande variedade de micro-organismos que produzem dextrana extracelularmente por uma grande variedade de bactérias da família *Lactobacillaceae*, e em particular aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (AQUINO, 2006), quando estes crescem em meios contendo sacarose (KOBAYASHI; MATSUDA, 1974). Dentre as principais espécies produtoras deste polímero se encontram o *Leuconostoc dextranicum* e *Leuconostoc mesenteroides* (NEGRO, 1999).

A dextrana produzida pela fermentação bacteriana é chamada de dextrana nativa e tem massa molecular elevada. Obtém-se dextranas com massas moleculares menores, de aplicações específicas, através de processo enzimático (KARTHIKEYAN, 1999 apud AQUINO, 2006).

Segundo Alsop (1983), as dextranas são precipitadas de forma diferentes, dependendo da concentração de etanol utilizado, formando dextrana de alta e baixa massa molecular, e que várias frações do polímero podem ser formadas, dependendo da concentração do etanol utilizado. Outros fatores também favorecem a formação de diferentes frações de dextrana como o pH e a composição do meio.

6.3.3 Caracterização das dextranas produzidas pelo *L. pseudomesenteroides* R2

6.3.3.1 Análise termogravimétrica

O gráfico ilustrado na figura 13 representa os resultados obtidos da análise termogravimétrica dos precipitados de dextranas (EPS I e EPS II) obtidos do caldo fermentativo do *L. pseudomesenteroides* R2. Pode-se observar que o comportamento quanto à perda de massa de todos os precipitados foi semelhante.

A uma temperatura de $\pm 300\text{ }^\circ\text{C}$ ocorreu cerca de 20% de perda de massa, sendo que a $\pm 350\text{ }^\circ\text{C}$ esta perda vai para $\pm 70\%$, indicando decomposição da amostra. Curva

termogravimétrica típica do polímero dextrana obtida de experimentos realizados por Rodrigues-Filho, et al. (2007), também mostram comportamento semelhante a este termograma.

Através desta análise pode-se afirmar que os polímeros extraídos do caldo fermentado de *L. pseudomesenteroides* R2, possuem alta estabilidade térmica. Segundo Jeanes, (1974), polímeros produzidos pelo *L. pseudomesenteroides* do tipo dextrana em soluções aquosas (3 a 10%) são bastante resistentes à esterilização pelo calor.

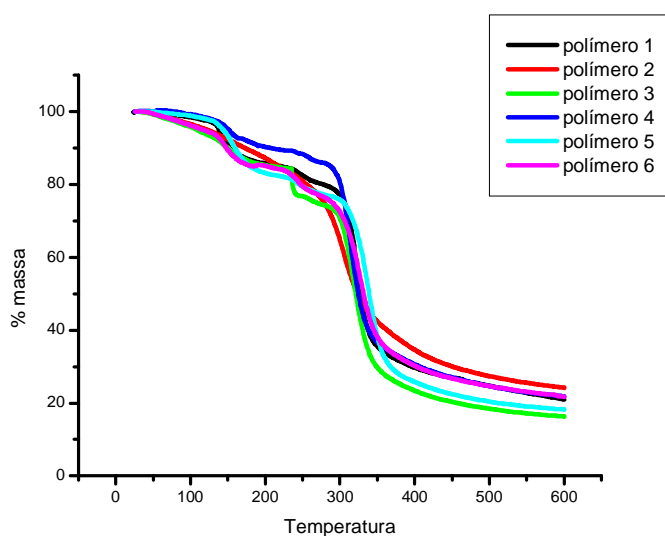


Figura 13: Análise termogravimétrica das frações dos EPS extraídos da cultura de *L. pseudomesenteroides* R2. * polímero 2 (EPS I)

6.3.3.2 Densidade aparente de livre empacotamento

A densidade aparente de livre empacotamento determinada no EPS I foi 0,50 g/cm³. O EPS II apresentou-se mais denso, com a densidade aparente de 0,67 g/cm³.

Nos polímeros de maneira geral predominam elementos leves, designadamente o (C, H, N e O). Além disso, as suas ligações atômicas de tipo covalente são propensas à existência de empacotamentos atômicos pouco densos (MISAKI, et al.1980).

6.3.3.3 Determinação da viscosidade

As figura 14 e 15 representam os reogramas correspondentes ao EPS I e ao EPS II, respectivamente, nas concentrações 1% e 5%. O Comportamento da viscosidade das soluções de dextrana é bastante variável devido a grande flexibilidade da estrutura desta classe de polímero. Uma solução de dextrana com concentração de até 5% (m/v) apresenta comportamento newtoniano. Acima desta concentração pode ter comportamento não newtoniano (AQUINO, 2006),

As soluções de ambos exopolissacarídeos apresentaram comportamento pseudoplástico, uma vez que a viscosidade aparente decresceu com o aumento da taxa de cisalhamento. De acordo com a literatura, esse comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (BERWANGER et al., 2007).

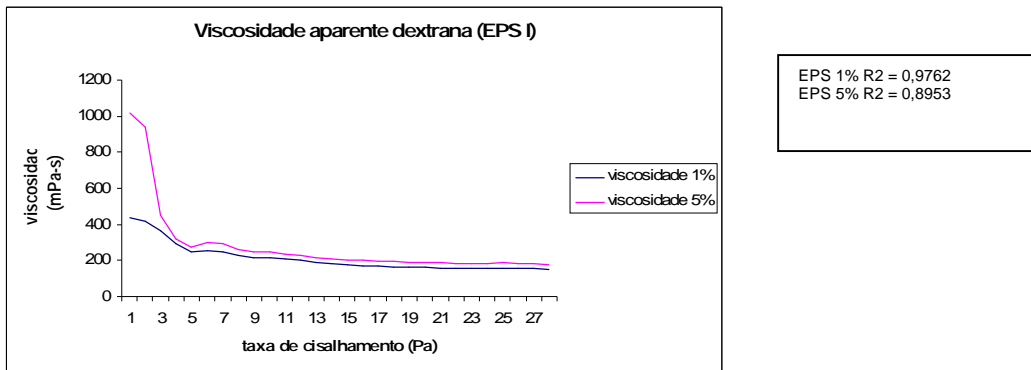


Figura 14: Reograma do EPS I extraído do *L. pseudomesenteroides* R2

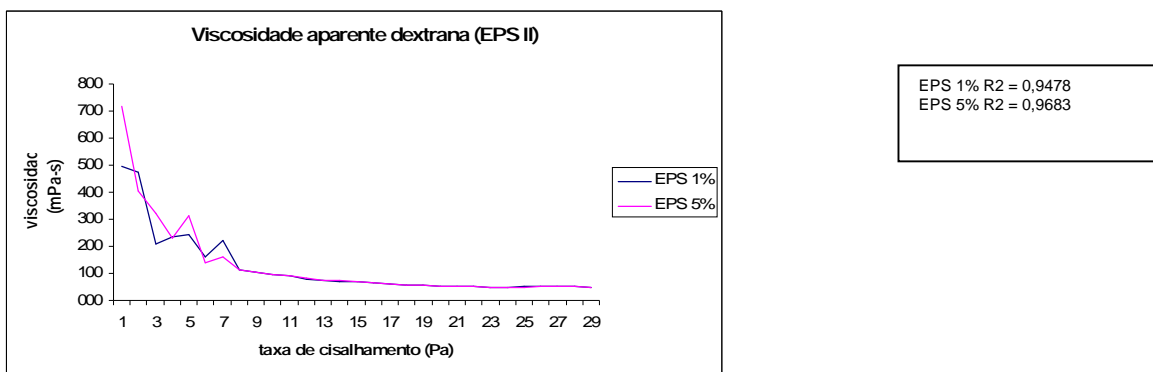


Figura 15 Reograma do EPS II extraído do *L. pseudomesenteroides* R2.

Normalmente a dextrana produzida pelos *Leuconostoc* apresenta comportamento pseudoplástico não Newtoniano. Segundo Sebatie, et al (1986) o comportamento pseudoplástico da dextrana está relacionado ao alinhamento das cadeias de forma linear, seguida de ligações de hidrogênio entre as moléculas, aumentando a viscosidade, quando a produção deste polímero é realizada em baixas temperaturas, sugerindo que existe uma relação, entre a temperatura onde ocorre à síntese da dextrana e sua estrutura molecular. As dextranas produzidas em baixas temperaturas são menos ramificadas e mais viscosas.

Tabela 2: Resultado da determinação da viscosidade aparente das dextranas extraídas do *L. pseudomesenteroides* R2.

<i>Dextranas</i> 1% / 5%	<i>Viscosidade</i> <i>aparente</i> (<i>mPa^s</i>)	<i>Velocidade</i> <i>de</i> <i>rotação</i> (<i>rpm</i>)	<i>%</i> <i>torque</i>	<i>Tensão de</i> <i>cisalhamento</i>	<i>Taxa de</i> <i>cisalhamento</i> (<i>s⁻¹</i>)	<i>T^oC</i>
Exopolissacarideo I	1.024/1.676	1	39/64	15/25	1,50	25
Exopolissacarideo II	615/718	1	23/27	9/11	1,50	25

A tabela 2 aponta a maior viscosidade aparente nas duas concentrações (1% e 5%) no EPS I, quando comparado ao EPS II na mesma taxa de cisalhamento (1,50 s⁻¹). Dos parâmetros que interferem na viscosidade das dextranas, pode-se citar o tipo de estrutura molecular e concentração de polímero (GREENFIELD; GERONIMOS, 1978). O aumento da viscosidade será maior quanto maior for a massa molecular da dextrana. A dextrana produzida pela fermentação bacteriana pode atingir de 9 x 10⁶ a 50 x 10⁸ Daltons (ROBYT; KHIMBLE; WALSET, 1974).

Os resultados apresentados na tabela 2 corroboram com Diaz, et al. (2007), no qual eles citam que a viscosidade das soluções se torna elevada com o aumento da sua concentração (DIAZ, et al., 2009).

6.3.3.4 Solubilização dos exopolissacarídeos

A amostra de dextrana correspondente ao EPS I mostrou total solubilização na água destilada a 25 °C em 1 hora enquanto a correspondente ao EPS II apresentou

algumas partículas sólidas neste intervalo de tempo, sendo totalmente solubilizado em 2h e 30 minutos.

A solubilização da dextrana pode variar de acordo com a linhagem que a produziu. O grau de ramificação afeta a solubilização em água, sendo que grandes números de ligação 1-6 aumenta a solubilização do polímero em água, apresentando elevada estabilidade sob condições ácidas e alcalinas, enquanto que grande número de ligações 1-3 diminui esta solubilização (AQUINO, 2006).

6.4 CONCLUSÃO

A linhagem *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 produziu nas condições experimentais deste trabalho dois tipos de polímeros identificados como dextrana (1-6) de cadeia linear, apresentando em ambos a mesma estabilidade térmica, porém com algumas características diferentes, como viscosidade, densidade aparente de livre empacotamento e tempo de solubilização em meio aquoso. A utilização destas dextranas em processos industriais vai depender dos requisitos do polímero utilizado para cada processo.

Sugere-se a determinação da massa molecular das dextranas sintetizadas pelo *L. pseudomesenteroides* R2, uma vez que a aplicabilidade deste tipo de polímero depende se eles são de baixa, média ou alta massa molecular.

AGRADECIMENTOS:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Meio Ambiente, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Departamento de Engenharia de Material, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

REFERÊNCIAS

ALSOP, R. M. Industrial Production of Dextrans. *Progress in Industrial Microbiology*, 1-42. ed. M. E. Bushell. New York: Elseiver, 1983.

AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.; GIROTTO, E. M.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CAMPESE, G. M. Caracterização de hidrogéis condutores constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de planejamento fatorial. *Polímeros* vol.18 no.2 São carlos Apr./June 2008.

AQUINO, D.S. Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas de cana-de-açúcar. Dissertação 74 f. (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia Química. Campinas, SP, 2006.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharides from *Sphingomonas paucimobilis* GS1., *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 219-222, 1995.

ASTOLFI-FILHO, Z.; SOUZA, C. A.; REIPERT, E.C.A; TELIS, V. R.N. Encapsulação de suco de maracujá por co-cristalização com sacarose: cinética de cristalização e propriedades físicas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 25(4): 795-801, out.-dez. 2005.

BEROVI, C, M.; HABIJANI, C., J.; ZORE, I.; WRABER, B.; HOD ZAR, D.; BOH, B.; POHLEVEN, F. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 103, n. 1, p.77-86, 2003

BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A.R.P.; DOMINGUES, N.M.; VANZO, L.T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F.F. Biopolymer production synthesized by *Sphingomonas capsulata*, using industrial media. *Ciência e Agrotecnologia*. vol.31 no.1, 2007.

BOHN, J. A. & BEMILLER, J. N. 1995 (1-3)-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 28, n. 1, p. 3-14. 1995.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* . 72, 248–254, 1976.

CAO, W., LI, X-Q., LIU, L., YANG, T-H., LI, C., Fan, H-T. Structure of antitumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv) Diels. *Carbohydrate Polymers*, 66, p. 149–159, 2006.

CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. *Lait*, 75:463–472, 1995.

CHI, Z; ZHÃO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Thecnology*, 33, 206-211, 2003.

DIAZ, P. S.,1;VENDRUSCOLO, C. T.; JOÃO LUIZ SILVA VENDRUSCOLO J. L. S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana Xanthan Rheological: a Review about the Influence of Electrolytes on the Viscosity of Aqueous Solutions of Xanthan Gums. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 25, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2004

DILTZ, S.; ZELLER, S. G. Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method. *Carbohydrate Research*, 331, 265-270, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3,350-356, 1956.

GALINDO E, Aspects of the process for xanthan production. Transactions of the Institution of Chemical Engineers. 72: 227-237, 1994.

GREENFIELD, P. F.; GERONIMOS, G. L. Effect of dextrans on the viscosity of sugar solutions and molasses. International Sugar Journal, v. 80, p. 67-72, 1978.

GUIMARÃES, D. P., COSTA, F., RODRIGUES, M. I., MAUGERI, F. Optimization of dextran synthesis and acidic hydrolysis by surface response analysis. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 16:2, 129-139, 1999.

JEANES, A. et al. Characterization and Classification of Dextrans from Ninety-six Strains of Bacteria. *Journal of the American Chemical Society.*, p. 5041-5052, 1954.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19, 597-625, 2001.

LEUNG, M. Y. K.; LIUB, C.; KOON, J. C. M.; FUNG, K. P. (2006) Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 101–114, 2006.

LIU, C., LIN, Q., GAO, Y., YE, L., XING, Y., & XI, T. Characterization and antitumor activity of polysaccharide from *Strongylo centrotus nudus* eggs. *Carbohydrate Polymers*, 67, p. 313–318, 2007.

LUCAS, E. F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. *Caracterização de polímeros*. Editora E-paper, Rio de Janeiro, 2001, 366p.

MESOMO, M. C. *Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo*. 2007, 80 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai da Missões – URI, Campos de Erechim- RS. 2007.

MISAKI, A; TORII, M; SAWAI, T.; GOLDSTEIN, I. Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355* *Carbohydrate Research*, 84(1980) 273-285.

NASCIMENTO, J. F. Estudo da processabilidade e da caracterização do poli-(ácido-3 hidroxibutírico) – PHB obtido a partir de cana-de-açúcar. 2001, Dissertação 75 f.(Mestrado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas-SP.74p. 2001.

NEGRO, M. R. G. O. C. 1999. Caracterização da “canjica” –polímero coletado em usinas de açúcar e álcool – e estudo de fatores relacionados à sua formação a partir de gomas produzidas por *Lactobacillus* isolados de caldo de cana-de-açúcar.130f. tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas- Campinas,SP, 1999.

PACE, G. W. Polímeros microbianos. In: BU'LO CK, J.; KRISTIANSEN, B. *Biotechnology básica*. Zaragoza: Acribia, 449-462, 1992.

PURAMA, R. K., GOSWAMI, P., KHAN, A. T., GOYAL, A. Structural analysis and properties of dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-640. *Carbohydrate Polymers*, 76, p. 30–35, 2009.

RICCIARDI, A.; CLEMENTI, F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. *Italian Journal of Food Science* . 1: 23-45, 2000.

ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of Dextranase Action: Direction of Dextran Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 165, p.634-641, 1974.

RODRIGUES FILHO, M. G.; LEITE NETO, A. F.; . AQUINO. F. W.; PLEPIS, A. M. G.; RODRIGUES-FILHO, U. P.; FRANCO, D. W. Quantificação de dextranas em açúcares e em cachaças. *Química Nova*, Vol. 30, No. 5, 1115-1118, 2007.

ROHM HAAS COMPANY. Processo de identificação e qualificação de polímeros em um sistema aquoso,USA. Patente PI9700705-6 Data da publicação : 03/12/2002.

SANTOS, M .; TEIXEIRA, J.A.;LOPRETTI, M.;RODRIGUES. .Dextran and Fructose production using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL.B512(F) with sucrose as substrate *Biochemical Engineering Journal*, 4:3, 177-188, 2000.

SEBATIE, J.; CHOPLIN, L.; PAUL. F.; MONSAN, P; Shear-induced structure in enzymatically-synthesized dextran solution. *Rheologica Acta*, v. 25,p. 287-285, 1986.

SEYMOUR, F. R. Structural analysis of dextrans containing 2-o- -D-Glucosylated -D-Glucopyranosyl residues at the branch points, by use of ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas-liquid chromatography- mass spectrometry. *Carbohydrate Research*, 71, p. 231-250.1979.

SHINGEL, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and c-irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337, p. 1445-1451, 2002.

SILVA, D. A., BRITO, A.C.F., DE PAULA, R.C.M., FEITOSA, J. P. A., PAULA, H. C.B., *Carbohydrate Polymers*, 54, 229-236, 2003.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos. p. 151-174, 2000.

SUTHERLAND, I. A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. *Microbiology Today*, [S.l.], 29, 70-71, 2002.

UZO CHUKWU, S., BALOGH, E., LOEFLER, R. T., & NGODDY, P. O. Structural analysis by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy of glucan extracted from natural palm wine. *Food Chemistry*, 76, p. 287-291,2002.

YOUNG, S. H. ; JACOBS, R. R. Sodium hydroxide induced conformational change in schizophyllan detected by the fluorescence dye, aniline blue. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 310, n. 1-2, p. 91-99, 1998.

CAPITULO 7

UTILIZAÇÃO DA DEXTRANA NATIVA PRODUZIDA PELO *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 NA FORMAÇÃO DE MICROPARTICULAS DE *L. acidophilus* La-5 PELO MÉTODO DE *SPRAY DRYING*

Elinalva Maciel Paulo¹, Sandra Aparecida de Assis², Izildinha Moreno³, Cristiano Ragagnin de Menezes⁴, Rosely Nascimento⁵, Itamar Soares de Melo⁵, Maria Inês Ré⁶, Milton Ricardo de Abreu Roque⁷

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Av Transnordestina s/n Km 0 Ba116, Feira de Santana, tel/fax (75) 32248018. elinalvamaciel@yahoo.com, ²Departamento de Saúde – UEFS, ³ Instituto de tecnologia de Alimentos – ITAL, ⁴Departamento de Tecnologia de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, RS, ⁵Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Meio Ambiente, Jaguariúna – SP, ⁶ Ecole des Mines d'Albi, France, ⁷Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA).

RESUMO

Vários polímeros já foram testados como material de parede para formação de microcápsulas bacterianas pelo método do *spray drying*, tendo respostas diferentes na sobrevivência das células, a depender da linhagem encapsulada. Este trabalho propõe a utilização da dextrana nativa produzida pelo *L. pseudomesenteroides* R2 como matriz encapsulante para microencapsulação em *spray drying* do *L. acidophilus* La-5. Foram testadas três tipos de formulações contendo os seguintes materiais encapsulantes: dextrana, alginato e alginato/dextrana. Utilizou-se como condição de funcionamento do *spray drying* temperatura de entrada de ar 120 °C e temperatura de saída de ar 77 °C. Em todas as formulações as microcápsulas apresentaram morfologia e tamanho semelhantes. A percentagem de sobrevivência das células nas microcápsulas logo após o processo foi: microcápsulas constituídas por dextrana (72%), pelo alginato (55%) e

pelo alginato/dextrana (62%). Quanto à sobrevivência das células armazenadas a 4 °C em 120 dias, as microcápsulas formuladas com dextrana apresentaram sobrevivência de 41%, a as microcápsulas compostas pelo alginato e alginato/dextrana a sobrevivência das células foi inferior a 31%. Quando em outro experimento de microencapsulação modificou-se a temperatura de entrada para 98 °C e saída para 65 °C, à sobrevivência das células aumentou para 94%, 74% e 78% nas microcápsulas constituídas por dextrana, alginato e dextrana/alginato, respectivamente. Os resultados da sobrevivência no tempo de estocagem de 120 dias foram 70%, 77% e 56% para as microcápsulas dextrana, alginato e alginato/dextrana, respectivamente. Através destes experimentos sugere-se a utilização da dextrana nativa produzida pela linhagem *L. pseudomesenteroides* R2 como mais uma alternativa de material de parede para a microencapsulação da bactéria probiótica. *L. acidophilus* La-5, pelo processo do *spray drying*, porém necessitando de ajustes de determinados parâmetros na formulação e no processo da microencapsulação.

Palavras-chave: *Spray drying*, microencapsulação, *Lactobacillus acidophilus*, exopolissacarídeos, bactérias lácticas.

ABSTRACT

Several polymers have been tested as a wall material for the formation of microcapsules by the bacterial method of spray drying, and different responses in cell survival, depending on the encapsulated strain. This paper proposes the use of native dextran produced by *L. pseudomesenteroides* R2 as a matrix for encapsulation in spray drying microencapsulation of *L. acidophilus* La-5. We tested three types of formulations containing the following materials encapsulating: dextran, alginate and alginate / dextran. Using as the operating condition of spray drying inlet temperature of 120 °C air temperature and air outlet 77 °C. In all formulations the microspheres showed similar morphology and size. The survival of cells within micro capsules after the process was: microcapsules formed by dextran (72%), the alginate (55.%) and alginate / dextran (62%). The survival of cells stored at 4 ° C in 120 days, the micro capsules formulated

with dextran showed a survival rate of 41%, the micro capsules composed of the alginate and alginate / dextran cell survival was less than 30%. While in another experiment microencapsulation changed the inlet temperature to 98 °C and output to 65 °C, the survival of cells increased to 94%, 74 and 77% in microcapsules composed respectively of dextran, dextran and alginate / alginate. The results of survival in the storage time of 120 days were 70%, 77% and 56% for the dextran microspheres, alginate and alginate / dextran, respectively. Through these experiments suggest the use of native dextran produced by the strain *L. pseudomesenteroides* R2 as an alternative wall material for microencapsulation of probiotic bacteria. *L. acidophilus* La-5, the spray drying process, but requiring adjustment of certain parameters in the process of microencapsulation.

Keywords: Spray drying, microencapsulation, *Lactobacillus acidophilus*, exopolysaccharides, lactic acid bacteria.

7.1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação é definida, do ponto de vista microbiológico, como o processo de imobilização celular pelo quais as células microbianas ficam retidas em uma matriz polimérica, formando micropartículas semipermeáveis (YOW; ROUTH, 2006, apud LORENZ, 2009). No entanto Covizzi et al. (2007) caracterizam este método de imobilização celular como “engaiolamento”, diferenciado da microencapsulação em que as células ficam envoltas em uma ou mais membranas e não há malhas envolvendo as células.

Silva et al., 2003 relatam que as micropartículas imobilizantes de células podem ser do tipo microcápsulas, formando um sistema reservatório contendo a substância ativa revestida por polímeros de espessuras variáveis, que constituem a membrana da cápsula ou do tipo microesferas, formando sistemas matriciais onde a substância ativa se encontra uniformemente disperso e/ou dissolvido numa rede polimérica.

A maioria dos pesquisadores utiliza o termo microencapsulação para todos os processos de formação de micropartículas (SILVA et al., 2003).

A microencapsulação consiste em formar cápsulas com alto grau de desidratação e, além de constituir um grande potencial para a conservação dos microorganismos (HANSEN et al., 2002), imobiliza as células possibilitando a sua reutilização na produção de metabólitos de interesse industrial (KAILASAPATHY; LAM, 2005; GROBOILLOT, et al., 1993), confere proteção contra efeito bactericida de ambientes agressivos como baixas temperaturas de congelamento, presença de oxigênio, alta acidez do suco gástrico e outras condições do trânsito gastrintestinal (KRASAEKOOPT et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2007). As micropartículas formadas no processo da microencapsulação são constituídas pelo material de parede, ou encapsulante, e pelo material ativo (encapsulado) (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Comercialmente as micropartículas têm tipicamente um diâmetro entre 3 a 1000 μm e contêm de 10 a 90% do material ativo. As partículas podem apresentar diferentes tipos de morfologia, podendo ser classificadas em: regular (esférica ou ovalada) ou irregular. A regularidade do formato das micropartículas depende, principalmente, da natureza do material encapsulante (PATRICK, 1984; SANTOS; FERREIRA e GROSSO, 2000).

As principais características das microcápsulas serem observadas são: estrutura geral externa e interna, tamanho e distribuição do tamanho das partículas, composição do material de parede e do material ativo, rendimento e atividade do encapsulador; comportamento de liberação, propriedades físicas, comportamento de liberação *in vitro* e estabilidade dependente das condições intrínsecas da cápsula e das utilizadas para estocagem (SANTOS; FERREIRA e GROSSO, 2000).

O passo inicial na encapsulação é a seleção do material de parede adequado. Substâncias de revestimento são basicamente materiais formadores de filme que podem ser selecionados a partir de uma variedade de polímeros naturais ou sintéticos, dependendo do material a ser revestido e das características desejadas nas microcápsulas (CUI et al., 2000). O passo seguinte é a preparação das microcápsulas.

Diversos métodos têm sido propostos para a produção de microcápsulas (ISLAS, 2002; TRINDADE et al., 2002; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA 2008, SEMYONOVE, et al., 2010). Os mais comumente utilizados são divididos em físico-químicos (coacervação, sol-gel), químicos (polimerização) e físicos (*spray drying*, *spray*

chilling).

A seleção do método está em função do pressuposto, dos custos, das propriedades dos materiais a encapsular, do tamanho desejado das microcápsulas/microesferas, da aplicação e dos mecanismos de liberação (ISLÃS, 2002).

A microencapsulação pelo *spray drying* é um dos métodos mais utilizados na microencapsulação de micro-organismos. Consiste em um processo de obtenção de micropartículas que se baseia na aspersão de um fluido em uma corrente de ar quente (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). A possibilidade de transformar soluções em partículas sólidas é uma das vantagens encontrada neste processo, permitindo o trabalho com microcápsulas na forma de pó.

O tamanho médio de partículas é de 5 a 500 μm (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; TRINDADE; GROSSO, 2003). Comparado com outras técnicas de microencapsulação, esta tem uma grande vantagem por produzir microcápsulas em um processo de operação contínuo e relativamente simples, (RÉ, 1998), tendo facilidade do seu uso em escala industrial, produzindo grande quantidade de microcápsulas de forma econômica e eficaz (ANAL ; SINGH, 2007). Porém tem como inconveniente o uso de calor, capaz de afetar as propriedades de polímeros e agente ativo termo-sensível.

Os fatores de formulação que influenciam as características das microcápsulas são: a concentração do polímero, a temperatura e a velocidade de alimentação do sistema (CHANDRAMAOU LI et al.; 2003). A eficiência de encapsulação varia normalmente entre 70 e 85%, independentemente dos parâmetros do processo (SILVA et al. 2003).

Diferentes polímeros são utilizados como material de parede na microencapsulação de diversos materiais. Em micro-organismos são utilizados polímeros de natureza biológica, tais como alginato, k-carragenana, gelana e xantana (BERTOLINI ,1999; SEMYONOV, 2010).

O encapsulante ideal deve ter baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser de fácil manipulação durante o processo; ter baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos; deve ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o

ingrediente ativo; não ser reativo com o material a ser encapsulado; (SHAHID; HAN, 1993). Deve ainda ter habilidade de selar, segurar ou “engaiolar” o material ativo dentro da estrutura da cápsula (COVIZZI, et al. 2007).

Os alginatos são um dos polímeros mais utilizados na imobilização e microencapsulação de células. Eles são produzidos por bactérias e por algas marinhas marrons. Pertencem a uma família de polissacarídeos lineares não ramificados (GARCIA-CRUZ, 2008).

Os alginatos utilizados na microencapsulação normalmente estão na forma de sais hidrossolúveis, nos quais incluem: ácido algínico, alginato de sódio, alginato de potássio, alginato de amônio, alginato de cálcio, alginato de propilenoglicol (OAKENFULL, 1987).

O uso do alginato é favorável porque é mais barato, mais simples e de maior biocompatibilidade (TANAKA; MASATOSE; VELERY 1984; MARTINSEN; SKAJAK-BREAK; SMIDSROD, 1997). No entanto, o gel de alginato é suscetível à desintegração na presença de excesso de agentes quelantes de íons de Ca^{2+} e ambiente químico severo, como pH muito baixo (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH 2003).

Apesar de alguns estudos mostrarem os sais de alginato e a sua associação com outros polímeros orgânicos, como ideal para o material de parede de microcápsulas bacterianas, estes compostos não formam uma barreira eficiente em algumas condições, principalmente em ambiente ácido como o encontrado no trato gastrintestinal (YOO et al. 1996). Com isso, se torna necessário o desenvolvimento de novos polímeros com finalidade encapsulante para uma aplicação comercial.

A utilização de polímeros produzidos pelas bactérias láticas com finalidade de proteção das próprias bactérias láticas, ainda não consta em literatura, sendo uma possibilidade que deve ser pesquisada, já que no ambiente natural estes polímeros são produzidos para proteger os micro-organismos de fatores ambientais agressivos. Assim, este trabalho propõe um estudo da utilização da dextrana nativa, um biopolímero (exopolissacarídeo) produzido pela linhagem de bactéria lática *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, para microencapsular a bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus*-La 5.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Micro-organismo microencapsulado

Utilizou-se a linhagem de *Lactobacillus acidophilus* La-5, (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca), uma bactéria probiótica de uso comercial.

7.2.2 Polímeros utilizados

Foi utilizado o alginato de sódio (marca nuclear) e dextrana (1-6), polímero extraído da linhagem nativa *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, isolada de repolho coletado na região do semi-árido baiano.

7.2.2 Preparo da bactéria para a formação das microcápsulas

A linhagem liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi reidratada em solução salina (NaCl 0,85%), inoculada em caldo MRS e incubada a 35°C por 18h. Após este período a cultura foi centrifugada a 8150 x g a 4°C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em solução salina. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes e realizou-se imediatamente a contagem das células, utilizando a técnica de semeadura por profundidade no agar MRS.

7.2.3 Preparo da suspensão

Utilizou-se a formulação recomendada pelo fabricante do aparelho do *spray drying* (Büchi), que consiste em: 1% (m/v) de leite em pó desnatado; 1% (m/v) de glicose; 3% (m/v) da gelatina (neste trabalho substituído pela dextrana e alginato) e 1% (m/v) do concentrado celular (substituído por 50 mL da solução do concentrado de células de *Lactobacillus acidophilus* La-5, equivalente a $4,5 \times 10^{10}$ UFC/mL). Foram preparados 500 mL de cada formulação (Quadro 1).

O leite e a glicose foram dissolvidos separadamente, sendo depois misturados aos polímeros previamente dissolvidos em água a 25°C sob agitação de 150 rpm e finalmente acrescentado à solução do concentrado celular.

Formulações	Leite desnatado % (m/v)	Glicose % (m/v)	Sol. conc. de <i>L. acidophilus</i>	Polímero % (mv)
1 - Dextrana	1,0	1,0	50mL	5,0
2 - Alginato	1,0	1,0	50mL	3,0
3 - Dextrana + alginato	1,0	1,0	50mL	5,0 / 3,0

Quadro 1. Formulações para a formação das microesferas pelo *spray drying*

7.2.4 Formação das microcápsulas

Foi utilizado o aparelho *spray drying* laboratorial (*B-290 mini spray dryer, Büchi, Flawil, Suíça*) (Figura 1) no processo da formação de microcápsulas. As condições de operação estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Condições de operação para a formação de microcápsulas contendo *L. acidophilus* La-5, pelo processo de atomização em *spray drying*

Parâmetros	Condições operacionais
Temperatura de entrada (°C)	120
Temperatura de saída (°C)	77
Fluxo do ar (L ⁻ⁿ)	439
Fluxo de operação (mL min ⁻¹)	6
Tempo total de operação (min)	90
Diâmetro da agulha (mm)	2,0



Figura 1. *Spray drying* utilizado na formação das microcápsulas

Foi determinada a umidade das microcápsulas, logo após o processo do *spray drying* pelo método clássico, gravimetricamente, por perda de massa em estufa a 105 °C até obtenção da massa constante, de acordo com o procedimento descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). As análises foram realizadas em triplicatas.

7.2.5. Análises morfológicas das microcápsulas

7.2.5.1 Análise da distribuição de tamanho das microcápsulas

Foi determinado o tamanho das microcápsulas obtidas nas três formulações utilizando o aparelho Analisador de Tamanho de Partículas por Difração à Laser Mastersizer S, modelo S-MAM 5005 da marca Malvern. Para cada amostra foram realizadas 2 replicatas com 5 leituras cada. As características do processo constam na tabela 2.

Tabela 2. Características do processo da análise de distribuição do tamanho das partículas das microesferas contendo *L. acidophilus* La-5 formadas em *spray drying*.

Módulo de análise	Unidade da suspensão da amostra
Solvente	metanol
Faixa de Análise	0,05 a 900 μ
Condições ambientais (T ^o laboratório)	20 \pm 2°C

7.2.5.2 Análise das partículas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

A morfologia das microcápsulas foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura; os materiais microencapsulados foram pulverizados no *stubs* metálico que continham uma fita dupla face e secados a 50°C por 3 horas. As amostras foram metalizadas com ouro em pó (metalizador EMITEC-K550 por 4 minutos sob corrente de 25mW) e depois visualizado no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) marca Zeiss DSM982 (Digital Scanning Microscope, modelo LEO 982) com filamento de emissão de campo fabricado pela CARL ZEISS SMT GmbH, Alemanha, com aumento de 500 e 1000 vezes, onde foram observados o tamanho das cápsulas e a presença de rachaduras. Estes procedimentos foram realizados logo após o processo do *spray drying*.

A observação da parede, do interior e da distribuição do recheio foi realizada utilizando-se a metodologia de Santos, Fávaro-Trindade e Grosso (2005), com pequenas adaptações, em que camadas finas das amostras de pó congeladas foram colocadas em placas de Petri, procedendo-se sobre as amostras, em todas as direções, sucessivos cortes com lâmina metálica (de barbear). Também se utilizou amostras maceradas (com pistilo no almofariz), visando observar as células de *L. acidophilus* misturadas à matriz polissacarídica. As amostras maceradas foram visualizadas no microscópio ótico e no MEV.

7.2.5.3 Viabilidade das células durante o período de estocagem

Inicialmente foram realizadas contagens de células bacterianas nos três tipos de suspensões, visando determinar a concentração de células bacterianas antes das suspensões serem atomizadas no *spray drying*.

A determinação da viabilidade das células nas microcápsulas foi realizada mensalmente em um período de 120 dias. Durante este período as microcápsulas ficaram acondicionadas em temperatura de refrigeração (4 °C).

Foram diluídas 100 mg de cada amostra em 9 mL de solução salina (10^{-2}), homogeneizadas na incubadora *shaker* (Nova Técnica) em 150 rpm a 28 °C por 1h, para liberação das células. Em seguida prosseguiu-se com as demais diluições seriadas até 10^{-7} . Todas as diluições foram semeadas por profundidades no agar MRS em triplicatas e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. Após este período procedeu-se a contagem das colônias. Os resultados foram expressos em Log de UFC de *L. acidophilus* por grama de microcápsulas.

A percentagem de sobrevivência dos lactobacilos de cada amostra foi calculada de acordo com a fórmula: $\text{viabilidade} = (100 \times N^*/N^*_o)$, onde N^*_o é o número de bactérias expresso em Log UFC/mL da suspensão e N^* é o número de bactérias expresso em Log UFC/g nas microcápsulas

7.2.7 Dissolução das microcápsulas

Foi avaliado o tempo de dissolução das microcápsulas constituído pelo polímero EPS (5% m/v) em condições ácidas (pH 1,5) e em condições alcalinas (pH 8,0). Este teste foi realizado em triplicata no dissolutor marca Nova Ética modelo 299. O procedimento de dissolução foi de acordo com o especificado pela *United States Pharmacopeia* (USP NF, 2007), onde 10 mg das cápsulas ficaram imersas em 900 mL de solução HCl 0,1N (condição ácida) e tampão fosfato pH 8,0 (condição alcalina) a 35 °C em 75 rpm por 2h. Após este período foram retiradas alíquotas de cada solução e realizado contagem direta das células de lactobacilos pela câmara de Newbauer. A contagem foi realizada em triplicata. A percentagem de dissolução das microcápsulas foi determinada pela liberação das células de lactobacilos no meio, onde foi utilizado a seguinte fórmula: $\text{dissolução das cápsulas} = (100 \times M^*/D^*_{2h})$, onde D^*_{2h} é o número de

células presentes em 1 mL do meio de dissolução no período de 2h e M é o número de células presentes em 1 g de pó de microcápsulas.

7.2.8 Delineamento estatístico

Foi utilizado o programa Statistica 6.0 para a realização da ANOVA. As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey.

7.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

7.3.1 Microencapsulação das células de *L. acidophilus*

As microcápsulas contendo os três tipos de formulações de acordo com a matriz encapsulante 1- (Dextrana), 2- (Alginato) e 3 - (alginato/dextrana), após o processo da formação das microcápsulas pelo *spray drying* originou um pó fino de cor esbranquiçado, aspecto este, conferido a todas as formulações (figura. 2).

Logo após o processo da microencapsulação as microcápsulas constituídas pela dextrana como material de parede apresentaram umidade de 3%, e as microcápsulas contendo alginato ou alginato/dextrana apresentaram umidade de 4%.



Figura 2. Microcápsulas de *L. acidophilus* La-5 contendo como matriz (1.Dextrana; 2.alginato; 3.alginato/dextrana)

As características das microcápsulas das três formulações obtidas pelo *spray drying* praticamente foram às mesmas no microscópio ótico (figura 3) e no microscópio eletrônico (figuras 4, 5 e 6), originando microcápsulas em diferentes tamanhos, fisicamente íntegras (sem rachaduras), não porosas (pelo fato delas não serem porosas aprisionam melhor as células e conferem menor permeabilidade a gases), de superfície irregulares (a maioria – figuras 4a, 5a e 6a) e de superfícies lisas e regulares (as de maiores tamanhos – 5b e 6b). As cápsulas de superfícies irregulares apresentaram concavidades ou achatamentos. Características estas, observadas por Lorenz (2009) nas microcápsulas de *L. acidophilus* formadas no *spray dryer*, contendo leite em pó, como material encapsulante, e também por Favaro-Trindade e Grosso (2002), quando microencapsularam células de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidum bacterium lactis* (Bb-12) por *spray drying*, utilizando como material de parede o celacefato, que é um polímero à base de celulose acetilado. Segundo O’Riordan et al. (2001) características como concavidades ou achatamentos, presentes na superfície das cápsulas, são resultados das altas temperaturas de secagem aplicadas pelo *spray dryer*. Tais concavidades são resultantes do murchamento das cápsulas ocas. Lian et al. (2002) afirmam que a ocorrência desse efeito depende do tipo de material encapsulante utilizado no processo.

Na amostra das microcápsulas contendo somente dextrana como material encapsulante, algumas micropartículas estavam com abertura, demonstrando serem ocas (figura 3b). Ao estudar a parte interna destas microcápsulas pode-se constatar que os micro-organismos não ficam na cavidade, e sim impregnados nos polímeros, formando uma suspensão (figura 7). Esta mesma observação foi feita por Rosenberg, Talmon e Kopelman (1985) com relação as microcápsulas constituídas pela goma arábica produzidas pelo processo de atomização.

Nas microcápsulas maceradas e coradas pelo método de Gram, quando visualizadas pela microscopia ótica, aparecem bacilos longos Gram positivos, típicos de *L. acidophilus* (figura 8a) misturados ao polímero dissolvido em água. No MEV (figura 8b) são observadas estruturas filamentosas, sugerindo ser células dos lactobacilos impregnadas no polímero. Esta é uma característica de micropartículas do tipo microesferas heterogêneas, onde a substância ativa se encontra uniformemente

suspensa em uma rede polimérica formando um sistema matricial, e pelo conceito de Silva et al. (2003) não seriam denominadas de microcápsulas e sim microesferas.

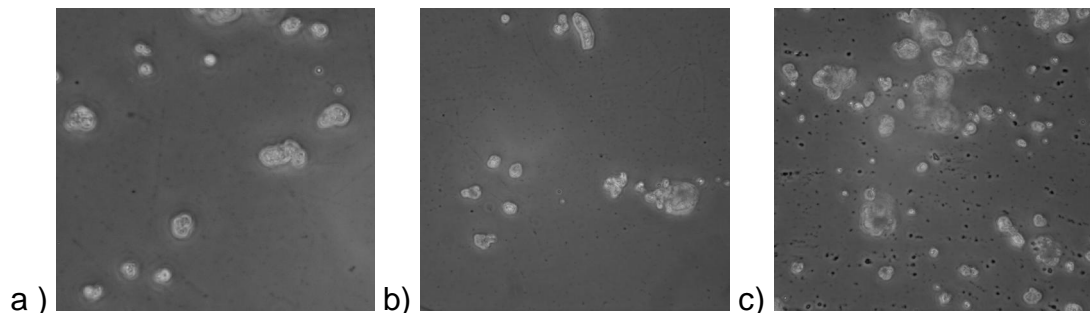


Figura 3. Visualização das microcápsulas obtidas através da preparação com a) dextrana, b) alginato, c) alg/dextrana através de microscopia ótica (400x).

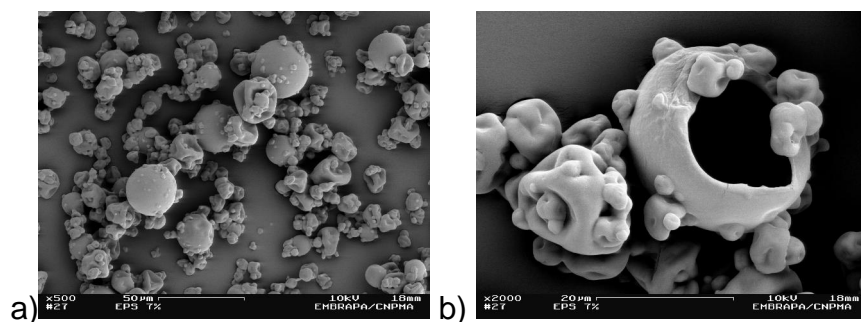


Figura 4. Micrografia das microcápsulas obtidas com a dextrana utilizando microscopia eletrônica de varredura na magnitude de 500x (a) e 2000x (b).

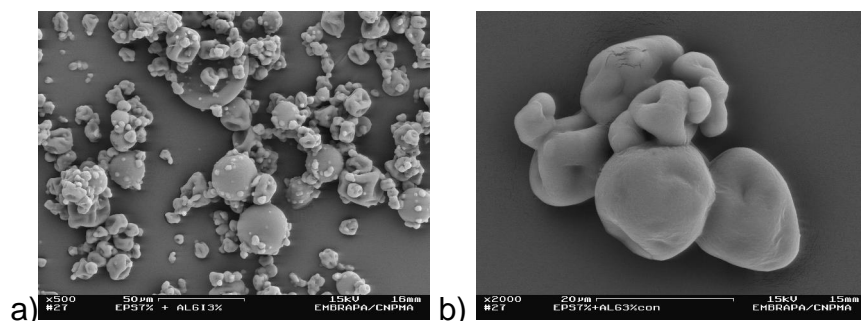


Figura 5. Micrografia das microcápsulas obtidas com a dextrana+alginato utilizando microscopia eletrônica de varredura na magnitude de 500x (a) e 2000x (b).

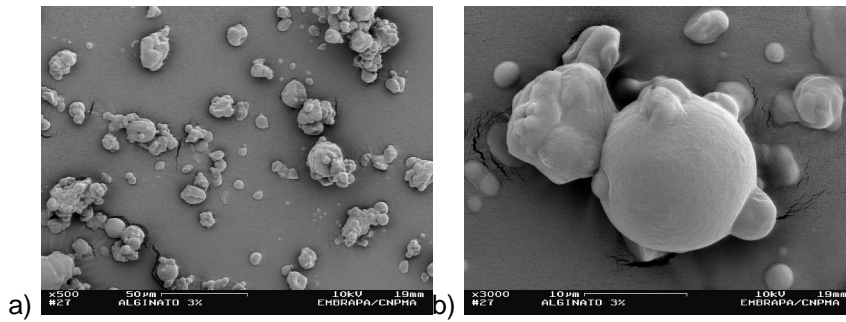


Figura 6. Micrografia das microcápsulas obtidas com o alginato utilizando microscopia eletrônica de varredura na magnitude de 500x (a) e 2000x (b).

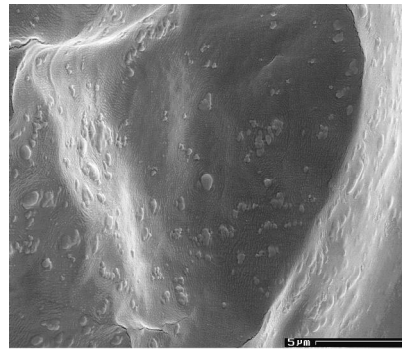


Figura 7. Micrografia do interior da microcápsulas obtidas com a dextrana utilizando microscopia eletrônica de varredura na magnitude de 10000x.

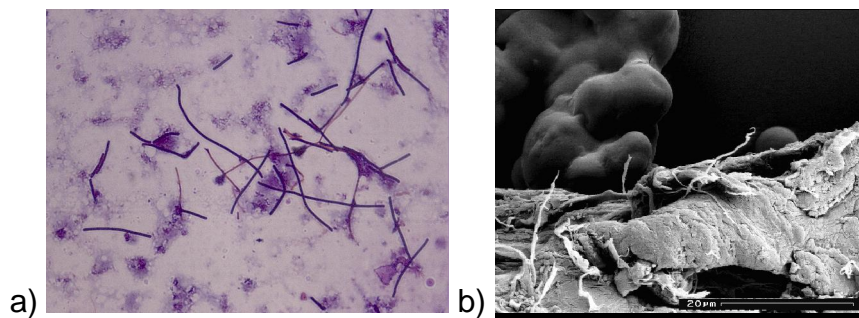


Figura 8. Micrografia do macerado das microcápsulas obtidas com a dextrana utilizando microscopia ótica (1000x) e microscopia eletrônica de varredura (10000x).

7.3.3 Distribuição dos tamanhos das microcápsulas

A tabela 3 apresenta as médias volumétricas obtidas nas microesferas formadas pelas três formulações. A análise granulométrica revelou que as micropartículas apresentam tamanho médio de 8,6 μm (dextrana), 9,2 μm e 9,1 μm (alginato e alginato + dextrana, respectivamente). Estes tamanhos estão dentro da faixa de tamanho de partículas produzidas por atomização, que é de 5 a 150 μm (SANTOS; TRINDADE; GROSSO, 2005; FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO E ROCHA, 2008). Favaro-Trindade e Grosso (2002) produziram microcápsulas contendo *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* (Lb-12) com tamanho médio de 22 μm .

Tabela 3. Médias volumétricas obtidas na análise por difração a laser.

<i>Amostras de Microesferas</i> (Tipos de encapsulantes)	<i>D [4,3] (μm) Replicata 1</i>	<i>D [4,3] (μm) Replicata 2</i>
Dextrana	8,8 \pm 0,1	8,4 \pm 0,0
Alginato	9,1 \pm 0,1	9,3 \pm 0,1
alginato + dextrana	9,1 \pm 0,0	9,1 \pm 0,0

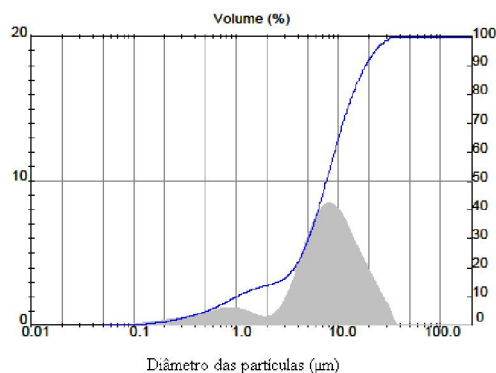


Figura 9. Distribuição granulométrica das microcápsulas obtidas das três formulações

Os três tratamentos apresentaram uma distribuição de tamanho bimodal (Fig. 9) situada em uma faixa entre 0,05 e 50 μm aproximadamente. O que mostra uma produção

heterogênea de partículas pelo processo de formação de partículas pelo *spray drying* empregado, confirmando às análises morfológicas que houve variação de tamanho das partículas.

7.3.4 Viabilidade das células de *L. acidophilus* nas microesferas formadas pelo *spray drying*.

A tabela 4 mostra os valores das determinações do pH e da concentração de *L. acidophilus* em cada suspensão antes de serem desidratadas no *spray drying*. A suspensão contendo o polímero dextrana apresentou o pH menos ácido em comparação às outras suspensões. Processos onde as células ficam submetidas a pH baixo e temperaturas altas comprometem bastante a viabilidade das células.

Tabela 4. Medida de pH e concentração celular de *L. acidophilus* La-5 de cada suspensão preparadas para ser processada no *spray drying*, temperatura de entrada 120 °C, temperatura de saída 77 °C.

Características das suspensões	Polímeros utilizados na microencapsulação de <i>L. acidophilus</i> La-5		
	Dextrana	Alginato de sódio	Alginato de sódio + dextrana
pH	6,3	5,3	5,4
Log UFC/mL	9,30±0,06	9,90±0,03	9,08±0,02

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que há diferença significativa (p<0,05) entre as médias.

Analisando a tabela 5 e a figura 10 pode-se observar que após o processo da desidratação com a formação das microcápsulas, os números de células viáveis decresceram de forma significativa (p<0,05) entre as três formulações, sendo que as microcápsulas constituídas pela dextrana a sobrevivência dos *L. acidophilus* foi maior, 72% comparadas as microcápsulas constituídas pelo alginato (55%) e pela mistura destes dois polímeros (62%). Estes resultados sugerem que para as microcápsulas com dextrana protegem mais os micro-organismos em altas temperaturas do que as

formuladas com alginato. Isto pode ser confirmado quando se comparam as microcápsulas que contêm os dois polímeros, com as que contêm somente alginato, cuja contagem de células viáveis foi maior nas microcápsulas contendo a mistura dos dois polímeros (tabelas 4 e 5).

Tabela 5. Acompanhamento dos parâmetros pH umidade e viabilidade dos *L. acidophilus* nas microesferas formadas pelo *spray drying* com temperatura de entrada 120 °C, temperatura de saída 77 °C, estocadas a 4 °C.

Dias	Polímeros utilizados no processo da microencapsulação								
	Dextrana			Alginato			Alginato /dextrana		
	umid. %	pH	Log UFC/g	umid. %	pH	Log UFC/g	umid. %	pH	Log UFC/g
0	3,2±0,17	4,1	6,65±0,02 ^a	4,3±0,45	4,5	5,47±0,07 ^c	4,3±0,56	4,5	5,64±0,01 ^p
30	3,7±0,49	4,1	6,15±0,03 ^a	4,9±0,32	4,9	4,49±0,04 ^b	4,9±0,72	4,2	< 2 ^q
60	9,0±0,32	3,8	3,90±0,03 ^a	12,0±0,4	3,8	3,16±0,02 ^b	13,0±0,17	4,1	< 2 ^r
90	12,0±0,07	3,5	2,70±0,04 ^a	13,0±0,4	3,5	< 2 ^b	13,0±0,14	3,5	< 2 ^s
120	12,3±0,04	3,3	< 2	13,0±0,07	3,5	< 2	13,4±0,12	3,5	< 2

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que há diferença significativa (p<0,05) entre as médias

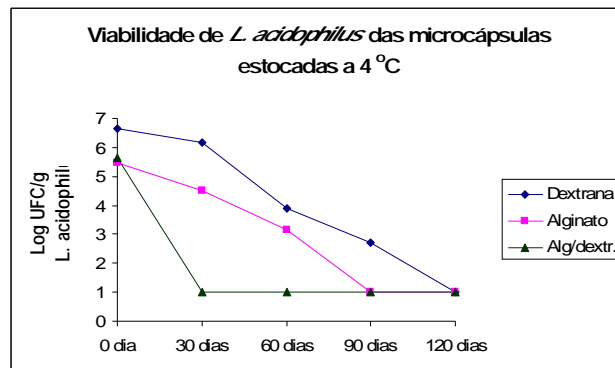


Figura 10. Viabilidade dos *L. acidophilus* nas microesferas formadas pelo *spray drying* temperatura de entrada 98 °C, temperatura de saída 65 °C, estocadas a 4 °C.

A explicação do decréscimo da viabilidade do *L. acidophilus* La-5 nas microcápsulas pode ser devido ao baixo pH já nas suspensões associado ao aumento

gradual da umidade e exposição das células a alta temperatura de entrada (120 °C) com longo tempo de exposição na temperatura de saída (75 °C/90 minutos). Favaro-Trindade e Grosso (2002) utilizaram os parâmetros temperatura semelhantes (entrada 130 °C e a saída 75 °C) para a microencapsulação de células de *Lactobacillus acidophilus* (La-05) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) no *spray drying*, obtendo melhores resultados, porém utilizando como material de parede o cefalato, um tipo de celulose acetilado. Neste experimento, o número de células viáveis de *B. lactis* ficou praticamente inalterado, já para *L. acidophilus* houve uma redução de dois ciclos logarítmicos, indicando que este último micro-organismo se comporta de forma mais sensível a altas temperaturas. Comparando ao presente experimento a redução no número de células de *L. acidophilus* La-5 imobilizadas nas microcápsulas constituídas pela dextrana, alginato e dextrana/alginato foi 2,65, 4,43 e 3,44 ciclos log de UFC/g , respectivamente.

No experimento com microencapsulação de *L. acidophilus* (XH1) no *spray drying* (temperatura de entrada 170 e temperatura de saída 85-90) realizado por Zhao et al, (2008), utilizando como material de parede -cyclodextrana e goma acácia na proporção de 9:1 (m/m), houve um decréscimo das células de 2,0 ciclos log no números de células, semelhante com a perda das células das microcápsulas com dextrana que foi de 2,65 ciclos log.

Altas temperaturas de entrada (>120 °C) no processo do *spray drying* resultam em altas temperaturas de saída (>60 °C) e conseqüentemente redução na viabilidade das células bacterianas. O’Riordan et al. (2001) observou este fato ao trabalhar com microencapsulação de bifidobactéria. Em experimentos contendo outros tipos de

bactérias probióticas também se observaram uma diminuição da viabilidade celular, como efeito de altas temperaturas de entrada no *spray drying* (GARDINER et al., 2000).

Quanto à manutenção das células viáveis nas microcápsulas no período estocado, as microcápsulas formuladas com a dextrana também apresentaram maior número de células viáveis ($p < 0,05$) no final de 90 dias de armazenamento (41%, decréscimo de 3,95 ciclos log.) quando comparados com as microcápsulas contendo as outras formulações que apresentaram sobrevivência abaixo de 30%. Entretanto, com 120 dias também o número de células viáveis ficou abaixo de 30,08%. A viabilidade das microcápsulas contendo a mistura dos dois polímeros durante a estocagem foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que as outras, pois já com 30 dias a sobrevivência das células ficou abaixo de 30% (Figura 9).

Lorenz (2009) observou uma diminuição na viabilidade das células de 1,75 ciclos Log UFC/g em microcápsulas de *L. acidophilus* La-5, tendo como material encapsulante leite em pó (12% m/v). Neste experimento eles utilizaram o método do *spray drying* operando com a temperatura de entrada de ar de 150 °C e temperatura de saída entre 50 a 60 °C e armazenamento do produto a -18° C por 60 dias. Nas microcápsulas contendo dextrana o decréscimo foi de 3,90 log no mesmo período de estocagem, porém as cápsulas estavam armazenadas a 4 °C. Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento maior será o tempo de sobrevivência dos micro-organismos.

Em função dos resultados apresentados, foi realizado outro experimento, modificando os parâmetros da temperatura para confirmar o envolvimento deste parâmetro na perda da viabilidade das células. Neste segundo experimento a temperatura de entrada foi 98 °C e a de saída 65 °C.

Tabela 6. Medida de pH e concentração celular de *L. acidophilus* La-5 de cada suspensão preparadas para ser processada no *spray drying*, temperatura de entrada 98 °C, temperatura de saída 65 °C

Características das suspensões	Polímeros utilizados na microencapsulação de <i>L. acidophilus</i> La-5		
	Dextrana	Alginato de sódio	Alginato/dextrana
pH	4,8	4,6	4,1
Log UFC/mL	9,49±0,01	9,76±0,04	9,28±0,02

Tabela 7. Acompanhamento dos parâmetros de pH, umidade e viabilidade dos *L. acidophilus* nas microesferas formadas pelo *spray drying* (temperatura de entrada 98 °C, temperatura de saída 65 °C), estocadas a 4 °C durante 120 dias.

Dias	Polímeros utilizados no processo da microencapsulação								
	Dextrana			Alginato			Alginato/dextrana		
	Umidade %	pH	Log UFC/g	umidade %	pH	Log UFC/g	umidade %	pH	Log UFC/g
0	3,5±0,19	4,5	8,91±0,11 ^a	4,3±0,01	4,7	7,20±0,03 ^b	5,0±0,17	4,6	7,18±0,06 ^b
30	4,0±0,15	4,3	7,25±0,08 ^a	4,0±0,03	4,3	6,30±0,09 ^b	7,3±0,09	4,0	6,10±0,03 ^c
60	12,0±0,04	3,8	6,98±0,02 ^a	12,0±0,05	4,0	6,18±0,06 ^a	12,0±0,02	3,8	6,23±0,02 ^a
90	12,6±0,36	3,2	6,28±0,006 ^a	12,8±0,21	3,5	5,69±0,056 ^b	13,3±0,31	2,7	4,13±0,055 ^c
120	12,8±0,003	3,1	6,21±0,004 ^a	12,2±0,005	3,3	5,56±0,00 ^b	12,9±0,06	2,5	4,04 ±0,04 ^c

* Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam que há diferença significativa (p<0,05) entre as médias

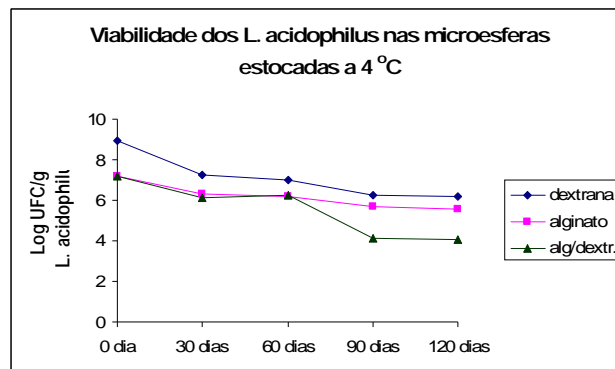


Figura 11. Viabilidade dos *L. acidophilus* nas microesferas formadas pelo *spray drying* temperatura de entrada 98, temperatura de saída 65, estocadas a 4 °C.

Analisando os dados das tabelas 6 e 7 e da figura 11 nota-se que houve maior sobrevivência das células bacterianas em todas as formulações, no segundo processo da microencapsulação no *spray drying*, em que foi utilizado temperaturas mais baixas, apresentando uma sobrevivência de 94%, 74% e 77% e decréscimo no número de ciclos log da UFC/g de 0,58, 2,56 e 2,10 nas microcápsulas formuladas com EPS, alginato e alginato/dextrana, respectivamente. Também neste segundo experimento as microcápsulas contendo dextrana apresentaram significativamente ($p < 0,05$) maior sobrevivência das células no processo da atomização por *spray drying* quando comparada com as outras formulações de polímero.

Quanto à sobrevivência das células no período de 90 dias de estocagem, as microcápsulas constituídas por dextrana tiveram uma sobrevivência celular de 71% , correspondendo a um decréscimo no número de células de 2,63 ciclos log UFC/g. As microcápsulas contendo alginato a sobrevivência foi de 79% com decréscimo de 1,51 ciclos log UFC/g, e para as microcápsulas contendo a mistura dos dois polímeros a sobrevivência foi de 58% com decréscimo de 3,05 ciclos log UFC/g. Em 120 dias de estocagem, o percentual de sobrevivência nas microcápsulas com dextrana, alginato e alginato/dextrana foi: 70%, 77% e 56%, respectivamente. Neste segundo experimento o polímero alginato teve um comportamento melhor com relação à manutenção da viabilidade das células nas microcápsulas durante o período de estocagem. Indicando que no processo de microencapsulação pela atomização em *spray drying* em temperaturas de 120 °C, obtêm-se melhores resultados com o polímero dextrana, quando comparado ao polímero alginato. E, como no primeiro experimento, a mistura da dextrana com o alginato teve resultados inferiores na sobrevivência das células de \angle .

acidophilus. Somente no período de 60 dias a sobrevivência das células nos três tipos de microcápsulas não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$).

O *spray drying* é uma tecnologia econômica e eficaz, no entanto provoca alta mortalidade das células em consequência do estresse causado pela desidratação, alta temperatura e pressão de oxigênio imposta as bactérias durante o processo (ANAL; SINGH, 2007). Daí a necessidade de se realizar estudos de novos materiais encapsulantes para conseguir maior proteção possível aos micro-organismos, na utilização desta técnica.

7.3.5 Dissolução das microcápsulas

Os resultados presentes na tabela 8 indicam que as condições ácida e alcalina não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) na dissolução das microcápsulas. Em duas horas de exposição no organismo, provavelmente as células serão liberadas de forma idêntica, nas duas condições: estomacal (pH 1,5) e intestinal (pH 8,0). A percentagem de liberação foi alta nas duas condições, o que poderá afetar a sobrevivência das células durante o trânsito gastrointestinal.

Tabela 8. Dissolução das microcápsulas de *L. acidophilus* La-5 em meio ácido e em meio alcalino exposto por 2h no dissolutor.

<i>Condições do meio de dissolução</i>	Liberação das células de <i>L. acidophilus</i> La-5 nas microcápsulas(contagem total = 10,08±0,87 cél/g)*	
	Log no de células/g	% liberação
pH 1,5	6,35±0,55 ^a	63,66
pH 8,0	7,05±0,85 ^a	69,94

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 2). Letras minúsculas iguais, na mesma coluna, indicam que não há diferença significativa (p<0,05) entre as médias

Diversos trabalhos realizados sobre a sobrevivência de linhagens de *L. acidophilus* nas condições similares do suco gástrico e intestinal foram realizados (ADHIKARI, et al.,2000; SULTANA, GODWARD, REYNOLDS, 2000; FAVAROTINDADE, 2008). E todos confirmam o decréscimo da viabilidade de células livres nestas condições. Kim, et al, (2008) pesquisaram a sobrevivência de *L. acidophilus* ATCC 43121 em contato com solução pH 1,5, na forma de células livres, e microencapsuladas em matriz de alginato de sódio. Eles observaram destruição completa nas células livres, e um decréscimo de 3 unidade log nas células microencapsuladas com alginato de sódio. Este decréscimo das células microencapsuladas está relacionado não somente a baixa resistência da matriz encapsulante ao suco gástrico, mas também com a porosidade das microcápsulas. Alguns autores sugerem como aumento da resistência das microcápsulas frente à ação dos fluídos gastrintestinais, o revestimento destas com proteínas. Gbassi et al. (2009) revestiram microcápsulas contendo matriz de alginato com proteínas do soro, obtendo grande sobrevivência das bactérias lácticas quando em contato com fluido gastrintestinal simulado.

7.4 CONCLUSÃO

A dextrana sintetizada pela *L. pseudomesenteroides* R2 comportou-se como um polímero resistente ao processo de microencapsulação pelo *spray drying*, formando microcápsulas com as mesmas características morfológicas das microcápsulas de alginato, atingindo a percentagem de sobrevivência dos *L. acidophilus* de 94% em condições mais adequadas do funcionamento do *spray drying*, e mantendo-se a viabilidade destas células nas microcápsulas armazenadas a 4 °C durante 120 dias em torno de 70%, indicando o uso deste polímero como mais uma alternativa de matriz polissacarídica utilizada na microencapsulação de linhagens bacterianas.

PERSPECTIVAS

A realização de experimentos com a aplicação de um planejamento de multivariáveis vai trazer melhor resposta na obtenção de maior número possível de células viáveis durante o tempo de armazenamento, devendo testar diferentes formulações deste polímero, e ajustar as condições ideais de funcionamento do *spray drying* para este propósito.

AGRADECIMENTOS

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Meio Ambiente, Instituto Tecnológico de Alimentos (ITAL).

REFERÊNCIAS

ADHIKARI, K., MUSTAPHA, A., GRUN, I. U.; FERNANDO, L. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1946–1951, 2000.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Review: Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18: 5 240-251, 2007.

BERTOLINI, A. C. Estabilidade de óleo essencial de laranja, linalool e citral microencapsulados em goma arábica por atomização. 1999. 82 f.. Dissertação (Mestrado em ciências da Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

CHANDRAMAOULI, V. I.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* In simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35, 2003.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n.2, p. 143-160, jul./dez. 2007.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian journal of food technology*., v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C.S., PINHO, S.C., ROCHA, G.A. Review: Microencapsulation of food ingredients. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103 – 112, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S. ; GROSSO C. R. F. Microencapsulation of *Lactobacillus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bili. *Journal of Microencapsulation*, 9, 485-494, 2002.

GARCIA-CRUZ, C. H; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. *Química. Nova* vol.31 no.7 São Paulo 2008.

GARDINER, G.E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A.E.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-

derived *probiotic Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and *spray drying*. *App. Environ. Microbiol*, 66: 2605-2612. 2000.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*. V. 129 (1), p 103-105, 2009.

GROBOILLOT, A. F. et al.. Membrane formation by interfacial crosslinking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Food Biotechnology and Bioprocessin*, . 42, 1157-63, 1993.

HANSEN, L. T. Allan-Wojtas, P. M.; Jin Y. L.; Paulson, T. A. et al. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35-45, 2002.

ISLAS, R. P. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los Procesos para la Microencapsulação de Alimentos para Larvas de Espécies Acuícola. Avances em Nutrição Acuícola VI. Memórias del XVI – SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. 2 al 6 de septiembre del 2002, Cancún, Quintana Roo, México.

KAILASAPATHY, K, AND LAM S.H.. Application of encapsulated enzymes to accelerate cheese ripening. *International Dairy Journal*, 15(6-9):929-939, 2005.

KIM, S, J.; CHO, S. Y, KIM, S. H.; O. J.; SHIN, S.; CHA, D. S. ; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Food Science and Technology*. V. 41(3), p 493-500, 2008.

KRASAEKOOPT, W. ;BHANDARI,B.; DEETH. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. *International Dairy Journal*, 13 :1, 3-13, 2003.

LIAN, W.C., HSIAO, H.C., CHOU, C.C. Survival of bifidobacteria after spray drying. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 79–86, 2002.

LORENZ, G. J. *Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de Lactobacillus acidophilus (La-5) e aplicação em sorvete*. Dissertação 79f. (mestrado em Ciências dos Alimentos) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

MARTINSEN, A. A.; SKAJAK-BREAK, G.; SMIDSROD, O, “Comparison of Different Methods for Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Alginates”, *Carbohydrate Polymers.*, 15:171-193, 1997.

MORTAZAVIAN, A., RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R., SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2007.

O’RIORDAN, K.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal Applied Microbiology*, 91, 1059-1066, 2001.

OAKENFULL, D. Gelling agents *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 24(1), 1-25, 1987.

PATRICK, D. B. Microencapsulation and related drug processes. Marcel Dekker. New York, 1984.

ROSENBERG, M.; TALMON, Y.; KOPELMAN, I. J. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, 5, 139-144, 1985.

SANTOS, A. B.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. ; GROSSO C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulasde oleoresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.*,25 :2, 2005.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas, uma alternative viável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, ano III, 16, 26-30, 2000..

SEMYONOV, D. RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L. NADYA GUREVICH, N. SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43,193–202, 2010.

SHAHID, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. Critical Review in: *Food Science and Nutrition*, 33: 6, 501-547, 1993.

SILVA, D. A., BRITO, A.C.F., DE PAULA, R.C.M., FEITOSA, J. P. A., PAULA, H. C.B., *Carbohydrate Polymers*, 54, 229-236, 2003.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. 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, n. 1-2, p. 47-55, 2000.

TANAKA, H.; MASATOSE, M ; VELEKY, I. A. Diffusion characteristic of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 26:1,53-58,1984.

TRINDADE, C. S. F.;GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de alimentos* , Campinas, 37(supl.), 88-93,2003.

YOO, I. K. ; SEONG, G. H.; CHANG, H. N ; PARK, J. K.. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for Lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*,19, 428-433, 1996.

CONCLUSÃO FINAL

Neste trabalho pode-se constatar que os produtos fermentados provenientes do semi-árido baiano constituem um grande potencial na obtenção de bactérias lácticas de interesse biotecnológico, principalmente no que se refere à produção de biopolímeros.

A utilização da Metodologia da Superfície de Resposta (MSR) possibilitou a determinação de regiões de máximo rendimento na produção de EPS, pelos isolados de bactérias láticas, com um número reduzido de ensaios;

A linhagem de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 isolada de repolho fermentado apresenta potencial industrial, por produzir exopolissacarídeos com rendimento de 60 g/L, de forma estável e em curto espaço de tempo.

O EPS extraído do *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 se comportou como um polímero de alta estabilidade térmica, podendo ser utilizado em processos industriais que utilizam altas temperaturas como no processo de formação de microcápsulas pela atomização em *spray drying*,

O processo da formação de microcápsulas contendo na formulação do material encapsulante o polímero dextrana, obteve êxito, uma vez que manteve 94% de sobrevivência em UFC/g de microcápsulas de *L. acidophilus* La-5, imediatamente após o processo de *spray drying*.

Após 120 dias, a viabilidade *L. acidophilus* La-5 nas microcápsulas, armazenadas a 4 °C, foi avaliada como sendo em torno de 70%, indicando a possibilidade de utilizar o exopolissacarídeo dextrana, na formação de microcápsulas, visando a preservação e o aumento do tempo de comercialização desta linhagem.

ANEXO I

IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADOS DA BACTÉRIA LÁTICA R2 PELAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E PELO KIT API 20 (BIOMEREUX)

Característica da Colônia		Característica da Célula	
Cor	Branca	Forma	Cocos
Forma	Circular	Gram	Positivo
Margem	Inteira	Rearranjo	Pares e cadeia pequena
Superfície	Lisa	Presença de Esporos	Não
Textura	Cremosa	Móveis	Imóvel
Briho/Opacidade	Opaca	Requerimento de Oxigênio	Anaeróbio facultativo, preferência microaerofilia

Quadro 1 .Características fenotípicas do isolado de bactéria láctica R2

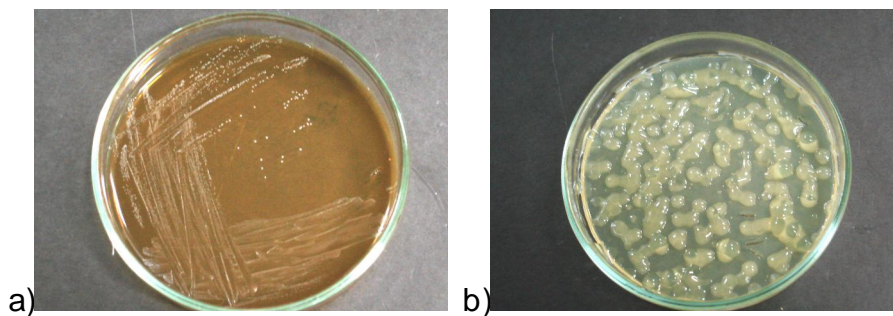


Figura 1. Aspecto das colônias da BL R2 : a) cultivadas em meio MRS, b) cultivadas em meio EPS

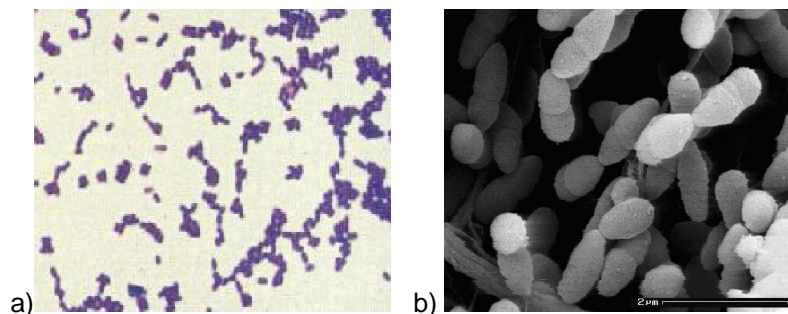
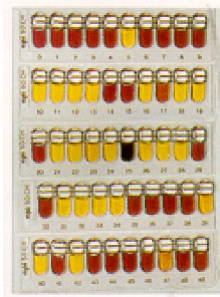


Figura 2 *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2: a) microscopia ótica x100 b)MEV x 20000 .

Testes Preliminares			
Catalase	-	Citrato	-
Indol	-	Uréia	-
Redução de Nitrato	-	Hidrolise de Arginina	-?
Crescimento a 30°C	+	Propionato	-
Crescimento a 37°C	+	Esculina	+
Crescimento a 50°C	-	Vermelho de Metila - Voges Proskauer	PH 4,0+
TSI	Glicose, Sacarose e Lactose+	Amido	-
H₂S	-	Gelatina	-
Tirosina	-	Caseína	+
Proteose do leite	-	NaCl 3%	+
Gás	+	NaCl 6,5%	-

Quadro 2. Testes preliminares para a identificação do isolado de bactéria láctica R2



KIT API 20 (BIMERIEUX)

Fermentação de carboidratos						
1 GLY – glicérol	-	14-SBE – L-sorbose	-	27-CEL – D-celbiose	+	40-TUR – D-turanose
2-ERY – eritríol	-	15-RHA – L-raninose	-	28-MAL – D-maltose	+	41-LYX – D-lixose
3-DARA – D-arabinose	-	16-DUL – dulcitol	-	29-LAC – D-lactose (origem bovina)	+	42-TAG – D-tagatose
4-LARA – L-arabinose	+	17-INO – inositol	-	30-MEL – D-melibiose	+	43-DFUC – D-fucose
5-RIB – D-ribose	+	18-MAN – D-manitol	-	31-SAC – D-sacarose	+	44-LFUC – L-fucose
6-DXYL – D-xilose	+	19-SOR – D-sorbitol	-	32-TER – D-treose	+	45-DARL – D-arabitol
7-LXYL – L-xilose	-	20-MDM – metil-alfa-D- manopiranosido	-	33-NU – inulina	-	46-LARL – L-arabitol
8-ADO – D-adonitol	-	21-MDG – metil-alfa-D- glucopiranosido	+	34-MLZ – D-melezitose	-	47-GNT – glucanato de potássio
9-MDX – metil-beta-D- xilopiranosido	-	22-NAG – N-acetil-glucosamina	-	35-RAF – D-rafinose	+	48-2KG – 2-cetoglucanato de potássio
10-GAL – D-galactose	+	23-AMY – amigdalina	+	36-AMD – amido	-	49-5KG – 5-cetoglucanato de potássio
11-GLU – D-glicose	+	24-ARB – arabinina	+	37-GLYG – glicogénio	-	
12-FRU – D-frutose	+	25-ESC – esculina citrato de ferro	+	38-XLT – xilitol	-	
13-MNE – D-manose	+	26-SAL – salicina	+	39-GEN – gentiobiose	-	

Quadro 3. Resultados dos testes bioquímicos pelo sistema de identificação API (Bimerieux)

ANEXO II

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR ISOLADO DE BACTÉRIA LÁTICA R2

Metodologia utilizada

- **Amplificação do gene RNA ribossomal 16S.** A metodologia consistiu na amplificação do gene RNA ribossomal 16S pela técnica de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias.
- **Sequenciamento.** Os produtos das amplificações foram purificados e submetidos diretamente ao sequenciamento usando o sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram p10f, 765f, 782r e p1100r.
- **Análise filogenética.** As sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e do RDP (<http://rdp.memsu.edu>). Foram então selecionadas sequências de micro-organismos relacionados ao micro-organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências de DNA foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson et al., 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens, utilizando o software incluído no programa MEGA 4.0.

Resultados

- As colônias isoladas obtidas em cultivo em meio sólido (MRS) apresentaram aspecto homogêneo, sem evidências de contaminação. A análise microscópica revelou a presença de bastonetes com coloração Gram negativa para a amostra CPQBA 072-10 DRM.
- Os fragmentos do gene RNA ribossomal 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. Os produtos das amplificações foram purificados em coluna (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento usando o sistema MegaBACE (GE Healthcare).
- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S obtida para a amostra CPQBA 072-10 DRM está apresentada no Anexo I. A árvore filogenética construída a partir das sequências recuperadas da base de dados do GenBank e da amostra CPQBA 072-10 DRM está apresentada nas Figura 1.
- O resultado de identificação é apresentado abaixo:

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 072-10 DRM	Tubo com crescimento bacteriano (R2)	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> Farrow et al. 1989)

Comentários

- A sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPOBA 072-10 DRM** apresentou entre 99% de similaridade com as sequências do gene RNA ribossomal 16S das espécies, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Leuconostoc mesenteroides*, além de várias linhagens de *Leuconostoc* sp. contidas nas bases de dados consultadas.
- A análise filogenética (Figura 1) recuperou a amostra **CPOBA 072-10 DRM** em um agrupamento coeso, com alto valor de bootstrap (91%), juntamente com a linhagem tipo *Leuconostoc pseudomesenteroides*, definindo a identificação da amostra em nível de espécie.

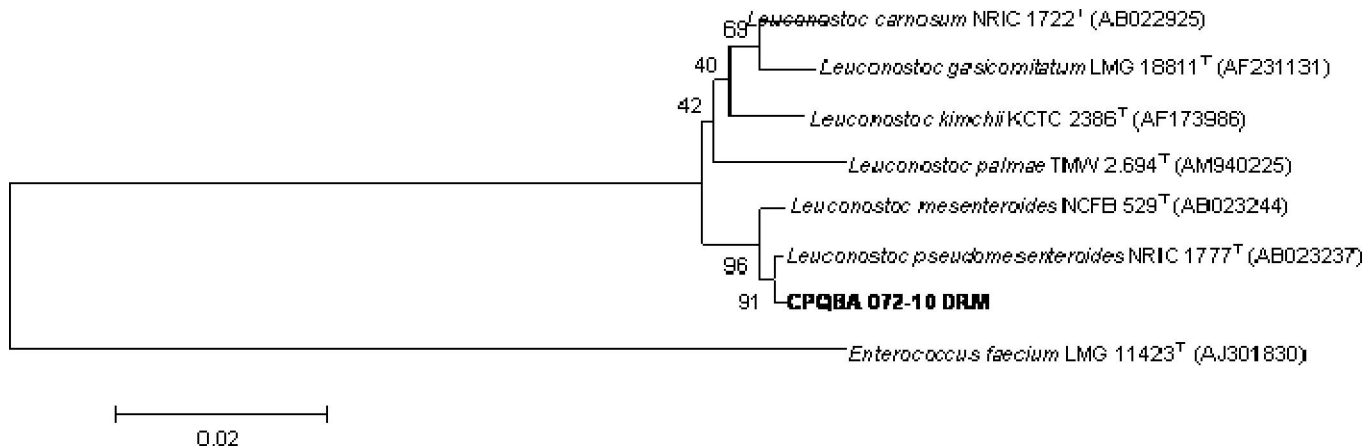


Figura 1. Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra **CPOBA 072-10 DRM** e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados RDP e Genbank.

Anexo I. Sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S da amostra analisada.

>CPQBA 072-10 DRM

```
CGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTG
GAAACAGATGCTAATAACGAATAAACTCAGTGTTCGCATGACACAAAGTT
AAAAGGCGCTTTGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAG
TTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGATTTGAGAG
ACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGG
CTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCC
GCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTCTGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGA
ACAGCTAGAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGG
GACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCAGCGT
TATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAAC
TTGAGTGCAGTAGAGGTAAGTGGACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTA
GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAAC TG
ACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTT
```

AGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATG
TGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTT
TGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTG
GTGCATGGTTCGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
AACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTGAGATGGGCACTCTA
GCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCA
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAA
CGAGTTGCCAACC CGGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTA

REFERÊNCIAS Bibliográficas

Farrow, J.A.E.; Facklam, R.R.; Collins, M.D. (1989) Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 39:279-283.

Kimura, M. (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Saitou, N. & Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & D. G. Higgins. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.

ANEXO III

TESTE DE PATOGENICIDADE *IN VITRO* DO *L. pseudomesenteroides* R2

Ø Atividade de hemolisinas meio: agar sangue

controle positivo: *Staphylococcus aureus* CCMB 284

controle negativo: *Escherichia coli* CCMB 285



L. pseudomesenteroides R2 não hemolisou o agar sangue

Ø Produção de gelatinase meio: agar gelatina nutriente

controle positivo: *Bacillus cereus* CCMB 286

controle negativo: meio sem inóculo



L. pseudomesenteroides não liquefez a gelatina

