

Marcelo Eduardo Marcon

Desenvolvimento de um meio de cultivo econômico para a
produção de probióticos como aditivos zootécnicos

São José do Rio Preto - SP

2010

Marcelo Eduardo Marcon

Desenvolvimento de um meio de cultivo econômico para a
produção de probióticos como aditivos zootécnicos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

São José do Rio Preto - SP

2010

Marcon, Marcelo Eduardo.

Desenvolvimento de um meio de cultivo econômico para a produção de probióticos como aditivos zootécnicos / Marcelo Eduardo Marcon. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.124 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Pedro de Oliva Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Alimentos funcionais. 3. Probióticos. 4. Alimentos – Aditivos. I. Oliva Neto, Pedro de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 641.1

Marcelo Eduardo Marcon

Desenvolvimento de um meio de cultivo econômico para a
produção de probióticos como aditivos zootécnicos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
UNESP – Assis
Orientador / Presidente

Prof.^a Dr.^a Valeria Marta Gomes de Lima
UNESP – Assis
1º Examinadora

Prof.^a Dr.^a Ivanise Guilherme Branco
UNESP – Assis
2º Examinadora

São José do Rio Preto
27/maio/2010

Dedico este trabalho

À esposa Gláucia e aos filhos Lucas e Eduardo.

Agradecimentos

Aos companheiros de laboratório e salas de aula pelo convívio diário, alegrias e auxílio durante esta jornada de mestrado.

Aos funcionários Léia e Sergio por toda atenção e auxílio.

Aos professores da UNESP de Assis e São José do Rio Preto pelos ensinamentos ministrados, especialmente a Prof.^a Dr.^a Valéria Marta Gomes de Lima pela atenção dispensada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto pelo apoio e orientação e confiança depositada em nosso trabalho.

“Let me walk before they make me run “

Keith Richards

Resumo

Os alimentos funcionais são utilizados para melhoria da qualidade de vida para humanos e animais, refletindo também na qualidade do alimento consumido pela população. Através da substituição de promotores de crescimento na nutrição de animais por probióticos, há eliminação de resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal, no meio ambiente e diminuição de resistência de microrganismos patógenos a estas moléculas. A utilização de probióticos em alimentos para animais é comprovadamente eficaz no aumento da produtividade, mas é limitado pelo alto custo de inoculação de microrganismos.

O soro de leite é uma alternativa para a produção de probióticos de baixo custo e de alta disponibilidade, mas necessita ser complementado para suprir as necessidades de crescimento de microrganismos probióticos. A formulação de um meio de cultura para cultivo de bactérias. probióticas dos gêneros *Lactobacillus sp* e *Bifidobacterium sp* com subprodutos da indústria láctea, mostrou-se eficaz para induzir o crescimento bacteriano, especialmente *Bifidobacterium Bb 12*, quando suplementado com extratos orgânicos como extrato de levedura , peptonas e extrato de carne .

Palavras-chave: Probióticos; Meios de cultivo; Soro de leite; *Lactobacillus acidophilus La 04*; *Bifidobacterium lactis Bb 12*.

Abstract

Functional foods are used to improve the quality of life for humans and animals, also reflecting the quality of food consumed by the population. Through the replacement of growth promoters in animal feeding with probiotics, have elimination of antibiotic residues in foods of animal origin, the environment and reduction of resistance of microorganisms pathogenic to these molecules. The use of probiotics in feed is proven effective in increasing productivity, but is limited by the high cost of inoculating microorganisms.

Whey is an alternative for the production of probiotic low cost and high availability, but needs to be supplemented to meet the growing needs of probiotic microorganisms. The formulation of a culture medium for growing bacteria genera of probiotic *Lactobacillus* sp and *Bifidobacterium* sp with byproducts of the dairy industry, was effective to induce bacterial growth, especially *Bifidobacterium* Bb 12, when supplemented with organic extracts like yeast extract, peptones and meat extract.

Keywords: Probiotics; Culture medium; whey; *Lactobacillus acidophilus* La 04; *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

TABELAS

1	Causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos.	9
2	Ação de probióticos em ruminantes	24
3	Metabolismo e aplicações de algumas bactérias lácticas	33
4	Análise comparativa da composição dos sólidos do leite e soro doce	42
5	Termos utilizados para nomenclatura dos meios de cultura	48
6	Composição dos meios de cultura para avaliação da influência do soro de leite e extrato de levedura no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04	50
7	Composição dos meios de cultura com soro de leite para avaliação da eficiência dos sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04	51
8	Composição dos meios de cultura para avaliação de eficiência de extratos orgânicos no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12	52
9	Componentes dos meios de cultura para determinação de curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12	53
10	Componentes do soro de leite doce em base seca	57
11	Análise de diferença estatística ($p < 0,05$) dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura	61
12	Análise de diferença estatística ($p < 0,05$) dos meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04	67
13	Análise de diferença estatística ($p < 0,05$) dos meios de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	71

- 14 Análise de diferença estatística ($p < 0,05$) dos meios de 74
crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12a base de soro de
leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos
- 15 Consumo de açúcares em meios de cultura para 80
Lactobacillus acidophilus La 04
- 16 Valores de produção de massa de *L.acidophilus* La 04 e *B.* 81
lactis Bb12

FIGURAS

1	Ação de probióticos e prebióticos na microbiota intestinal	14
2	Fermentação láctica da glicose	26
3	Fluxograma de produção de soro de leite e derivados	41
4	Crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite 10% e extrato de levedura	59
5	Crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite 7,5% e extrato de levedura	59
6	Crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite 5,0% e extrato de levedura.	60
7	Crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite 2,5% e extrato de levedura	60
8	Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 10% e extrato de levedura	62
9	Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 7,5% e extrato de levedura	62
10	Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 5,0% e extrato de levedura	63
11	Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura	63
12	Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 10% e extrato de levedura	64

13	Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 7,5% e extrato de levedura	64
14	Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 5,0% e extrato de levedura	65
15	Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura	65
16	Valores de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura para avaliação da eficácia dos sais inorgânicos e polisorbato	66
17	Valores da medição do pH em meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04	68
18	Valores da acidez em meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilum</i> La 04	68
19	Valores de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 em meios de cultura a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	70
20	Valores de pH dos meios de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	72
21	Valores de acidez dos meios de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	72
22	Valores de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12 em meios de cultura a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	74

23	Valores de pH dos meios de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis Bb 12</i> à base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	75
24	Valores de acidez dos meios de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis Bb 12</i> com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos	76
25	Valores da curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus La 04</i> em meio de cultura com soro de leite	78
26	Valores da curva de crescimento de <i>Bifidobacterium Bb 12</i> em meio de cultura com soro de leite	78

SUMÁRIO

1	Introdução	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Alimentos Funcionais e Nutracêuticos	3
2.2	Classes de aditivos zootécnicos	6
2.2.1	Prebióticos	6
2.2.2.	Probióticos	8
2.2.3.	Simbióticos	13
2.2.4.	Aplicação dos aditivos zootécnicos em animais de produção	14
2.2.4.1	Aditivos zootécnicos na avicultura	16
2.2.4.2	Aditivos zootécnicos na suinocultura	18
2.2.4.3	Aditivos zootécnicos em ruminantes	21
2.3	Bactérias láticas	25
2.3.1	Efeito de compostos orgânicos no estímulo do crescimento das bactérias láticas	29
2.3.2	Bactérias láticas geneticamente modificadas	31
2.3.3	Bactérias láticas probióticas	33
2.3.3.1	Os Lactobacilos	35
2.3.3.2	As Bifidobactérias	36
2.3.4	Meios de cultura para bactérias láticas	37
2.3.4.1	Componentes dos meios de cultivo	40
2.3.4.1.1	Soro de leite	40
2.3.4.1.2	Outros nutrientes	44
3	Objetivos	46
3.1	Objetivos gerais	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	Material e Métodos	47
4.1	Microrganismos.	47
4.2	Nutrientes	47
4.3.	Formulação dos meios de cultura	48

4.3.2	Preparação de meios de cultura para o controle do crescimento bacteriano	49
4.3.3	Preparação de meios de cultura para crescimento de bactérias lácticas em soro de leite	49
4.3.3.1	Composição de meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura para avaliação de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04	49
4.3.3.2	Avaliação da eficiência de sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura	51
4.3.3.3	Avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12 em meios de cultura	51
4.3.3.4	Componentes do meio de cultura para determinação de curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12	52
4.3.4	Preparo do inóculo	53
4.3.5	Esterilização dos meios de cultivo e equipamentos	53
4.4	Fermentação láctica para produção dos probióticos	53
4.5	Análises da fermentação	54
4.5.1	Medidas de estimativa do crescimento bacteriano	54
4.5.1.1	Plaqueamento e diluição em série	54
4.5.1.2	Determinação da Biomassa seca	54
4.5.2	Determinação de pH e acidez total	55
4.5.3	Determinação de açúcares redutores	55
4.5.3.1	Determinação de açúcares residuais nos meios de cultivo	56
4.6	Análises estatísticas	56
5	Resultados e Discussão	57
5.1	Composição do soro de leite	57
5.2	Ensaio de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12	57

5.2.1	Crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 em diferentes concentrações de soro de leite e extrato de levedura	58
5.2.2	Avaliação da eficácia dos sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura.	66
5.2.3	Avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12 em meios de cultura com soro de leite	69
5.2.3.1	Valores de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 em meios de cultura com soro de leite e extratos orgânicos	70
5.2.3.2	Valores de crescimento de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12 em meios de cultura com soro de leite e extratos orgânicos	73
5.2.4	Avaliação da curva de crescimento de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 04 e <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb 12 em meio de cultura com soro de leite	77
5.3.	Açúcares redutores totais residuais nos meios de cultivo após crescimento	79
5.4	Valores de massa úmida e massa seca	80
5.5	Avaliação de custo x benefício dos meios de cultura	81
6	Conclusões	82
7	Referências Bibliográficas	83
8	Anexos	95

1. Introdução

A busca por uma vida mais saudável amplia a comercialização de alimentos funcionais, que são aqueles alimentos que contêm substâncias ou nutrientes que forneçam benefício à saúde, seja como prevenção ou tratamento de doenças. De maneira geral, os alimentos funcionais são considerados promotores de saúde humana e podem estar associados com a diminuição dos riscos de algumas doenças crônicas. O Japão foi o pioneiro na produção e comercialização de alimentos funcionais, conhecidos como FOSHU, "Foods for Specified Health Use", os alimentos funcionais japoneses sustentam um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem Estar. A lei japonesa foi elaborada em junho de 1997, mas não é a única atualmente. Hoje, vários países contam com uma legislação específica, e no Brasil as regras foram instituídas a partir de 1999.

A FDA (Food and Drug Administration) regula os alimentos funcionais baseada no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: Alimentos, suplementos, alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou droga (NOONAN & NOONAN, 2004).

No Brasil, a indústria deve seguir a legislação do Ministério da Saúde. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece normas e procedimentos para registro de alimentos e/ou ingredientes funcionais. Para se obter o registro de um alimento com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde, deve ser formulado um relatório técnico científico bastante detalhado, comprovando os benefícios e a segurança de uso do alimento.

O mercado mundial de alimentos funcionais apresenta crescimento mundial, em 1998 movimentou US\$ 22 bilhões e em 2010, US\$ 250 bilhões. No Brasil também há procura crescente por alimentos que promovem a saúde, um foco estratégico de marketing (LERAYER, 2010).

Os alimentos funcionais também são utilizados na nutrição animal visando à saúde e melhoria de desempenho zootécnico de animais de produção, agindo através de modulação da microbiota intestinal, resposta imunológica, redução de patógenos e aproveitamento dos alimentos.

A indústria de nutrição animal movimentou cerca de US\$16 bilhões no ano de 2009, e o mercado brasileiro de micro ingredientes, incluindo aditivos zootécnicos,

movimenta anualmente cerca de U\$ 1 bilhão e está totalmente inserido e integrado à cadeia de ingredientes e alimentos para animais.

A fabricação de alimentos funcionais para animais de produção também é uma atividade de grande perspectiva de crescimento, pois o mercado vislumbra uma gradativa substituição dos promotores de crescimento a base de antibióticos utilizados atualmente por produtos alternativos que atendam as exigências do mercado sem perda da produtividade.

O Brasil produziu 21,128 milhões de litros de soro em 2004 decorrentes da industrialização do leite para a fabricação de queijos (IBGE 2004), a utilização deste subproduto da indústria láctea na produção de microrganismos de características probióticas é uma alternativa de baixo custo para a produção de aditivos zootécnicos probióticos, solucionando ainda o problema ambiental de descarte de soro de leite produzido na fabricação do queijo. Os estudos realizados com soro de leite definem varias limitações impostas ao soro como meio de cultivo, e a determinação de componentes para sua viabilização industrial não são claras. Este estudo visou avaliar vários componentes que possam ser utilizados como ingredientes para a viabilização da produção de probióticos a partir do soro de leite residual da indústria láctea.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos

Alimentos funcionais são "produtos alimentícios que produzem benefícios específicos, ou que contêm níveis significantes de componentes biologicamente ativos, para melhoria da saúde, além dos seus nutrientes básicos tradicionais" (ROBERFROID, 2002). A crescente atenção que se tem dado a esta categoria de alimentos está ligada ao seu valor adicional em relação às propriedades preventivas de doenças crônicas. Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: Quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo; no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA et al., 2003).

Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças. Esta classe de compostos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares, mas o seu papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção.

Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características:

- 1 Ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual;
- 2 Ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;
- 3 Ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;
- 4 A alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico;
- 5 Ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido, a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada ou no qual

a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada. (ROBERFROID, 2002).

Os alimentos funcionais são vistos como promotores de saúde e agentes de redução ao risco de certas doenças. Contudo, eles não garantem boa saúde, eles fazem parte do conjunto total incluindo boa nutrição e hábitos saudáveis.

Alimentos nutraceuticos são alimentos ou parte destes que proporcionam benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados até suplementos e alimentos processados. (ROBERFROID, 2002; ANDLAUER & FURST, 2002). Vários nutraceuticos podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos considerados como GRAS (Generally Recognized as Safe). Os nutraceuticos podem ser classificados como fibras, ácidos graxos polinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (glutathione, selênio) (ANDLAUER & FURST, 2002).

O alvo dos nutraceuticos é significativamente diferente dos alimentos funcionais, por várias razões:

- 1 Prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico) são relevantes aos nutraceuticos, apenas a redução do risco da doença, e não a prevenção e tratamento da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais;

- 2 Nutraceuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum.

Kruger & Mann (2003) definem os ingredientes funcionais como um grupo de compostos que apresentam benefícios à saúde, tais como as alicinas presentes no alho, os carotenóides e flavonóides encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos encontrados nos vegetais crucíferos os ácidos graxos polinsaturados presentes em óleos vegetais e óleo de peixe. Estes ingredientes podem ser consumidos juntamente com os alimentos dos quais são provenientes, sendo estes alimentos considerados alimentos funcionais, ou individualmente, como nutraceuticos. Devem apresentar adequado perfil de segurança, demonstrando a segurança para o consumo humano.

Assim, na nutrição de animais, como na nutrição humana há incorporação de aditivos aos alimentos, incluindo os prebióticos, os probióticos, os ácidos graxos polinsaturados e minerais quelatados visando à substituição de aditivos promotores de crescimento em animais de produção ou nos animais de companhia.

Uma característica comum aos aditivos é que são especialidades químicas que, uma vez adotadas pelo mercado, tendem a ser consideradas como “commodities”. Dentro do mercado globalizado, a indústria brasileira garante a qualidade de seus produtos de acordo com normas pré-estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

Essas regras permitem o livre comércio para produzirmos alimentos seguros para animais, bem como a produção de proteína animal para o mercado interno e externo.

A produção e utilização dos aditivos modernos consideram as tendências mundiais na produção animal:

- Adequada remuneração aos trabalhadores da agricultura;
- Adequação das instalações onde ficam os animais;
- Atualização dos criadores/produtores;
- Rastreabilidade dos alimentos;
- Bem-estar dos animais
- Biossegurança.

O conceito de micro ingredientes utilizado no setor da produção animal costumeiramente se aplicava à categoria de aditivos nutricionais da legislação internacional (Cfe. Reg. 1831/2003 de 22/09/2003 do Parlamento Europeu), entretanto, a partir de nova regulamentação do MAPA, a Instrução Normativa No.13 de 30/11/04, segundo orientações do *Codex Alimentarius*, as categorias de aditivos passam a ser:

Aditivos nutricionais: Vitaminas, provitaminas, e substâncias quimicamente definidas de efeitos similares; oligoelementos ou compostos de oligoelementos (microminerais); aminoácidos, seus sais e análogos; uréia pecuária e seus derivados.

Aditivos tecnológicos: Adsorventes; aglomerantes antiaglomerantes; antioxidantes; antiumectantes; conservantes; emulsificantes; estabilizantes; espessantes; gelificantes; regulador da acidez; umectantes;

Aditivos sensoriais: Corante e pigmentantes; aromatizantes; palatilizantes;

Aditivos zootécnicos: Enzimas; probióticos; prebióticos; simbióticos; nutracêuticos; ácidos orgânicos; promotores de crescimento e/ou eficiência alimentar. (Sindirações, 2009).

O Brasil é deficiente na produção de aditivos, mas contamos com forte produção nacional de aminoácidos, microminerais e enzimas e já participamos do

mercado exportador mundial, com grande potencial de crescimento. O mercado de micronutrientes importa alguns tipos de vitaminas, aminoácidos e agentes de promoção de crescimento há décadas porque não há produtos similares no Brasil. Muitos destes produtos foram sintetizados na década de 1950 e começaram a ser importados sistematicamente na década 1970, à medida que a pecuária brasileira desenvolveu métodos tecnificados de criação.

A tendência mundial é a produção de alimentos mais saudáveis, sem resíduos químicos, isentos de patógenos humanos e conseqüentemente, com menos riscos para o consumidor. Os alimentos funcionais e nutracêuticos são uma alternativa viável e saudável para a substituição dos promotores de crescimento, antibióticos e quimioterápicos utilizados na nutrição e terapêutica animal. (Sindirações, 2009).

2.2 - Classes de aditivos zootécnicos.

2.2.1. Prebióticos

O termo Prebióticos foi empregado por Gibson & Roberfroid em 1995 para designar "Ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e atividade de uma ou mais bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro". A principal ação dos Prebióticos é estimular o crescimento e/ou ativar o metabolismo de algum grupo de bactérias benéficas do trato intestinal.

Para que uma substância (ou grupo de substâncias) possa ser definida como tal, deve cumprir os seguintes requisitos (FOOKS et al., 1999):

- 1 Não ser digerida nem sofrer hidrólise na porção superior do trato digestivo;
- 2 Ser parcialmente fermentada por uma colônia de bactérias benéficas.
- 3 Induzir efeitos no lúmen que beneficie o hospedeiro.

Estão dentro deste conceito de prebióticos alguns açúcares absorvíveis ou não, fibras, álcoois de açúcares e oligossacarídeos. Destes, os oligossacarídeos - cadeias curtas de polissacarídeos compostos de três a 10 açúcares simples ligados entre si, tem recebido mais atenção pelas inúmeras propriedades prebióticas atribuídas a eles.

Os frutoligossacarídeos (FOS) são polissacarídeos que têm demonstrado excelentes efeitos prebióticos "alimentando", seletivamente, algumas espécies de

Lactobacillus e *Bifidobacterium* e, desta maneira, reduzindo a quantidade de outras bactérias como *Bacteróides*, *Clostridium* e coliformes.

O Mananoligossacarídeo (MOS) é um produto prebiótico usado em animais de produção, e tem como objetivo influenciar a ecologia microbiana assim como os probióticos e promotores de crescimento. Eles são derivados da parede celular de leveduras e consistem principalmente de resíduos de glucomanoses fosforilados (PETTIGREW, 2000).

Segundo o autor estes produtos apresentam dois mecanismos de ação:

1 Eles se ligam a lectinas na parede celular de certas bactérias patogênicas. Estas lectinas bacterianas normalmente se ligam a enterócitos e auxiliam as bactérias a procederem à colonização do intestino. Entretanto, se as lectinas estiverem ligadas aos mananoligossacarídeos, elas não podem se ligar nas células epiteliais e as bactérias indesejáveis são eliminadas do lúmen intestinal.

2 Os mananoligossacarídeos aumentam a ação do sistema imunológico. Estes mecanismos de ação permitem aos mananoligossacarídeos a proteger o animal de organismos patogênicos.

Arabinose, galactose, manose e, principalmente, lactose, são outros carboidratos utilizados com efeitos prebióticos. Lactose adicionada à ração, juntamente com probiótico, reduz a colonização por salmonelas. Os prebióticos podem ser obtidos na forma natural em sementes e raízes de alguns vegetais como cevada e grãos de soja, fontes de oligossacarídeos naturais. Há, também, os oligossacarídeos sintéticos obtidos através da polimerização direta de alguns dissacarídeos da parede celular de leveduras ou fermentação de polissacarídeos. Os oligossacarídeos sintéticos têm apresentado melhores resultados como prebiótico e menos efeitos colaterais. (GIBSON, G. R, 1999).

As substâncias prebióticas agem alimentando e estimulando o crescimento de diversas bactérias intestinais benéficas, cujos metabólitos atuam também reduzindo o pH através do aumento da quantidade de ácidos orgânicos presentes no trato gastrointestinal. Por outro lado, atuam bloqueando os sítios de aderência (principalmente a D-Manose), imobilizando e reduzindo a capacidade de fixação de algumas bactérias patogênicas na mucosa intestinal.

Especula-se que os oligossacarídeos possam atuar estimulando o sistema imune, através da redução indireta da translocação intestinal por patógenos, que

determinariam infecções após atingir a corrente sangüínea (GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. 1995)

2.2.2. Probióticos

A definição internacional atualmente aceita é de que os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro

(SAAD, 2006, FULLER,1989). Em um intestino adulto saudável, a microflora predominante se compõe de microrganismos promotores da saúde, em sua maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os *Lactobacilos* geralmente citados como probióticos são: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L.delbreuckii subsp. bulgaricus*, *L.brevis*, *L.cellibiosus*, *L.lactis*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. reuteri*. As espécies de *Bifidobacterias* com atividade probiótica são: *B.bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. thermophilum* e *B. animalis* (KALANTZOPOULOS, 1997).

Segundo Holzapfel & Schillinger (2002), outras bactérias ácido-láticas com propriedades probióticas são: *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* e *Sporolactobacillus inulinus*, enquanto os microrganismos *Bacillus cereus*, *Propionibacterium freudenreichii* e *Saccharomyces cerevisiae* têm sido citados como microrganismos não lácticos associados às atividades probióticas principalmente para uso farmacêutico ou em animais.

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição por nutrientes e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. A tabela 1 relaciona os mecanismos de ação dos probióticos aos efeitos benéficos.

Tabela 1. Causas e mecanismos dos efeitos benéficos atribuídos aos probióticos.

Efeito benéfico	Possíveis causas e mecanismos
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídios e carboidratos.
Melhor valor nutritivo	Níveis elevados das vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano.
Melhor utilização da lactose	Níveis reduzidos de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase
Ação antagônica contra agentes Patogênicos entéricos	Distúrbios tais como diarreia, colites, mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica são controlados pela acidez.
Colonização do intestino	Inibidores microbianos e inibição da adesão e ativação de patógenos
	Sobrevivência ao ácido gástrico, resistência a lisozima e à tensão superficial do intestino, adesão ao epitélio intestinal, multiplicação no trato gastrointestinal, modulação imunológica.
	Conversão de potenciais pré-carcinogênicos em compostos menos perniciosos.
	Estimulação do sistema imunológico.
	Produção de inibidores da síntese do colesterol
	Utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados.
Modulação imunitária	Melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras.

Fonte: Gomes e Malcata, 1999.

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989).

Sabe-se que há um sinergismo entre estas ações, como demonstram os autores Saad, (2006) e Salminen, (1998).

1 Competição por sítios de ligação: Este conceito ficou conhecido, também, com o nome de "Exclusão Competitiva". As bactérias dos Probióticos ocupam dos sítios de ligação (receptores ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, desta maneira, as bactérias patogênicas seriam excluídas pela competição.

2 Produção de substâncias antibacterianas: Bactérias dos Probióticos produzem compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos - ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico, láctico) e peróxido de hidrogênio, que têm ação antibacteriana, especialmente, em relação às bactérias patogênicas. Produção de lactato e acetato que reduzem o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano.

3 Competição por nutrientes: As bactérias probióticas se nutrem de ingredientes que não foram total ou parcialmente degradados pelas enzimas digestivas normais ou, foram intencionalmente adicionados à dieta. Estas substâncias, intencionalmente adicionadas, com a finalidade de "alimentar" as bactérias probióticas, são conhecidas com prebióticos. A escassez de nutrientes disponíveis na luz intestinal que possam ser metabolizados pelas bactérias patogênicas é um fator limitante de manutenção das mesmas neste ambiente.

4 Modulação da atividade enzimática: Uma função vital das bactérias lácticas na microbiota intestinal é produzir a enzima β -D-galactosidase, auxiliando a quebra da lactose no intestino. Essa ação é fundamental, particularmente no caso de indivíduos com intolerância à lactose, os quais são incapazes de digeri-la

adequadamente, o que resulta em desconforto abdominal em grau variável. Diversas evidências têm demonstrado que o consumo de quantidades adequadas, de cepas apropriadas de bactérias lácticas (incluindo bactérias lácticas não-probióticas como *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) é capaz de aliviar os sintomas de intolerância à lactose. Desta maneira, consegue-se incorporar produtos lácteos e os nutrientes importantes que fazem parte desses produtos de volta à dieta de indivíduos intolerantes à lactose, anteriormente obrigados a restringir a ingestão desses produtos. Outros efeitos descritos foram a redução ou supressão da atividade de enzimas fecais, como a β -glicuronidase, a nitrorredutase e a azorredutase.

5 Estímulo do sistema imune: A defesa imunológica do hospedeiro está diretamente relacionada com a microbiota intestinal. Um homem ou animal, simplesmente não consegue sobreviver se não desenvolver uma microbiota intestinal saudável. Algumas bactérias dos probióticos estão diretamente relacionadas com o estímulo da resposta imune, através do aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferon. Os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - "natural killer") e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Os efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial. Entretanto, nem todas as cepas de bactérias lácticas são igualmente efetivas. A resposta imune pode ser aumentada, quando um ou mais probióticos são consumidos concomitantemente e atuam sinergisticamente, como parece ser o caso dos *Lactobacillus* administrados em conjunto com os *Bifidobacterium*.

Alguns critérios são importantes para obter resultados satisfatórios na administração de probióticos (LEE Y.K. et al; 1999) :

1 Quantidade: A dose inoculante de microrganismos viáveis é extremamente variável, de milhões a bilhões de U.F.C. nos produtos comercializados, mas deve ser suficiente para permitir a colonização do trato gastrointestinal do hospedeiro.

2 Administração contínua: A via de administração dos probióticos pode determinar uma melhor ou pior capacidade de colonização intestinal pelas bactérias presentes no produto utilizado. Independente da via, os probióticos devem ser administrados continuamente para que as bactérias presentes no produto colonizem

e se multipliquem no trato intestinal do hospedeiro, iniciando suas atividades benéficas.

3 Linhagens: Os probióticos podem conter bactérias totalmente conhecidas e quantificadas ou, culturas bacterianas não definidas. *Enterococcus*, *Bacteróides*, *Eubacterium* e especialmente *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão presentes em todas as misturas de culturas definidas. Por outro lado, não se conhece, ainda, nem a composição total, nem a perfeita combinação entre elas, que melhor estimula as propriedades probióticas "in vivo". Estas são as razões pelas quais os produtos com culturas não definidas tem melhor ação probiótica que as culturas definidas. Aparentemente, um número maior de espécies bacterianas determina um probiótico mais efetivo. Só, a partir de quatro espécies de bactérias é que se evidencia alguma proteção. Nas misturas contendo mais de 20 espécies, a proteção tende a ser mais efetiva. Culturas contendo, em torno de, 50 espécies bacterianas teriam mais chances de manter o equilíbrio da microbiota intestinal. As culturas definidas procuram combinar diversas espécies de bactérias que mostram ação sinérgica "in vitro", estas combinações variam de 28 até 65 espécies bacterianas. Há necessidade que as bactérias sejam hospedeiro-específicas, a fim de que a máxima eficácia do produto seja atingida. Ou seja, bactérias com ação probiótica em suínos pode não ter ação em aves.

4 Interação com drogas e alimentos: Experimentos em leitões observaram aumento na concentração de *E. coli* no íleo de leitões desmamados aos 23 dias de idade, seguido de uma queda na concentração de lactobacilos quando administrado bacitracina de zinco, um promotor de crescimento com ação inibitória sobre bactérias gram-positivas (MATHEW, A. G. 1996). A associação de fatores nutricionais que favorecem o crescimento de cepas probióticas à alimentação ou ao probiótico permite uma potencialização dos efeitos desejáveis, constituindo o princípio de ação dos simbióticos.

Para serem efetivos, os microrganismos probióticos devem ser criteriosamente selecionados, visando à segurança alimentar onde deverão atuar. Os critérios para a seleção de M.O. probióticos segundo Lee Y.K. et al, (1999) são:

1 Origem: Necessariamente espécie específica, gênero, caracterização e espécies seguras.

2 Estabilidade: Manutenção de suas características.

3 Segurança: Ausência de potencial patogênico e invasivo. Cepas com plasmídeos de resistência não devem ser empregadas como probióticos humanos ou animais, por serem, possivelmente, capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas, dificultando a cura de infecções.

4 Atividade: Aspectos funcionais e fisiológicos (Resistência ao baixo pH, aos sucos gástrico, biliar e pancreático, aderência ao epitélio intestinal, antagonismo aos patógenos, estimulação ou supressão da resposta imunológica, estimulação às bactérias benéficas)

5 Manter a viabilidade nos meios em que são administrados aos hospedeiros. Quando as bactérias, com capacidade probiótica, são retiradas (isoladas) do seu habitat convencional e subcultivadas e/ou liofilizadas, algumas das suas propriedades são perdidas. Os microrganismos probióticos devem sobreviver em todas as etapas de elaboração e armazenagem do produto, por isso, a escolha do alimento no qual serão adicionados depende do teor de sal, do pH, da umidade, entre outros fatores que podem influenciar sua efetividade.

2.2.3. Simbióticos

“Um produto em que estão combinados um probiótico e um prebiótico é denominado simbiótico. A interação entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico, se ele for consumido juntamente com o prebiótico” (SAAD, 2006). Alternativamente, esse efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões “alvo” do trato gastrointestinal, os intestinos delgado e grosso. O consumo de probióticos e de prebióticos selecionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de cepas probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002).

Desta maneira, os prebióticos agem intimamente relacionados aos probióticos, pois constituem o “alimento” das bactérias probióticas. O uso de produtos denominados prebióticos em associação como os probióticos apresenta ações benéficas comparadas aos antibióticos promotores de crescimento, notadamente, evitando resíduos nos produtos de origem animal e não induzindo o desenvolvimento

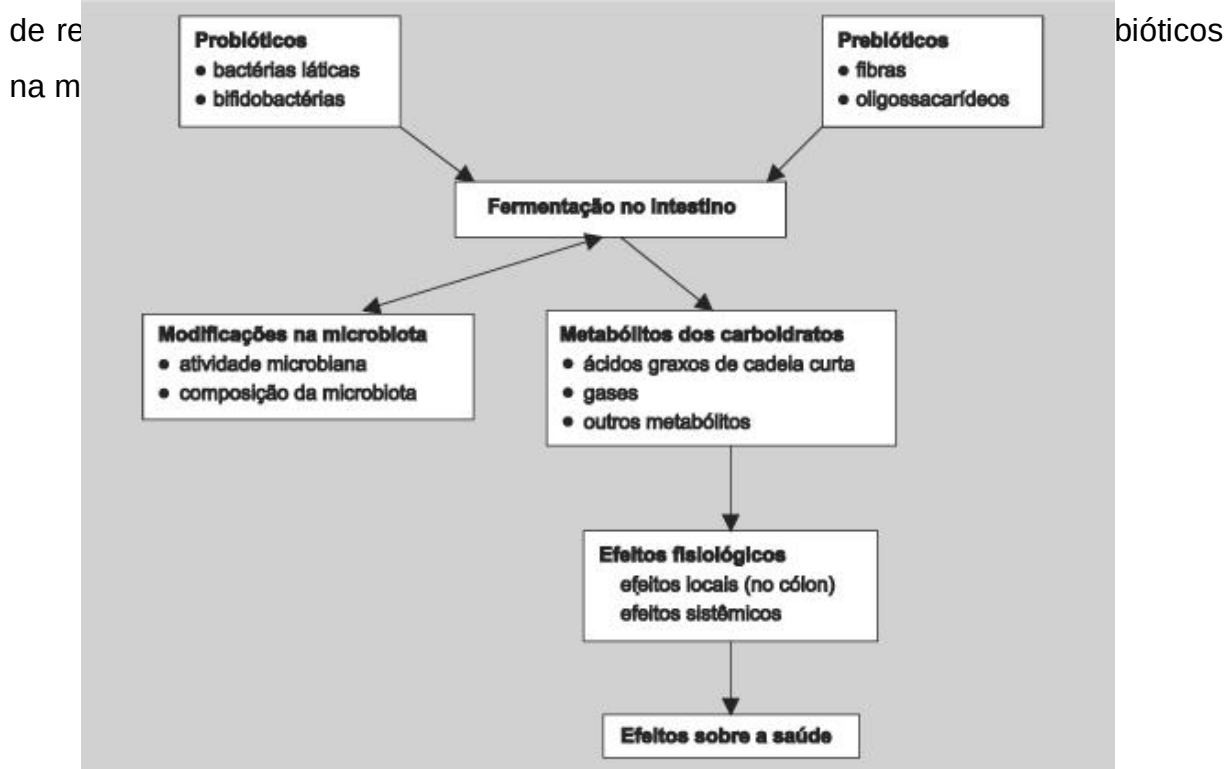


Figura 1: Ação de probióticos e prebióticos na microbiota intestinal (Puupponen-Pimiä et al., 2002).

2.2.4 Aplicação dos aditivos zootécnicos em animais de produção.

Os aditivos zootécnicos são utilizados em aves, suínos e ruminantes em substituição aos promotores de crescimento, geralmente visando à melhoria da conversão alimentar em adultos e a colonização do trato gastrointestinal (TGI) em animais jovens, e também na prevenção e combate de patologias como diarreias.

Os promotores do crescimento são agentes antimicrobianos que em concentrações baixas reduzem ou inibem o crescimento de microorganismos. Esta classe de compostos inclui antibióticos (substâncias naturalmente produzidas por leveduras, fungos e outros microorganismos) e quimioterápicos (substâncias quimicamente sintetizadas). Além disso, o cobre e o zinco também apresentam propriedades antibacterianas quando presentes em altas concentrações. A ação dos antibióticos ocorre ao nível do lúmen intestinal, exercendo ali sua função primordial. (CROMWELL,1991)

O modo de ação mais aceito dos antibióticos como promotor de crescimento é no controle de doenças subclínicas. A exposição contínua a ambiente hostil propicia

o desenvolvimento de microorganismos que causam doenças subclínicas. Ao fornecer antibióticos, ocorre redução de microorganismos patogênicos, propiciando ao animal expressar o máximo do seu potencial genético. O efeito benéfico dos antibióticos pode ser melhor expresso em animais jovens. Isto se deve a sua proteção imunológica deficiente. (CROMWELL,1991) .

Microorganismos presentes no lúmen intestinal produzem substâncias tóxicas como amônia, estas irritam a parede intestinal, levando a um espessamento (VISEX, 1978) e morfologia da mesma (PARKER e ARMSTRONG, 1987). Estas alterações são representadas por aumento nas vilosidades e em uma maior relação vilosidade / cripta. O peso do intestino dos animais livres de agentes patogênicos é menor do que os convencionais. Dierick et al,1986 consideraram que a formação de amônia e aminas era importante tanto do ponto de vista nutricional como toxicológico. Ambos apresentaram efeitos deletérios no metabolismo de nutrientes e absorção no intestino delgado. Esta alteração tecidual afeta enterócitos, alterando certamente as enzimas e proteínas transportadoras de nutrientes (proteínas integrais de membrana). Por consequência, reduz a absorção de nutrientes. A utilização de antibióticos resulta em redução de bactérias patogênicas, conseqüentemente, a parede intestinal torna-se mais fina, pois reduz o crescimento da parede intestinal, reduz a troca de enterócitos e a umidade fecal, facilitando a absorção de nutrientes (HENDERICKX et al., 1981, ANADÓN e LARRANAGA, 1999),

Collington et al. (1990) demonstraram que tanto antibióticos como probióticos aumentavam a atividade da sacarase, da lactase e da tripeptidase em leitões aos 17 dias de idade. A ação benéfica destes aditivos ocorre mais sobre enzimas localizadas nas microvilosidades do que no citosol. Os autores concluíram que o aumento das enzimas nas microvilosidades reflete um aumento na proporção de células maduras nas vilosidades, resultado de redução da troca do tecido intestinal no período imediatamente antes do desmame. Os leitões que receberam antibióticos e probióticos apresentaram maior ganho de peso aos 31 dias de idade, comparativamente ao grupo controle, e mantiveram esta vantagem até 81 dias de idade (COLLINGTON et al., 1988). Além disso, o intestino apresenta uma alta taxa metabólica, contribuindo para o aumento da produção de calor (KOONG et al., 1982). A redução da massa intestinal em animais recebendo antibióticos significa maior disponibilidade de energia e nutrientes (vitaminas, ácidos graxos, glicose e

minerais) para outros tecidos, resultando em melhor desempenho produtivo (CROMWELL, 1991; ANADON e LARRANAGA, 1999).

Os ganhos de produtividade decorrentes do uso de promotores de crescimento são de importância fundamental tanto para o sucesso no comércio nacional como internacional. É importante salientar que discussões paralelas também ocorrem na área de hormônios e de animais e plantas geneticamente modificadas. De um modo geral, o bloco americano defende a utilização de antibióticos, já o europeu defende a eliminação de sua utilização. O fato dos europeus banirem o uso da maior parte dos agentes antimicrobianos como promotores de crescimento na alimentação animal, deixa os produtores de países exportadores de carne com as alternativas de perder milhões de dólares na exportação de carne ou desistir das drogas proibidas e incorrer em maiores custos de produção.

Portanto, resta aos países exportadores a busca de aditivos alternativos para os agentes antimicrobianos, bem como medidas de melhoria das condições higiênico-sanitárias ambientais. (RUTZ , 2001)

2.2.4.1. Aditivos zootécnicos na avicultura.

A utilização de aditivos zootécnicos tem como alvo a colonização do trato gastro intestinal (TGI) da ave com micro-organismos probióticos, especialmente o íleo, ceco e cólon. Os resultados das ações benéficas dos alimentos funcionais (AFN) utilizados em avicultura se faz em duas formas principais:

- 1 Determinando melhores índices zoeconômicos, maior produtividade, aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar;
- 2 Redução da colonização intestinal por alguns patógenos, como as salmonelas.

Modernamente, a arrancada para o uso dos probióticos no controle da infecção de aves por salmonelas foi dada por um trabalho realizado por pesquisadores finlandeses (NURMI & RANTALA, 1973). Em seus experimentos, os autores observaram que o conteúdo intestinal de aves adultas normais, administrado oralmente às aves com um dia de idade, alterava sua sensibilidade à infecção por *Salmonella spp*, prevenindo o estabelecimento desta no intestino. Esta idéia foi conceituada como "Exclusão Competitiva" e, tornou-se conhecida como o "conceito de Nurmi". A colonização intestinal por outros patógenos como *Escherichia coli* e

Campylobacter spp, também, pode ser prevenida pelos probióticos. Na mesma época, outros autores demonstraram que a aplicação de probiótico constituído por *L. acidophilus* melhorava a conversão alimentar e o ganho de peso em aves tratadas (TORTUERO, 1973).

A moderna exploração avícola, com finalidade de produção de carne e ovos, praticamente "esteriliza" o ovo de incubação. E, é conceito de produção que o pinto de um dia deva conter o menor índice de contaminação possível; de qualquer natureza. As técnicas modernas de criação avícola exigem um ambiente de criação inicial com uma qualidade bacteriológica da água e rações que dificultam e retardam o estabelecimento de uma micro biota intestinal, e não poderia ser diferente devido aos seus riscos potenciais (MEAD , 2000). Parte destes riscos tem sido minimizados pelo uso dos chamados "promotores de crescimento". Contudo, em condições normais, a natureza tem nos ensinado que os pintos tem contato, imediatamente ao nascer, com as fezes da mãe como a primeira fonte de "alimento". Isto não acontece por acaso. As fezes das "mães" dos pintos contém elementos extremamente importantes na imunoproteção, estímulo ao desenvolvimento e funcionamento do trato digestivo das aves jovens. (FERKET, 2004).

Gedek (1986) relatou que existe uma microflora natural no trato gastrintestinal de difícil definição e composta de aproximadamente 400 espécies em equilíbrio entre si e com o hospedeiro. A presença dessa flora intestinal normal, em equilíbrio, é tão necessária quanto benéfica para o bem estar do animal. Estima-se que 90% da microbiota seja composta por bactérias facultativas (aeróbicas/anaeróbicas) e produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*), incluídas as bactérias exclusivamente aeróbicas como os *Bacteróides spp*, *Fusobacterium spp* e *Eubacterium spp*. Os 10% restantes desta flora são constituídos de bactérias consideradas nocivas ao hospedeiro, entre estas, a *Escherichia coli*, *Escherichia enterococci*, *Clostridium spp*, *Staphylococcus spp*, *Pseudomonas spp*, *Blastomyces spp*. O desequilíbrio, em favor das bactérias indesejáveis, resulta em infecção intestinal severa que, muitas vezes, pode ser fatal.

A eficácia dos aditivos zootécnicos em relação aos promotores de crescimento pode ser comparada no experimento de Flemming e Freitas, (2005), que concluíram:

1 Na fase inicial de vida das aves, o probiótico apresentou resultados significativos para ganho de peso (semanas 1 e 2) quando comparado ao controle e

ao lote com antibiótico. A conversão alimentar para o probiótico foi significativamente melhor do que o antibiótico na primeira semana.

2 Na fase de crescimento, o probiótico, o promotor de crescimento e a associação probiótico e Mananoligossacarídeos apresentaram melhor ganho de peso do que o controle, o qual por sua vez consumiu menos ração do que os demais.

3 No resultado acumulado (início ao abate com 42 dias), o probiótico apresentou os melhores resultados para ganho de peso em relação ao controle, mas não diferindo, entretanto, da associação de probiótico com prebiótico (MOS) e o antibiótico.

Os Aditivos zootécnicos podem ser administrados às aves de várias maneiras:

- Adicionado às rações pela adição em água de bebida;
- Pulverização sobre as aves;
- Inoculação via cloaca;
- Inoculação em ovos embrionados;
- Através da cama usada;
- Cápsulas gelatinosas.

(BUTOLO, 2001).

O uso concomitante de probióticos e prebióticos representa uma alternativa de substituição de promotores de crescimento em aves, transferindo os efeitos benéficos propiciados pela natureza e aplicando-os às criações industriais.

2.2.4.2. Aditivos zootécnicos na suinocultura.

Os aditivos zootécnicos têm sido utilizados como uma alternativa ao uso de antibióticos na dieta de suínos. O uso de bactérias lácticas tem sido promissor para inibição de patógenos intestinais como *E. coli* em suínos. A maioria dos experimentos concluiu que há uma melhoria na taxa de crescimento e na eficiência da utilização do alimento, mas que os resultados são variáveis (SANTOS et al., 2002).

A importância da microflora intestinal no controle de agentes patogênicos pode ser explicada pelo princípio da exclusão competitiva. O estabelecimento de uma flora microbiana é complementar a funções digestivas do hospedeiro ao aumentar a gama

de enzimas digestivas e, em condições normais, fornecer uma barreira contra a invasão de patógenos.

A aplicação de aditivos zootécnicos em monogástricos recai em três categorias principais:

- 1 Manutenção de uma microflora intestinal estável não patogênica.
- 2 Restauração de uma microflora intestinal após desequilíbrio.
- 3 Promover uma microflora intestinal não patogênica estável no recém nascido.

O papel de um aditivo zootécnico no intestino e seu mecanismo de ação pode ser contrastado com o de antibióticos. Existem evidências que um probiótico pode influenciar a digestibilidade e absorção de nutrientes. Entretanto, muita atenção tem sido dada ao papel de prebióticos e probióticos em afetar a ligação de organismo patogênico a parede intestinal e, portanto, na produção de enterotoxinas (FULLER, 1989). A ligação de bactérias patogênicas à superfície da mucosa do hospedeiro e a produção de enterotoxinas na superfície é atualmente reconhecido como o passo inicial e essencial na patogênese (JONES e RUTTER, 1972). É provavelmente o efeito da ligação e da produção de toxinas que contam para a maior proporção da alta taxa de síntese protéica na parede intestinal. Segundo Williams (1991), o papel de um microorganismo probiótico é manter o balanço da microflora entérica em favor de espécies não patogênicas, eliminando as patogênicas. A maior parte das bactérias se adere a superfície intestinal via fímbria bacteriana. O componente da fímbria bacteriana que realmente se adere é lectina. Esta reconhece estruturas específicas de carboidratos na superfície da parede intestinal. Tanto a *Salmonella* como a *E. coli* se ligam via grupos de manose específicos. Um possível modo de ação para a atividade de um probiótico em suínos a de que um organismo probiótico compete com bactéria patogênica pelos sítios de ligação na superfície intestinal, assim excluindo o patógeno e impedindo a produção de toxinas. Para que isto ocorra, a fímbria da bactéria deve ser similar e reconhecer o mesmo sítio de ligação. Durante as primeiras semanas de vida do leitão, ocorre uma sucessão de diferentes cepas de *Lactobacillus*, o que indica uma alteração na natureza dos componentes de adesão no intestino (TANNOCK al., 1990).

Tournut (1998) recomenda que caso a porca não tenha recebido probióticos, os leitões deveriam receber probióticos de 8 dias até 30 kg de peso vivo. Já a matriz

deve receber probióticos durante 15 dias antes do parto, a fim de modificar a sua flora intestinal e estabilizá-la.

Pettigrew (2000) forneceu mananoligossacarídeos (MOS) para suínos pós-desmame até a fase de terminação. O autor concluiu que ao adicionar este produto na dieta inicial de leitões, melhorou o desempenho dos animais. A utilização mais eficiente do produto pode ser obtida ao fornecer altos níveis de mananoligossacarídeos após o desmame e então reduzir gradualmente o nível conforme os suínos avançam a idade. Existe indicativo de que é possível que a utilização de mananoligossacarídeos melhore o desempenho de animais em terminação. O autor ainda comenta que o referido produto melhora a saúde e o desempenho de leitões expostos a desafio sanitário.

A ingestão dos aditivos zootécnicos é feita na forma de preparações farmacêuticas como cápsulas, sachês, de alimentos fermentados como iogurte ou leite "acidophilus" ou suplementado como o leite em pó adicionado de células vivas. Não são conhecidos probióticos capazes de se instalarem no ecossistema digestivo mesmo após uma ingestão prolongada, já que a microbiota local, mesmo desequilibrada, impede essa colonização.

Nos probióticos as bactérias benéficas são introduzidas vivas na área intestinal, muitas cepas de bactérias têm sido comercialmente usadas, sendo as espécies de *Lactobacillus*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* as mais comuns. Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* podem ser incluídas na dieta de animais monogástricos. (FERKET, 2004)

O uso de antibióticos e quimioterápicos tradicionalmente usados para o tratamento de diarreias de leitões (como tetraciclina, streptomina, neomicina, cloranfenicol e sulfas) mostram-se ineficazes no controle da disenteria, pois se verifica uma tendência à aparecimento de casos de resistência, como consequência do uso freqüente de alguns princípios ativos. Por outro lado, estudos comparando a eficiência do probiótico com antibiótico na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação, observaram que os tratamentos não influenciaram o desempenho dos animais e o probiótico não apresentou vantagem adicional. A adição de probiótico e prebiótico em rações de leitões desmamados constatou que a adição destes não influenciou significativamente a incidência de diarreia quando comparada com o uso de antibióticos. Os efeitos dos probióticos parecem ser mais

consistentes e positivos em leitões em crescimento do que animais em terminação (CORASSA, A, LOPES, D.C., BELLAVER, C. et al. 2005).

As variabilidades dos resultados das pesquisas realizadas com Probióticos podem ainda estar associadas com as diferentes cepas, nível de dose, condição de armazenamento, composição de dieta, estratégia de alimentação e interações com drogas. (BELLAVER, C. 2005)

2.2.4.3. Aditivos zootécnicos em ruminantes.

Os ruminantes são mamíferos herbívoros que possuem vários compartimentos gástricos, por isso também denominados de poligástricos, que ao contrário dos monogástricos que possuem um só compartimento gástrico, o estômago, os ruminantes possuem quatro, o rúmen, retículo, omaso e abomaso. A característica principal dos ruminantes é o consumo de fibras (celulose e hemicelulose) obtidas das gramíneas e das leguminosas, e como não possuem um sistema enzimático dotado de celulase, estes necessitam de um conjunto de microorganismos que façam a digestão das fibras. Estes microorganismos são bactérias e protozoários celulolíticos, que fermentam no rúmen as fibras e produzem ácidos orgânicos (acetato, butirato e propionato) que são assimilados pelo ruminante para obter energia. Estes organismos, depois de saírem do rúmen para o intestino, são fonte de proteína e de vitaminas para os ruminantes (CUNNINGHAN, J.G. 2004).

São exemplos de animais de produção ruminantes, os bovinos , os ovinos e os caprinos, entre outros. O uso de aditivos zootécnicos em ruminantes deve considerar as particularidades do sistema digestivo, de cada espécie e de idade , visto que se comportam como monogástricos nos primeiros estágios de vida.

O uso de microorganismos como aditivos alimentares em bovinos não é algo novo, os probióticos são utilizados para ruminantes como alternativas aos aditivos químicos. São considerados aditivos alimentares compostos de culturas puras ou múltiplas, com a capacidade de se instalar e proliferar no trato ruminal e intestinal do hospedeiro, beneficiando a saúde do mesmo. Os microorganismos mais utilizados como probióticos incluem várias espécies de *Bacteróides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* e *Propionibacterium*, assim como leveduras do gênero *Saccharomyces* (CUARÓN, 2006).

Atualmente cerca de 40 microrganismos diferentes são reconhecidos como seguros para utilização nos alimentos. Nesta lista incluem, na maioria, procariontes (bactérias), mas também as espécies dos eucariontes *Aspergillus* e *Saccharomyces*. Enquanto a levedura *Saccharomyces* é um microrganismo fornecido diretamente aos animais, o *Aspergillus* é utilizado principalmente como uma fonte de enzimas (CUARÓN, 2006).

Segundo Arcuri et al. (2006), os prováveis mecanismos de ação dos probióticos no ambiente ruminal são:

- 1 Alteração no número de bactérias ruminais,
- 2 Promover as condições de anaerobiose do rúmen,
- 3 Evitar queda no pH ruminal
- 4 Aumentar a digestibilidade da fibra.

As leveduras são reconhecidas como fontes ricas em vitaminas, aminoácidos, proteínas e outros co-fatores importantes que as tornam atraentes como auxiliares da digestão e uma fonte básica de nutrientes, como vitaminas (Tiamina, principalmente) para apoiar o crescimento dos microrganismos no rúmen.

As leveduras têm a característica de manter suas atividades metabólicas em condições de anaerobiose, secagem, aquecimento e condições de pH baixo, o que torna viável seu emprego na dieta de ruminantes. Certas cepas de leveduras dentro do rúmen possuem características desejáveis ao animal, pois a inclusão destas leveduras vivas na dieta incrementam a população bacteriana ruminal, que têm a capacidade de alterar a atividade metabólica específica do rúmen, proporcionando o aumento da proteína microbiana, melhor digestão da celulose e a maior utilização do ácido láctico. (NEWBOLD, 1997).

A *Saccharomyces cerevisiae* possui grande afinidade por oxigênio, retirando-o do rúmen, melhorando as condições para os microrganismos anaeróbios. A remoção do oxigênio via levedura estimularia o crescimento de bactérias estritamente anaeróbicas do rúmen, o que também foi sugerido como método de seleção bacteriana. A concentração de conteúdo ruminal é essencialmente anaeróbica, mas alterações de oxigênio dissolvido pode ser detectada durante o ciclo da alimentação diária. O oxigênio entra no rúmen, enquanto o animal está comendo, tanto com os alimentos e como através da salivação. O aumento do potencial de redox após a refeição em ovinos observado por Mathieu et al. (1996), é principalmente devido ao fornecimento de oxigênio no rúmen durante a ingestão de alimentos, mastigação e

ingestão de água. A capacidade de diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para estimular o crescimento de bactérias viáveis no rúmen parece ser relacionada à sua capacidade de remover o oxigênio do líquido ruminal, uma vez que mutantes deficientes de respiração de *Saccharomyces cerevisiae* não conseguiram estimular o número de bactérias ruminais. (NEWBOLD et al., 1997).

Com a inclusão de leveduras na dieta animal ocorre redução da concentração de amônia ruminal devido a utilização da amônia pelos microrganismos. As leveduras têm ação estimulante sobre determinados microrganismos ruminais favorecendo o aumento de sua população, ocorrendo maior incorporação da amônia na proteína microbiana, explicando o decréscimo na concentração de amônia no rúmen. Esse aumento na síntese de proteína pode ser importante para suprir as necessidades de aminoácidos específicos para animais em crescimento ou de alta produção. (HUBER, 1994; WALLACE, 1994).

Nos animais alimentados com dietas ricas em concentrados, as culturas de leveduras podem ter um papel importante no controle da fermentação ruminal, pois as altas concentrações de ácido láctico e diminuição do pH ruminal resultam muitas vezes em quadros de acidose. A suplementação com leveduras nessa situação tende a diminuir as concentrações de ácido láctico no rúmen e manter o pH ruminal em uma faixa próxima ao ideal. A estabilização do pH está geralmente associada à diminuição dos níveis de ácido láctico no rúmen. A estimulação da utilização do ácido láctico por bactérias poderia esclarecer o fato de *Saccharomyces cerevisiae* ter induzido a diminuição das concentrações de ácido láctico e a elevação correspondente do pH ruminal. O aumento do número total de bactérias cultiváveis no rúmen parece ser um dos efeitos mais consistentemente relatados em respostas à suplementação de levedura (NEWBOLD, 1990). Com um pH ideal ocorre o aumento das bactérias celulolíticas no rúmen resultando num aumento das atividades digestivas proporcionando um possível aumento na produção de ácidos graxos voláteis (AGV) sem, porém, alterar a sua proporção, melhorando o aspecto nutricional do animal. (NEWBOLD, 1997). O aumento dos níveis de protozoários no rúmen após a ingestão de *Saccharomyces cerevisiae* também foram relatadas pelo mesmo autor.

O efeito da ingestão de *Saccharomyces cerevisiae* não é constante sobre as concentrações totais de ácidos graxos voláteis (AGV), produção de metano e concentração de amônia, mas parece estar fortemente dependente do tipo de dieta

testada (CHAUCHEYRAS, 2002) . Fiems *et al.* (1993) relataram que a efeito da levedura sobre o pH ruminal foi mais pronunciado em ovinos alimentados com silagem de milho, cereais e concentrado como base da dieta (açúcares altos / teor de amido alto) do que com o feno de capim.

Os possíveis efeitos da ação dos probióticos em ruminantes adultos é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 Ação de probióticos em ruminantes.

Efeitos observados no rúmen	Efeitos na produção animal:
Aumento do número de bactérias no rúmen	Aumento nas atividades das bactérias com maior síntese de proteínas e de vitaminas. Diminuição dos níveis de amônia ruminal.
Aumento da digestão ruminal da celulose	Aumento da disponibilidade de nutrientes para o processo de produção. Melhor eficiência na utilização de alimentos volumosos e maior ganho de peso dos animais. Estímulo para maior ingestão.
Alteração das atividades metabólicas no rúmen	Maior estabilidade do processo digestivo ruminal. Maior produção e melhor composição dos produtos de origem animal, como o leite em teores de proteína e gordura.

Fonte: Newbold, (1990)

Os efeitos dos aditivos microbianos no desempenho e no metabolismo são variáveis, devido à diversidade de composição dos produtos microbianos, das dietas e da categoria animal estudados. Os aditivos bacterianos para ruminantes podem vir sozinhos ou em combinação com extratos de fungos, que tem sido usado para estimular o desenvolvimento de animais jovens (ZIOLECKI *et al.*, 1984).

Os probióticos compostos por bactérias lácticas são utilizados principalmente em bezerros, para obter um controle de diarreias bacterianas, visando, entre outras coisas, uma desmama precoce e sem estresse (MEYER *et al.*, 2001).

Os prebióticos usados em ruminantes são oligossacarídeos, sendo que os compostos mais utilizados são os mananoligossacarídios (MOS), obtidos da parede externa da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e os frutoligossacarídeos (FOS) que são encontrados em certas plantas (ROBERFROID, 1996). Atualmente esses compostos vêm sendo utilizados como alternativa aos promotores de crescimento

com o objetivo de manter o equilíbrio benéfico da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em eminente condição de estresse. No mercado de aditivos, a maioria das empresas direciona a utilização dos probióticos para ruminantes e monogástricos, enquanto que os prebióticos são geralmente recomendados preferencialmente para monogástricos. (WALLACE, R.J. e NEWBOLT, C.J.,1993).

Os aditivos zootécnicos são fornecidos aos ruminantes através de rações e suplementos, e a uniformidade de consumo é um dos obstáculos ao emprego destes aditivos em animais em manejo de pastoreio.

Existem indicações de que aditivos microbianos podem melhorar a produção de ruminantes em cerca de 7 a 8%, magnitude semelhante à de ionóforos, os promotores de crescimento mais utilizado em ruminantes (MARTIN e NISBET, 1992; WALLACA, 1994). Caton *et al.*, 1993 relataram efeito positivo da suplementação do extrato de fermentação de *A. orizae* no consumo e digestibilidade dos alimentos quando os novilhos consumiam pasto mais maduros. A utilização de nutrientes reduziu-se proporcionalmente com a adição do suplemento biológico quando a forrageira é mais jovem.

2.3. Bactérias láticas

As bactérias láticas são grupo bastante heterogêneo de microrganismos distribuídos amplamente na natureza e tem sido isoladas de varias fontes: seres humanos, animais, plantas produtos a base de leite, vinhos e ensilagens (ORLA-JENSEN, 1919; ROGOSA, 1974). Entretanto muitas espécies parecem ter se adaptado às condições ambientais específicas e, geralmente, não foram encontrados fora de seu habitat especializado (LONDON, 1976). O metabolismo dessas bactérias explica esta seletividade ambiental. Bioquimicamente, não possuem o ciclo de Krebs e cadeia respiratória clássica, o que as limita a ambientes de baixa concentração de oxigênio (microaerofilia), ou mesmo ausência total (BRYAN-JONES, 1975). Enzimas oxidativas terminais flavoproteicas constituem o sistema responsável pelo transporte de oxigênio durante a oxidação de vários substratos.(STRITTMATER, 1959).

As bactérias láticas são acidófilas, limitando-se a ambientes de pH relativamente baixos, crescendo numa faixa de pH de 5,5 a 6,2, mas também valores menores que 5,0. Os principais grupos são os bacilos e cocos, Gram positivas ,

anaeróbias facultativas, não esporogênicas, catalase negativas. A maioria morre à temperatura de 70°C mas, algumas são resistentes até 80°C. Elas preferem a lactose como fonte de carbono e fermentam a lactose formando ácido láctico. Considera-se homofermentação quando o produto final da fermentação da lactose é quase exclusivamente ácido láctico e heterofermentação quando os produtos finais são ácido láctico, acético, dióxido de carbono e etanol. A capacidade fermentativa varia de acordo com a espécie e o(s) substrato(s) disponível. A maioria das bactérias lácticas atinge índices entre 0,5 a 1,5% de ácido láctico no meio de cultura, mas existem espécies que formam até 3 %. A Figura 2 mostra a fermentação láctica a partir da glicose:

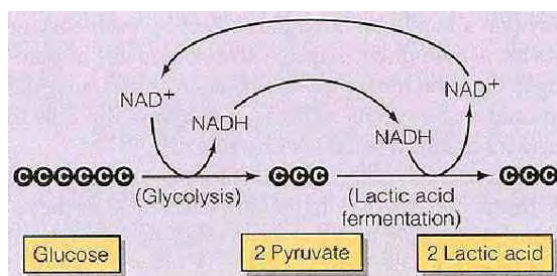


Figura 2: Fermentação láctica da glicose.

As bactérias lácticas têm requerimentos nutricionais complexos, e crescem em ambientes ricos do ponto de vista nutricional. Dentre os nutrientes necessários está o nitrogênio orgânico que obtém através da liberação no leite através de proteases que hidrolisam a caseína. A capacidade proteolítica das espécies varia bastante. Aminoácidos, peptídeos, derivados de ácido nucléicos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos e carboidratos são necessários em meios de cultivo ricos e complexos, contendo extratos orgânicos ricos em vitaminas e peptídeos (KANDLER e WEISS, 1986).

Cada espécie apresenta requerimentos nutricionais característicos. No caso dos lactobacilos são necessárias as vitaminas pantotenato de cálcio e niacina para a grande maioria ; riboflavina para *L. delbrueckii*, *L. heveticus* e *L.casei*; tiamina é necessária para o crescimento dos heterofermentativos (*L.plantarum*, *L.fermentum*, e *L. brevis*). As vitaminas B12, timidina e biotina são muito pouco exigidas entre os lactobacilos (KANDLER e WEISS, 1986).

Muitos lactobacilos requerem folato e o consumo envolve ATP ou algum outro intermediário de ligação fosfato (HENDERSON ET AL.1979). *L.delbrueckii* requer

fosfato de piridoxiamina (Mc NUTT & SNELL,1950) e timidina (KITAY ET AL.1950). *Leuconostoc* requer ácido nicotínico, tiamina, pantotenato de cálcio e biotina para todas as espécies. Cobalamina e ácido â-amino benzóico não são requeridos por nenhuma espécie (GARVIE,1986).

Em relação ao metabolismo de carboidratos, as bactéria láticas são consideradas sacarolíticas. Uma grande diferenciação foi feita (KANDLER e WEISS,1986) entre os lactobacilos baseada nas características clássicas de subgêneros de ORLA-JENSEN (1919),e três grupos foram definidos. O grupo *I-Lactobacilos*, obrigatoriamente homofermentativos que fermentam hexose quase exclusivamente a ácido lático pela via Embden-Meyerhof, e as pentoses e gluconato não são fermentados. O grupo *II-Lactobacilos* facultativamente heterofermentativos que fermentam hexoses como os do grupo I, exceção a poucas espécies que produzem outros ácidos em condições limitadas de glicose, pentoses são fermentadas produzindo ácido acético e lático via fosfocetalose induzível. O grupo *III-Lactobacilos* obrigatoriamente heterofermentativos fermentam hexoses a ácidos láticos e acético (etanol) e CO₂, pentoses são fermentadas a ácido lático e acético. Muitos carboidratos podem ser fermentados variando entre as espécies.

Para *Leuconostoc*, ramnose, melezitose, inulina, amido, glicerol, sorbitol e inositol não são fermentados. Algumas espécies produzem goma a partir de sacarose e manitol a partir de frutose (GARVIE.1986).

Tanto *Leuconostoc* como *Lactobacillus* requerem uma grande variedade de aminoácidos e os requerimentos variam com a linhagem. *L.mesenteróides subsp. Mesenteroides* constituem uma excessão requerendo somente ácido glutâmico e valina (GARVIE,1986).

Pequenas lesões genéticas no genoma bacteriano são responsáveis por requerimentos de aminoácidos em lactobacilos. Genes essenciais para biossíntese da maioria dos nutrientes parece estar presente no genoma de *L.casei S1* e muitos deles falham na produção de proteínas funcionalmente ativas devido a uma ou poucas mutações deletérias (MORISHITA ET AL. 1974,1981).

Os seguintes aminoácidos foram considerados essenciais (MORISHITA et al. 1981) para o crescimento de *L.plantarum*, *L.helvelticus*, *L.casei* e *L. acidophilus*: Isoleucina (Ile), leucina(Leu), glutâmico(Glu), fenilalanina(Phe), triptofano(Trp), metionina(Met),exceto para *L.casei*, treonina(Thr), exceto para *L.plantarum* e *L. casei*, tirosina(Tyr), ácido aspártico(Asp) e arginina(Arg), exceto para *L.plantarum*.

Barton -Wright(1952) considera para *L.arabinosus*, após comparação com diversos trabalhos,os seguintes aminoácidos essenciais: Leu, Val, Ile, Glu Met, cisteína(Cus) e triptofano(Trp). Os não essenciais são: Glicina(Gly), Hidroxiprolina, nor Val e nor Leu. Os estimulantes ou essenciais são Phe, Tyr, Arg e Lys. Eles concordam que todos esses aminoácidos devem estar presentes para o máximo crescimento da bactéria. Alguns trabalhos indicam que Asp, histidina(His), alanina(Ala), serina(Ser) e prolina(Pro) são acessórios ou estimulantes para o crescimento desses organismos.

Hutchings e Peterson (Cit. Em BARTON-WRIGHT-1952) trocaram a caseína por Leu, Val, Glu, Asp, Ser, Trp, Lys, Arg, Phe e Tyr,no meio de cultivo obtendo o crescimento de *L. helveticus*. Para *L.casei* os aminoácidos essenciais são: Leu, Ile, Val, glutamina(Gln), asparagina(Asn), Glu, Phe, Arg, Lys, Trp, Tyr e Phe (STROBEL et al.,1989).

Collar (1992) relacionou aminoácidos que foram consumidos durante a fermentação da massa do trigo inoculando-se bactérias lácticas. *L.brevis* consumiu Leu, Ile, Lys, Glu, Asp, ornitina (Orn), Pro, Phe e Met, detectados através da diminuição desses aminoácidos na massa do trigo.

O transporte ativo de aminoácidos é normalmente o mais utilizado pelas bactérias lácticas. Pelo menos cinco transportadores estão envolvidos no transporte de Gln, Asn, Glu/Asp (mesmo carregador), Phe ou aminoácidos de cadeia ramificada. Leu é consumida mais rapidamente que Val e Ile. Dos 10 aminoácidos requeridos para o crescimento de *L.casei* energizado com glicose, apenas Glu, Leu, Phe, Asp são consumidos rapidamente. O consumo de Leu por *L.casei* é completamente inibido pelo excesso de Val e Ile e, similar excesso de Asp inibe completamente o consumo de Glu (STROBEL et al.,1989).

Em *Streptococcus lactis* ML3 e *Streptococcus cremoris* Wg2 o consumo de glutamato e glutamina são mediados pelo mesmo sistema transportador, o qual tem 30 vezes mais afinidade por Gln do que por Glu a pH 6,0, o transporte é feito pela forma protonada dependendo apenas do pH intracelular, requerendo ATP e não pelo sistema de força próton motiva (POOLMAN et al.,1987). Aminoácidos neutros (Ser, Ala e Gly) tem sido estudados em *S.lactis* ML3 (THOMPSON,1976) e *S.faecalis* (ASGUAR et al.,1973) .O transporte é dirigido pelo sistema de força próton motiva, com alteração do pH externo.

Em *L. casei* o transporte de Leu e Phe decresce rapidamente quando o pH é

aumentado para 7,5 devido a inibição da força próton-motiva. Porém os aminoácidos Gln, Asn e Glu, são transportados rapidamente em pH 7,7, embora o sistema de força próton-motiva esteja totalmente desativado. Semelhante ao streptococcus, esses aminoácidos não são transportados pelo sistema de força próton-motiva, mas por um sistema de transporte dirigido por moléculas transportadoras com ligação de fosfato (STROBEL et al,1989).

A capacidade de acumular vários aminoácidos em *L.arabinosus* é decrescida mais severamente pela deficiência de vitamina B6, e em menor grau por biotina e ácido pantotênico. Isso parece estar associado a síntese anormal da parede celular a qual leva a um sistema de transporte não usual,sensível a fatores osmóticos (HOLDEN,1964).

Os aminoácidos são o principal fator de indução de crescimento de *Lactobacillus fermentum* em caldo de fermentação alcoólica, e não houve crescimento bacteriano na ausência de suplementação com Leucina , Isoleucina e Valina (OLIVA-NETO e YOKOYA , 1997).

2.3.1 Efeito de compostos orgânicos no estímulo do crescimento das bactérias lácticas.

Os extratos orgânicos que participam nas formulações de meios de cultivo para o crescimento de bactérias lácticas foram bastante estudadas nas décadas de 40 a 60, e representam a base das informações sobre a nutrição desse grupo. A partir desse período poucas contribuições tem sido feitas nesse sentido.

A participação do extrato de levedura no meio foi comprovada (FENEY e STRONG,1941), levando ao aumento acentuado na taxa de crescimento de *Lactobacillus casei*. Na ausência de suprimento desse extrato, pouco ou nenhum crescimento bacteriano foi observado. Asn e Gln foram capazes de substituir o extrato de levedura. No ano seguinte esses autores identificaram a Asn como estimuladora do crescimento de vários substratos. Concentrações relativamente baixas de extrato de levedura (acima de 0,60 g /mL) estimularam o crescimento de lactobacilos durante a fermentação alcoólica, efeito este provavelmente associado aos aminoácidos desprendidos durante a autólise das leveduras (OLIVA-NETO e YOKOYA, 1996).

Smith (1943) verificou que substâncias desconhecidas presentes no extrato de levedura eram necessárias para o crescimento de *Streptococcus lactis*. Estas

substâncias não eram vitaminas conhecidas, não puderam ser substituídas por uma mistura de 23 aminoácidos, não eram precipitáveis por vários sais, eram insolúveis em solventes lipídicos e sua atividade foi destruída a 210° C. Halvorson & Muedeking (1947) compararam as taxas de fermentação de *L. casei* em meio sintético e em meio à base de extrato de levedura. Segundo os autores, vitaminas do complexo B e bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas) não tiveram efeito no crescimento quando adicionadas no meio sintético.

A peptona foi comprovada ser estimuladora de *L. casei* por Pollack e Linder (1943) e Figueredo e Passos (2003). Ikawa e O'Barr (1956) relataram uma grande variedade de substâncias orgânicas (extratos de levedura, fígado, carne, malte, caseína, triptona e insulina), estimuladoras do crescimento de *L. delbruackii*, sendo os extratos de levedura e fígado os mais ativos. Produtos de degradação de ácidos ribonucléicos e peptídeos presentes na digestão enzimática de proteínas foram considerados estimuladores do crescimento, quando foram feitas purificações dos extratos. Dos compostos puros testados, ácidos uridílicos e citidílicos foram os mais ativos promotores de crescimento. Uridina e citidina foram menos ativos.

A hidrólise ácida parcial da caseína estimulou o crescimento de *L. delbrueckii* e a adição de peptídeos de His e Ser duplicaram o crescimento quando adicionados ao meio de cultivo (PETERS et al., 1953; PRESCOTT et al., 1953).

Mc anelly & Speck (1957) trabalhando com *L. casei* e Speck et al. (1958) com *S. lactis*, determinaram que peptídeos presentes nos extratos de pâncreas, fígado e levedura eram os responsáveis pelo estímulo do crescimento bacteriano. Dahiya e Speck (1963) identificaram a adenina como fator estimulante do crescimento de *S. lactis* e *S. cremoris* em leite.

Weinmanet et al (1964) determinaram um fator de crescimento para *L. bulgaricus* denominado GBF, quando cultivado em meio basal semi-sintético. Extrato de levedura e de fígado foram as melhores fontes de GBF. Esse fator foi estável ao tratamento térmico, a pH 2,5 a 11 e a exposição prolongada a luz. Ele foi destruído a pH 1,0 e formou um único componente em cromatografia em papel. Foram testados adenina, ácido ribonucléico, digestão alcalina de RNA e Mg⁺ em experimentos individuais, porém a resposta do estímulo do crescimento foi bem inferior aos extratos de levedura e de fígado. Os autores não conseguiram identificar o composto do GBF. Fukuda et al (2002), descrevem GBF como uma mistura insolúvel de proteína rica em glutamina e fibra dietética de hemicelulose, utilizada por

Bifidobacterium e *Lactobacillus* .

O extrato de levedura foi fracionado em Sephadex G-25 em 7 frações por Selby - Smith et al. (1975). As frações mais estimuladoras do crescimento de *S. lactis* C10 continham 70% de nitrogênio amínico, uma ampla variedade de aminoácidos e pequena soma de peptídeos. Os aminoácidos foram os maiores responsáveis pelo estímulo do crescimento bacteriano; as bases adenina, guanina, uracila, xantina e constituintes inorgânicos também contribuíram na estimulação, porém em menor grau.

Em varias fermentações, embora o crescimento de leveduras provavelmente iniba bactérias maloláticas, pela produção de substâncias inibitórias ou remoção de nutrientes (RIBEREAU-GAYON et. al., 1975), o crescimento bacteriano é estimulado por leveduras nos estágios finais do ciclo de crescimento. É provável que nutrientes retornem ao meio pela excreção e/ou autólise das leveduras. O termo excreção refere-se ao desprendimento de compostos do citoplasma da célula da levedura viva, que ocorre durante o consumo de açúcares após a conclusão do brotamento (DELISE e PHAFF, 1961). Células de leveduras excretam aproximadamente 1/3 do nitrogênio total absorvido na forma de aminoácidos, peptídeos, purinas, pirimidinas, etc. Joslyn (1955) descreveu esse fenômeno com uma hidrólise enzimática intracelular dos constituintes protoplásmicos.

Oliva – Neto e Yokoya (1996,1997) estudaram as interações entre leveduras e Bactérias durante a fermentação. Curvas de crescimento de bactérias (*Leuconostoc oenos* e leveduras *Shaccaromycces*) , a partir de culturas puras e mistas , indicaram que o crescimento ativo de um inibia o outro. A autólise de leveduras foi estimuladora do crescimento de bactérias. Segundo os autores o menor crescimento de das bactérias em cultura mista, em relação ao cultivo puro, pode ser devido a ausência ou carência de aminoácidos.

2.3.2. Bactérias lácticas geneticamente modificadas.

A demonstração de um efeito biológico das bactérias lácticas no hospedeiro pode ser confirmado superexpressando certas atividades nessas bactérias para demonstrar de maneira absoluta os seus efeitos. Vários laboratórios há alguns anos, tentaram produzir moléculas com efeitos probióticos nas bactérias lácticas. Essa perspectiva começou lentamente a se tornar realidade graças aos conhecimentos

acumulados nos últimos 15 anos sobre a genética das bactérias lácticas e ,sobretudo *Lactococcus lactis* (PIARD,1999).

Muitas técnicas genéticas estabelecidas para essa bactéria foram adaptadas para as outras espécies e hoje podemos introduzir DNA em um grande número de bactérias lácticas. Foram também desenvolvidos instrumentos genéticos de um amplo espectro de hospedeiros (plasmídios, transposons, sistemas de expressão indutíveis, etc.) e a seqüência de genomas de diversas espécies de bactérias lácticas. A idéia é utilizar estas bactérias como veículo de diversas atividades biológicas a serem introduzidas no tubo digestivo. Uma dessas poderá ser a de produzir enzimas para suplementar deficiências pancreáticas ou vitamínicas para melhorar a saúde do hospedeiro ou oferecer lhe um melhor conforto intestinal. Essas aplicações se situam na área de desenvolvimento de produtos de um novo tipo de alimento, o alimento-saúde. Nessa categoria de produtos, as bactérias lácticas não serão somente escolhidas pelas suas aptidões tecnológicas, mas também pelas suas atividades probióticas (PIARD,1999).Se pudermos pensar que, no futuro, um tipo de produto fermentado poderá ter várias versões, segundo o conteúdo das bactérias lácticas adaptadas a diferentes deficiências o que, por exemplo,facilitaria a digestão de certos glicídios ou suplementariam nutrientes raros, e outros. Uma outra perspectiva particularmente atraente é utilizar as bactérias lácticas como vacinas vivas (DOUGAN, 1994). Nesse caso, tentaremos fazer com que as bactérias lácticas produzam antígenos ou peptídeos imunogênicos capazes de induzir uma resposta imunitária contra certo patógeno. Essa seria uma solução promissora para controlar doenças endêmicas causadas por numerosos vírus ou bactérias patogênicas que entram no organismo pela via oral (como, por exemplo, água potável e alimentos) e se desenvolvem na mucosa digestiva. A mucosa digestiva é um órgão linfóide importante e a indução de imunidade de mucosa permite uma luta precoce contra numerosas infecções. A noção de vacina viva administrada oralmente é também atraente no âmbito sócio econômico, pois essas seriam vacinas de fácil administração e de baixo custo. Esses argumentos incitaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a colocar o desenvolvimento desse tipo de vacinas como objetivo prioritário de saúde pública. Nesse tipo de aplicação, as bactérias lácticas constituiriam uma nova categoria de produtos: bactérias-medicamentos (PIARD,1999).

2.3.3. Bactérias lácticas probióticas.

É interessante notar que dentro de cada gênero que contém linhagens filogeneticamente próximas, temos linhagens não patogênicas e patogênicas. Por exemplo, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* são usadas na produção de iogurte e queijo, respectivamente, enquanto *Streptococcus pneumoniae* e *Lactococcus garviae* são agentes da pneumonia e da mastite, respectivamente. Desta forma, apenas as bactérias não patogênicas são inócuas e consideradas G.R.A.S. (Generally Regarded As Safe) e tornam-se interessantes como agentes bioterapêuticos. A Tabela 3 descreve algumas bactérias lácticas, metabólitos e aplicações.

Tabela 3: Metabolismo e aplicações de algumas bactérias lácticas

Nomenclatura	T °C crescimento	Produtos da fermentação	Origem	Aplicação
Bifidobacterium breve	37-41	Acido Láctico Acido Acético Acido Fórmico	Yakult	Leite fermentado
Bifidobacterium bifidum	37-41	Acido Láctico Acido Acético Acido Fórmico	Yakult Vários	Leite fermentado
Bifidobacterium lactis	37-41	Acido Láctico Acido Acético Acido Fórmico	Chr.- Hansen	Leite fermentado iogurte Probióticos*
Bifidobacterium longum, subsp. Animalis	37-41	Acido Láctico Acido Acético	Chr.- Hansen Vários	Leite fermentado

		Acido Fórmico	Probióticos*	
Lactobacillus acidophilus	35-38	Acido lático Peróxido hidrogênio	Vários	Leite fermentado Probióticos*
Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus	40-43	Acido lático	Chr.- Hansen Unilever	Leite fermentado
Lactobacillus casei	30-35	Acido Lático Acido Acético Acido Fórmico Etanol	Yakult	Leite fermentado
Lactobacillus jonsonii	35-38	Acido lático	Unilever	Leite fermentado
Lactobacillus plantarum	30-35	Acido Lático Acido Acético Acido Fórmico Etanol	Vários	Probióticos*
Enterococcus faecium	22-33	Acido lático	Kera Vários	Probióticos *

* Uso em animais de produção

Adaptado de

Lee,. Y.K. , (1999).

2.3.3.1. Os Lactobacilos.

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez por Moro (1900) a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno; este investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. Estes microorganismos são geralmente caracterizados como Gram-positivos incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e aerotolerantes ou anaeróbios. O gênero compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas. As mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. O *L. acidophilus*, o mais comum, é um bacilo gram-positivo com pontas arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio, e ser microaerofílico. São mesofílicos com temperatura de cultivo entre 32 ° C a 40° C.(GOMES e MALCATA , 1999).

Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS, THORNTON, SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999;).

Lactobacillus acidophilus é o microrganismo probiótico mais utilizado nos produtos destinados a humanos e animais monogástricos. Essas bactérias saudáveis normalmente habitam os intestinos, proporcionando proteção contra a proliferação de microrganismos patogênicos. O íleo terminal e o cólon parecem ser, os locais de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos (CHARTERIS et al., 1998). *Lactobacillus acidophilus* possui ação antimicrobiana comprovada contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *C. albicans*, *Escherichia coli*, *Clostridium* e *Klebsiella*. .(KANDLER e WEISS, 1993).

O microrganismo consegue ter ação antimicrobiana através de uma variedade de mecanismos, como, por exemplo, a quebra dos alimentos pelo *L. acidophilus* leva a produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e outros subprodutos que tornam o ambiente hostil para microrganismos indesejáveis. *L. acidophilus* produz a enzima lactase em grande quantidade e esta enzima fraciona as moléculas do açúcar presente no leite (lactose) em açúcares mais simples que podem ser facilmente digeridos. As pessoas com intolerância à lactose não produzem essa enzima, e podem se beneficiar do uso de suplementos de *L. acidophilus*.

L. acidophilus e outras bactérias benéficas são resistentes aos ácidos e à bÍlis. São, portanto, capazes de sobreviver ao trânsito através do trato gastrintestinal após serem ingeridos. (SALMINEN,1993)

2.3.3.2. As BifidobactÍrias.

As bifidobactÍrias foram isoladas pela primeira vez no final do sÉculo XIX por Tissier, sendo, em geral, caracterizadas por serem microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbios (SGORBATI et al., 1995). Podem ter várias formas que incluem bacilos curtos e curvados e bacilos bifurcados. Atualmente, o gÊnero *Bifidobacterium* inclui 30 espécies, 10 das quais são de origem humana (cáries dentárias, fezes e vagina), 17 de origem animal, 2 de águas residuais e 1 de leite fermentado (*B. lactis*); esta última tem a particularidade de apresentar uma boa tolerância ao oxigênio, ao contrário da maior parte das outras do mesmo gênero. O pH ótimo verifica-se a valores de pH entre 6 e 7, com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4.5-5.0 ou a valores de pH alcalinos de 8.0-8.5. São organismos heterofermentativos, que produzem ácidos acético e láctico na proporção molar de 3:2, crescem a temperaturas entre os 37 e 41  C,(GOMES e MALCATA, 1999). Inicialmente foram agrupados no gênero *Bacillus*. O gênero *Bifidobacterium* foi proposto em 1920 (ORLA-JENSEN,1924), no entanto, não havia um consenso taxon mico para este gênero, e novamente durante grande parte do século XX foram classificados no gênero *Lactobacillus* devido às suas formas semelhantes a bastonetes e características fermentativas. No entanto, estudos detalhando DNA, conteúdos GC e recursos metabólicos característicos resultaram a ressurreição do gênero *Bifidobacterium*, que foi incluído na edição oito do manual do Bergey em 1974.

Eles são caracterizados por um metabolismo hexose exclusivo que ocorre por meio de uma via fosfatoquelatase (phosphoketolase) frequentemente chamado o '*shunt bifid*'. Frutose-6-fosfato phosphoketolase (F6PPK)   uma enzima chave de '*shunt bifid*' e sua presença é o teste de diagnóstico mais comum para este gênero, como não  st presente em outras bactérias intestinais Gram positivas.

São comumente encontradas nos intestinos dos seres humanos e maioria dos animais e insetos. O *Bifidobacterium bifidum* ao lado de outras bifidobact rias como *B.longum* e *B. pseudocatenulatum*, é um dos microrganismos presentes na flora

intestinal de jovens, onde têm predominância de até 90% nos resíduos fecais. Esta porcentagem diminui chegando a 25 % durante a vida adulta (KANDLER e WEISS, 1993). Várias espécies de *Bifidobacterium*, entre elas *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis*, *B. animalis (lactis)*, *B. angulatum* e *B. pseudocatenulatum* colonizam simultaneamente o trato gastrintestinal de adultos. (YUAN-KUN LEC .1999).

È uma das principais bactérias probióticas, devido a numerosos estudos que forneceram um conjunto crescente de provas por seu papel em uma infinidade de benefícios potenciais para a saúde. Estes incluem a prevenção de diarreia em pacientes tratados com antibióticos (BLACK et al., 1991); redução do colesterol (DAMBEKODI e GILLILANDI, 1998); atenuação dos sintomas de intolerância lactose (JIANG et al., 1996); estimulação imunológica (TAKAHASHI et al., 1998); e prevenção do câncer (REDDY e RIVERSON, 1993). Os *Bifidobacterium* inibem a proliferação de bactérias que podem alterar os nitratos, transformando-os nos potencialmente danosos nitritos. As cepas de *B. bifidum* ajudam o funcionamento saudável da função hepática, além de promoverem a síntese de vitaminas do complexo B e ajudarem a assegurar a regularidade dos movimentos peristálticos do intestino. Os *Bifidobacterium* ajudam a absorção de vários minerais, principalmente o cálcio, além de diversas vitaminas, principalmente as do complexo B. Também ajudam o organismo a eliminar os resíduos digestivos de alimentos não totalmente digeridos. Por evitar o crescimento de bactérias indesejáveis, evitam a passagem de amônia para a corrente sanguínea, onde a mesma teria que ser metabolizada e desintoxicada pelo fígado, evitando assim uma provável sobrecarga do órgão (MOODLER, 1990)

Essa miríade de potenciais benefícios de saúde atribuído aos *Bifidobacterium* ilustra claramente que possuem muitas características interessantes para uso em aditivos probióticos.

2.3.4.Meios de cultura para bactérias lácticas

Dentre os componentes principais de um meio de cultura para as bactérias lácticas, estão as fontes de carbono e energia como os açúcares, as fontes de nitrogênio, fósforo e sais minerais. Outros componentes mais específicos como os fatores de crescimento são as vitaminas e aminoácidos. As bactérias lácticas são

fastidiosas e há variação nas necessidades nutricionais, pois cada espécie apresenta necessidades nutricionais características. *Lactobacillus* são altamente complexos necessitando de baixa pressão de oxigênio, carboidratos fermentáveis, aminoácidos, derivados do ácido nucléico, vitaminas (principalmente do complexo B), sais e ácidos graxos (GOMES e MALCATA, 1999). Os *Lactobacillus* utilizam apenas a via glicolítica para a degradação da glicose, havendo então necessidade de disponibilizar no meio de cultura as necessidades não geradas nas vias biossintéticas (BARBOSA e TORRES, 1999). As vitaminas pantotenato de cálcio e niacina são necessárias para a maioria das espécies, a riboflavina para o *L. casei* e a tiamina para os heterofermentativos como *L. plantarum* e *L. Fermentum*. As vitaminas B12, Timidina e Biotina são pouco exigidas entre os *Lactobacillus* (KANDLER e WEISS, 1986). Os *Lactobacillus* requerem também grande quantidade de aminoácidos decorrentes de pequenas lesões genéticas evolutivas no genoma bacteriano, não ocorrendo a expressão genética para a síntese destes. Os seguintes aminoácidos foram considerados essenciais: Isoleucina, Valina, Ácido Glutâmico, Fenilalanina, Triptofano, Metionina, Treonina, Ácido aspartico e Arginina, com pequenas variações entre espécies. (MORISHITA et al, 1981). Oliva-Neto e Yokota (1996) destacam a inibição do crescimento de *L. Fermentum* na ausência de aminoácidos, especificamente Leu, Ile e Val em caldo de cana. O extrato de levedura foi capaz de suprir a necessidade destes aminoácidos na cultura e promover crescimento bacteriano. Por outro lado Tyr, Asp, Lys não são essenciais, e a ausência de Phe, Ala, Glu, Cys, Pro, His, Arg, Thr, Trp, Ser, Met inibiram o crescimento bacteriano.

O gênero *Bifidobacterium* é ainda mais exigente nutricionalmente que os *Lactobacillus*, sendo os aminoácidos cisteína e cistina essenciais para o crescimento de algumas espécies de *Bifidobacterium*. (SYKES e SKINNER, 1973).

O meio de cultivo de eleição para o crescimento de bactérias lácticas é o MRS (De MAN, et al, 1960) desde a década de 60, período em que se consolidou a base de informações sobre a nutrição deste grupo. MRS contém peptonas e glicose que fornecem nitrogênio e carbono. Tween 80[®], acetato, magnésio e manganês e fornecem fatores de crescimento para o cultivo de uma variedade de bactérias lácticas. Estes ingredientes podem inibir o crescimento de alguns organismos contaminantes, e especificamente a adição de cloreto de lítio 0,003g / mL em MRS para a cultura de *Bifidobacterium*.

O soro de leite tem potencial como meio de cultura para a propagação de bactérias lácticas, pois contêm nutrientes, mas somente o emprego deste não é suficiente para o crescimento máximo. (BURY et al , 1998; MAIARA – MAKINEN e BIGRET, 1993).

O soro de leite é uma fonte de lactose e outros constituintes como aminoácidos, vitaminas e sais minerais, mas a complementação do meio com extratos orgânicos é necessária para o crescimento bacteriano. Os aminoácidos essenciais ao crescimento bacteriano estão presentes nas proteínas e no permeado do soro de leite, exceto a Valina (SGARBIERI,1996.).

A adição de soro de leite em substituição à água do meio MRS proporcionou crescimento de *Lactobacillus* e no caso de *Bifidobacterium* este crescimento foi superior ao meio controle MRS modificado em até 197% e 243% respectivamente (SARON et al , 2007), comprovando a presença de fatores de crescimento no permeado de soro de leite.

O extrato de levedura é uma fonte de peptídeos, aminoácidos e vitaminas do complexo B que complementa o meio para crescimento bacteriano, mas sua adição isoladamente ao permeado de soro não foi capaz de induzir o crescimento de *Lactobacillus* como o meio MRS, atingindo, em sua melhor combinação, 57,5 % do crescimento do meio controle. Esta mesma combinação foi suficiente para superar (128,8%) o meio controle no crescimento de *Bifidobacterium* , demonstrando pouca eficácia do meio MRS, mesmo adicionado de L cisteína em promover seu crescimento.(SARON et al , 2007).

Figueredo et al (2003) induziram o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* com diferentes fontes de nitrogênio no meio a base de permeado de soro de leite, obtendo crescimento semelhante ao meio MRS somente com a adição de proteose peptona nº. 3.

2.3.4.1. Componentes dos meios de cultivo

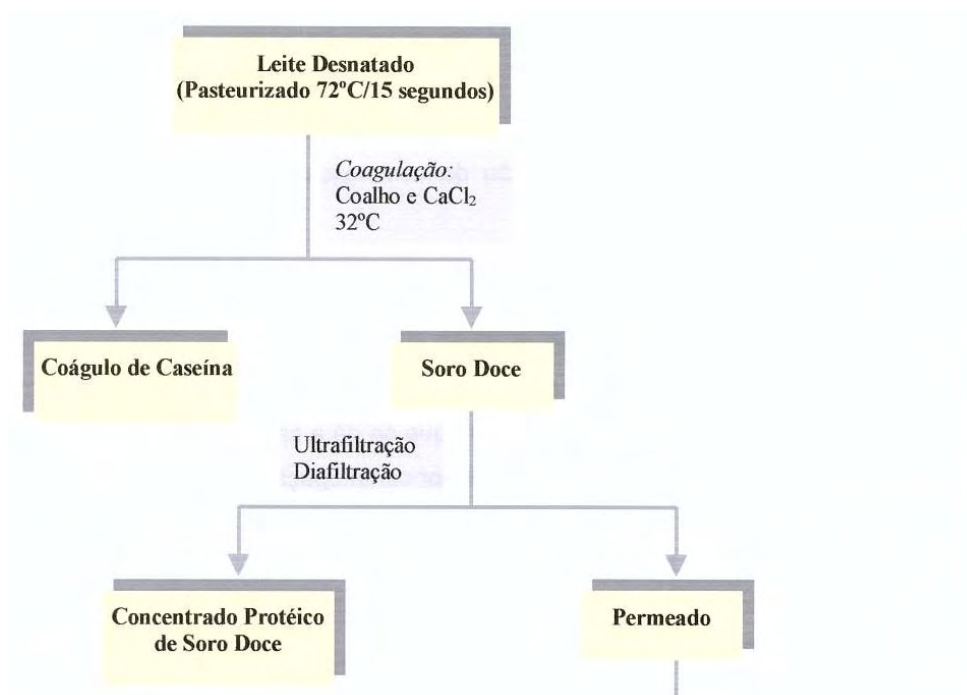
Os componentes utilizados foram os constituintes do meio de cultivo MRS, seletivamente acrescidos ao soro de leite doce bovino em pó reconstituído.

2.3.4.1.1. Soro de leite

Soro de leite em pó é conhecido há décadas como um produto de alto valor nutritivo. Hoje o desenvolvimento de mercados utilizando o soro de leite em pó e frações de soro como ingredientes nos gêneros alimentícios para consumo humano e animal transformaram o então subproduto em um produto valioso para a indústria de laticínios e queijos. Existem dois tipos de soro de leite de acordo com sua origem industrial.

O soro ácido provém principalmente da fabricação de queijos tipo *Cottage* e *Ricota*. No caso da fabricação de queijo *Cottage*, uma quantidade significativa da lactose do leite é convertida em ácido láctico antes que o soro seja separado da massa. À medida que aumenta a acidez, uma quantidade crescente dos sais de cálcio no leite se dissociam, o que provoca a solubilização do cálcio. Também a quantidade de cálcio retido no gel de caseína é menor. Assim sendo, a fabricação de queijo tipo *Cottage*, dá origem a um tipo de soro com acidez titulável mais elevada ($> 0,35\%$ de ácido láctico); além disso, produz soro com teor de lactose mais baixo, teor de cálcio mais alto e perfil de minerais diferente do soro doce.

O soro doce é subproduto da fabricação de queijos tipo *Cheddar*, *Suíço*, *Mussarela* e outros similares. Este tipo de soro contém menos ácido láctico ($< 0,16\%$), percentual de lactose mais elevado e menor teor de cálcio em comparação ao soro ácido. A maior parte dos produtos de soro de leite é derivada de soro doce. No que se refere às aplicações, o soro ácido é utilizado como realçador de sabor em molhos cremosos para saladas; é também empregado como retentor de água, emulsificador e fonte de cálcio. Já o soro doce é muito utilizado em produtos de panificação, salgadinhos, sorvetes e sobremesas lácteas. Todos os tipos de soro podem ser secos por “spray-dryer”, no entanto cada um requer seus próprios cuidados no manuseio. De forma geral, o soro doce é mais fácil de secar que o ácido. As principais operações utilizadas para a manufatura de soro em pó são como na Figura 3:



Saron et al: 2003

Figura 3. Fluxograma de produção de soro de leite e derivados.

O Fracionamento do soro de leite.

O soro comum ou pré-cristalizado, pode ser ultrafiltrado (UF). O soro é dividido em duas frações: O retido da ultra filtração, para produção de WPC (concentrados de proteína de soro em graus diferentes 35, 60 ou 80) ou mesmo WPI (isolado de proteína de soro com conteúdo de proteína maior do que 90% em base sólida) e um permeado. O permeado pode ser evaporado mais adiante para produzir lactose em graus diferentes. Durante este processo, também é possível retirar o mineral fosfato de cálcio.

Composição soro de leite

O soro de leite em pó é composto principalmente de lactose (85%) , proteínas (lactoalbuminas), lipídeos e minerais. A Tabela 4 mostra a composição do leite integral e do soro de leite doce.

Tabela 4: Análise comparativa da composição dos sólidos do leite e soro doce.

Componente (g/100 mL)	Leite Integral	Soro de leite doce
Proteínas	26,6	13,4
Gordura	29,7	1,1
Lactose	37,8	76,9
Minerais	5,9	8,6

Fonte: USDEC, (1997).

As variações de composição de amostras de soro de leite podem ocorrer devido ao processo de fabricação de queijos e retirada de gordura do soro antes do descarte ou processo de secagem.

Nutrientes no de soro de leite

- **Carboidratos:** O açúcar presente no soro é a lactose (Galactose α -1,4 glucose). A lactose é formada por dois carboidratos menores, chamados monossacarídeos, a glicose e a galactose, sendo, portanto, um dissacarídeo. O leite de vaca contém originalmente de 4-6% deste açúcar. No soro a lactose se encontra em duas formas isoméricas denominadas de α -lactose e β -lactose. As estruturas moleculares da α -lactose e da β -lactose diferem na orientação de um hidrogênio e em um grupo hidroxila no átomo de carbono 1 (na molécula da glicose). Ambos os isômeros mudam entre si continuamente. Este fenômeno é chamado mutarrotação. A velocidade da mutarrotação é determinada por fatores tais como a temperatura, a concentração, e o pH da solução. As soluções de lactose procuram o estado do equilíbrio entre as formas α e β . Na temperatura ambiente, o equilíbrio resulta em uma relação de 40% α -lactose e 60% de β -lactose aproximadamente. A lactose é hidrolisada pela ação da lactase, é fracamente doce e as leveduras não a fermentam, mas podem ser adaptadas para fazê-lo. Lactobacilos a transformam em ácido láctico.

- **Proteínas:** As lactoalbuminas são os produtos resultantes da precipitação pelo calor de albuminas solúveis do soro oriundo da fabricação de queijos ou caseína.

O lactosoro contém entre 0,8 - 0,9% de proteínas solúveis a α -lactalbumina (65%), β -lactoglobulina (20%), Soroalbumina–BSA (5%) imunoglobulinas (8%) e lactoferrina(2%). As proteínas solúveis podem ser precipitadas pelo calor ou recuperadas sem desnaturação por separação de membranas ou processos cromatográficos. Do ponto de vista aminoacídico (aminoácidos essenciais), as proteínas de soro apresentam todos os aminoácidos essenciais para o crescimento de bactérias lácticas (Anexo III), mas a disponibilidade destas para a síntese bacteriana depende da capacidade de lise das proteínas pelos micro-organismos. As proteínas do soro apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina. (SGARBIERI,1996.).

- **Aminoácidos:** O soro de leite doce é rico em aminoácidos e peptonas, com variações de 20,3 g a 34,3 g de destes componentes em 1 kg soro em pó, de acordo com o processo industrial de fabricação de queijos (MAVROPOULOU et al , 1972). Os aminoácidos que compõe o soro de leite doce estão descritos no anexo I. Outra fonte de aminoácidos são as proteínas do soro de leite, para microorganismos com proteases para utilizá-las. A composição aminoacidica destas proteínas está no anexo II.

- **Lipídeos:** As gorduras presentes no soro de leite são saturadas (70%) e insaturadas (30%). Devido ao grande valor econômico e a facilidade de retirada da gordura do soro, geralmente este é centrifugado após a fabricação dos queijos e a presença de gorduras no soro é pequena.

- **Vitaminas:** O soro do leite possui vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) em pequenas quantidades , mas é uma rica fonte de proteínas hidrossolúveis , B1 (Tiamina), B2 (riboflavina), B6 (Piridoxina),B12 (Cianocobalamina), Niacina e Acido Pantatênico. A composição vitamínica do soro de leite está descrita no anexo III.

- **Macrominerais:** Os minerais Na, Ca, K, Mg e P estão presentes no soro de leite conforme descrito no anexo IV.

- **Microminerais:** Os seguintes microelementos estão presentes em quantidades-traço na composição do soro de leite: Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Se e Zn.

2.3.4.1.2. Outros nutrientes

Extrato de levedura

Os extratos de levedura são excelentes substratos para muitos microrganismos. Ele é produzido a partir da plasmólise de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* com altas concentrações de NaCl ou mediante autólise a 50-55°C. O extrato contém aminoácidos, peptídeos, proteínas, vitaminas solúveis em água e carboidratos. O glicogênio e a trealose das células da levedura se hidrolisam com a glucose durante a produção do extrato. As composições mais detalhadas do extrato de levedura produzido por autólise e plasmólise estão na Tabela 12. Ocorre também uma variação de na composição devido aos substratos que foram utilizados no crescimento da biomassa das leveduras (CRUEGER e CRUEGER, 1993). São secas em “*spray dryer* “ originando um pó fino, de cor bege clara, solúvel em água. É um composto de peptídeos, aminoácidos e vitaminas do complexo B. A composição detalhada do extrato de levedura esta descrita no anexo V.

Proteose Peptona

. A Proteose peptona é utilizado com fonte de Nitrogênio para o crescimento celular, obtido através da digestão péptica de tecido animal. É rica em proteoses, peptonas e livre de aminoácidos. O Nitrogênio total mínimo é de 12,0%. (Fonte : Departamento de assessoria científica - Biosystems Lab.) Composição detalhada no anexo VI .

Extrato de carne

O Extrato de Carne é utilizado como fonte de Nitrogênio para crescimento celular a partir de carne magra fresca. O extrato de carne é um complemento da peptona. Este completa a peptona de carne, fornecendo minerais, fosfatos, fontes de energia e fatores essenciais que faltam na peptona. Nitrogênio total mínimo é de 11,5% . (Fonte: Departamento de Assessoria Científica - Biosystems). A Composição detalhada esra descrita no anexo VI

Sais inorgânicos

Os micronutrientes atuam como componentes de proteínas,cofatores de enzimas, componentes de estruturas ou osmorreguladores .

Polisorbato

Agente tensoativo não-iônico, emulsionante, estabilizante, solubilizante e umectante. Não possui função nutricional nas soluções, pois não é metabolizado.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Caracterizar as melhores condições de utilização do soro de leite para o cultivo de micro organismos probióticos para a produção de suplementos e aditivos alimentares para animais.

3.2. Objetivos específicos

1 A caracterização da composição do soro de leite reconstituído e a avaliação do perfil das fontes nutricionais limitantes ao crescimento de bactérias probióticas no soro de leite doce.

2 Avaliar o crescimento bacteriano em varias concentrações de soro de leite doce.

3 Avaliar os nutrientes adicionais necessários para utilização industrial do soro de leite doce como meio de cultura para bactérias lácticas, como extrato de levedura , peptonas, extrato de carne , sais e adsorventes.

4 Determinar parâmetros de avaliação de crescimento celular em meio de cultura com soro de leite utilizando absorbância, unidades formadoras de colônia / mL, pH da solução , determinação de acidez total , biomassa e consumo de açucares do meio.

4. Material e Métodos

Os Experimentos aqui apresentados foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis.

4.1. Microorganismos.

Foram utilizadas cepas bacterianas cedidas pela Christian – Hansen (Valinhos , Brasil) depositadas no laboratório de biotecnologia industrial da Unesp – Assis – SP. ,

1 *Lactobacillus acidophilus* La 04

2 *Bifidobacterium lactis* Bb 12

As culturas são mantidas em amostras congeladas em nitrogênio líquido (-270°) em MRS, pH 6,0 com 10% de glicerol na solução para preservação das células para utilização nos ensaios .

4.2. Nutrientes

Os meios de cultura devem prover os microrganismos com fonte de nitrogênio (N), carbono (C) vitaminas, aminoácidos e sais minerais. Os extratos orgânicos são uma importante fonte de nutrientes para as bactérias lácticas, e dentre estes o extrato de levedura fornece componentes essenciais sem os quais não é possível o crescimento bacteriano. Testes preliminares realizados com soro de leite e extrato de levedura mostraram potencial para promover o crescimento tanto de *Lactobacillus acidophilus* La 04 como *Bifidobacterium lactis* Bb 12. , confirmando os resultados obtidos em meios de cultura em permeado de soro de leite. (SARON; 2007, FIGUEREDO e PASSOS , 2003).

Soro de leite

Neste trabalho foi utilizado soro de leite doce, em pó, da empresa Laticínios Porto Alegre Ltda., de Mutum –MG.

Extrato de levedura

O extrato de levedura utilizado é o BIONIS YE F102, da empresa Biorigin.

Proteose Peptona

O produto utilizado é da marca SIGMA proveniente de origem animal do laboratório Sigma Aldrich.

Extrato de carne

O Extrato de Carne utilizado é o extrato numero 1 - HIVEG - Cód. RM003V . Lab. HIGEG.

Sais inorgânicos

Os sais foram adicionados aos meios em composição similar à sua constituição no meio MRS.

Polisorbato

Foi utilizado o produto denominado comercialmente como Tween 80.

4.3. Formulação dos meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados em Erlenmeyers de 250 mL , com conteúdo de 150 mL formulado conforme o objetivo do ensaio. O pH foi ajustado para 6,0, esterilizado por autoclave a 121°C por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A nomenclatura dos meios de cultura indica os constituintes presentes em cada formulação. Os caracteres indicativos dos constituintes estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Termos utilizados para nomenclatura dos meios de cultura.

Componentes	Símbolo
Soro de leite	W
Extrato de levedura	Y
Proteose Peptona	P
Extrato de carne	M
MRS modificado	MRS m
Sais do MRS	S
Polisorbato	T

4.3.2. Preparação dos meios de cultura para o crescimento bacteriano.

Os parâmetros de avaliação de crescimento em meio de cultura de *Lactobacillus acidophilus* La 04 foram realizados com o meio MRS (De Man, Rogosa e Sharp, 1960) , modificado de acordo com formulação utilizada no Laboratório de Biotecnologia industrial – UNESP – ASSIS – SP , cujos constituintes estão descritos nos anexos VII.

Para a cultura de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 utilizou-se para parâmetro de crescimento o mesmo MRS adicionado a L-cisteína (0,05g / 100 mL de meio) passando a ser identificado com MRS modificado (MRS m – SYKES e SKINER, 1973). A solução de cisteína foi filtrada em membrana Millipore (0,22 μ m) antes de ser adicionada ao meio previamente autoclavado (121 °C / 15 min.) e resfriado a temperatura ambiente.

4.3.3. Preparação dos meios de cultivo para crescimento de bactérias lácticas em soro de leite.

As variações de componentes nos meios de cultivo visaram determinar a sua influência no crescimento bacteriano.. O meio resultante foi analisado nos critérios de valores finais estimados de nitrogênio disponível (N), açúcares (lactose ou glicose), matéria mineral e sólidos totais. A concentração final de cada item aparece no final da tabela de cada meio formulado. A composição dos ingredientes dos meios foi baseada nas análises fornecidas por cada fabricante e está disponível no anexo VIII.

4.3.3.1. Composição de meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura para avaliação de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 .

Os meios de cultura foram preparados com variação nas concentrações de soro de leite, (10,0%, 7,5 % , 5,0% e 2,5 %), nas concentrações de extrato de levedura (1,5% , 1,0% e 0,5%), utilizando os sais inorgânicos e polisorbato. Os componentes

do meio estão na tabela 6. O crescimento do microrganismo em meio MRS foi usado como referência. A composição detalhada no anexo IX.

Tabela 6. Composição dos meios de cultura para avaliação da influência do soro de leite e extrato de levedura no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Meio		Componentes		
	Soro de leite	Extrato levedura	Sais	Polisorbato
W 10%	10,0%	-	-	-
W 10% Y1,5% ST	10,0%	1,50%	+	+
W 10% Y1,0% ST	10,0%	1,00%	+	+
W 10% Y0,5% ST	10,0%	0,50%	+	+
W 7,5%	7,5%	-	-	-
W 7,5% Y1,5% ST	7,5%	1,50%	+	+
W 7,5% Y1,0% ST	7,5%	1,00%	+	+
W 7,5% Y0,5% ST	7,5%	0,50%	+	+
W 5,0%	5,0%	-	-	-
W 5,0% Y1,5% ST	5,0%	1,50%	+	+
W 5,0% Y1,0% ST	5,0%	1,00%	+	+
W 5,0% Y0,5% ST	5,0%	0,50%	+	+
W 2,5%	2,5%	-	-	-
W 2,5% Y1,5% ST	2,5%	1,50%	+	+
W 2,5% Y1,0% ST	2,5%	1,00%	+	+
W 2,5% Y0,5% ST	2,5%	0,50%	+	+

(+): Indica adição do ingrediente ao meio formulado

(-): Indica ausência ingrediente ao meio formulado

4.3.3.2. Avaliação da eficiência de sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura .

A avaliação do crescimento bacteriano foi realizado em meios de cultura com soro de leite com variação na composição de sais, polisorbato e extrato de levedura. Os componentes do meio estão descritos na Tabela 7. O crescimento do microrganismo em meio MRS foi usado como parâmetro. A composição detalhada esta descrita no anexo X.

Tabela 7. Composição dos meios de cultura com soro de leite para avaliação da eficiência dos sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Meio	Componentes			
	Soro de leite	Extrato levedura	Sais	Polisorbato
W 5,0% Y1,5%	5,0%	1,50%	-	-
W 5,0% Y1,5% ST	5,0%	1,50%	+	+
W 5,0% Y1,5% S	5,0%	1,00%	+	-
W 5,0% Y1,5% T	5,0%	0,50%	-	+

(+): Indica adição do ingrediente ao meio formulado

(-): Indica ausência ingrediente ao meio formulado

4.3.3.3. Avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura.

O crescimento bacteriano foi avaliado em meios de cultura com diferentes fontes de nitrogênio. Os extratos orgânicos que compõe o MRS (extrato de levedura, extrato de carne e proteose peptona), foram adicionados em conjunto e separadamente aos meios de cultura conforme descrito na Tabela 8. A avaliação do

crescimento dos microrganismos em meio MRS foi realizado como parâmetro. Composição detalhada no anexo XI

Tabela 8. Composição dos meios de cultura para avaliação de eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

Meio	Componentes					
	Soro leite	de Extrato levedura	Extr.Carne	Proteose peptona	Sais	Polisorbato
W 7,5% PMY	7,5%	0,5%	1,0%	1,0%	-	-
W 5,0% PMY	5,0%	0,5%	1,0%	1,0%	-	-
W 5,0% Y 1,0%	5,0%	1,0%	-	-	-	-
W 5,0% P 1,0%	5,0%	-	-	1,0%	-	-
W 5,0% M 1,0%	5,0%	-	1,0%	-	-	-

(+): Indica adição do ingrediente ao meio formulado

(-): Indica ausência ingrediente ao meio formulado

4.3.3.4. Componentes do meio de cultura para determinação de curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

Os meios de cultura com soro de leite mais eficientes em promover o crescimento bacteriano foram utilizados para determinar a velocidade de crescimento. O inóculo foi controlado por plaqueamento em série e a curva de crescimento estabelecida em intervalos de tempo T0h, T4h, T10h, T18h, T24h e T48h. Os meios foram cultivados em estufa a 37°C. Os componentes da formulação do meio estão na Tabela 9. O crescimento em meio MRS foi realizado como parâmetro de crescimento. A composição detalhada esta no anexo XII.

Tabela 9. Componentes dos meios de cultura para determinação de curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

Meio	Componentes					
	Soro de leite	de Extrato	levedura	Extr.Carne	Proteose peptona	Sais
W 7,5% PMY	7,5%	0,5%		1,0%	1,0%	-
W 5,0% PMY	5,0%	0,5%		1,0%	1,0%	-

(+): Indica adição do ingrediente ao meio formulado

(-): Indica ausência ingrediente ao meio formulado

4.3.4. Preparo do inóculo.

Foram ativados através de descongelamento em água a temperatura ambiente por 30 segundos e transferidos assepticamente em tubos de ensaio com 6 mL do meio MRS em estufa a 37 °C, cultivados durante 12 horas . O inóculo padrão foi de 2% (v/v) das culturas utilizadas. .

4.3.4. Esterilização dos meios e equipamentos

A fim de garantir condições estéreis de crescimento do microrganismo, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como, todos os materiais utilizados, foram esterilizados em autoclave a 121°C, durante 15 min para volumes de caldo até 150 mL e 30 minutos para volumes maiores.

4.4. Fermentação láctica para a produção de probióticos

O processo de fermentação foi realizado pelo método de batelada simples, em estufa sem agitação, em Erlenmeyers de 250 mL com 150 mL de meio de cultura. Na

determinação da biomassa utilizou-se Erlenmeyers de 3,0 L com 2,5 L de meio de cultura. A temperatura de escolha para os processos foi de 37°C por até 48 h.

4.5. Análises da fermentação

As fermentações foram analisadas visando determinar o crescimento celular, a velocidade de crescimento celular, a acidificação dos meios de cultura, a quantidade de ácido lático produzido pelos microrganismos e consumo de açúcares no meio.

4.5.1. Medidas de estimativa do crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi mensurado por métodos diretos e indiretos, descritos como segue:

4.5.1.1. Plaqueamento e diluição em série

O Plaqueamento e diluição em série foram os métodos de escolha de medida de intensidade de crescimento bacteriano nos experimentos. A semeadura em placas ou plaqueamento revela o número de células capazes de se multiplicarem e formarem colônias em meios de cultivo apropriados e sob condições de incubação adequadas. Cada colônia desenvolvida é suposta ter sido originada a partir de uma unidade viável, a qual pode ser um organismo ou muitos. Este método permite avaliação de crescimento em meios com grande quantidade de partículas em suspensão, como os meios a base de soro de leite (TORTORA, 2003).

Como para uma maior precisão da análise, foram contadas as placas com número de colônias entre 30 e 300 U.F.C. A diluição da amostra foi feita antes de se proceder a sua mistura com o meio de cultura em agar gel (Anexo XIII).

4.5.1.2. Determinação da Biomassa seca.

Para a produção de Biomassa foi realizada culturas em MRS e soro de leite (W) em dois Erlenmeyers de 3 L com de 2,5 L de meio de cultivo cada. Foram utilizados o meio MRS como parâmetro e os meios a base de soro de leite com maior crescimento. Cada inóculo foi cultivado em meio igual ao meio de destino. O volume

de inóculo foi de 150 mL de meio de cultura MRS de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 ativados por 12 horas a 37°C em estufa. Os dois frascos foram cultivados a 37°C durante 48 horas em estufa, sem agitação.

A determinação da massa úmida dos cultivos é realizada por pesagem após separação por centrifugação a 2500 rpm durante 20 minutos, descarte do sobrenadante e lavagem do centrifugado. Este procedimento foi repetido por três vezes.

A determinação da massa seca foi feita através de secagem da massa úmida em placas em estufa de secagem a 105 °C durante 72 horas (O'TOOLE , 1984).

4.5.2. Determinação de pH e acidez total

A determinação do pH foi realizada através de retirada de 5 mL do meio de cultivo , diluído em frasco Becker para 20 mL com água destilada , homogeneizada e medido com o equipamento pH meter TEC 2 - Tecnal. A acidez total foi determinada através da medição de volume para neutralização de 5 mL retirados do meio de cultura, diluído em frasco Becker com 20 mL com água destilada, por uma solução de NaOH 0,1 N, e utilizando como indicador duas gotas de solução de fenolftaleína (1% em solução alcoólica). A padronização da solução de NaOH foi realizada com biftalato de potássio 0,1 N, preparado conforme anexo XIV.

Acidez total da solução convertida para Ácido Lático foi calculado multiplicando-se o valor do volume de NaOH corrigido por 1,81.(RIBEIRO, 2004).

4.5.3. Determinação de açúcares redutores nos meios de cultivo.

O método Somogy-Nelson foi utilizado para determinação da quantidade dos carboidratos (glicose e lactose) nos meios de cultivo pois são açúcares redutores. Os açúcares redutores possuem grupos aldeídos e cetonas livres na cadeia e são chamados redutores por atuarem como agentes redutores, isto é, que sofrem oxidação (doam elétrons). Açúcares não redutores (como a sacarose) possuem esses grupamentos interligados e tornam-se redutores a partir do momento em que sofrem hidrólise.

A lactose é um dissacarídeo redutor, reduz o íon cúprico do reativo de SOMOGY a óxido cuproso, em meio alcalino e a quente. Em seguida, o óxido

cuproso reage com o anion arseno-molibdato do reativo de NELSON produzindo um composto de coloração azul (óxidos de molibdênio, Mo_2O_3 , com $\lambda_{\text{max}} = 530$ nm). Dentro de certos limites, a intensidade da coloração azul é diretamente proporcional à quantidade de lactose na amostra. A preparação dos reativos está descrita no anexo XV. (RIBEIRO, 2004).

A determinação da quantidade de lactose presente no soro diluído 100g / 1000 mL (W 1,0) e estabelecimento de curva padrão em espectrofotômetro Ultrapec 1100 Pro, 530 nm das concentrações de 0,020, 0,040 , 0,060, 0,080 e 0,100 g de lactose para 100 mL de água deionizada e apresentados no anexo XVI. A determinação dos ART no soro de leite foi realizados após reconstituição de 10 g de soro de leite em pó em 100 mL água deionizada, em 1 mL retirado de amostra.

4.5.3.1. Determinação de açúcares residuais nos meios de cultivo.

Foram analisados por amostragem através de retirada de 1 mL de cada cultura após 48 h de cultivo a 37°C, pelo método Somogy-Nelson. A curva padrão de lactose e glicose foram utilizadas como referência para medição das amostras em espectrofotômetro Ultrospec 1100 Pro , 530nm. (Anexo XIV)

4.6. Análises estatísticas

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa GRAPHAT INSTAT , (Rutgers University – USA) e ao teste de médias de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Composição do soro de leite.

O soro de leite utilizado possui a quantidade de 76,6 g de lactose em 100 g do produto em base seca, (análise completa no anexo XV) , compatíveis com as especificações do fabricante e inferior às análises de soro de leite obtido por outros autores (SMITHERS et al, 1996 e SARON, 2007). Estes descreveram respectivamente 86,00 g e 85,05 g de lactose por 100 g do produto em base seca. As análises de proteínas no soro mostraram valores semelhantes aos encontrados pelos mesmos autores, exceto para a amostra de SARON (2007), que indica valores menores, devido ao processo de ultrafiltração da amostra com conseqüente retirada parcial das proteínas do soro doce. Os resultados referentes à gordura presente no soro utilizado foram maiores que o obtido por SMITHERS (1996) indicando ausência de processo de extração industrial no soro testado, o que altera a presença de nutrientes, principalmente vitaminas lipossolúveis que seriam carregadas junto com os lipídeos retirados no processo.

Tabela 10: Componentes do soro de leite doce em base seca

Componentes	(g / 100 g)
Lactose	76,66
Proteína	1,33
Gordura	2,5

5.2. Ensaio de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

Os ensaios de crescimento bacteriano foram realizados com *Lactobacillus acidophilum* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12. , separadamente, determinando a medida de crescimento celular pelo método de plaqueamento seriado e os valores de pH e acidez total em ácido láctico.

As formulações iniciais dos meios para ensaio evidenciaram tendência dos meios compostos à base de soro de leite resultar em meios com maior quantidade de sólidos, açúcares (lactose x glicose) e minerais. A composição dos meios com soro de leite também evidenciou menor quantidade de nitrogênio disponível no meio, principalmente nas formulações com adição de somente um extrato orgânico em relação ao meio MRS. A correção destes fatores através da retirada de sais inorgânicos, ajuste da adição de soro de leite em pó e a adição de extratos orgânicos em quantidade similar ao meio controle resultaram em meios de cultura com maior capacidade de induzir o crescimento bacteriano, mas elevou os custos dos meios a base de soro de leite.

5.2.1. - Crescimento de *Lactobacillus acidophilum* La 04 em diferentes concentrações de soro de leite e extrato de levedura.

Os meios formulados com soro de leite que refletem as concentrações de lactose próximas ao produto “in natura “(3,8 g a 5,75 g de lactose / 100 mL), ou pouco acima deste (3,8 g a 5,75 g de lactose / 100 mL), mostraram-se mais eficazes para promover o crescimento das bactérias lácticas. As formulações com 7,6 g de lactose / 100 mL (W 10,0%) e 1,91 g de lactose/100 mL (W 2,5%) não superaram o crescimento de 10^8 UFC / mL(Figuras 4, 5, 6 e 7).

Os meios adicionados com soro de leite 7,5% e 5,0 % e extratos orgânicos mostraram crescimento celular semelhante ao meio MRS, e significativamente maior que os meios em concentrações de soro de leite 10,0% e 2,5%.($p < 0,05$)(Figuras 4, 5, 6 e 7). O soro de leite integral hidrolisado mostrou maior capacidade de induzir crescimento bacteriano comparativamente ao soro de leite não hidrolizado. O soro integral mostrou ser mais eficaz que o permeado de soro de leite conforme descrito por Figueredo e Passos (2003). Isto evidencia a ativação das proteases das bactérias lácticas por peptídeos presentes no soro e a disponibilidade nutricional das proteínas do soro, que embora desnaturadas pelo processo de esterilização, não

perdem sua capacidade para nutrir as bactérias láticas. (MARUGG,1995; BURY,1998).

O extrato de levedura é um do extrato orgânico com grande capacidade de induzir o crescimento de bactérias láticas (OLIVA-NETO e YOKOYA , 1996,1997). A maior concentração de extrato de levedura no meio mostrou maior eficiência para induzir crescimento bacteriano, independente da concentração de soro de leite. O maior crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 entre os meios a base de soro de leite na concentração de 1,5% de extrato de levedura (10^9 UFC / mL). O decréscimo da intensidade de crescimento celular correspondeu à diminuição do soro de leite e do extrato de levedura nos meios de cultivo. O meio MRS promoveu o crescimento bacteriano de 10^9 U.F.C. / mL .

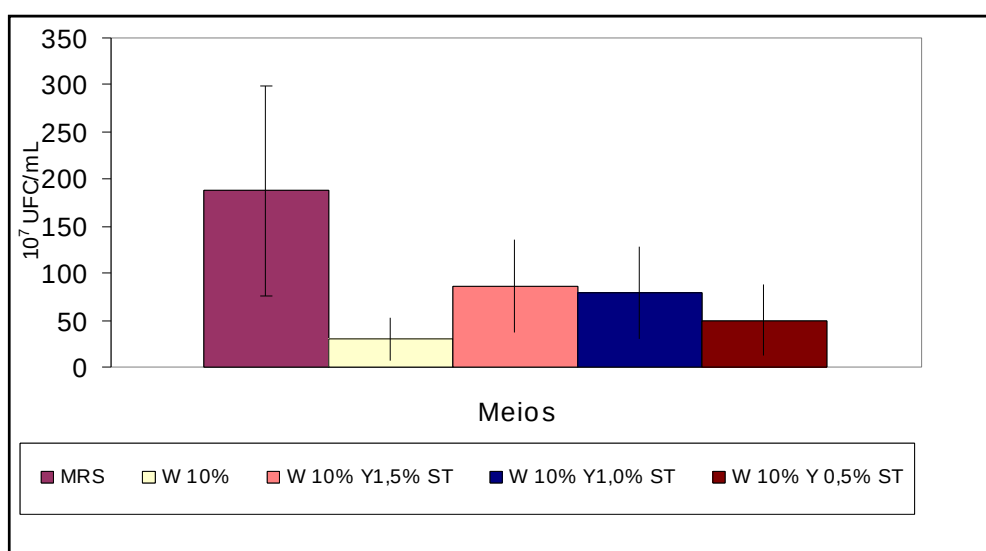


Figura 04: Crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite 10% e extrato de levedura (24 h cultivo / 37°C).

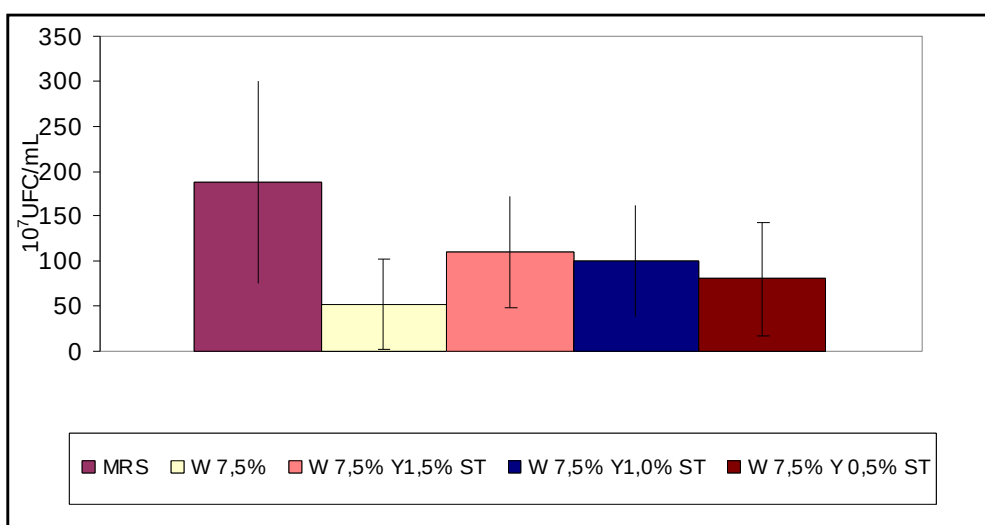


Figura 05: Crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite 7,5% e extrato de levedura. (24 h cultivo / 37°C).

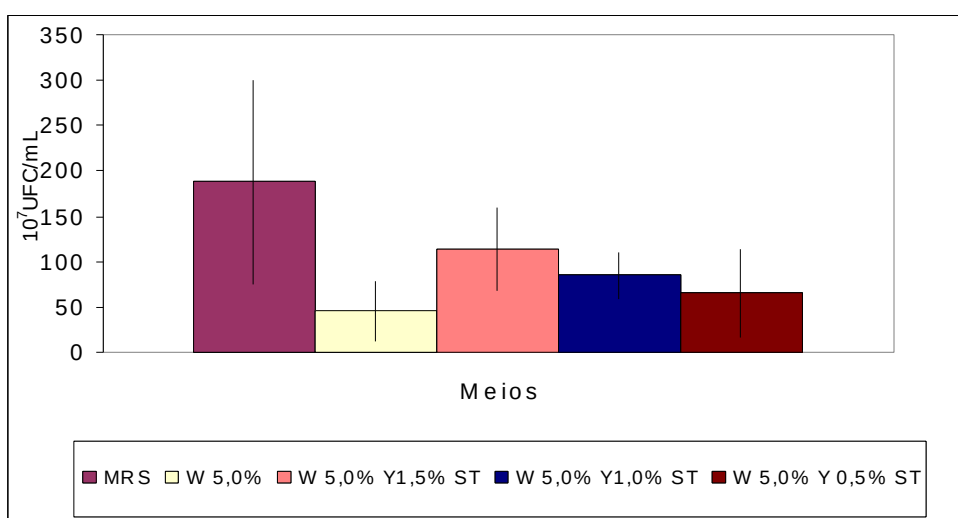


Figura 06: Crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite 5,0% e extrato de levedura. (24 h cultivo / 37°C).

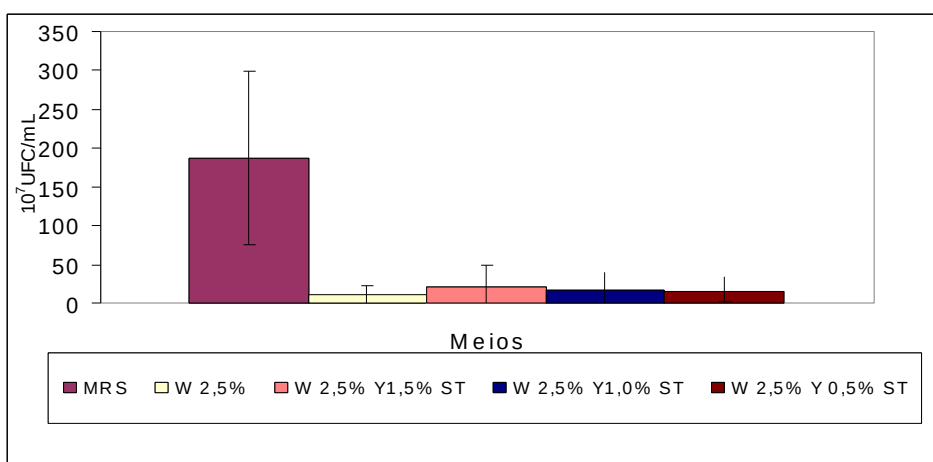


Figura 07: Crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 em meios de cultura com soro de leite 2,5% e extrato de levedura. (24 h cultivo / 37°C).

A tabela 11 mostra as diferenças estatísticas entre os resultados de crescimento bacteriano nos diferentes meios de cultura. Os meios com menor quantidade de soro de leite (2,5%) foram estatisticamente inferiores em promover o crescimento de *Lactobacillus acidophilum* La 04 quando comparado ao meio MRS. Os meios com soro de leite sem adição de extrato de levedura ou menor inserção deste extrato (0,5%) mostrarm diferença significativa de crescimento com o meio MRS.

Tabela 11: Análise de diferença estatística dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura .

Meios	UFC x 10 ⁷	SD	
MRS	187,6	112,15	a
W 10%	29,8	22,38	b
W 10% Y1,5% ST	86,0	49,06	ab
W 10% Y1,0% ST	78,4	21,97	ab
W 10% Y 0,5% ST	50,0	16,88	b
W 7,5%	52,2	22,75	b
W 7,5% Y1,5% ST	110,4	34,31	ab
W 7,5% Y1,0% ST	100,2	27,45	ab
W 7,5% Y 0,5% ST	80,4	27,95	ab
W 5,0%	45,4	15,02	b
W 5,0% Y1,5% ST	114,4	20,59	ab
W 5,0% Y1,0% ST	84,6	11,40	ab
W 5,0% Y 0,5% ST	65,4	21,74	b
W 2,5%	10,6	5,20	b
W 2,5% Y1,5% ST	20,6	12,90	b
W 2,5% Y1,0% ST	17,6	9,54	b
W 2,5% Y 0,5% ST	15,0	8,26	b

Letras diferentes indicam diferença entre si. (p < 0,05)

Os valores de pH indicam grande acidificação dos meios. Os meios de cultivo com 5,0% de soro de leite e extrato de levedura atingiram o pH mais baixo entre todos os testados, respectivamente 3,68, 3,85 e 3,89 . Os meios com a maior e a menor quantidade de soro de leite (10,0% e 2,5%) foram os menos acidificados. A produção de ácido láctico nos meios de cultura a base de soro de leite não foi correspondente a queda do pH, comparado ao meio MRS. A capacidade de tamponamento do MRS permitiu produção de maior quantidade de ácido sem correspondente queda no pH. O meio W 5,0% Y 1,5% ST atingiu pH de 3,68 e produção de 11,7 g / L

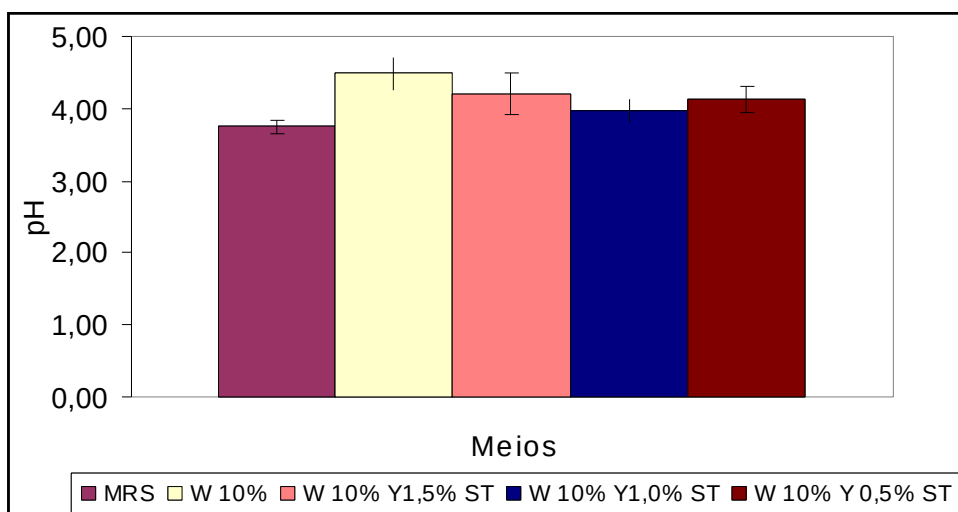


Figura 08: Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilus* La 04 com soro de leite 10% e extrato de levedura .

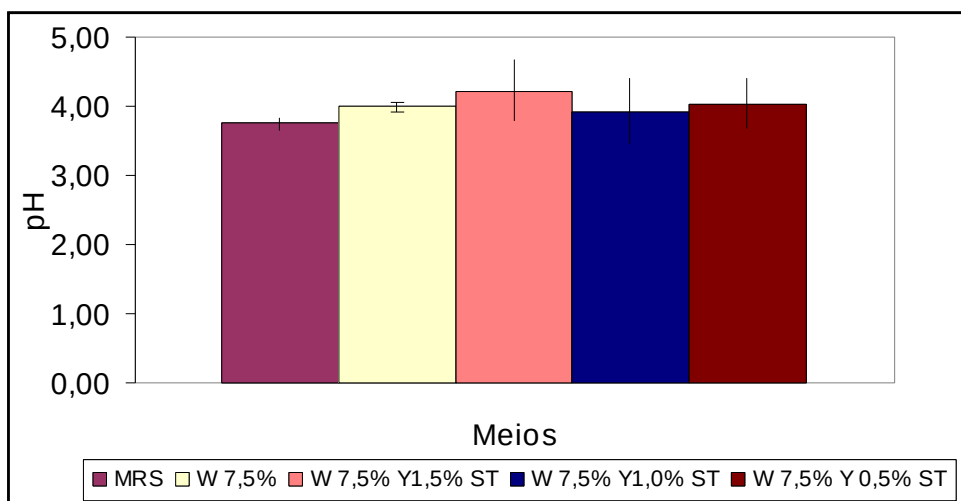


Figura 09: Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 7,5% e extrato de levedura.

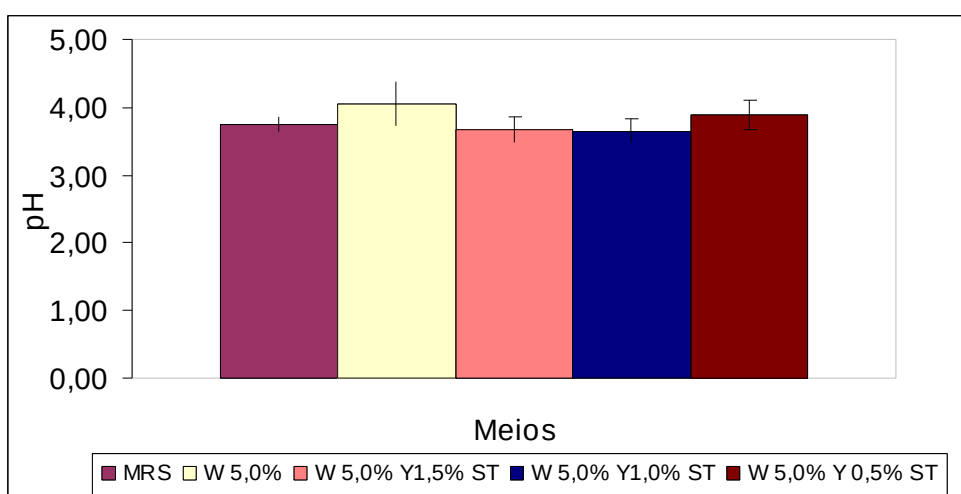


Figura 10: Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 5,0% e extrato de levedura .

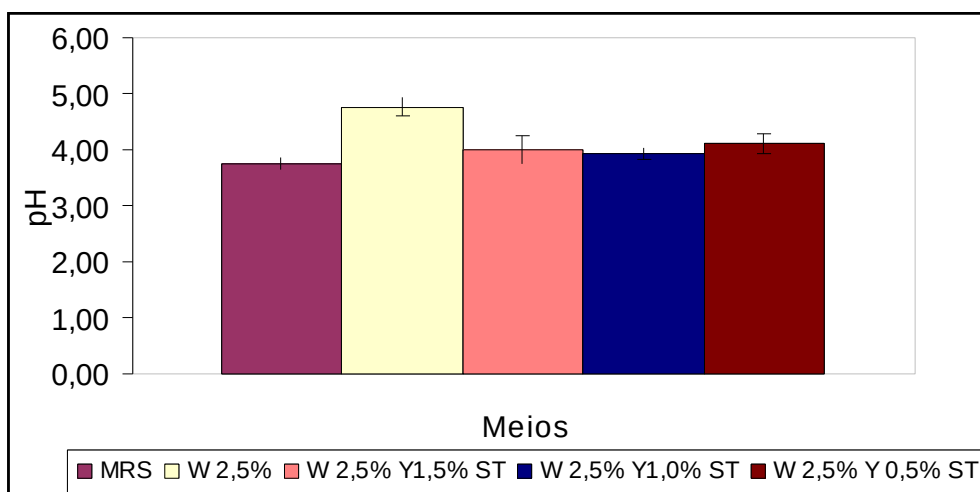


Figura 11: Valores de pH dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura .

A produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus acidophilum* La 04 atingiu o valor de 21,32 g / L no meio MRS , o maior entre os meios testados, e o menor valor 8,72 g / L no meio W 2,5% Y 0,5%. Houve correspondência entre a produção de ácido láctico e o crescimento celular. O meio MRS mostrou maior capacidade de tamponamento entre os meios testados.

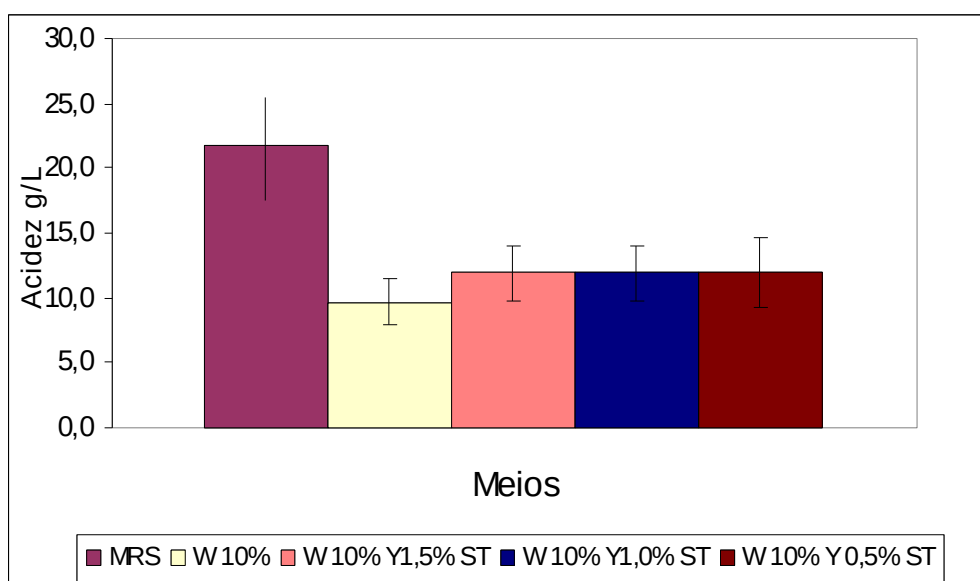


Figura 12: Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 10% e extrato de levedura .

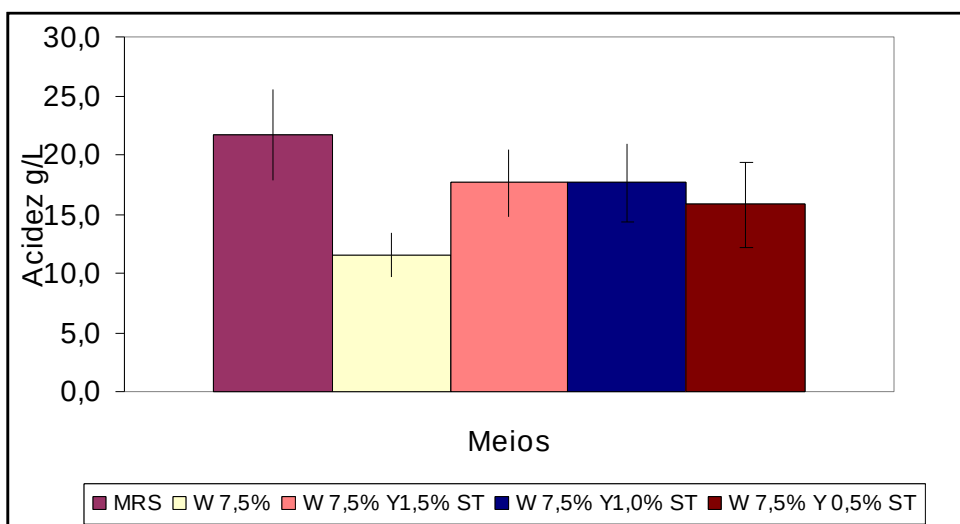


Figura 13: Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 7,5% e extrato de levedura .

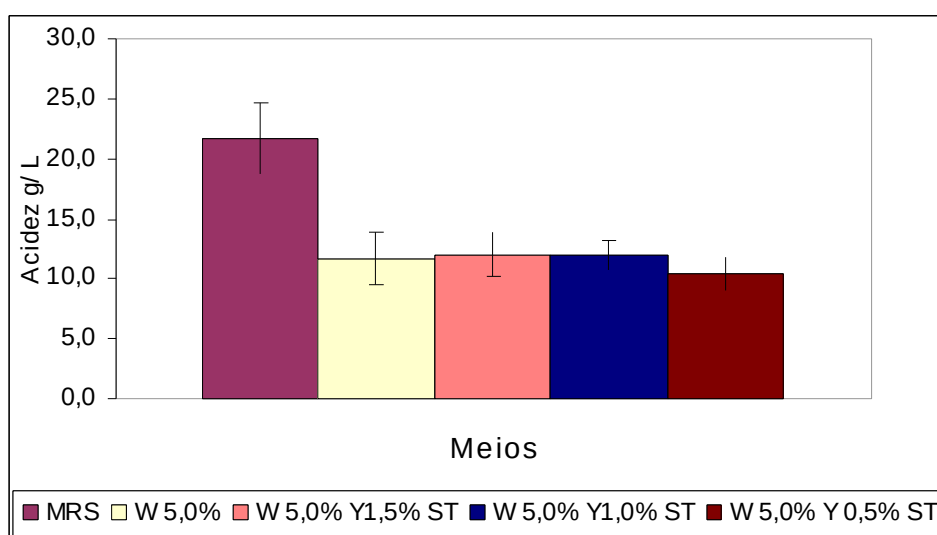


Figura 14: Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 5,0% e extrato de levedura.

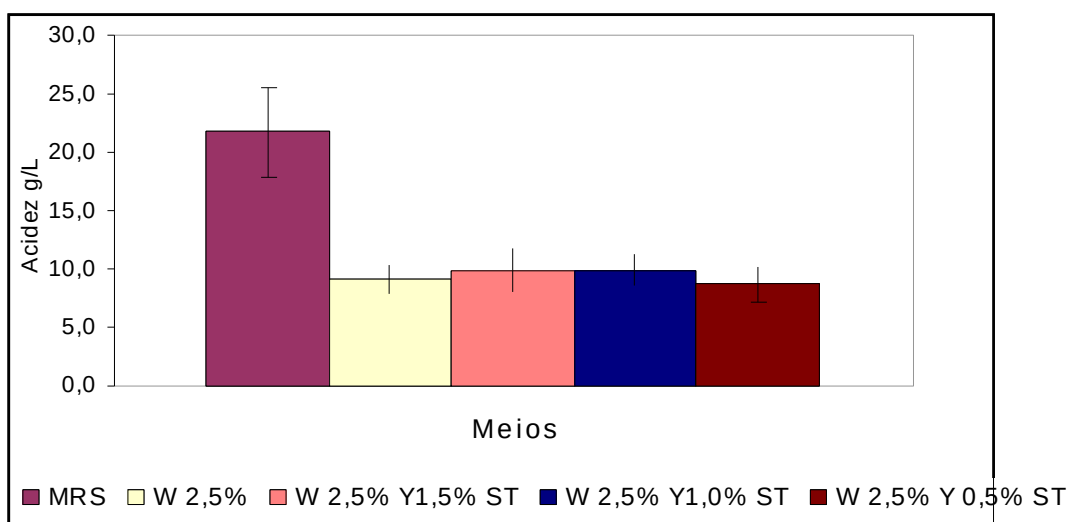


Figura 15: Valores de acidez dos meios de cultura para avaliação de crescimento celular de *Lactobacillus acidophilum* La 04 com soro de leite 2,5% e extrato de levedura.

5.2.2. Avaliação da eficácia dos sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilum* La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura.

A presença de sais inorgânicos nos meios de cultura mostrou-se ineficaz para promover o crescimento das bactérias lácticas quando adicionadas aos meios com soro de leite, pela presença de grande quantidade de sais na composição do soro (detalhes no anexo X) e nos extratos orgânicos, ou pelo aumento da quantidade de sólidos totais resultante nos meios de cultura de soro de leite. Os meios adicionados com sais inorgânicos e polisorbato mostraram crescimento celular similar aos outros meios testados sem estes componentes ($p > 0,05$). Os meios com 5,0 % de soro de leite e 1,5% de extrato de levedura com sais e polisorbato mostraram crescimento celular de 10^8 UFC / mL, enquanto os meios sem estes componentes atingiram crescimento de 10^9 UFC / mL. A menor média de crescimento de *Lactobacillus acidophilum* La 04 entre os meios ocorreu na presença de sais inorgânicos e polisorbato, no meio com a maior quantidade de sólidos testados no ensaio (Anexo X). O meio MRS promoveu o crescimento bacteriano em 10^9 U.F.C. / mL desta

bactéria mostrando eficiência para seu cultivo. A figura 16 mostra os resultados do crescimento celular nos ensaios para avaliação da eficácia de sais inorgânicos e polisorbato.

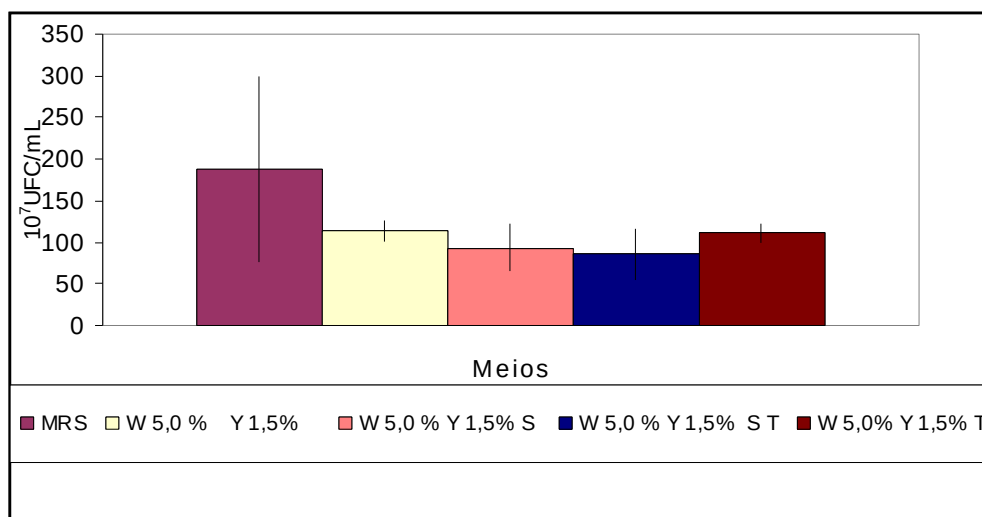


Figura 16. Valores de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite e extrato de levedura para avaliação da eficácia dos sais inorgânicos e polisorbato (24 h cultivo / 37°C).

Os meios testados não mostraram diferença estatística entre si, conforme demonstra a Tabela 12.

Tabela 12. Análise de diferença estatística dos meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Meios	UFC x 10 ⁷	SD
MRS	187,6	112,15 a
W 5,0% Y 1,5%	114,0	13,45 a
W 5,0% Y1,5% S	93,4	28,77 a
W 5,0% Y1,5% ST	85,8	30,09 a
W 5,0% Y 0,5% T	111,4	11,82 a

Letras diferentes indicam diferença entre si.(p < 0,05)

Os valores de pH indicam grande acidificação dos meios de cultivo de *Lactobacillus acidophilum* La 04. Os meios de cultivo com sais inorgânicos foram os de maior valor de pH entre todos os testados, respectivamente 4,76 e 4,30. O meio que atingiu menor pH foi o de soro de leite com extrato de levedura. A figura 17 mostra os resultados do pH nos ensaios para avaliação da eficácia de sais inorgânicos e polisorbato.

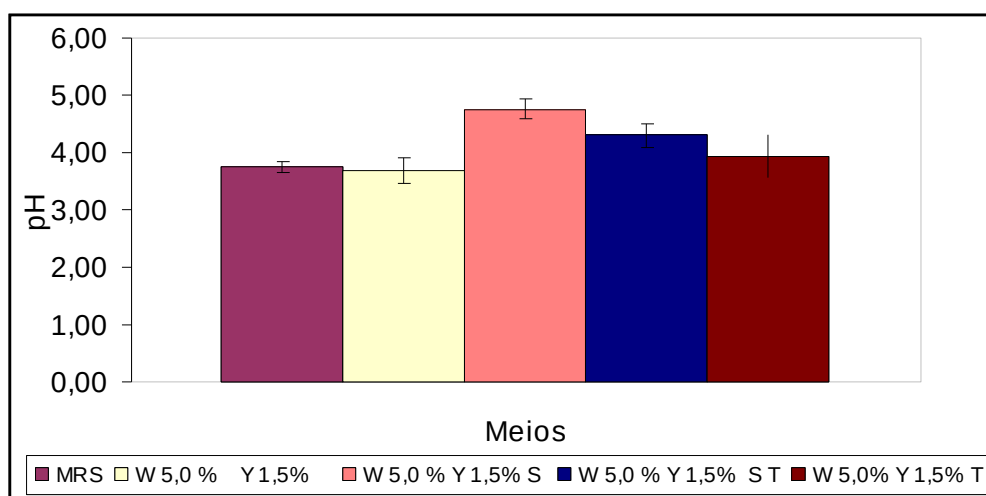


Figura 17. Valores da medição do pH em meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilum* La 04.

A figura 18 mostra os resultados da acidez, medida em ácido láctico, nos ensaios para avaliação da eficácia de sais inorgânicos e polisorbato. Os valores indicam grande produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus acidophilum* La 04 correspondente ao crescimento celular nos respectivos meios, sendo a maior concentração a de 21,32 g / L para o meio de maior crescimento (MRS) e o menor 14,53 g / L para o meio de menor crescimento (W 5,0% Y 1,5% S).

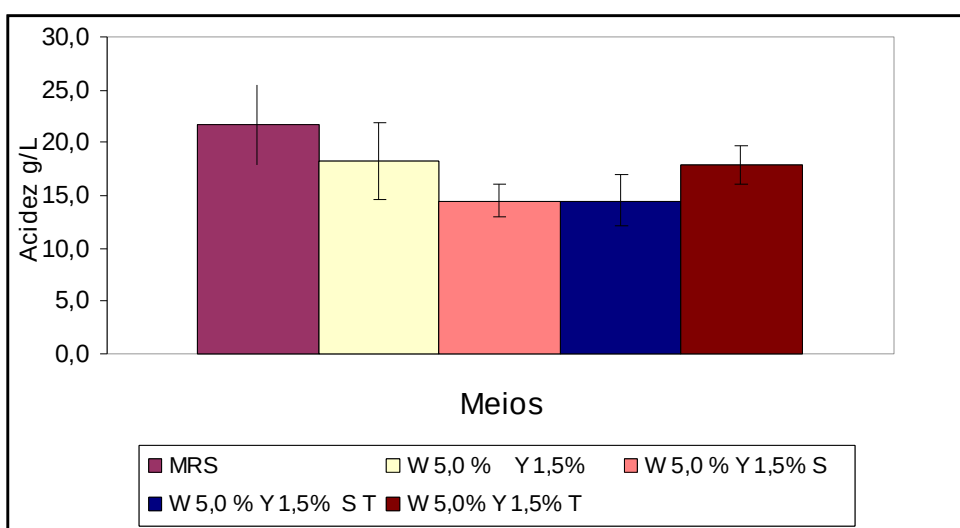


Figura 18. Valores da acidez em meios de cultura com soro de leite, extrato de levedura, sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

5.2.3. Avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura com soro de leite.

A adição de diferentes extratos orgânicos ao soro de leite promoveu o crescimento das bactérias lácticas, evidenciando a necessidade da adição de outras fontes de nitrogênio ao meio de cultura para induzir o crescimento bacteriano. As melhores médias de resultados obtidos com *Lactobacillus acidophilus* La 04 foram nos meios com soro de leite em pó adicionado a 7,5% e a 5,0% com extratos orgânicos (proteose peptona, extrato de carne e extrato de levedura), que atingiram 60% do crescimento verificado com a mesma bactéria no meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe). A melhor media de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 ocorreu no meio adicionado com soro de leite em pó a 7,5% e extratos orgânicos (proteose peptona, extrato de carne e extrato de levedura) e atingiu 141% do crescimento obtido com a mesma bactéria no MRS modificado (MRSm). Saron (2007) mostrou em ensaios microbiológicos com os mesmos meios controle, que a adição de diferentes níveis de permeado de soro ao MRS ou MRSm para *L. acidophilus* La-5 e *B. lactis* Bb-12, respectivamente, resultou em um aumento significativo no crescimento das duas bactérias probióticas, mas não quantifica os níveis de crescimento atingido. Figueredo e Passos (2003) atingiram um crescimento de 10^9 UFC / mL com a utilização de soro de leite doce integral

hidrolisado com papaína e proteose peptona n.03. Os meios de cultura a base de soro de leite adicionados com extratos orgânicos isoladamente, seja proteose peptona, extrato de carne ou extrato de levedura, demonstraram capacidade limitada de prover o crescimento bacteriano, atingindo crescimento 10^8 UFC / mL (Figuras 19 e 22).

A adição de extratos orgânicos aos meios a base de soro de leite de modo similar ao meio MRS, (proteose peptona, extrato de carne e extrato de levedura) mostrou maior média de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 dentre todos os meios a base de soro de leite testados. Os resultados foram similares para as concentrações de 7,5% e 5,0 % de soro de leite, (10^9 UFC / mL) e os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas entre todos os meios testados ($p > 0,05$). A maior concentração de sólidos ocorreu no meio com 7,5% de soro de leite com todos os extratos orgânicos do MRS, 9,5 g / 100 mL. (anexo XI).

Entre os meios de cultura com soro de leite 5,0% e adição individual de extratos orgânicos, o meio com 1,0% de extrato de carne (WM 5,0 % M 1,0%) mostrou-se a melhor média de crescimento celular, atingindo o crescimento de 10^9 UFC / mL. Os meios adicionados com proteose peptona ou extrato de levedura atingiram 10^8 UFC / mL.

5.2.3.1. Valores de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite e extratos orgânicos.

O meio MRS mostrou-se superior, em média, cerca de 30% para induzir o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em relação a todos os meios testados. A melhor média de crescimento obtida pelos meios a base de soro de leite foi o W 5,0 % PMY com crescimento de $1,26 \times 10^9$ UFC / mL. A Figura 19 mostra os resultados dos ensaios para avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura com soro de leite.

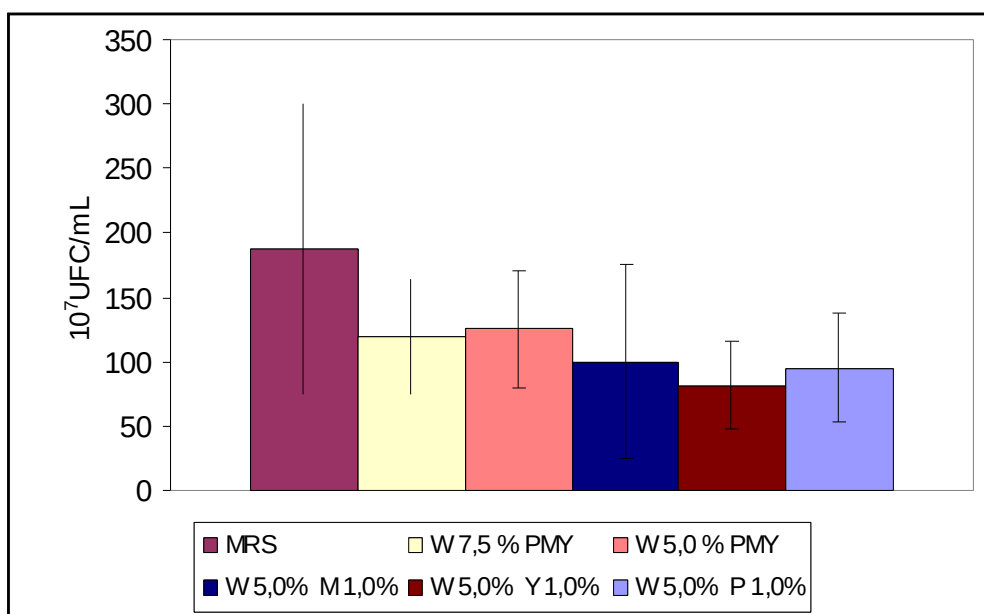


Figura 19: Valores de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meios de cultura a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos (24 h cultivo / 37°C).

Os meios testados não mostraram diferença estatística entre si, conforme demonstra a Tabela 13.

Tabela 13: Análise de diferença estatística dos meios de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

Meios	UFC x 10 ⁷	SD
MRS	187,6	112,15 a
W 7,5% PMY	119,8	44,56 a
W 5,0% PMY	125,8	45,65 a
W 5,0% M 1,0%	100,2	76,13 a
W 5,0% Y 1,0%	82,0	33,87 a
W 5,0% P 1,0%	95,2	41,67 a

Letras diferentes indicam diferença entre si. (p < 0,05)

Os valores de pH indicam grande acidificação dos meios com extratos orgânicos e soro de leite. Os resultados mostraram pouca variação nos meios com soro de leite, todos acima de pH 4, sendo os meios com maiores valores de pH (4,74 e pH 4,77) os de formulação com múltiplos extratos orgânicos, demonstrando maior capacidade de tamponamento conjunto destes substratos em relação adição individual de cada um deles. Os meios com extratos múltiplos possuem também maiores quantidades totais de extratos orgânicos que meios de cultura adicionados somente com um único extrato. A figura 19 mostra os resultados da medição de pH em meios com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

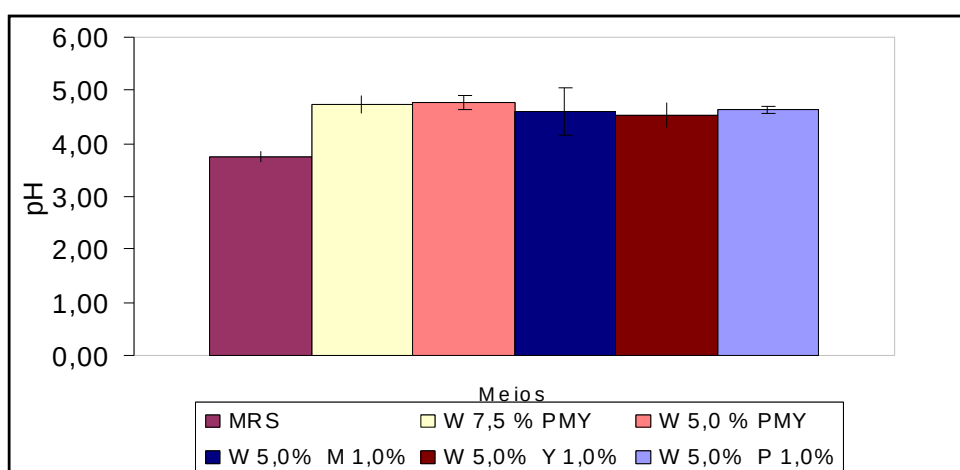


Figura 20: Valores de pH dos meios de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 à base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

A produção de ácido láctico pelo *Lactobacillus acidophilum* La 04, correspondeu ao crescimento celular no respectivo meio, sendo a maior concentração a de 21,32 g / L para o meio de maior crescimento (MRS) e o menor 10,27 g / L para o meio de menor crescimento (WM 5,0% P 1,0%). A Figura 20 mostra os resultados da acidez, medida em ácido láctico, nos ensaios para avaliação da eficácia de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 .

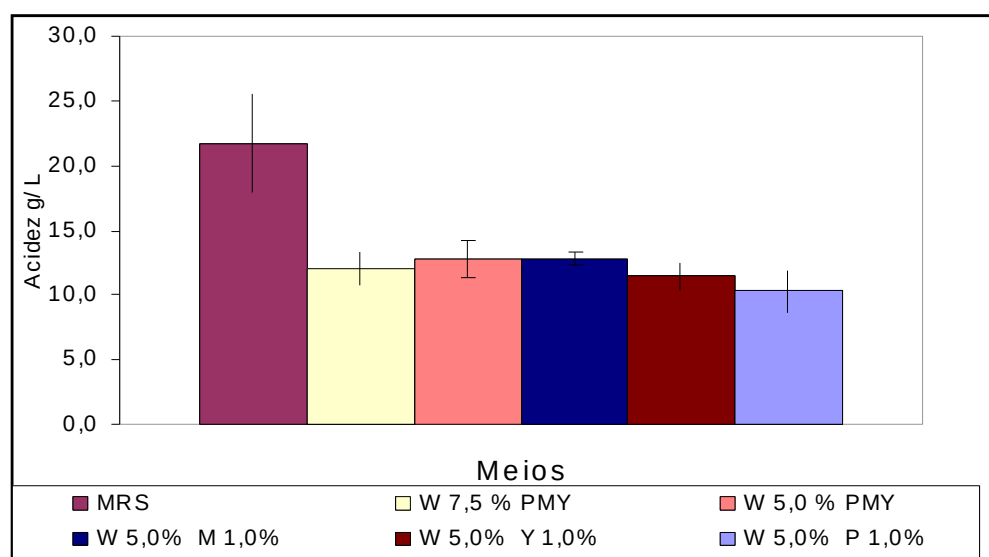


Figura 21: Valores de acidez dos meios de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

5.2.3.2. Valores de crescimento de *Bidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura com soro de leite e extratos orgânicos.

A composição dos meios de cultura para cultivo de *Bidobacterium lactis* Bb 12 com combinação de extratos orgânicos similar ao meio MRS, proteose peptona, extrato de carne e extrato de levedura mostrou maior média de crescimento do micro organismo dentre todos os meios testados, incluindo o meio referência MRS. A média de crescimento para a concentração de 7,5% de soro de leite no meio de cultura superou a concentração de 5,0%. Estas foram as únicas a atingirem um crescimento de 10^9 UFC / mL. Os meios testados não mostraram diferenças significativas de crescimento entre si, exceto os meios com adição de todos os extratos orgânicos (W 7,5% PMY e W 5,0% PMY) e meios adicionados de proteose peptona e extrato de carne. A maior concentração de sólidos no meio com 7,5% de soro de leite e com os extratos orgânicos do MRS (Anexo XI) favoreceu o crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12. Entre os meios de cultura com complementação do soro de leite 5,0% e adição individual de extratos orgânicos, o meio com 1,0% de extrato de levedura (W 5,0 % Y 1,0%) mostrou a maior média de crescimento celular sem , no entanto , conseguir atingir o crescimento de 10^9 UFC /

mL. Os meios adicionados individualmente com proteose peptona e extrato de carne atingiram 10^8 UFC / mL.

Comparativamente ao meio MRS, o meio W 7,5% PMY mostrou eficiência superior para induzir o crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12. A Figura 22 mostra os resultados dos ensaios para avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura com soro de leite.

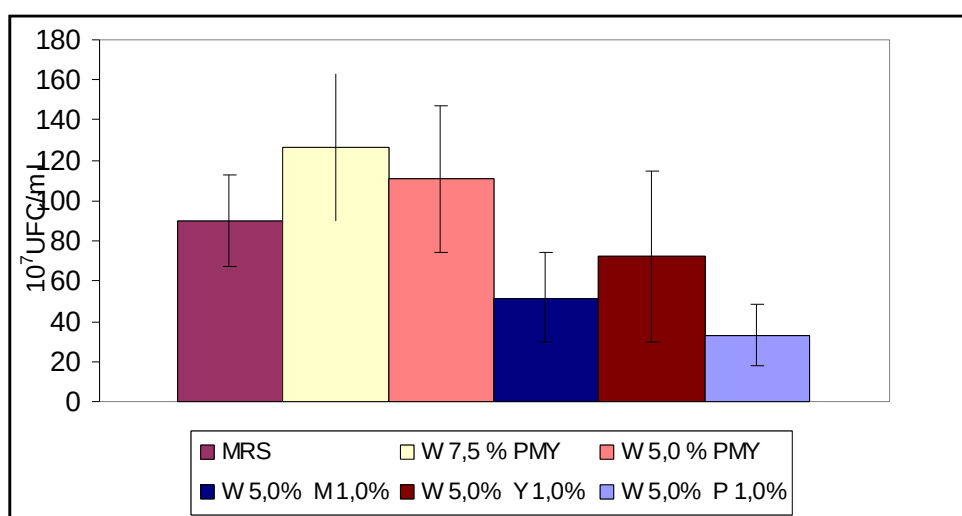


Figura 22: Valores de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

A Tabela 14 mostra que os meios testados não mostraram diferença significativa com o meio controle, exceto o meio com proteose peptona como fonte de nitrogênio (W 5,0% P 1,0%). Os meios adicionados com os três extratos orgânicos e o meio de cultura referência foram estatisticamente iguais.

Tabela 14: Análise de diferença estatística dos meios de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12a base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

Meios	UFC x 10 ⁷	SD	
MRS	90,0	23,22	a
W 7,5% PMY	126,6	36,80	ab
W 5,0% PMY	110,4	36,67	ac

W 5,0% M1,0%	51,8	22,49	abc
W 5,0% Y 1,0%	72,0	42,30	ab
W 5,0% P 1,0%	33,0	15,68	bc

Letras diferentes indicam diferença entre si. ($p < 0,05$)

Os valores de pH indicam maior acidificação que a ocorrida nos meios de cultura pelo crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04. Há maior acidificação nos meios com soro de leite em relação ao meio referência, todos abaixo de pH 3,9. O meio com proteose peptona foi o de maior acidificação (pH de 3,80). Os valores obtidos pelos meios que tem na composição múltiplos extratos orgânicos foram semelhantes aos obtidos pelos meios com adição individual de extratos. A Figura 23 mostra os resultados da medição de pH em meios com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

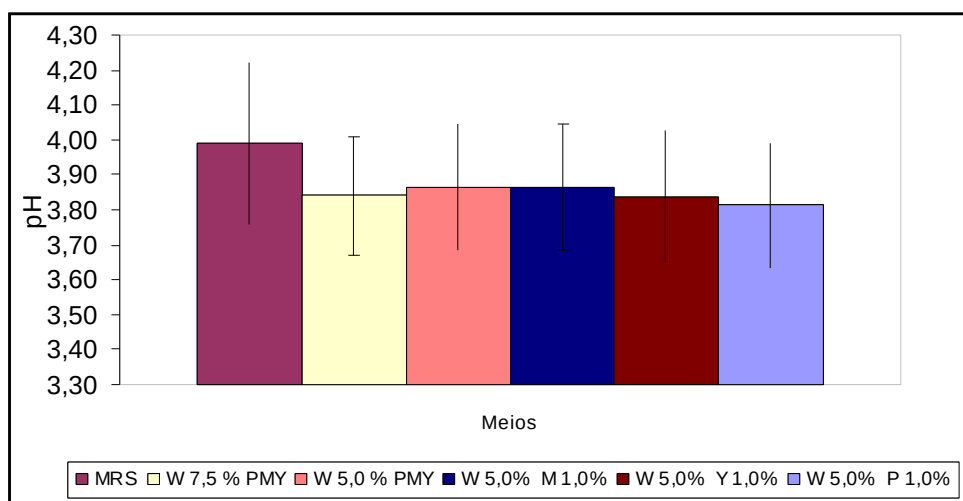


Figura 23: Valores de pH dos meios de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 à base de soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

A figura 24 mostra os resultados da acidez, medida em ácido láctico nos ensaios para avaliação da eficácia de extratos orgânicos nos meios de cultura para induzir crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

Os resultados constataam a grande produção de ácidos pelo *Bifidobacterium lactis* Bb 12. , principalmente no meio MRS (23,25 g/ L). Entre os meios a base de

soro de leite, o de maior média de produção de ácidos foi o meio W 7,5% PMY (15,50 g / L). O meio W 5,0% P 1% foi o de menor produção de ácidos (9,69 g / L). O crescimento celular nos meios mostrou correspondência com a produção de ácidos pelo micro organismo entre os meios a base de soro de leite, mas não houve relação entre os meios a base de soro de leite e meio MRS.

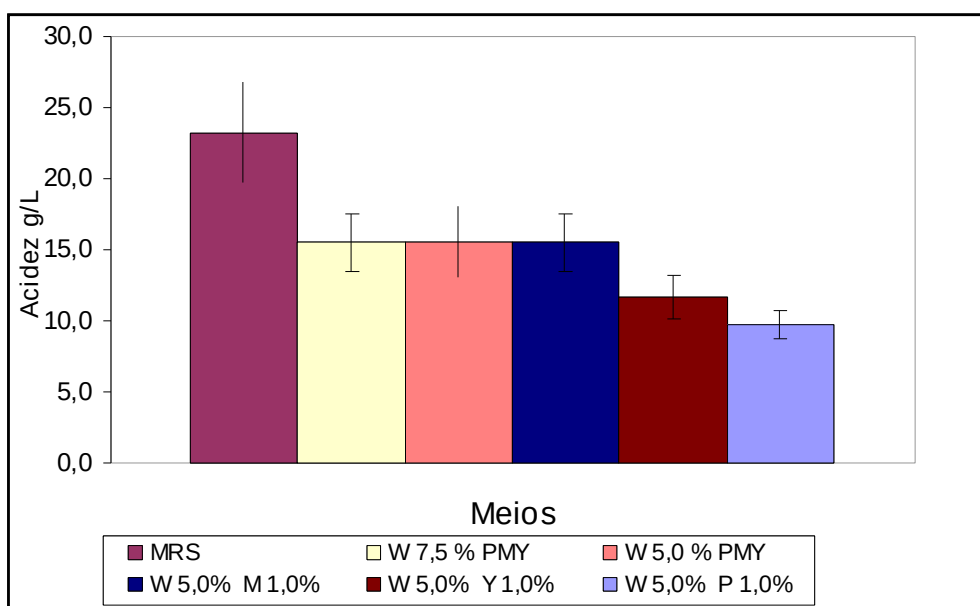


Figura 24: Valores de acidez dos meios de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 com soro de leite para avaliação da eficiência de extratos orgânicos.

5.2.4. Avaliação da curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio de cultura com soro de leite.

Os crescimentos de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 mostraram seu ápice em 18 horas de cultivo. A cultura mostrou rápida adaptação aos meios a base de soro de leite com início de crescimento nas primeiras 4 horas (Fase Lag). O crescimento exponencial (Fase Log) ocorreu até as 18 horas pós inóculo. A ativação enzimática bacteriana necessária para fermentação da lactose disponível nos meios a base de soro de leite pode explicar esta característica (SARON, 2007). A fase estacionária e declínio das culturas foram detectados a partir das 20 h até 48 h pós inóculo. O ultimo período é mais curto no meio controle devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura. As Figuras 25 e 26 mostram o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios a base de soro de leite e MRS.

A velocidade de crescimento (μ) do *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meio MRS foi a menor entre os meios testados ($\mu=0,145 \text{ h}^{-1}$), e a maior foi registrada no meio W 5,0% PMY, ($\mu=0,214 \text{ h}^{-1}$). O tempo de duplicação da cultura de maior velocidade de crescimento foi de 3,2 h.

A velocidade de crescimento (μ) do *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio MRSm foi a menor entre os meios testados ($\mu=0,204 \text{ h}^{-1}$), e a maior foi registrada no meio W 7,5% PMY, ($\mu=0,264 \text{ h}^{-1}$). O tempo de duplicação da cultura de melhor velocidade de crescimento foi de 2,8 h.

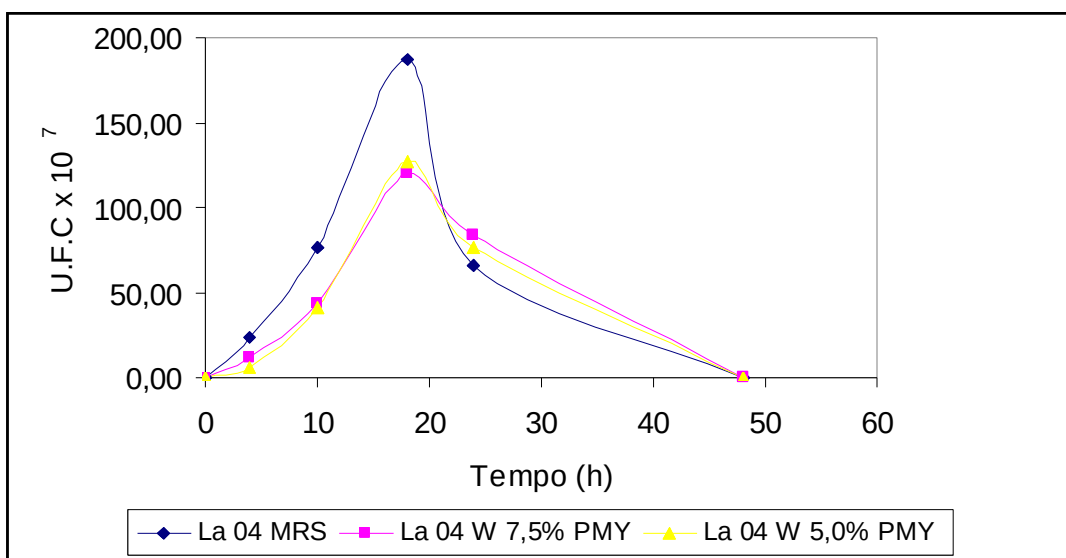


Figura 25: Valores da curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meio de cultura com soro de leite.

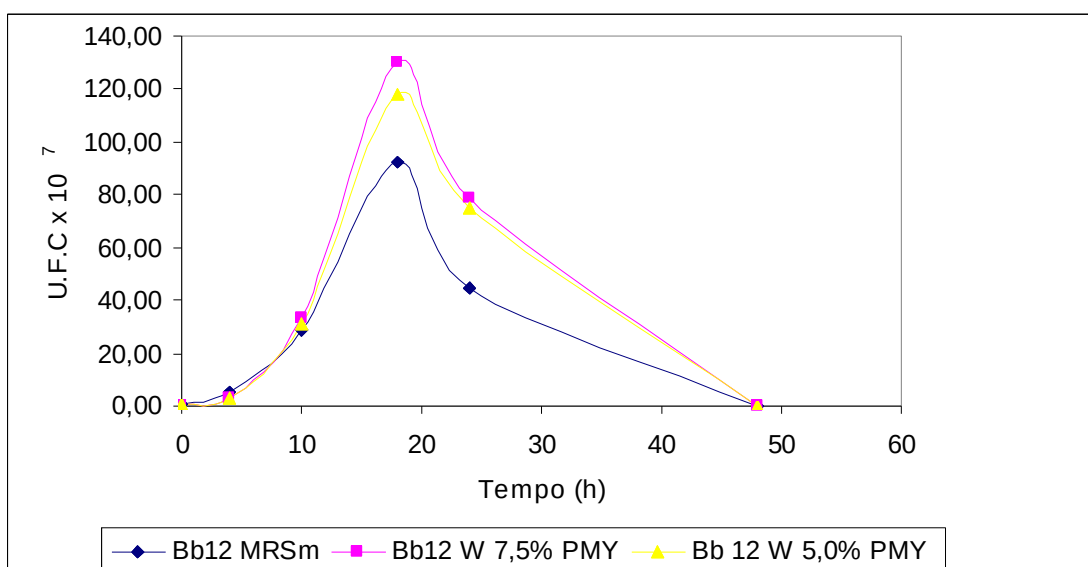


Figura 26: Valores da curva de crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio de cultura com soro de leite.

5.3. Açúcares redutores totais residuais nos meios de cultivo após crescimento.

Em todos os crescimentos promovidos em meios a base de soro de leite houve consumo parcial de açúcares disponíveis, independente da quantidade adicionada, evidenciando incapacidade dos microrganismos de exercer todo o potencial de crescimento dos meios. Fatores limitantes parecem exercer efeito sobre o crescimento bacteriano, principalmente a falta de neutralização do ácido láctico produzido nos meios a base de soro de leite. Em contrapartida o meio controle MRS foi eficaz no consumo de açúcares, levando o meio à exaustão, apesar da grande quantidade de ácido produzido (Tabela 15). Fatores como a correção de pH e agitação, podem ser efetivos para elevar o consumo de açúcares nos meios a base de soro de leite e aumentar a eficiência em promover o crescimento bacteriano (ROGERS L.A, 1928).

A determinação do ART pelo método de Somogy-Nelson nos meios de cultivo a base de soro de leite com extratos orgânicos, após crescimento celular, mostrou baixa eficácia no consumo de açúcares. Os maiores crescimentos bacterianos foram registrados nos meios de cultura, W 5,0% PMY, com consumo de 77% do açúcar disponível, e o meio W 7,5% PMY com consumo de 71% do açúcar disponível. O meio MRS não apresentou glicose residual no meio, caracterizando consumo total pelos microrganismos. O crescimento bacteriano nos meios a base de soro de leite são inibidos ainda com açúcar disponível.

Segundo Rogers e Whittier(1928) o controle de concentração hidrogeniônica de uma cultura em pH favorável permite o crescimento de maiores populações bacterianas do que em culturas em que o ácido acumulado não é neutralizado. O pH favorável às bactérias lácticas seria ao redor de 5,5. O pH final dos meios em torno de 4,00 , ou mais baixos que isto, justificaria a parada de fermentação, e as sobras de açúcar residual. A tabela 15 mostra o consumo de açúcares nos meios de cultivo para crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Tabela 15. Consumo de açúcares em meios de cultura para *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Meio de cultura	Açúcar consumido	
	%	g/100 mL
MRS	100%	2,00
WM 5,0 %	65%	2,46
WM 7,5 %	63%	3,62
WM 10 %	50%	3,82
WM 7,5 % PMY	71%	4,07
WM 5,0 % PMY	77%	2,94

5.4. Valores de massa úmida e massa seca

O *L. acidophilus* La 04 produziu 29,67 g/L de massa úmida no meio MRS e 68,06 g/L de massa úmida no meio WM 7,5 PMY. O *B. lactis* Bb12 produziu 15,73 g/L de massa úmida no meio MRS e 76,24 g/L de massa úmida no meio WM 7,5 PMY. Os maiores valores de biomassa seca para os meios W 7,5% PMY em relação ao meio controle não refletem maior crescimento celular, pois a maior quantidade de sólidos na composição dos meios com soro de leite interfere nos resultados deste método de análise de crescimento bacteriano.

O rendimento da cultura ($Y_{x/s}$) para *Lactobacillus acidophilus* La 04 no meio MRS foi de $Y_{x/s} = 0,246$ g de biomassa / g açúcar consumido e no meio W 7,5% PMY de $Y_{x/s} = 0,184$ g de biomassa / g açúcar consumido. O *Bifidobacterium lactis* Bb 12 obteve rendimento de $Y_{x/s} = 0,138$ e $Y_{x/s} = 0,233$ g de biomassa / g açúcar consumido nos meios MRSm e W 7,5% PMY, respectivamente. Os valores de biomassa atingidos pelas culturas de *L. acidophilus* La 04 e *B. lactis* Bb12 nos meios MRS e a base de soro de leite estão descritos na Tabela 16.

Tabela 16: Valores de produção de massa de *L.acidophilus La 04* e *B. lactis Bb12*.

Meios de cultura	MRS	WM 7,5 PMY	MRSm	WM 7,5 PMY
Micro organismo	<i>La 04</i>	<i>La 04</i>	<i>Bb 12</i>	<i>Bb 12</i>
Massa úmida (g / L)	29,67	68,06	15,73	76,24
Massa seca (g / L)	4,92	7,49	2,75	9,53
Relação Biomassa (g / g)	16,58%	11,00%	17,3%	12,50%

5.5. Avaliação de custo x benefício dos meios de cultura a base de soro de leite e MRS.

Os custos dos ingredientes utilizados na formulação são determinantes no custo final dos meios de cultura testados. A formulação do MRS e dos meios a base de soro de leite, no próprio laboratório, foi condição para diminuição total de custos de ambos os meios. Os valores são mostrados nos anexos XXII e XXIV. O custo dos ingredientes do meio MRS é de R\$ 37,35 / L de meio formulado e mostra pouca diferença entre os meios a base de soro de leite feitos com todos os extratos orgânicos. O meio W 5,0% PMY resultou em R\$ 34,92 / L e o meio W 7,5% PMY em R\$ 35,00 / L. A proteose peptona e o extrato de carne respondem por 80% dos custos dos ingredientes em um meio de cultivo MRS, e 85 % nos meios a base de soro de leite. A adição destes ingredientes determina o custo do meio. Os meios adicionados com somente um extrato orgânico, principalmente extrato de levedura apresentam custos mais reduzidos. O meio W 5,0% Y 1,0 % tem um custo final de R\$ 9,91 / L, o meio W 5,0% M 1,0 % de R\$ 12,69 / L e o meio W 5,0% P 1,0 % de R\$ 17,50 o litro formulado. Considerando a produção de UFC de microrganismo em relação ao custo do litro de meio de cultura, a utilização do extrato de levedura na formulação dos meios apresenta melhor relação custo / benefício na cultura de *Bifidobacterium lactis Bb 12*. A possibilidade de hidrólise enzimática das proteínas do soro pode aumentar a disponibilidade de fontes de nitrogênio do próprio meio de cultura (proteínas séricas) para os microrganismos em cultura e melhorar o desempenho dos meios a base de soro de leite na indução do crescimento bacteriano. (FIGUEREDO e PASSOS, 2003)

6. Conclusões

1 Os meios de cultura a base de soro de leite adicionados de fontes de nitrogênio, como a combinação de proteose peptona, extrato de carne e extrato de levedura mostraram-se eficazes para estimular o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12

2 A adição de sais inorgânicos e polisorbato aos meios de cultura a base de soro de leite se mostraram ineficazes para promover o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

3 O extrato de levedura mostrou-se o melhor extrato orgânico, individualmente, para promover o crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12.

4 São necessários mais estudos de cinética de crescimento bacteriano com ajustes de formulação nos meios de cultura a base de soro de leite, tendo em vista a pouca capacidade tamponante destes meios em relação ao MRS.

7. Referências Bibliográficas.

- ANVISA. Regulamento técnico de substancias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional de saúde. Resolução rdc N.2, 7 de janeiro de 2002.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. v. 35, p. 171-176, 2002.
- ARCURI, P.B.; CAMPOS, O.F.LOPES, F.C.F.;CARNEIRO, J.C..Utilização de Probióticos e Prebióticos em rações de bovinos. IN: VIII *Simpósio sobre Nutrição de Bovinos*, EALQ, 2006.
- ASGUAR,S.S.,LEVIN,E.;HROLD,F.M. Accumulation of neutral amino acids by *Streptococcus faecalis*. *J.Biol.Chem.* , v 248:5225-5233. 1973.
- BARBOSA, HR et al . Nutrição e metabolismo bacteriano. In: Trabulsi et al , *Microbiologia 3ª edição* .São Paulo . Editora Abril , cap. P. 25-45 .1999.
- BARTON-WRIGHT,C.C. The microbiological assay of the vitamin B complex and amino acids. New York, Pitman Publ. Corp.1952.
- BEELMAN,R.B.,KEEN,R.M.,BANNER,M.J.;KING,W.S. Interations between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Dev.Ind.Microbiol.* v 23:107-21.1982.
- BELLAVER, C. Utilização de melhoradores de desempenho na produção de suínos e de aves. In: *Congresso Internacional de Zootecnia*,7,2005, Campo Grande, MS. Anais. ABZ / UEMS /UFMS, Embrapa Pantanal, 2005.
- BLACK, F., K. EINARSON, A. LIDBECK, K. ORRHAGE, and C. E. NORD,. Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scand. J. Infect. Dis.*,v 23:247-254. 1991.
- BLAUT M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*. v. 41,supplement 1, p.1-16, 2002.
- BRACHT A; et al. Métodos de Laboratório em Bioquímica Ed. Manole, 2003 439 pg.
- BRYAN-JONES,G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: CARR,J.G. et al.eds.*Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*.London,Academic Press, p. 165-175. 1975.

- BURY, D. *et al* . Whey Protein concentrates as nutrient supplement for lactic acid bacteria *International Dairy Journal*. Barking, v.8, n. 2,p 149-151. 1998.
- BUTOLO. J.E. Utilização de ingredientes líquidos na alimentação animal. *In: Simpósio sobre ingredientes na alimentação animal*, Campinas, 2001. Anais.. Campinas: CBNA, 2001, p.295-334.
- CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. *Boletim da SBCTA*. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.
- CATON, J.S.; ERICKSON, D.O.; CAREY, D. A.; ULMER, D.L. Influence of *Arpegillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site digestion, in situ degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. *Journal of Animal Science*, v71, p. 779-87, 1993.
- CHARTERIS,W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.*, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.
- CHAUCHEYRAS, F.; FONTY, G. Influence of a probiotc yeast *Shaccaromyces cerevisiae* CNCM I – 1077 on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. *Microbial ecology in health and disease*. v 14; pag. 30-36.2002
- COOLINGTON, G. K., D. S. PARKER, D. G. ARMSTRONG. *British J. of Nutrition* 64, 59. 1990.
- CORASSA, A.; LOPES, D.C.; BELLAVER, C.; FERNANDES, P.C.C. Mananoligossacarídeos, ácidos orgânicos e probióticos em dietas de leitões de 21 a 39 dias de idade. *In: Simpósio Brasileiro Alltech, 2., 2005, Curitiba, PR. Biotecnologia nutricional na indústria de alimentação animal: anais*. Curitiba: Alltech, p.20. 2005.
- CUARÓN J.A.C. Estímulo de la inmunidad por Pre y Probióticos. II CLANA,*Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal*, CBNA, 2006.
- CUNNINGHAN, J.G. (3 ed.). *Tratado de fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara. 579p. 2004.

- DAHIYA,R.S.;SPECK,M.L. Indentification of stimulatory factor involved in symbiotic growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*,*J.Bacteriol.* v 85:585-589. 1963.
- DAMBEKODI, P. C.;S. E. GILLIAND.. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* v 81:1818-1824. 1998
- DELISE,A.L.;PHAFF,H.J. The release of nitrogenous substances by brewers yeast. *Brewer's yeast. Brewer's Digest*, v1:35-39. 1961.
- De MAN, J.C., ROGOSA , M.; SHARPE, M.E. A médium for cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* ,Oxford, v.23, p.130-135, 1960.
- DOUGAN G. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens :implications for oral vaccine development. *Microbiol.* v140 : 215-224. 1994.
- DIERICK, N. A, I. J. VERVAEKE, J. A ; DECUYPERE. *Livestock Production Science* v14: 161. 177 .1986
- EMIATE I M; G. *et al.* Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos: comparação entre método colorimétrico e titulométrico. *Soil Science* v8 (1) p. 65-78, 2002
- ECKLES, C. H., WILLIAMS, V. M., WILBUR, J. W. Yeast as a supplementary feed for calves. *Journal Dairy Science*, v 7, 421-39, 1994.
- ERASMUS, LJ, Botha, AM e Kistner, A.. Efeito da suplementação com cultura de levedura na produção, fermentação ruminal e fluxo duodenal de nitrogênio em vacas leiteiras. *J. Dairy Science.*, 75: 1992.
- FEENEY,R.E.;STRNG,F.M. Indentification of growth-stimulating substances for *Lactobacillus*. *J. Biol. Chem.* 140:xxxviii. 1941.
- FERKET P.R. Alternatives to antibiotics in poultry production: responses, practical experience and recommendations In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries Proceedings of Alltech's Twentieth Annual Symposium* Ed. by TP Lyons e KA Jacques. Nottingham University Press. p. 57-68. 2004.

- FIGUEREDO, H.M., PASSOS, F.J.V. Influência da fonte de nitrogênio no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* UFVH2B20 *Sitienbus*, Feira de Santana, n.28 p.37-50, 2003.
- FLEMMING, J.S.; FREITAS, R.J.S. Avaliação do efeito de prebióticos (MOS) , probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. *Archives of Veterinary Science* v. 10, n. 2, p. 41-47, 2005
- FUKUDA M, Kanauchi O, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, Takagi K, Toyonaga A, Sata M, Fujiyama Y, Fukuoka M, Matsumoto Y, Bamba T. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *J Mol Med.* Jan;9(1):65-70. 2002.
- FULLER R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* May;66(5):365–378. 1989.
- GARVIE, E.I. Genus *Leuconostoc*. In: SNEATH, P.H.A. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. 9^o ed., v. 2, Section 12, p. 1071-1975. 1986.
- GEA Filtration • Niro Inc. • Boletim técnico: 1600 O'Keefe Road • Hudson, Wisconsin 54016, USA. 2009.
- GEDEK, B. Probiotics in animal feeding. Effect performance and animal health. *Feed Management*, v.3., p.21-24, 1986.
- GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, [S.l.], v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1995.
- GIBSON, G. R.. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of Nutrition*, [S.l.], n. 7, p. 1438-1441, 1999
- GOMES, A.M.P. et al. *Bifidobacterium spp* and *Lactobacillus acidophilus* : Biochemistry, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, Cambridge, v. 10 , n.4-5 p.139-157, 1999.

- HALVORSON,H.O. e MUEDEKING,M.R. A comparison of rates of by Lactobacillus casei in synthetic and yeast extract media .*J. bacteriol.*, 54:39-40. 1947.
- HEDERSON,G.B.;ZEVELY,E.M.;HUENNEKENS,F.M. Coupling of energy to folate transport in Lactobacillus casei. *J.Bacteriol.*, 139:552-559. 1979.
- HENDERICKX, H. K. , I. J. VERVAEKE, J. A DECUYPERE. In: Proceedings of the Growth Promotion Mode-of -action Symposium,*SmithKline Corp.*, Philadelphia, 3-9. 1981.
- HOLDEN,J.T. Amino acid transport in bacteria. Effect of nutritional and physical factors. In Amino Acids and Serum proteins.*Adv.Chem.Series.* 44:96-117. 1964.
- HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. *Food Research International.* v. 35, p.109-116, 2002.
- IKAWA, M.;O BARR,J.S. The nature of some growth stimulatory substances for Lactobacillus delbrueckii. *J. Bacteriol* 71:401-405. 1956.
- JIANG, T. A., A. MUSTAPHA,E D. A. SAVAIANO. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* v79:750-757. 1996.
- JONES, G. W., J. M. RUTTER. *Infection and Immunology* v6:918. (1972).
- JOSLYN, M. A. Yeast autolysis. I.Chemical and cytological changes involved in autolysis.*Wallerstein Lab.Commun.* v18:107-122. 1955.
- JUKES, T.H. The history of the antibiotic growth effects of antibiotics.*Pharmacology Revision*, v5, p. 381-420, 1997.
- KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. *Anaerobe.* v. 3, p. 185–190, 1997.
- KANDLER, O e WEISS N. Genus Lactobacillus, pp. 1063-1065. In, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 2, 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore 1993.
- KANDLER,O. e WEISS N. Regular Nonsporing Gram Positive Rods. In:SNEATH et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.Baltimore. Williams and Wilkens.vol.II,section 14,p. 1208-1234. 1986

- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: Potencial pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 15, p. 1-9, 2002.
- KITAY,E.;McNUTT,W.S.;SNELL,E.E. Desoxyribosides and vitamin B 12 as growth factors for lactic acid bacteria. *J.Bacteriol* , 59:727-738. 1950.
- KOONG, L. J. J. A NEINABER, J. C. PEKAS. J. Nutrition 112:1638. 1982.
- KRUGER, C. L.; MANN, S. W. Safety evaluation of funcional ingredients. *Food and Chemical Toxicology*. v. 41, p.793-805, 2003.
- KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: The development of a regulatory concept. *Food Control*. v. 12, p.99-107, 2001.
- LEATHERWOOD, J.M.; MORCHRIE, R.D.; THOMAS, W.E. Some effects of supplementary cellulose preparation on feed utilization by ruminants. *Journal Dairy Science*, v43, p.1460-1464, 1960.
- LERAYER, A,L.S. Saúde Intestinal: Probióticos . Palestra ministrada. Centro de P & D de Laticínios -TECNOLAT – ITAL. 2110
- LONDON,J. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Annu.Rev.Microbiol* ,v30:279-301. 1976.
- MAPA. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. IN Nº 15, de 26 de maio de 2009.
- MARUGG J.D., MEIJER W., KRANENBURG R., LAVERMAN P.,BRUINENBERG P.G.,† AND. DE VOS W. .Medium-Dependent Regulation of Proteinase Gene Expressionin *Lactococcus lactis*: Control of Transcription Initiationby Specific Dipeptides. *Journal of Bacteriology*, p. 2982–2989 1995
- MATHEW, A. G. et al. Influence of weaning age on ileal microflora and fermentation acids in young pigs. *Nutritional Reserch*, v. 6, p. 817-827,1996
- MAYARA-MAKINEN, A; BIGRET,M. Industrial use production of lactic acid bacteria .In: SALMINEN, S. e Von Wright, A., *Lactic Acid Bacteria*. New York States: Marcel Dekker Inc. Cap.1, p.65-96 .1993.
- MAVROPOULOU I. P. KOSIKOWSKI F. V. Free Amino Acids and Soluble Peptides of Whey Powders. *Journal of dairy science*. v. 56, Nº, 9 .1972
- Mc ANELLY,J.K.;SPECK,M.L. The amino acid content of a peptide stimulatory for *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol*, v73:676-678. 1957.

- Mc NUTT,W.S.;SNELL,E.E. Pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate as growth factors lactic acid bacteria *J. Biol. Chem* v182:557-567. 1950.
- MEAD, G.C. Microbial ecology of the digestive tracts. In: Word's Poultry Science Congress. *CD-ROM*. Montreal, Canadá: WPSA, 2000. 8p
- MEYER P M; *et al.* Adição de probiótico ao leite integral ou sucedâneo e desempenho em bezerros da raça Holandesa. *Scientia Agricola*, v.58, n.2, p.215-221, abr./jun. (2001)
- MIRANDA ,RLA , MENDOZA MGD , BARCENA-GAMA,JR. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures on NDF level on parameters of ruminal fermentation . *Animal Feed Sci.*v63: 289-296 (1996).
- MODLER,H.W. et al .Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Canadian Institute of food science and Technology Journal*. Ottawa,v.23 , p. 29-41, 1990.
- MORISHITA,T.,DEGUSHI,Y.,YAJIMA,M.,SAKURAI,T. e YURA,T. Multiple nutritional requerements of *Lactobacilli*:genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J. Bacteriol.*,v148(1):64-71. 1981.
- MORISHITA,T.;FUKATA,T.;SHIROTA,M.YURA,T. Genetic basics of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*.*J. Bacteriol.*, v120(3):1078-1084. 1974.
- MORISHITA et al, Multiple Nutritional Requirements of *Lactobacilli*: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways *Journal Am Soc Microbiol*, v. 148, No. 1p. 64-71 0021-v 1986
- NAGAJARA, T.G., NEWBOLD, C.J., VAN NEVEL, C.J. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P. N., Stewart, C. S. (eds). *The Rumen Microbial ecosystem*. Blackie Academic e professional, London. p. 523-632, 1997.
- NEWBOLD. C.J. Probiotcs as feed additives in ruminant diets. In 51 st *Minnesota Nutrition Conference*, ed. M. Stern, G. Wagner, J. Rogers an R. Seilner. University of Minnesota, Minnesota, p. 102-18, 1990.
- NEWBOLD, C.J. Microbial feed additives for ruminants. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*, ed. R.J. Wallace and A. Chesson. VCH, Weinheim, p. 259-78, 1997
- NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requeriments for “functional foods” claims. *Toxicology Letters*. v. 150, p. 19- 24, 2004

- NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature*, v.241, p.210-211, 1973
- O'TOOLE, D.K. Weighing technique for determining bacterial dry mass based on rate of moisture uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* V 46:506-508,1984.
- OLIVA-NETO , P. ; YOKOYA , F. – Influência do extrato de levedura na estabilidade da fermentação alcoólica contaminada por *Lactobacillus fermentum* . *Ciênc. Tecnol. Alim.* , v16 (2) 170-174 1996
- OLIVA-NETO , P. ; YOKOYA , F. – Effects of nutritional factors on growth *L. fermentum* mixed with *Sacharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation . *Ciênc. Tecnol. Alim.* , v28:25-31. 1997
- ORLA-JENSEN,S. The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen.Andr.Fre.Host.and Son.1919.
- ORLA-JENSEN,S. La classification des bactéries lactiques. *Lait* 4, 468-474.1924.
- OYOFO, BA, et al.. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization with D-mannose. *Poultry Sci.* , v68: 1357-1360. (1989).
- PARKER, D. S. e D. G. ARMSTRONG. *Proceedings of the nutrition Society* v46:415.1987.
- PETERS,V.J.;PRESCOTT,J.M.;SNELL,E.E. Peptides and bacterial growth.IV.Histidine peptides as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii* 9649.*J.Biol.Chem.*, v202:521-532. 1953.
- PETTIGREW, J. E. *Feedstuffs* v72 (53): 12 .2000.
- PIARD, J. C. , Le LOIR Y. POQUET , LANGELLA P. As bactérias lácticas no centro de novos desafios tecnológicos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* - Encarte Especial ed. 8 pag. 81:84 1999.
- PIRT, S. JOHN. Principles of microbe and cell cultivation *Blackwell Scientific Publications* London . 1975
- POLLACK,M.A.;LINDNER,M. A growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J.Biol.Chem.* ,v147:183-187. 1943.
- PRESCOTT,J.M.;PETERS,V.J.;SNELL,E.E. Peptides and bacterial growth. V.Serine peptides and growth of *Lactobacillus delbrueckii* 9649.*J.Biol.Chem.*, v 202:533-540. 1953.

- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALENTEY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, Amsterdam, v.13, p.3-11,2002.
- PUTNAM, D.E.; SCWAB, C.G.; SOCHA, M.T.; WHITEHOUSE, N.L.; KIERSTEAD, N.A.; GARTHWAITE, B.D. Effect of yeast culture in the diets of early lactation dairy cows on ruminal fermentation and passage of nitrogen fractions and amino acids to the small intestine. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v80, n. 2, p. 374-384, 1997.
- REDDY, B. S., E A. RIVERSON. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, a food mutagen. *Cancer Res.* v53:3914-3918.1993.
- RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. *Química de alimentos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia,.ISBN: 85-212-0326-8. 2004.
- RIBEREAU-GAYON,J.;PEYNAUD,E.;RIBEREAU-GAYON,P.;SUDRAUD,P. *Tarite d'Oenologie,Sciences et Techniques du Vin*,Tomo 2. Dunod,Paris,556 p.cit.p.363,461. 1975.
- ROGERS L. A. WHITTIER E. O. :Limiting factors in the lactic fermentation .*Bureau of Dairy Industry*, United States Department of Agriculture, 1928
- RUTZ , F.; LIMA G.J. M. M. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no Brasil. *Embrapa Suínos e Aves*. 2001.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: O estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 42, n.1., p.1-16, 2006.
- SALMINEN, S., et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology's*. 44, p. 93–106, 1998.
- SALMINEN, S. e VON WRIGHT, A., *Lactic Acid Bacteria*. New York States: Marcel Dekker Inc, 1993
- SANTOS, M. S. Probiótico à base de Lactobacilos para leitões na fase de aleitamento e de creche. *Ciências agro*. Universidade Federal de Lavras, 2002.

- SARON, M. L. G. *et al.* Use of Bovine Whey Permeate and Lactulose as Potential Enhancers of the MRS and Modified MRS Media for the Cultivation of Species of Probiotic Bacteria - *Bras. J. Food Technol.*, Caminhos, v. 10, n. 1, p. 35-41, Jan./mar. (2007).
- SCHAR-P Z , *et al.*; Influência da composição do meio de fermentação nas propriedades físico-químicas de superfície de *Lactobacillus acidophilus*. *Nestlé Research Center*, PO Box 44, Veers-chez-les-Blanc, CH-1000 Lausanne 26, Suíça. *Appl Environ Microbiol.* Dec; 71 (12) :8165-73 2005.
- SELBY-SMITH,J.;HILLIER,A.J.;LEES,G.J.;JAGO,G.R. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extracts. *Dairy Res.* v42(1):123-138.
- SGARBIERI VC. Proteínas em alimentos protéicos:Propriedades-degradações-modificações. São Paulo: Varela; 1996. 517p.
- SGORBATI, B., BIAVATI, B. e PALENZONA, D. The genus *Bifidobacterium*. Em Wood, B. J. B. e Holzapfel, W. H. (eds),*The Lactic Acid Bacteria Vol. 2. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, capítulo8, pp. 279-306, Blackie Academic, Londres, RU. 1995.
- SMITH,F.R. Nutricional studies on *Streptococcus lactis* I. An unidentified growth factor found in yeast extract *.J. Bacteriol.*, v46:369-371. 1943.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA.*v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.
- SPECK,M.L.;Mc ANELLY,J.K.;WILBUR,J.D. Variability in response of lactic streptococci to stimulants in extracts of pancreas,liver and yeast. *J. Dairy Sci.* v41:502-508. 1958.
- STRITTMATTER,C.F. Electron transport to oxygen in *Lactobacilli* *J. Biol.Chem.*, v234(10): 2789-2793. 1959.
- STROBEL,H.J.;RUSSEL,J.B.;DRIESSEN,A.J.M.;KONINGS,W.N. Transport of amino acids in *Lactobacillus casei* by proton-motive-force-dependent and non-proton-motive-force-dependent mechanisms.*J. Bacteriol.* v171(1):280-284. 1989.
- SYKES, G., SKINNER, F.A.,. Techniques for the isolation and characterization of *Actinomyces* and *Bifidobacterium* species, report of a panel discussion. *Appl. Bacteriol. Symp. Ser. No.2.* Academic Press, New York, pp. 327–333.

1973

- THOMPSON, J. Characteristics and energy requirements of an alfa aminoisobutyric acid transport system in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, v127:719-730. 1976.
- TANNOK G. W., R. FULLER, K. PEDERSEN. Applied and Environmental Microbiology 56, 1310 1996.
- TANNOK G. W.. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Issues Mol. Biol.* v1(1):53-64. 1999
- TISSIER, H.. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique) *Paris Thèses*: v1-253. 1900
- TISSIER, H.. Traitement Des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology* v60:359-361.1906
- TOURNUT, J.R. Probiotics. In: Reunião da sociedade brasileira de Zootecnia , 35, Botucatu. *Anais...* Botucatu: SBZ, 1998, p.179-199. 1998.
- TORTUERO, F. Influence of the implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poult. Sci.*, v.52, p.197-203, 1973
- USDEC-THE U.S.DAIRY EXPORT COUNCIL. Manual de referência para produtos de soro dos EUA. *USDEC Ingredientes News*, São Paulo, 1997.
- WALLACE, RJ and NEWBOLT, CJ. Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast culture as feed additives. In: *Biotechnology in the Feed Industry* , Lyons, TP (ed.). Alltech Technical Publications, Kentucky, 173-192. (1993).
- WALLACE, R.J. Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *Journal of Animal Science*, Champaign, v72, n. 11, p. 2992-3003, 1994.
- WEINMAN, D.E.; MORRIS, G.K.; WILLIAMS, W.L. Unidentified growth factor for a lactic acid bacterium. *J. Bacteriol.* v87:263-269. 1964.
- WILLIAMS, P. E. V. *Pig Veterinary Journal* v27: 75. 1991.
- WISEK W. J. *J. Anim. Sci.* v46:1447. 1978.
- YUAN-KUN LEC et al : Handbook of probiotics , John Wiley and sons Inc. –N.Y. 1999

ZIOLECKI, A.; KWATKOWSKA, E.; LASKOWSKA, H. The effect of stabilized rumen extract on growth and development of calves. 2. Digestive activity in the rumen and development of microflora in the rumen and faces. *Z. Tierphysiol. Tierernah. Futtermittel*, v51, 20-31, 1984.

Anexos:

Anexo I: Perfil de aminoácidos no Soro de leite bovino.

Aminoácidos	mg/100g amostra
Ácido Aspártico	13,50
Treonina	12,98
Serina	Não Detectado
Ácido Glutâmico	92,79
Prolina	14,29
Glicina	38,56
Alanina	11,59
Cistina	10,34
Valina	Não Detectado
Metionina	Não Detectado
Isoleucina	115,14
Leucina	6,40
Tirosina	Não Detectado
Fenilalanina	Não Detectado
Lisina	81,83
NH ₃	101,95
Histidina	Não Detectado
Triptofano	*
Arginina	Não Detectado

* Triptofano é destruído durante a hidrólise ácida.

Fonte : Saron et al -2007

Anexo II: Composição de aminoácidos nas proteínas do soro de leite
(Conteúdo em g por 100 g proteína).

Aminoácidos	Proteína de soro
Triptofano	2,1
Fenilalanina+Tirosina	7,3
Leucina	11,1
Isoleucina	6,8
Treonina	8
Metionina+Cisteína	4,8
Lisina	9,9
Valina	6,8
Total	56,8

Fonte: Tabelas de nutrição para laticínios, Prof. Dr. Edmund Renner, Dr. Anna Renz-Schauen, Justus-Liebig-Universität Gießen, 1986

Anexo III. Composição vitamínica do sobrenadante do soro de leite

Tabela 9. Composição vitamínico do sobrenadante do soro de leite

Vitaminas	mg/ 100 ml
Tiamina B	10,44
Riboflavina B2	0,46
Piridoxina B6	0,16
Niacina	12,1
Ac. Fólico	1,18

Fonte : Saron et al -2007

Anexo IV : Componentes minerais do soro de leite doce.

Minerais	PSL (mg/100g)	
	Literatura ^a	Processado [*]
Potássio	150	132,0 ± 8
Cálcio	30	28,3 ± 2,2
Fósforo	40	38,2 ± 2,3
Sódio	65	41,0 ± 4,8
Magnésio	7	6,7 ± 0,3
Cloreto	120	126,9 ± 17

^a Renner et al. (1991).

^{*} Média de três repetições analíticas ± estimativa de desvio padrão.

Fonte: Saron et al , 2007

Anexo V. Características e componentes do extrato de levedura na base seca.

Características Físico-Químicas (em g por 100g de produto)	
Umidade .	Máx. 6,0
Nitrogênio Total	11,0
Nitrogênio Amino	6,0
Proteínas (N x 6,25)	Mín. 65,0
Carboidratos	12,5
Cinzas	Máx. 15,0
Cloreto	< 0,5
pH (solução a 2%)	7,0
Densidade (g/l)	Mín 400

Vitaminas (em mg/kg ou PPM)	
B1 - Tiamina	100 - 130
B2 - Riboflavina	50 - 100
B5 - Ácido Pantatênico	110 - 160
B6 - Piridoxina	40 - 100
B3 - Niacina	800 - 1.200
B12 - Cobalamina PPB	5 – 15

Componentes Inorgânicos (em g por 100g de produto)	
Potássio	2,85
Sódio	1,28
Magnésio	0,36
Cálcio	0,08
Fósforo	1,89
Enxofre	0,02
Zinco	596,0

Perfil de Aminoácidos (Expresso em 100g de proteína)		
Aminoácido	Total (T)	Livre (F)
Alanina	6,50.....	6,40
Arginina	2,00.....	1,00
Ácido Aspártico	10,2.....	3,60
Cistina	1,20.....	0,60
Ácido Glutâmico	13,4.....	3,90
Glicina	5,60.....	1,10
Histidina	2,30.....	0,70
Isoleucina	6,00.....	2,80
Leucina	11,6.....	4,10
Lisina	8,80.....	3,30
Metionina	1,60.....	0,90
Fenilalanina	4,40.....	2,60
Prolina	3,90.....	0,90
Serina	4,20.....	1,70
Treonina	4,20.....	1,50
Triptofano	1,10.....	0,70
Tirosina	2,80.....	1,40
Valina	7,50.....	3,40

Fonte: Biorigin: Boletim técnico ,18/07/06.

Anexo VI: Composição da Peptona proteose e extrato de carne

COMPOSIÇÃO	PEPTONA PROTEOSE	EXTRATO DE CARNE
Nitrogênio total	12%	11,50%
Nitrogênio A-amino	3,50%	3,20%
Umidade	5%	5%
Cinzas	20%	20%
Cloreto de Sódio	12%	6%
pH	6,5 a 7,5	6,4 +/- 0,5

Anexo VII. Componentes do meio MRS

Peso Grama por litro:	55,15g / L
Dextrose Glicose	20.0g
Peptose Proteona	10.0g
Extrato de Carne	10.0g
Extrato de levedura	5.0g
Acetato de sódio	5.0g
Fosfato dissódico	2.0g
Citrato de amônio	2.0g
Tween [®] 80	1.0g
Sulfato de magnésio	0.1g
Sulfato de manganês	0,05g

De Man et al. 1960.

Peso Grama por litro:	59,66g / L
Dextrose Glicose	20.0g
Peptose Proteona	10.0g
Extrato de Carne	10.0g
Extrato de levedura	5.0g
Fosfato de K monobásico	3,1g
Acetato de sódio tri hidratado	2,0g
Citrato de sódio monohidratado	8,3g
Tween [®] 80	1,0g
Sulfato de magnésio	0,205g
Sulfato de manganês	0,056g

Lab 1 – Unesp . 2009.

Anexo VIII: Composição dos nutrientes utilizados na formulação dos meios de cultura.

Componentes	Nitrogênio	Açúcares	Matéria Mineral	Sólidos
Extrato de carne	11,500	0,000	10,000	95,000
Proteose peptona	12,000	0,000	14,000	95,000
Extrato de levedura	11,000	12,500	14,000	95,000
Extrato de malte	0,000	0,000	0,000	100,000
Glicose	0,000	100,000	0,000	100,000
Soro de leite WM em pó	0,050	70,600	10,000	95,000
Fosfato de potássio monohidratado	0,000	0,000	95,000	95,000
Citrato de sódio	0,000	0,000	95,000	95,000
Acetato de sódio trihidratado	0,000	0,000	95,000	95,000
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,000	0,000	95,000	95,000
Sulfato de manganês dihidratado	0,000	0,000	95,000	95,000
Tween 80	0,000	0,000	0,000	100,000
Água destilada	0,000	0,000	0,000	0,000

Anexo IX: Componentes dos meios de cultura para avaliação da influência do soro de leite e extrato de levedura no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04

Meios	MRS	W 10,0 %	W 10 %	W 10%	W 10 %
			Y 1,5%	Y 1,0%	Y 0,5%
			S T	S T	S T
Componentes	%	%	%	%	%
Extrato de carne	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,000	1,5000	1,0000	0,5000
Glicose	2,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	10,000	10,0000	10,0000	10,0000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,000	0,3130	0,3130	0,3130
Citrato de sódio	0,2000	0,000	0,2000	0,2000	0,2000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,000	0,8300	0,8300	0,8300
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,000	0,2100	0,2100	0,2100
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,000	0,0060	0,0060	0,0060
Tween 80	0,1000	0,000	0,1000	0,1000	0,1000
Água destilada	93,8410	90,000	86,8410	87,3410	87,8410
Total	100,0000	100,000	100,00	100,0000	100,0000
N (g / 100 ml)	0,2900	0,005	0,170	0,1150	0,0600
Açúcares (g / 100 ml)	2,0000	7,060	7,060	7,0600	7,0600
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	1,000	2,691	2,6211	2,5511
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	9,500	12,406	11,9311	11,4561

Meios	MRS	WM 7,5 %	WM 7,5 %	WM 7,5%	WM,7,5 %
			Y 1,5%	Y 1,0%	Y 0,5%
			S T	S T	S T
Componentes	%	%	%	%	%
Extrato de carne	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,000	1,5000	1,0000	0,5000
Glicose	2,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	7,500	7,5000	7,5000	7,5000

Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,000	0,3130	0,3130	0,3130
Citrato de sódio	0,2000	0,000	0,2000	0,2000	0,2000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,000	0,8300	0,8300	0,8300
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,000	0,2100	0,2100	0,2100
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,000	0,0060	0,0060	0,0060
Tween 80	0,1000	0,000	0,1000	0,1000	0,1000
Água destilada	93,8410	92,500	89,3410	89,8410	90,3410

Total	100,0000	100,000	100,00	100,0000	100,0000
N (g / 100 ml)	0,2900	0,004	0,169	0,1138	0,0588
Lactose (g / 100 ml)	2,0000	5,295	5,295	5,2950	5,2950
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	0,750	2,441	2,3711	2,3011
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	7,125	10,031	9,5561	9,0811

Meios	MRS	W 5,0 %	W 5,0%	W 5,0%	W 5,0 %
			Y 1,5%	Y 1,0%	Y 0,5%
			S T	S T	S T

Componentes	%	%			
-------------	---	---	--	--	--

Extrato de carne	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,000	1,5000	1,0000	0,5000
Glicose	2,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	5,000	5,0000	5,0000	5,0000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,000	0,3130	0,3130	0,3130
Citrato de sódio	0,2000	0,000	0,2000	0,2000	0,2000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,000	0,8300	0,8300	0,8300
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,000	0,2100	0,2100	0,2100
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,000	0,0060	0,0060	0,0060
Tween 80	0,1000	0,000	0,1000	0,1000	0,1000
Água destilada	93,8410	95,000	91,8410	92,3410	92,8410

Total	100,0000	100,000	100,00	100,00	100,0000
N (g / 100 ml)	0,2900	0,003	0,168	0,113	0,0575
Lactose (g / 100 ml)	2,0000	3,530	3,530	3,530	3,5300
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	0,500	2,191	2,121	2,0511
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	4,750	7,656	7,181	6,7061

Meios	MRS	W 2,5 %	W 2,5% Y 1,5% S T	W 2,5% Y 1,0% S T	W 2,5 % Y 0,5% S T
Componentes	%	%	%	%	%
Extrato de carne	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,000	1,5000	1,0000	0,5000
Glicose	2,0000	0,000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	2,500	2,5000	2,5000	2,5000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,000	0,3130	0,3130	0,3130
Citrato de sódio	0,2000	0,000	0,2000	0,2000	0,2000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,000	0,8300	0,8300	0,8300
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,000	0,2100	0,2100	0,2100
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,000	0,0060	0,0060	0,0060
Tween 80	0,1000	0,000	0,1000	0,1000	0,1000
Água destilada	93,8410	97,500	94,3410	94,8410	95,3410
Total	100,0000	100,000	100,0000	100,0000	100,0000
N (g / 100 ml)	0,2900	0,001	0,1663	0,1113	0,0563
Lactose (g / 100 ml)	2,0000	1,765	1,7650	1,7650	1,7650
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	0,250	1,9411	1,8711	1,8011
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	2,375	5,2811	4,8061	4,3311

Anexo X. Componentes do meios com soro de leite para avaliação da eficiência dos sais inorgânicos e polisorbato no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04.

Meios	MRS	W 5,0 % Y 1,5%	W 5,0 % Y 1,5%	W 5,0 % Y 1,5%	W 5,0% Y 1,5%
		S	S	ST	T
Componentes	%				
Extrato de carne	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,5000	1,5000	1,5000	1,5000
Glicose	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,0000	0,3130	0,3130	0,0000
Citrato de sódio	0,2000	0,0000	0,2000	0,2000	0,0000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,0000	0,8300	0,8300	0,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,0000	0,2100	0,2100	0,0000
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,0000	0,0060	0,0060	0,0000
Tween 80	0,1000	0,0000	0,0000	0,1000	0,1000
Água destilada	93,8410	92,5000	91,9410	91,8410	93,4000
Total	100,0000	100,00	100,00	100,0000	100,00
N (g / 100 ml)	0,2900	0,293	0,168	0,168	0,168
Açúcares (g / 100 ml)	2,0000	3,530	3,530	3,530	3,530
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	0,810	2,191	2,191	0,710
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	7,125	7,656	7,656	6,175

Anexo XI . Componentes dos meios de cultura para avaliação de eficiência de extratos orgânicos no crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb12.

Meios	MRS	W 7,5 % PMY	W 5,0 % PMY	W 5,0% M 1,0%	W 5,0% Y 1,0%	W 5,0% P 1,0%
Componentes	%					
Extrato de carne	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000
Extrato de levedura	0,5000	0,5000	0,5000	0,0000	1,0000	0,0000
Glicose	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	7,5000	5,0000	5,0000	5,0000	5,0000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Citrato de sódio	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tween 80	0,1000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Água destilada	93,8410	90,0000	92,5000	94,0000	94,0000	94,0000
Total	100,0000	100,0000	100,00	100,00	100,0000	100,00
N (g / 100 ml)	0,2900	0,2938	0,293	0,118	0,113	0,123
Açúcares (g / 100 ml)	2,0000	5,2950	3,530	3,530	3,530	3,530
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	1,0600	0,810	0,600	0,640	0,640
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	9,5000	7,125	5,700	5,700	5,700

Anexo XII. Componentes do meios de cultura para determinação de curva de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb12 .

Meios	MRS	W 5,0 % PMY	W 7,5% PMY
Componentes	%		
Extrato de carne	1,0000	0,0000	0,0000
Proteose peptona	1,0000	0,0000	0,0000
Extrato de levedura	0,5000	1,5000	1,0000
Glicose	2,0000	0,0000	0,0000
Soro de leite WM em pó	0,0000	7,5000	7,5000
Fosfato de potássio monohidratado	0,3130	0,0000	0,0000
Citrato de sódio	0,2000	0,0000	0,0000
Acetato de sódio trihidratado	0,8300	0,0000	0,0000
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2100	0,0000	0,0000
Sulfato de manganês dihidratado	0,0060	0,0000	0,0000
Tween 80	0,1000	0,0000	0,0000
Água destilada	93,8410	91,0000	91,5000
Total	100,0000	100,00	100,0000
N (g / 100 ml)	0,2900	0,169	0,1138
Açúcares (g / 100 ml)	2,0000	5,295	5,2950
Matéria mineral (g / 100 ml)	1,7911	0,960	0,8900
Sólidos Totais (g / 100 ml)	5,4061	8,550	8,0750

Anexo XIII: Método de diluição celular e contagem em série.

Procedimento

- 1- Tomar 1 mL da amostra (suspensão de células) e transferir para um tubo de cultura com 9 mL de água ou solução salina esterilizada (diluição 1:10 ou 10^{-1}).
- 2- Homogeneizar em agitador de tubos.
- 3- Pipetar 1 mL da diluição anterior para outro tubo com 9 mL de água ou solução salina esterilizada e ter-se-á uma diluição 1:100 ou 10^{-2} . Diluições maiores podem ser obtidas tomando-se 1 mL de cada diluição sucessiva e colocando em tubos com 9 mL de água ou solução salina, até se atingir a diluição desejada.

4- Fazer a semeadura em placas de Petri, pipetando 1 mL e adicionando-se o meio de cultivo adequado liquefeito e resfriado a uma temperatura de 45-46°C.

Agitar a placa com movimentos horizontais para distribuir as células com uniformidade (plaqueamento em profundidade). Semear no mínimo 2 placas de cada diluição e escolher três diluições.

- 5- Incubar a 32°C por 24-48 horas.

Cálculo: número de colônias na placa X índice de diluição da amostra = número de bactérias/mL (Por exemplo, considerando-se que a placa que recebeu a diluição de 1/10.000 contém 32 colônias, pode-se estimar que existam $32 \times 10.000 = 320.000$ bactérias/mL da amostra ou $3,2 \times 10^5$).

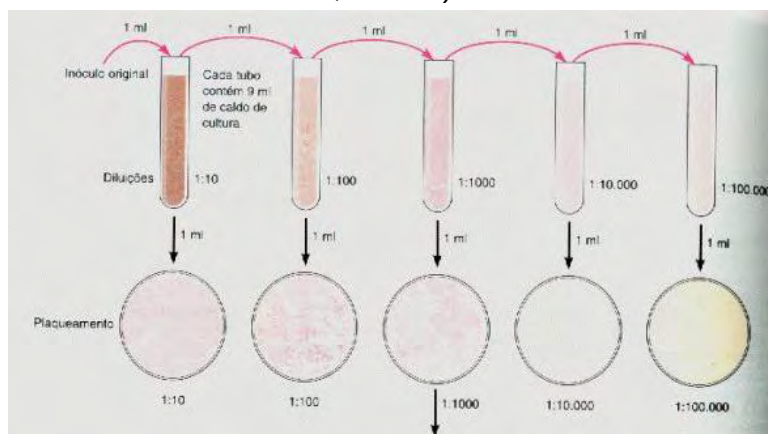


Figura XI A. Contagem em placa e diluições seriadas.

Na diluição seriada, o inóculo é diluído em uma série de tubos de diluição. No exemplo apresentado, cada tubo de diluição subsequente conterá um décimo do número de bactérias presentes na anterior. Posteriormente, as amostras destes tubos serão transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura onde ocorrerá o crescimento das colônias e a contagem. O número de colônias será utilizado na determinação da quantidade de bactérias presentes na amostra original (Retirado de Tortora *et al.*, 2003).

Anexo XIV: Método de determinação do fator de conversão para a solução de NaOH.

A quantia de 0,500 gramas de pó de bifitalato foi seco em estufa a 120 graus Celsius durante 2 horas , pesado 0,3045 gramas e diluído em 15 ml de água destilada fervida e resfriada. Esta solução recebeu 3 gotas de solução de fenolftaleína . Em seguida preparada uma solução de 0,1 N de NaOH, (4,0 gramas em 1000 ml de água destilada).

O fator de conversão foi determinado pelo volume de solução de NaOH 0,1 N necessário para neutralizar 15 ml da solução de bifitalato de potássio, através da formula:

Fator de Conversão (F.C.) = Volume de Bifitalato / Volume de NaOH

$$F.C. = 15,00 \text{ ml} / 15,92 \text{ ml}$$

$$F.C. = 0,9423.$$

Anexo XV: Método SOMOGY-NELSON

Preparação dos reativos:

- Reativo de Somogy: Dissolver 28 gramas de fosfato monoácido de sódio e 40 gramas de tartarato duplo de sódio e potássio em 700 ml de água. Adicionar 100 ml de NaOH 1N. Gotejar, sob agitação constante, 80 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 10%. Adicionar 180 gramas de sulfato de sódio anidro e completar a 1 litro. Deixar em repouso por 2 dias e filtrar. Guardar em frasco escuro a cerca de 37°C. Filtrar antes do uso.

- Reativo de Nelson: Dissolver 25 gramas de molibdato de amônio em 450 ml de água destilada. Adicionar 26 ml de ácido sulfúrico concentrado. Adicionar 3 gramas de arseniato dibásico de sódio dissolvido em 25 ml de água. Manter em repouso em frasco escuro durante 2 dias antes de uso.

Curva padrão de lactose

1 Dissolver 0,100 gramas de lactose pura em um litro de água. Esta solução conterá 100 mg/ml.

2 Tomar 6 tubos de ensaio e numerá-los de 0 a 5. Adicionar 0,0, 0,20, 0,40, 0,60 0,80, e 1,0 ml da solução padrão de lactose contendo (100 micro gramas/mL = 100 mg/mL) e completar o volume a 1.0 mL com água destilada.

3 Acrescentar em cada tubo 1.0 mL do Reativo de Somogy e agitar. Deixar em banho-maria fervente por 10 minutos. Esfriar em água corrente.

4 Adicionar 1.0 ml do Reativo de Nelson e agitar. Completar o volume a 10 mL, adicionando 7 ml de água destilada.

5 Fazer leitura em espectrofotômetro em 540 nm.

Obs. : Repetir o mesmo procedimento para determinar a curva padrão de glicose.

(Fonte: Bracht et al . 2003 ; Demiate et al ,2002) .

Anexo XVI: Padrões de absorbância para lactose e glicose.

Tabela XVI A : ART -Curva padrão da lactose e glicose

Concentração de Açúcar	Espectro
Lactose 0,020g/100 ml	0,137
Lactose 0,040g/100 ml	0,188
Lactose 0,060g/100 ml	0,255
Lactose 0,080g/100 ml	0,337
Lactose 0,100g/100 ml	0,440
Glicose 0,020g/100 ml	0,198
Glicose 0,040g/100 ml	0,256
Glicose 0,060g/100 ml	0,316
Glicose 0,080g/100 ml	0,395
Glicose 0,100g/100 ml	0,492

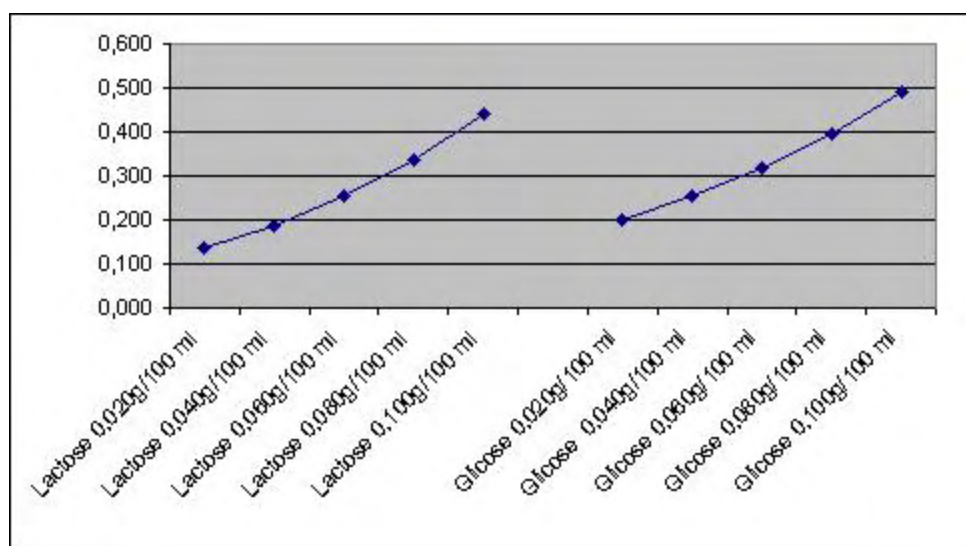


Figura XVI A : ART -Curva padrão da lactose e glicose

Anexo XVII: Análises do soro de leite reconstituído.



INTERESSADO: LANDTECH COMERCIO E INDUSTRIA LTDA

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA: WM 1,0 (10%) INTEGRAL

DATA DE ENTRADA: 18/02/2010

DATA DA SAÍDA: 26/02/2010

MATERIAL: RESÍDUO

Nº LABORATÓRIO: 0262022010

Amostra: coletada e encaminhada ao Laboratório pelo interessado

Determinação	Resultado (%)
Extrato Etéreo	0,25
Fibra Bruta	0,00
Matéria Seca	8,43
Proteína Bruta	1,07
Resíduo Mineral Fixo	0,72
Umidade	91,57
Carboidratos	6,39

Observações:

Aleixo
Aleixo Agnaldo Sachete
Químico Industrial
CRQ 04230496 – IV Região

Laboratório credenciado no CIPOA, publicação D.O.E. seq. I, São Paulo, 108 (145), 01/08/1998 - 15
Laboratório cadastrado no Ministério da Agricultura e Reforma Agrária - DFARA/SP - SP 01290-4
Av. Getúlio Vargas, 1200 - Vila Nova Santana - Fone/Fax (18) 3302 1058 - Assis - SP - 19807-634
Serviço de Atendimento ao Consumidor: femacec@femanet.com.br

Anexo XVIII: Componentes do soro de leite doce em base sêca.

Componentes	Concentração
-------------	--------------

Macro componentes (g /100 g)

Lactose	76,66 g
Proteína	13,33 g
Gordura	1,76 g
Minerais	8,50 g

(Laticínios Porto Alegre Ltda. – Departamento Técnico)

Componentes	Concentração
-------------	--------------

Macro componentes (g /100 g)

Lactose	86,00
Proteína	1,66
Gordura	1,76
Minerais	10,56

(Adaptado de Smithers *et al.*, 1996)

Anexo XIX: Composição final do soro de leite reconstituído.

Componentes	Concentração
Macro componentes (g /100 g)	
Lactose	4,9
Proteína	0,86
Gordura	0,11
Minerais	0,66

(Smithers *et al.*, 1996)

Anexo XX: Composição parcial do permeado do soro de leite em base seca:

Componente	Concentração
Macro componentes (g/100g)	
Lactose	85.05 ± 0.12
Cinzas	9.64 ± 0.08
Proteínas (N x 6.25)	4.14 ± 0.01

Saron et al , 2007 .

Anexo XXI: Figuras da fermentação bacteriana , análise do pH e acidez e plaqueamento.



Figura XXI A: Fermentação bacteriana em erlenmeyers



Figura XXI B: Análise de pH e acidez.

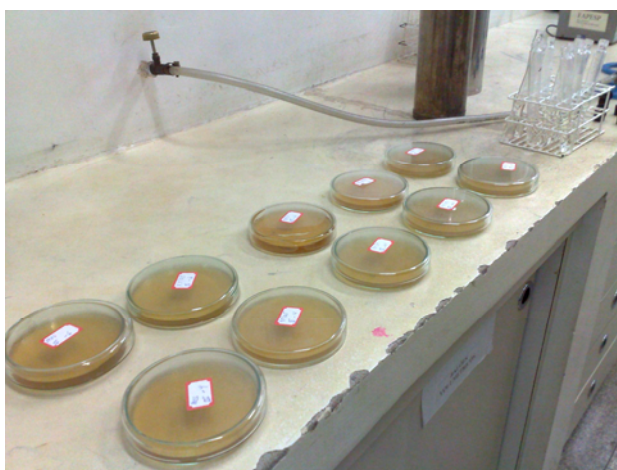


Figura XXI C : Plaqueamento em Agar gel de MRS.

Anexo XXII: Custo dos ingredientes dos meios de cultura para bactérias lácticas.

Descrição	Formula	Fornecedor	Embalagem KG	Preço / kg
Sacarose		ALPAX	0,5	R\$ 159,98
Glicose		ALPAX	0,5	R\$ 111,50
Soro de leite em pó		Lat.Porto Alegre	20	R\$ 3,00
Extrato de Levedura		ALPAX	1,0	R\$ 976,00
Proteose peptona		ALPAX	0,5	R\$ 1.735,00
Extrato de carne		ALPAX	0,5	R\$ 1.254,00
Acetato de Sódio tri hidratado		CAQ- Nuclear	0,5	R\$ 15,00
Citrato de Sódio monohidratado		CAQ- Nuclear	0,5	R\$ 20,50
Fosfato de potássio monobásico	K ₂ .HPO ₄	CAQ- Nuclear	0,5	R\$ 36,00
Sulfato de Magnésio heptahid.	MgSO ₄ .7H ₂ O	Casa Americana	0,5	R\$ 15,60
Sulfato de Manganês	MnSO ₄ .H ₂ O	Casa Americana	0,5	R\$ 91,60
Tween 80		Casa Americana	1,0	R\$ 28,00

Anexo XXIII: Custo dos meios de cultura para bactérias láticas.

Tabela XXIII A: Custo dos meios de cultura MRS e W 7,5% PMY.

Descrição	Meio		Meio	
	MRS	MRS	W 7,5% PMY	W 7,5% PMY
	Formula	Valor	Formula	Valor
Sacarose		R\$ -	0,000%	R\$ -
Glicose	2,000%	R\$ 2,23	0,000%	R\$ -
Soro de leite em pó		R\$ -	7,500%	R\$ 0,23
Extrato de Levedura	0,500%	R\$ 4,88	0,500%	R\$ 4,88
Proteose peptona	1,000%	R\$ 17,35	1,000%	R\$ 17,35
Extrato de carne	1,000%	R\$ 12,54	1,000%	R\$ 12,54
Acetato de Sódio tri hidratado	0,200%	R\$ 0,03	0,000%	R\$ -
Citrato de Sódio monohidratado	0,830%	R\$ 0,17	0,000%	R\$ -
Fosfato de potássio monobásico	0,310%	R\$ 0,11	0,000%	R\$ -
Sulfato de Magnésio heptahid.	0,020%	R\$ 0,00	0,000%	R\$ -
Sulfato de Manganês	0,006%	R\$ 0,01	0,000%	R\$ -
Tween 80	0,100%	R\$ 0,03	0,000%	R\$ -
0		R\$ -		R\$ -
Água destilada	94,034%	R\$ -	90,000%	R\$ -
Sólidos	5,966%	R\$ / Litro / Meio	10,000%	R\$ / Litro / Meio
Total	100,000%	R\$ 37,35	100,000%	R\$ 35,00

Tabela XXIII B: Custo dos componentes dos meios de cultura W 5,0%PMY e W 5,0% Y1%.

Descrição	Meio		Meio	
	W 5,0%PMY		W 5,0% Y 1%	
	Formula	Valor	Formula	Valor
Sacarose	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Glicose	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Soro de leite em pó	5,000%	R\$ 0,15	5,000%	R\$ 0,15
Extrato de Levedura	0,500%	R\$ 4,88	1,000%	R\$ 9,76
Proteose peptona	1,000%	R\$ 17,35	0,000%	R\$ -
Extrato de carne	1,000%	R\$ 12,54	0,000%	R\$ -
Acetato de Sódio tri hidratado	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Citrato de Sódio monohidratado	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Fosfato de potássio monobásico	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Sulfato de Magnésio heptahid.	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Sulfato de Manganês	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Tween 80	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
0	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Água destilada	92,500%	R\$ -	94,000%	R\$ -
Sólidos	7,500%	R\$ / Litro / Meio	6,000%	R\$ / Litro / Meio
Total	100,000%	R\$ 34,92	100,000%	R\$ 9,91

Tabela XXIII C : Custo dos componenetes dos meios de cultura W 5,0% M1% e W 5,0% P1%.

Descrição	Meio		Meio	
			W 5,0% P	
	W 5,0% M 1%	W 5,0% M 1%	1%	W 5,0% P 1%
	Formula	Valor	Formula	Valor
Sacarose	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Glicose	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Soro de leite em pó	5,000%	R\$ 0,15	5,000%	R\$ 0,15
Extrato de Levedura	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Proteose peptona	0,000%	R\$ -	1,000%	R\$ 17,35
Extrato de carne	1,000%	R\$ 12,54	0,000%	R\$ -
Acetato de Sódio tri hidratado	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Citrato de Sódio monohidratado	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Fosfato de potássio monobásico	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Sulfato de Magnésio heptahid.	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Sulfato de Manganês	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Tween 80	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
0	0,000%	R\$ -	0,000%	R\$ -
Agua destilada	94,000%	R\$ -	94,000%	R\$ -
		R\$ / Litro /		
Solidos	6,000%	Meio	6,000%	R\$ / Litro / Meio
Total	100,000%	R\$ 12,69	100,000%	R\$ 17,50

Anexo XXIV: Velocidades de crescimento, tempo de duplicação e rendimento de cultura dos meios de cultura para *Lactobacillus acidophilum* La 04 e *Bifibobacterium lactis* Bb 12.

Meios	Microorganismos	μ (h ⁻¹)	Tempo de duplicação (Td)	Rendimento ($Y_{x/s}$)
MRS	La 04	0,145	4,78 h	0,246 g/ g açúcar
	Bb 12	0,204	3,40 h	0,138 g/ g açúcar
W 7,5%	La 04	0,162	4,30 h	0,184 g/ g açúcar
PMY	Bb 12	0,264	2,60 h	0,234 g/ g açúcar
W 5,0%	La 04	0,214	3,20 h	-----g/ g açúcar
PMY	Bb 12	0,257	2,80 h	----- g/ g açúcar

Anexo XXV: Resultados da regressão linear do crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio de cultura MRS.

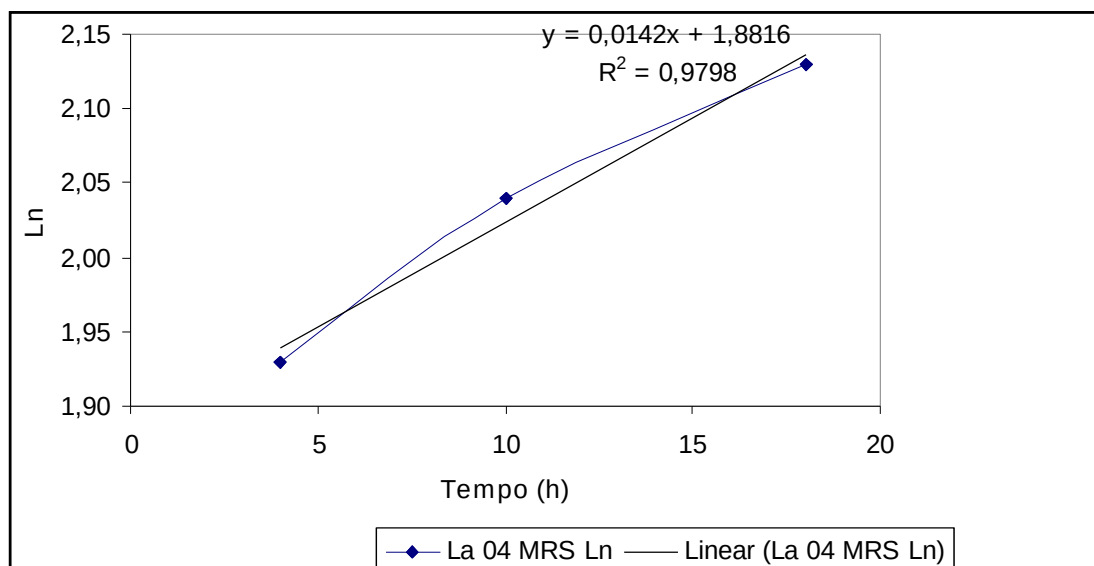


Figura XXV A : Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meio MRS.

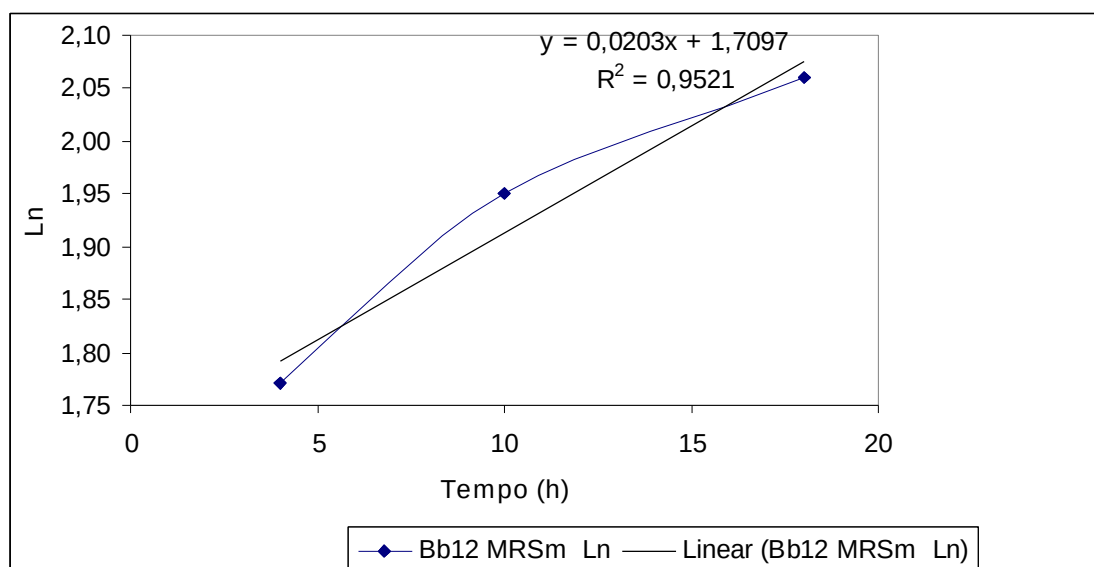


Figura XXV B: Crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio MRS.

Anexo XXVI: Resultados da regressão linear do crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura a base de soro de leite 7,5%.

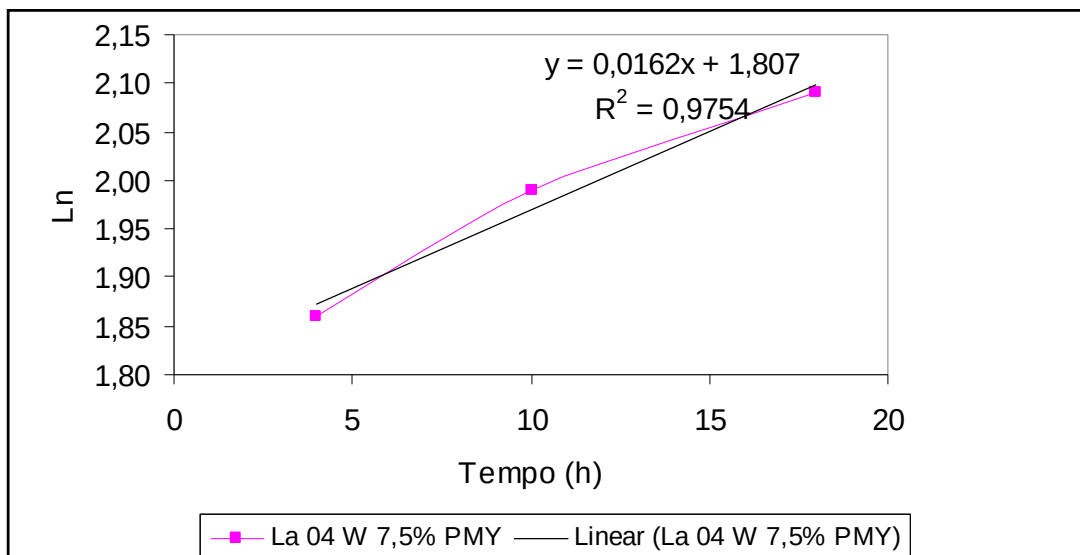


Figura XXVI A : Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meio W 7,5%.

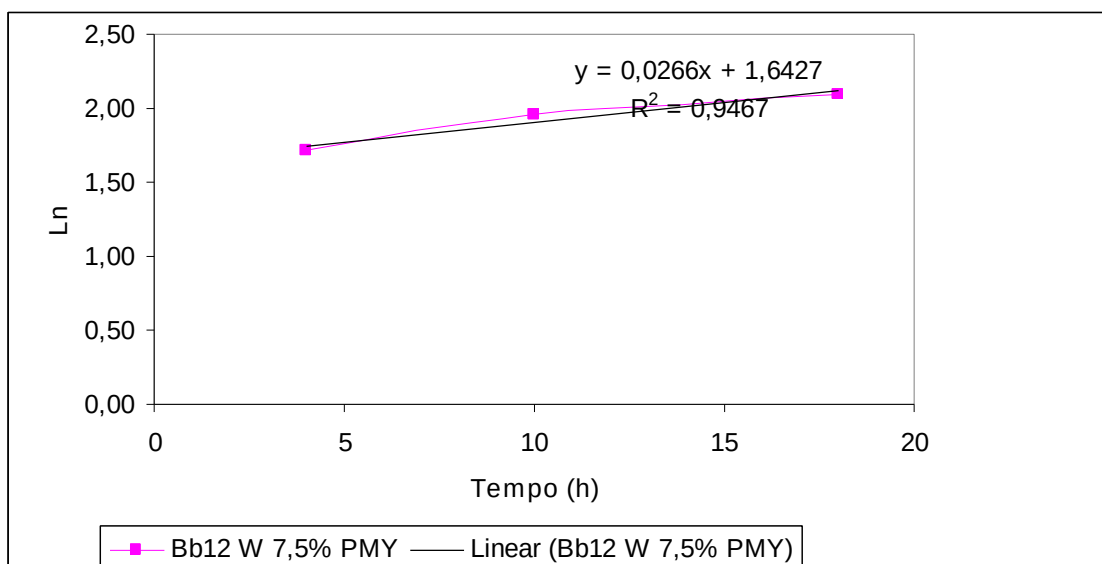


Figura XXVI B : Crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio W 7,5%.

Anexo XXVII: Resultados da regressão linear do crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 e *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meios de cultura a base de soro de leite 5,0%.

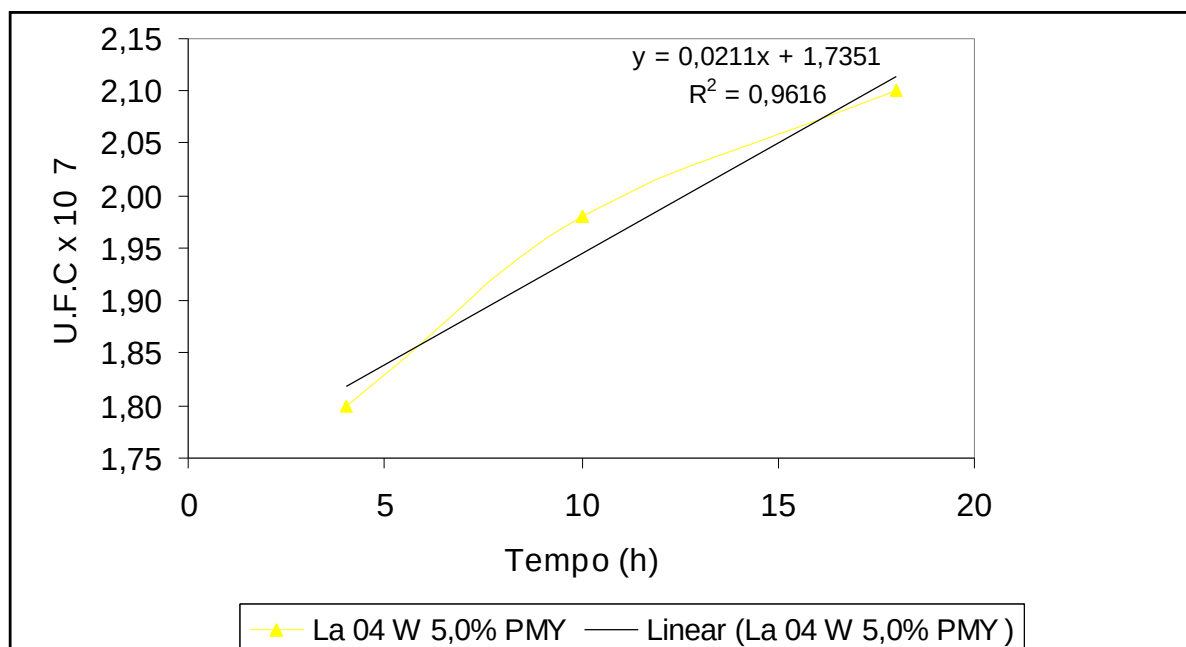


Figura XXVII A : Crescimento de *Lactobacillus acidophilus* La 04 em meio W 5,0%.

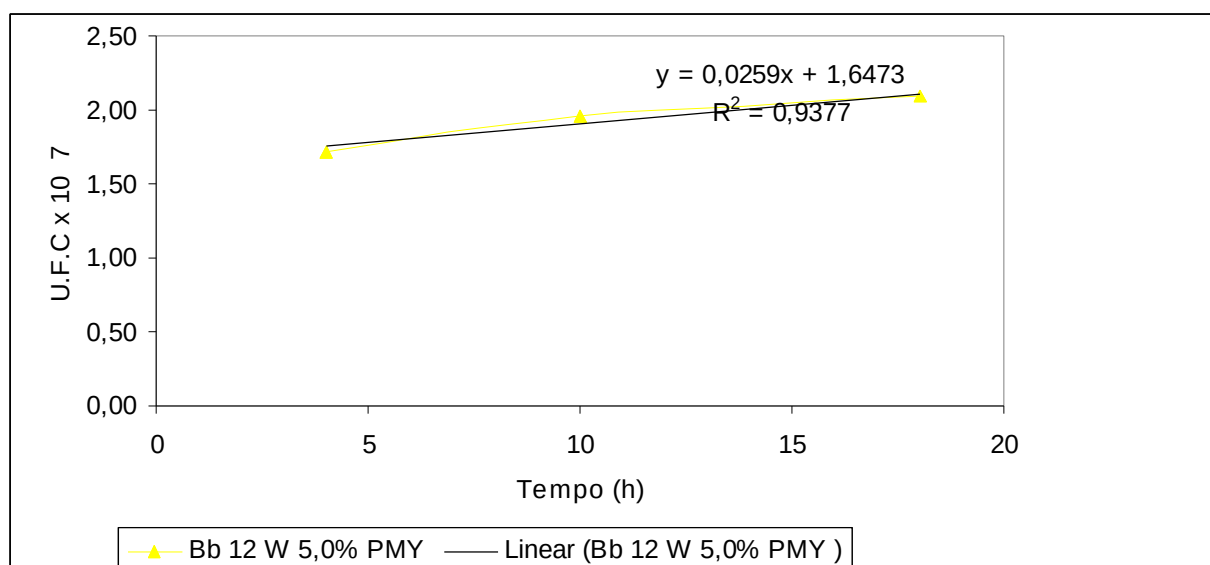


Figura XXVII B: Crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb 12 em meio W 5,0%.