



ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA ADAMI

**ESTUDO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO SIMBIÓTICO DE
LINHAGENS PROBIÓTICAS NA PRESENÇA DE
OLIGOSSACARÍDEOS**

**CAMPINAS
2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA ADAMI

**ESTUDO *IN VITRO* DO COMPORTAMENTO SIMBIÓTICO DE
LINHAGENS PROBIÓTICAS NA PRESENÇA DE
OLIGOSSACARÍDEOS**

Orientador (a): Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore

Co-orientador (a): Dra. Rosângela dos Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciência dos Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ANGÉLICA APARECIDA VIEIRA ADAMI.
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA.GLAUCIA MARIA PASTORE**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR

MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA FACULDADE DE

ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Adami, Angélica Aparecida Vieira.

Ad15e Estudo in vitro do comportamento simbiótico de
linhagens probióticas em oligossacarídeos / Angélica
Aparecida Vieira Adami -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Gláucia Maria Pastore.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Simbiose. 2. Prebióticos. 3. Probióticos. 4.
Oligossacarídeos. 5. *In vitro*. I. Pastore, Gláucia

Maria, 1953- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Study in vitro behavior symbiotic strain probiotics in the
presence of oligosaccharides

Palavras-chave em inglês:

Symbiosis

Prebiotics

Probiotics

Oligosaccharides

In vitro

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gláucia Maria Pastore [Orientador]

Mário Roberto Maróstica Júnior

Izildinha Moreno

Data da defesa: 26-02-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior
Universidade Estadual de Campinas
Membro Titular

Dra. Izildinha Moreno
Instituto de Tecnologia de Alimentos
Membro Titular

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Universidade Estadual de Campinas
Membro Suplente

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Universidade Federal de São João Del-Rei
Membro Suplente

***Deus, que me iluminou a cada dia com seu Espírito Santo a minha
inteligência, permitindo que tivesse o dom da leitura e escrita...***

Aos meus pais, Josefina e Benedito, meu amores eternos...

A Prof^a. Gláucia Maria Pastore que acreditou na minha capacidade...

***A Rosângela dos Santos que sempre me aconselhou de forma clara e
concisa...***

Dedico este estudo

Divino Espírito Santo, fonte de toda ciência...

Derramai sua benção sempre...

Sobre minha inteligência...

Amém.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus pais que me deram o dom da vida, ao meu esposo Gláucio Adami que sempre me apoiou. E aos meus professores desde o início da minha formação até aos dias atuais.

A minha orientadora Prof^ª. Gláucia Maria Pastore, a minha co-orientadora Rosângela dos Santos, MUITO OBRIGADA!

Ao pessoal do Laboratório de Bioaromas...

Em especial o pessoal da Universidade do Vale do Sapucaí: Ana Beatriz, Daniella Alves, Guilherme Guido, Tamires entre outros...

Ao pessoal da pós-graduação em Microbiologia de Alimentos (Michele, Bruna, Leilane e Josylene...)

Agradecimento sincero e verdadeiro ao Prof^º. Manoel Araújo Teixeira (grande amigo)...

Ao meu irmão Luciano Rafael Vieira, pelos bons conselhos e apoio...

Ao meu amigo Diego Andreazzi Duarte...

Ao pessoal do Instituto de Biologia IB/UNICAMP, em especial ao Matheus Perez.

A professora Gabriela, Mário Maróstica pela atenção nos momentos de dúvidas.

A querida Graça do Bioaromas... Ao Nadir...

A todos meus amigos e familiares que me apoiaram e de alguma forma me ajudaram a concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ, pela bolsa de estudos...

ÍNDICE GERAL

APRESENTAÇÃO

RESUMO GERAL.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
OBJETIVOS.....	xix
INTRODUÇÃO GERAL.....	xxii

CAPÍTULO I

COMPORTAMENTO SIMBIÓTICO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA PRESENÇA DE OLIGOSSACARÍDEOS: UMA REVISÃO

Resumo.....	01
Abstract.....	02
1. Introdução.....	03
1.1. Probióticos.....	03
1.2. Oligossacarídeos.....	04
1.3. Mecanismos de ação que caracterizam a simbiose.....	05
1.4. Antagonismo da condição de simbiose.....	06
1.5. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas	08
1.6 Propriedades funcionais dos exopolissacarídeos.....	09
2. Conclusão.....	12
3. Referências Bibliográficas.....	13

CAPÍTULO II

ESTUDO DO EFEITO DE OLIGOSSACARÍDEOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA ATIVIDADE BIFIDOGÊNICA DE LINHAGENS PROBIÓTICAS

Resumo.....	21
Abstract.....	22
3. Introdução.....	23
4. Materiais e Métodos.....	24
4.2. Seleção dos oligossacarídeos.....	24
4.3. Reativação das linhagens probióticas.....	25
4.4. Avaliação da atividade bifidogênica.....	25
4.5. Avaliação da acidificação dos meios.....	26
2.5 Análises Estatística.....	26
3. Resultados e Discussões.....	26
3.1. Reativação das linhagens probióticas.....	26
3.2. Avaliação da acidificação dos meios.....	27
3.3. Avaliação da atividade bifidogênica.....	29
4. Conclusão.....	36
5. Referências Bibliográficas.....	37

CAPÍTULO III

PERFIL DE HIDROFOBICIDADE DA SUPERFÍCIE CELULAR DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EM MEIO ENRIQUECIDO COM OLIGOSSACARÍDEOS

Resumo.....	40
Abstract.....	42
1. Introdução.....	43
2. Materiais e Métodos.....	47
2.1. Seleção dos oligossacarídeos.....	47
2.2. Reativação das linhagens probióticas.....	47
2.3. Coloração de Gram para confirmação das linhagens.....	48
2.4. Meio de cultura enriquecido com prebióticos.....	48
2.5. Teste de Hidrofobicidade (MATH).....	49
3. Resultados e Discussões.....	50
3.1. Reativação das linhagens probióticas.....	50
3.2. Teste de Hidrofobicidade (MATH).....	50
4. Conclusão.....	53
5. Referências Bibliográficas.....	54

CAPITULO IV

ESTUDO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* EM MEIO LIQUIDO ENRIQUECIDO COM OLIGOSSACARÍDEOS

Resumo.....	57
Abstract.....	58
1. Introdução.....	59
2. Materiais e Métodos.....	61
2.1. Produção de exopolissacarídeos.....	61
2.2. Extração dos exopolissacarídeos	61
2.3. Avaliação Qualitativa da formação de exopolissacarídeos.....	62
2.4. Avaliação Quantitativa da formação de exopolissacarídeos.....	62
3. Resultados e Discussões.....	63
3.1. Produção de exopolissacarídeos.....	63
3.2. Análise qualitativa e quantitativa da produção dos exopolissacarídeos.....	66
4. Conclusão.....	68
5. Referências Bibliográficas.....	69

CAPITULO V

EFEITO ANTAGÔNICO DAS LINHAGENS *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* CULTIVADAS EM OLIGOSSACARÍDEOS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

Resumo.....	73
Abstract.....	75
1. Introdução.....	77
2. Materiais e Métodos.....	80
2.1. Reativação das linhagens probióticas.....	80
2.2. Meio de Cultura enriquecido com oligossacarídeos.....	80
2.3. Dosagem de ácido láctico.....	81
2.4. Reativação das linhagens patogênicas.....	81
2.5. Avaliação antagônica pelo método de difusão em ágar.....	82
3. Resultados e Discussões.....	82
3.1. Reativação dos micro-organismos.....	82
3.2. Dosagem de ácido láctico e acidificação do meio.....	83
3.3. Avaliação antagônica pelo método de difusão em ágar.....	87
4. Conclusão.....	92
5. Referências Bibliográficas.....	92
CONCLUSÃO GERAL.....	101
ANEXOS.....	103

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Propriedades funcionais dos EPS.....	10
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1: Linhagens de bactérias ácido-láticas <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) e <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05)	27
Figura 2: Linhagens de bactérias ácido-láticas <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) e <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05).....	27
Figura 3: Valores de pH resultantes da fermentação em 12 horas das linhagens de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) em meio MRS+FOS (100mg de FOS), MRS+GOS (100g de GOS) e MRS+Yacon (100g de Yacon) a 37°C em condições de anaerobiose.....	28
Figura 4: Valores de pH resultantes da fermentação em 12 horas das linhagens de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS+FOS (200mg de FOS), MRS+GOS (200g de GOS) a 37°C em condições de anaerobiose. Meio controle (MRS sem fonte de dextrose).....	29
Figura 5: Curva de Crescimento para <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) nos meios MRS+GOS (200mg de GOS) e MRS+FOS (200mg de FOS); e o controle MRS sem fonte de dextrose.	32
Figura 6: Curva de Crescimento para <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) nos meios MRS+GOS (100mg de GOS), MRS+FOS (100mg de FOS) e MRS+yacon (100mg de FOS); e o controle MRS sem fonte de dextrose.....	34
Tabela 1: Contagem inicial das culturas probióticas	26
Tabela 2: Avaliação de bifidogenia com <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) usando diferentes concentrações de galactooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose.....	30
Tabela 3: Avaliação de bifidogenia com <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) usando diferentes concentrações de frutooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose.....	31
Tabela 4: Avaliação de bifidogenia com <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) usando diferentes concentrações de frutooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose.....	33
Tabela 5: Avaliação de bifidogenia com <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) usando diferentes concentrações de galactooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose.....	34
Tabela 6: Avaliação de bifidogenia com <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12)	

usando diferentes concentrações de yacon, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose.....	35
--	----

CAPÍTULO III

Figura 1: O desenvolvimento de um biofilme.....	44
Figura 2: Estruturas da membrana celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	45
Figura 3: Esquema da Teoria de Lewis sobre interações entre doadores e receptores de elétrons.....	45
Figura 4: Linhagens de bactérias ácido-láticas A. <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) e B. <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05).....	50
Figura 5: Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12).....	51
Figura 6: Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05).....	52

CAPÍTULO IV

Figura 1: Localização celular de polissacarídeos produzidos por bactérias gram-positivas e Gram-negativas.....	50
Figura 2: Curva de calibração para estimativa da concentração de carboidratos totais.....	63
Figura 3: Produção de exopolissacarídeos por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS suplementado com galactooligossacarídeo.....	64
Figura 4: Produção de exopolissacarídeos por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS suplementado com frutooligossacarídeos.....	65
Figura 5: Valores de pH do meio de cultivo líquido (MRS + prebióticos) durante o período de fermentação a 37°C em condições de anaerobiose.....	65
Figura 6: Exopolissacarídeos produzidos por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS suplementado com galactooligossacarídeo.....	66
Figura 7: Exopolissacarídeos produzidos por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS suplementado com frutooligossacarídeos.....	67

CAPÍTULO V

Figura 1: Curva de padrão para estimar a concentração de ácido láctico.....	84
Figura 2: Produção de ácido láctico por <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) em meio MRS suplementado com oligossacarídeos.....	85
Figura 3: Produção de ácido láctico por <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) em meio MRS suplementado com oligossacarídeos.....	85
Figura 4: Valores de pH resultantes da fermentação em 24 horas das linhagens de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05).....	86
Figura 5: Valores de pH resultantes da fermentação em 24 horas das linhagens de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12).....	86
Figura 6: Avaliação antagônica de <i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12) cultivada em oligossacarídeos (GOS 100g, FOS 100g, Yacon 100g) sobre linhagens patogênicas.....	88
Figura 7: Avaliação antagônica de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05) cultivado em oligossacarídeos (GOS 100g, FOS 100g, Yacon 100g) sobre linhagens patogênicas.....	90
Tabela 1: Estudos <i>in vitro</i> com cultivo de células de origem gastrointestinal que utilizaram.....	79
Tabela 2: Resultados de provas bioquímicas realizadas com as linhagens patogênicas linhagens de lactobacilos e bifidobactérias.....	83

RESUMO GERAL

Estudos são realizados com oligossacarídeos, probióticos e a combinação deles; são vários os fatores que envolvem os benefícios que estes em combinação podem agregar para a saúde dos consumidores. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar o comportamento simbiótico *in vitro* das linhagens probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), em substratos enriquecidos com oligossacarídeos, ou seja, avaliar se esses potencializavam a capacidade probiótica das linhagens estudadas. Os oligossacarídeos utilizados no estudo foram o galactooligossacarídeo (GOS) sintetizado pela β -galactosidase de *Scopulariopsis sp.*, frutooligossacarídeo (FOS-Orafti) e extrato bruto de Yacon. Avaliou-se o efeito bifidogênico de diferentes concentrações de GOS, FOS e Yacon utilizando as culturas probióticas e sua capacidade de acidificação do meio. Foi avaliado o perfil hidrofóbico e ácido da membrana celular dos probióticos usando meio enriquecido com GOS, FOS e controle meio MRS (Man Rogosa e Sharpe) sem fonte de dextrose; pelo método MATH (aderência microbiana de hidrocarbonetos). Realizou-se também a produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos (EPS) por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meios enriquecidos com FOS e GOS, a quantificação foi pelo método fenol-sulfúrico seguida de leitura de absorbância a 490nm, os resultados foram submetidos a uma curva padrão de glicose. Verificou-se ainda o antagonismo das linhagens probióticas cultivadas em meios suplementados com GOS, FOS, Yacon, MRS sem fonte de dextrose e controle MRS adicionado de NaOH, sobre linhagens patogênicas; o antagonismo foi avaliado através do método de difusão em ágar. Avaliou também a capacidade de produção de ácido láctico. Na avaliação bifidogênica os resultados revelaram que os substratos estimularam o metabolismo dos probióticos estudados. A melhor atividade para as linhagem de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) foi com o substrato GOS com atividade de 11,56 LogUFC (na concentração de 200mg de GOS, em 12 horas de incubação), e para e *Bifidobacterium animalis* (Bb12) foi com o substrato FOS com atividade de 11,3 LogUFC (na concentração de 100mg FOS, em 12 horas de incubação), na medida que se aumentou a concentração dos substratos,

houve a redução da atividade bifidogênica. Os resultados revelaram que os prebióticos GOS e FOS estimularam o perfil de adesão e acidez da membrana celular das linhagens probióticas estudadas, quando comparado com o controle meio MRS sem fonte de dextrose. Quanto à produção de EPS, o maior valor (13,53 µg.mL) foi obtido após 48 horas de cultivo em caldo MRS suplementado com GOS (25% v/v), enquanto que o FOS (25% v/v) também estimulou a produção (7,68 µg.mL) em 12 horas, seguida da queda de produção após este período. Verificou-se que os oligossacarídeos estimularam a ação antagônica dos probióticos sobre os micro-organismos patogênicos, e que esta inibição do crescimento pode estar ligada com a produção de ácidos pelos probióticos em conjunto com os oligossacarídeos. Em síntese, os resultados revelaram que os oligossacarídeos estimularam o potencial probiótico das linhagens estudadas.

ABSTRACT

Several studies have been conducted with oligosaccharides in general and also with probiotics, or combination of them, due to factors involving the combined benefits they can add to the health of consumers. This research aimed to evaluate *in vitro* the behavior of symbiotic probiotic strains *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) and *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), on substrates enriched with oligosaccharides in the case to assess whether the oligosaccharides intensified the ability of probiotic strains studied. The oligosaccharides used in this study were synthesized by the galactooligosaccharide β -galactosidase *Scopulariopsis* sp., fructooligosaccharide and crude extract of yacon. We evaluated the bifidogenic effect of different concentrations of GOS, FOS and Yacon using probiotic cultures and their ability to acidification of the medium. Was evaluated the profile acid and hydrophobic cellular membrane of probiotics using medium supplemented with GOS, FOS and control MRS medium without added dextrose; MATH method (microbial adherence to hydrocarbons). Was also conducted production, extraction and quantification of exopolysaccharides (EPS) by *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) media supplemented with FOS and GOS, quantification was by the phenol-sulfuric method followed by absorbance reading at 490nm, the results were subjected to a standard curve of glucose. It was further antagonism of probiotic strains grown in media supplemented with GOS, FOS, yacon, MRS without dextrose and source control MRS added NaOH on pathogenic strains; antagonism was assessed by the agar diffusion method; also evaluated the ability to produce lactic acid. In evaluating the results revealed that bifidogenic substrates stimulated metabolism studied probiotics, the best activity for the strain of *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) was the substrate with GOS activity of 11.56 LogUFC (200mg in 12 hours incubation), and for and *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) was with the FOS substrate with activity of 11.3 LogUFC (100mg in 12 hours incubation), as it increased the concentration of the substrates decreased the activity of microorganisms. The results revealed that prebiotic GOS and FOS stimulated acid profile of adhesion and cell membrane of probiotic strains studied, as compared to the MRS control medium without added dextrose. As for the highest production of EPS production (13.53 μ g.ml) was after 48 hours of culture in MRS broth

supplemented with GOS, while also stimulated FOS production (7.68 µg.ml) for 12 hours followed by production decrease thereafter. It was found that the oligosaccharides stimulated antagonistic action of probiotics on pathogenic microorganisms and that this growth inhibition is connected with acid production by probiotics together with the oligosaccharides. In summary, the results revealed that the oligosaccharides stimulated the potential probiotic strains studied.

OBJETIVOS

- Avaliar o comportamento simbiótico *in vitro* das linhagens probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), em substratos enriquecidos com oligossacarídeos, e a influência no potencial probiótico das linhagens bacterianas estudadas.
- Investigar o efeito bifidogênico de diferentes concentrações dos oligossacarídeos GOS, FOS e Yacon sobre as culturas de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb-12).
- Avaliar a produção de acidez nestes substratos.
- Analisar a adesão das linhagens probióticas cultivadas em meios enriquecidos com GOS e FOS; através do perfil de hidrofobicidade e características ácido-básicas da parede celular.
- Produzir, extrair e quantificar exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio enriquecido com GOS e FOS.
- Avaliar a capacidade dos oligossacarídeos GOS, FOS e Yacon em potencializar o efeito antagônico das linhagens probióticas sobre micro-organismos patogênicos, e a influência dos ácidos formados durante a fermentação na inibição do crescimento dos patogênicos.

INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos funcionais podem ser definidos como componente de um alimento que oferecem benefícios para a saúde, além do valor nutritivo. Entretanto estes alimentos podem ser nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados ou até mesmo alimentos processados e derivados de plantas (ANJO, 2004; MORAES e COLLA, 2006).

Os oligossacarídeos são considerados prebióticos, são nutrientes que se assemelham as fibras não-digeríveis; proporcionam benefícios a saúde humana através da alteração da composição ou do metabolismo da microbiota intestinal, possuem também efeito imunomodulador (ROOBERFROID, 2007).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos, que uma vez administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006). Os probióticos presentes no cólon competem com os patógenos pelos nutrientes existentes, e também podem aderir à mucosa, impedindo a colonização de micro-organismos potencialmente patogênicos (CALLEYA, 2010).

A combinação de micro-organismos probióticos e oligossacarídeos são caracterizados como uma condição de simbiose, ou seja, alimentos que contém estas substâncias são considerados alimentos funcionais simbióticos. A presença de oligossacarídeos potencializa a ação dos micro-organismos probióticos, estes acabam por fermentar estas fibras não-digeríveis, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, e outros metabólitos que podem ser benéficos ao ser humano.

Os mecanismos de ação que envolve este perfil simbiótico ainda não são bem definidos, estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de compreender melhor estas ações.

Desta maneira este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento simbiótico de duas linhagens de bactérias probióticas (*Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*) com grande aplicação nas pesquisas e indústria de alimentos. Avaliar ainda a influência de oligossacarídeos no comportamento simbiótico destas linhagens.

CAPÍTULO I

COMPORTAMENTO SIMBIÓTICO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS NA PRESENÇA DE OLIGOSSACARÍDEOS: UMA REVISÃO

RESUMO

A microbiota intestinal humana exerce papel importante na manutenção da saúde e no auxílio do tratamento de doenças. Uma dieta contendo probióticos e oligossacarídeos resultam em uma condição de simbiose, garantindo benefícios ao hospedeiro. Os probióticos são micro-organismos que devem estar vivos e viáveis nos alimentos, e que causam benefícios a saúde. Os oligossacarídeos também são conhecidos como prebióticos; são carboidratos não-digeríveis, que ocorrem de forma natural nos vegetais ou podem ser sintetizados; estimulam seletivamente as bactérias desejáveis no colón. O presente artigo trata do estudo do comportamento dos micro-organismos probióticos na presença de oligossacarídeos, ou seja, o comportamento simbiótico; relata os mecanismos de ação dos probióticos sobre os patógenos intestinais e ainda a formação de exopolissacarídeos (EPS), os conceitos atuais em que os EPS podem ser considerados alimentos funcionais e quais as principais bactérias produtoras destes EPS. Outros aspectos também como antagonismo e conceitos do tema são discutidos.

Palavras-chave: Oligossacarídeos, probióticos, comportamento simbiótico.

ABSTRACT

The human intestinal microbiol plays an important role in maintaining health and aid in the treatment of diseases. A diet containing probiotic and oligosaccharides result in a condition symbiosis, providing benefits to the host. Probiotics are micro-organisms to be alive and viable in foods, and ensure that health benefits. The oligosaccharides are also known as prebiotics, are non-digestible carbohydrates that occur naturally in plants or can be synthesized; selectively stimulate desirable bacteria in the colon. This paper deals with the study of the behavior of probiotic microorganisms in the presence of oligosaccharides, ie the symbiotic behavior, reports the mechanisms of action of probiotics on intestinal pathogens and also the formation of exopolysaccharides (EPS), the current concepts that the EPS can be considered functional foods and what are the main producers of these bacteria EPS. Other aspects also as antagonism and concepts of the subject are discussed.

Key-words: oligosaccharides, probiotic, symbiotic behavior.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Probióticos

De acordo com Saad (2006), o conceito de probiótico origina-se do grego e significa “a favor da vida”. São micro-organismos vivos e devem estar viáveis no produto, não podem ser patogênicos e devem contribuir de forma benéfica para microbiota do hospedeiro. Pereira *et al.*, (2003) define probiótico como sendo suplementos alimentares contendo micro-organismos vivos que ajudam a estabelecer o equilíbrio microbiano intestinal.

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas como parte integrante de alimentos, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (WHO, 2012).

O consumo de probióticos influencia de forma benéfica a microbiota intestinal humana através de fatores como efeitos antagônicos 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.

As espécies de bactérias mais utilizadas como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. lactis*, *L. johonsii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *Bacillus toyoi*, *B. subtilis*, *Bifidobacterium spp*, *Bifidobacterium animalis*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *Streptococcus thermophilus*, entre outras (SANTOS *et al.*, 2003).

O uso de probióticos apresenta uma longa história, e atualmente se adequam nos parâmetros de segurança para alimentos destinados a seres humanos. As estirpes de bactérias lácticas usadas em alimentos não podem ser patogênicas, virulentas e toxigênicas. Muitos lactobacilos e bifidobactérias são geralmente reconhecidos como micro-organismos seguros “*Generally Recognized As Safe*” (GRAS) para utilização em alimentos. Pesquisas com animais foram conduzidas no sentido de investigar a toxicidade aguda pelos probióticos; não foram observados efeitos adversos na sua saúde, nem quaisquer alterações bioquímicas, hematológicas, histológicas (mucosa intestinal) ou alterações da incidência de translocação bacteriana (DEVON, 2009).

Os micro-organismos probióticos mais utilizados fazem parte do grupo das bactérias lácticas. São bactérias Gram-positivas, anaeróbicas, microaerófilas, catalase negativa, com morfologia de cocos ou bacilos (PEREIRA *et al.*, 2003). O consumo de produtos contendo bactérias lácticas estimulam os movimentos peristálticos do intestino, ampliam a absorção de nutrientes, controlam as infecções intestinais e favorecem o desenvolvimento de micro-organismos resistentes a patógenos (THAMER e PENNA, 2006).

1.2. Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos são polissacarídeos, formados pela ligação de monossacarídeos, através de ligações glicosídicas originando compostos de alta massa molecular, com propriedades físico-químicas e biológicas peculiares (SUTHERLAND, 1998).

Segundo Passos e Park (2003), estes oligossacarídeos são semelhantes à fibra alimentar e são parcialmente digeridos por seres humanos, e as porções não digeríveis servem como alimentos para as bactérias que fazem parte da microbiota natural, tais como a bifidobactérias e lactobacilos.

De forma geral, os oligossacarídeos não-digeríveis são altamente fermentáveis, e alguns possuem as chamadas propriedades prebióticas. Um dos prebióticos mais conhecidos são os frutanos, os quais incluem os frutooligossacarídeos ou oligofrutoses, obtidos pela hidrólise enzimática da inulina de ocorrência natural, e seus análogos sintéticos obtidos por síntese enzimática (MCCLEARY e BROWN, 2004).

Atualmente há um grande número de oligossacarídeos não-digeríveis processados e sintéticos, entre eles, os galactooligossacarídeos que podem ser produzidos a partir da lactose pela atividade de transgalactosilação da enzima β -galactosidase. Esta enzima pertence à classe das hidrolases, muito usada na indústria de laticínios para hidrolisar a lactose, liberando glicose e galactose, e diminuir a concentração de lactose nesses alimentos (PESSELA *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm sido publicados nos últimos anos sobre os efeitos dos oligossacarídeos (MATSUMOTO *et al.*, 1993; PLAYNE e CRITTENDEN, 1996; TANAKA e MATSUMOTO, 1998; SAKO *et al.*, 1999; SCHOTERMAN, 2001; PLAYNE, 2002; MEYER e TUNGLAND, 2001; NAKAKUKI, 2002).

Assim, tais substâncias representam novas fontes de fibra alimentar, uma vez, que se enquadram nos critérios estabelecidos por definições de fibra alimentar.

1.3. Mecanismos de ação que caracterizam a simbiose entre probióticos e oligossacarídeos

Os micro-organismos probióticos agem benéficamente na microbiota intestinal, contribuindo para manter a simbiose. Os probióticos são empregados para fortalecer ou recuperar esta simbiose, quando a mesma for alterada por fatores oponentes como: estresse, tratamentos com antibióticos, presença de patógenos, mudanças nos hábitos alimentares, entre outros (CARDOSO e OLIVEIRA, 2008).

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que os probióticos atuam sobre o sistema imune, reforçando a barreira da mucosa, também por exclusão competitiva e disputa por sítios de adesão na mucosa intestinal (POPPI, 2005).

Para Cardoso e Oliveira (2008), um dos mecanismos de ação é a competição física no trato intestinal. Onde os micro-organismos probióticos disputam com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, coibindo sua ação momentânea.

Os probióticos podem também eliminar os patógenos através da síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio, ou até mesmo agir sobre o metabolismo celular, diminuindo a concentração de amônia no organismo, e liberando enzimas como a lactase (COPPOLA e TURNES, 2004).

Estudos revelam que as bactérias probióticas, podem manter a integridade da mucosa do intestino e amenizar os efeitos de muitas doenças intestinais; como a diarreia decorrente do uso prologado de antibióticos e as doenças inflamatórias intestinais (ATOBE, 2003).

A simbiose entre bactérias probióticas e oligossacarídeos, refere-se ao resultado benéfico ao organismo humano decorrente da combinação destes compostos na alimentação. Os oligossacarídeos presentes na dieta melhoram a sobrevivência e implantação dos probióticos no trato-gastrointestinal, favorecem o

crescimento seletivo e a atividade metabólica destas bactérias (O'SULLIVAN, 2001).

A interação entre probióticos e os oligossacarídeos *in vivo* é favorecida pela adaptação do micro-organismo ao substrato, anterior ao consumo; resultando em uma vantagem competitiva para o probiótico. O consumo de probióticos com oligossacarídeos podem aumentar os efeitos benéficos de cada um deles (BIELECKA *et al.*, 2002; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

As bactérias probióticas se aderem à mucosa intestinal, impedindo a possível fixação de micro-organismos patogênicos. A capacidade de aderência já foi mostrada para as maiores das cepas de bifidobactérias e lactobacilos (TRABULSI e SAMPAIO, 2000). O crescimento dessas cepas probióticas é estimulado com o consumo de oligossacarídeos, resultando em simbiose, que por sua vez, previnem a colonização de bactérias patogênicas (LIM *et al.*, 1993).

Shoaf *et al.* (2006) analisou o efeito antiadesivo do galactooligossacarídeo em relação a *E. Coli enteropatogênica* (EPEC), o estudo revelou a capacidade do GOS em potencializar este efeito contra o micro-organismo patogênico.

A incorporação de oligossacarídeos na dieta intensifica a viabilidade da adesão de bactérias benéficas no trato gastrointestinal, alterando a composição de sua microbiota. Ao mesmo tempo, bactérias patogênicas incluindo *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e outras são inibidas, concomitantemente (YAMASHITA *et al.*, 1984, WANG e GIBSON, 1993, SPIEGEL *et al.*, 1994, GIBSON e ROBERFROID, 1995; PASSOS e PARK, 2003).

À medida que bactérias probióticas e oligossacarídeos são combinados na alimentação, a condição de simbiose se torna permanente impossibilitando o estabelecimento de bactérias como a *Escherichia coli*, *Clostridium sp*, *Salmonella sp*, entre outros, aumentando o número de bactérias benéficas produtoras de ácidos orgânicos (OYOFO *et al.*, 1989; ITO *et al.*, 2004; FLEMMING e FREITAS, 2005).

1.4. Antagonismo da condição de simbiose sobre os patógenos intestinais

Barbosa *et al.* (2011) classificam a microbiota que habita a pele e as mucosas de pessoas saudáveis como: microbiota transitória, que apresenta pouca importância para o hospedeiro, e a microbiota residente normal. No entanto se a microbiota residente for perturbada, os microrganismos transitórios podem colonizar e proliferar, rompendo a homeostasia podendo instalar um quadro patológico.

A microbiota intestinal é um ecossistema em que convivem microrganismos benéficos e patogênicos (MITSUOKA, 1990). Em condições normais o equilíbrio entre os micro-organismos segue normalmente. Fatores como o uso de antibióticos, estresse fisiológico, consumo excessivo de açúcar e proteínas, causam o rompimento deste equilíbrio, o que pode acarretar no crescimento desordenado de bactérias patogênicas, produzindo distúrbios intestinais como diarreia, colites e flatulência. Por outro lado, os próprios micro-organismos da microbiota normal podem provocar doenças em certas condições, como o caso de pacientes em terapia enteral ou parenteral, pode-se instalar um quadro de translocação bacteriana e estes micro-organismos tornarem-se danosos à saúde (NICOLI E VIEIRA, 2000).

O sistema imunológico protege o trato-gastrointestinal contra microbiota normal e também de outros patógenos, estudos têm sido realizados a fim de identificar como o sistema imune distingue entre as duas formas de microbiota em residente e patogênica.

Em estudo realizado por Nicaise (1999) revelou que a microbiota intestinal pode modular a medula óssea e a produção de citocinas de macrófagos do baço em uma forma diferencial. Didierlaurent *et al.* (2002) também estudaram como o organismo faz esta diferenciação, e mostraram que a imunidade inata da mucosa ativa mecanismos específicos para reconhecer os patógenos os chamados receptores moleculares padrões (PAMP's). Já a microbiota residente é reconhecida por meio dos receptores moleculares padrões (MAMP's). As células epiteliais monocíticas são responsáveis por fazer esta diferenciação, mas ainda não se sabe como os receptores (MAMP's) não desencadeiam respostas

inflamatórias em condições normais de saúde; pesquisas sobre este tema estão sendo realizadas.

Todos estes processos de reconhecimento e ação dos micro-organismos da microbiota intestinal na exclusão de patogênicos são potencializados na presença de oligossacarídeos, ou seja, na presença de simbiose. Há evidências crescentes de que as bactérias probióticas como lactobacilos e bifidobactérias, que habitam o trato-gastrointestinal, podem desenvolver atividade antagônica e antimicrobiana; participando do sistema de defesa do hospedeiro.

A avaliação dos efeitos dos probióticos sobre a inibição de patógenos é muito importante, uma vez que as bactérias patogênicas são agentes causadores de doenças do trato gastrointestinal. As bactérias lácticas apresentam efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias patogênicas. A atividade antagônica é resultado de competição por nutrientes, produção de ácido láctico e ácido acético, produção de bacteriocinas, aminoácidos e outros metabólitos; resultando na inibição do crescimento e não permacência do patógeno no trato-gastrointestinal do hospedeiro (SERVIN e COCONIER, 2003; KALANTZOULOS, 1997; JIN *et al.*, 1996).

1.5. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas

As bactérias probióticas possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), estes são polímeros de carboidratos com alto peso molecular. Os exopolissacarídeos são produzidos durante o processo de fermentação do substrato, e secretados ao meio. Os EPS possuem a capacidade de aumentar a viscosidade do meio, característica desejável em produtos lácteos fermentados (CERNING *et al.*, 1995).

Os EPS são produzidos e excretados ao meio onde se encontram, a constituição química dos EPS é estritamente ligada ao meio em que ele se encontra (DE VUYST e DEGEEST, 1999).

Pesquisas atuais mostram que os EPS podem ser considerados alimentos funcionais atuando na saúde humana (SENGUL *et al.*, 2006).

Estudos apontam que a condição de simbiose intestinal promovida pela alimentação, contendo oligossacarídeos e micro-organismos probióticos, favorece a produção de EPS no lúmen intestinal (SENGUL *et al.*, 2006).

Parte das bactérias lácticas (BAL) é considerada probióticas e são utilizadas na produção de alimentos. Elas possuem a capacidade de hidrolisar e converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor, mas também podem contribuir para aumentar a textura e viscosidade de produtos fermentados por meio da síntese de EPS (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2002). Os EPS's são produzidos como compostos da parede celular ou ainda como metabólitos primários pelas bactérias lácticas (KIM *et al.*, 2009). Inúmeros exopolissacarídeos com diferentes composições, tamanhos e estruturas são sintetizados por essas bactérias (DE VUYST e DEGEEST, 1994).

A capacidade de produzir EPS é generalizada entre os lactobacilos incluindo *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* e também a microbiota propiônica do leite (CERNING *et al.*, 1995). Várias cepas de bactérias lácticas são produtoras destes biopolímeros, que apresentam interessantes propriedades tecnológicas e funcionais (DE VUYST e DEGEEST, 1999).

A composição dos polissacarídeos produzidos por bactérias são, geralmente, compostas por galactose e glicose ou galactose, ramnose e pentose (CERNING, 1994). Os exopolissacarídeos produzidos pelas BAL são classificados em homopolissacarídeos sintetizados por *Leuconostoc* e *Streptococcus*, e os heteropolissacarídeos pelas bactérias mesófilicas, termofílicas como *Lactobacillus* e *Lactococcus* (SUTHERLAND, 1998).

1.6 Propriedades funcionais dos exopolissacarídeos

Os EPS's podem contribuir com a saúde humana, pois são considerados alimentos funcionais, devido a sua fração não digerível, atuam como prebióticos. Possuem ação antitumoral, antimicrobiana, imunomoduladores, redução do colesterol e outros benefícios à saúde (NAKAJIMA *et al.*, 1992; KIM *et al.*, 2009; HOSONO *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2006; DEGEEST, DE VUYST e VANINGELGEM, 2001).

Há relatos do uso de exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido-láticas como prebióticos. A resistência à digestão pode ser uma característica

importante para o seu possível papel prebiótico, mas há poucos estudos sobre este tema. Looijestein *et al.* (2000) verificaram a resistência dos EPS à digestão, em um estudo onde ratos foram suplementados durante 2 semanas com EPS derivados de *L. lactis. subsp. Cremoris*. Os pesquisadores observaram índice de recuperação nas fezes de quase 100%, indicando que os EPS foram resistentes as condições extremas do trato-gastrointestinal.

A digestibilidade dos EPS também foi estudada por Ruijssearnas *et al.*, (2000), eles observaram a degradação de EPS produzidos por *S. thermophilus* por micro-organismos gastrointestinais, em contraste com EPS de *L. lactis spp.cremoris*, que não foram degradados; concluíram que susceptibilidade à degradação biológica está diretamente ligada com a estrutura primária dos EPS.

Os exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias probióticas possuem benefícios para a saúde humana (Figura 1) mediante efeitos hipocolesterolêmicos e prebiótico, imunomodulação e atividade anticarcinogênica (LIN e CHANG CHIEM, 2007).

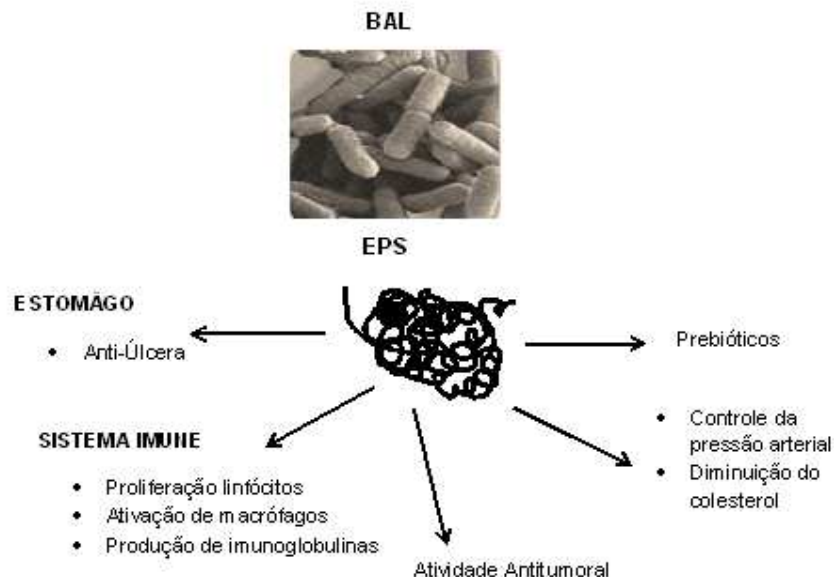


Figura 1: Propriedades funcionais dos EPS.

Fonte: Adaptado: Ruas-Madiedo *et al.*, 2002

Kim *et al.*, (2009) verificaram a atividade anticarcinogênica de EPS produzidos por *Lactobacillus acidophilus*, em cultura de células HT-29, usando análises de proteoma. Os resultados revelaram que os EPS atuaram na morfologia das células, diminuindo sua tumorigenicidade.

Está bem estabelecido que os EPS desempenhem papel imune importante contra a invasão e adesão bacteriana (RUAS-MADIEDO *et al.*, 2005). Um estudo em ratos com colite experimental demonstrou que os EPS produzidos por bactérias probióticas, reduziram os níveis inflamatórios e atenuou os sintomas (SENGUL *et al.*, 2006).

Ciszek-Lenda *et al.*, (2011) em análises preliminares usaram EPS bruto produzido por *L.rhamnosus*, o qual também reduziu o desenvolvimento da artrite induzida por colágeno em ratos. No estudo *in vitro* de Ciszek-Lenda *et al.*, (2011) demonstraram que os EPS podem estimular a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos. Pouco ainda se sabe sobre os potenciais imunes dos EPS derivados dos *Lactobacillus*.

Para compreender a importância da produção dos biopolímeros (EPS) pelas bactérias ácido-láticas, Costerton *et al.*, (1987) estudaram o processo de adesão bacteriana e demonstraram que os EPS capsulares podem promover a aderência das bactérias na mucosa intestinal, facilitando a colonização na parede intestinal, favorecendo um ambiente de exclusão competitiva.

Kim *et. al.*, (2009) estudaram a redução de biofilme por *Escherichia coli enterohemorrhagica* O157: H7 em culturas de células em um modelo de superfície com poliestireno e polivinil, aplicando EPS liberados por *Lactobacillus acidophilus* A4. A pesquisa revelou um decréscimo de 87% a 94% da formação de biofilme. Os EPS são componentes chaves da matriz do biofilme de muitas bactérias formadoras de biofilme, incluindo os *Lactobacillus* (WATNICK e KOLTER, 2000; LAWS e MARSHALL, 2001; CISZEK-LENDA 2011).

No entanto mais estudos sobre o efeito que os EPS desempenham sobre a adesão bacteriana, e os benefícios à saúde humana são necessários.

2. CONCLUSÃO

A simbiose intestinal saudável e microbiologicamente equilibrada resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, caracterizando melhor qualidade de vida.

O efeito dos probióticos e dos oligossacarídeos pode ser potencializado, através da sua combinação, dando origem aos alimentos funcionais simbióticos.

Os mecanismos que envolvem esta combinação ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, mais estudos devem ser desenvolvidos, para melhor compreensão destes mecanismos que ocorrem na simbiose. Como por exemplo, a estimulação à produção de exopolissacarídeos, que atualmente os estudos apontam como sendo um alimento funcional, e que como os oligossacarídeos podem ser sintetizados e aplicados em outros estudos, a fim de comprovar sua eficácia.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, 2004, v.3(2): 145-154.

ATOBE, J. H. **Efeito do leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* Shirota na microbiota intestinal de crianças sob terapia antimicrobiana**. 2003.127f. Tese (Doutorado em Farmácia- Análises Clínicas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo: USP. 2003.

BARBOSA, F.H., BARBOSA. L.P.J.L., NICOLI. J.R. Avaliação da capacidade probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* da microbiota fecal de seres humanos contra *Clostridium perfringes*. **Estação Científica UNIVAP**, Macapá, v.1, n.1, p 75-88, 2011.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n. 2/3, p. 125-131, 2002.

CARDOSO, A. L.; OLIVEIRA, G. G. de. Alimentos Funcionais. **Jornal Eletrônico**. Florianópolis/SC, n.5, p.1-6, jun., 2008.

CALLEYA, R.N.A. **A Ingestão De Probióticos E Prebióticos Na Prevenção e Tratamento De Doenças Intestinais: Uma Revisão Integrativa Na Área Da Nutrição**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição)- Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, 2010.

CERNING, J. In: ROISSANT, H. e LUQUEST, F. M. **Bactéries Lactiques, Aspects Fondamentaux et Technologiques**, Ed Loriga, 1, 309-310, 1994.

CISZEK-LENDIA, M. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. **Centr. Eur. J. Immunol.**, n.36, p.51–55, 2011.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e Resposta Imune. **Ciência Rural, Santa Maria** v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

COSTERTON, J. W., *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

CRITTENDEN, R. G.; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v. 71, p. 353-361, 1996.

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

DEGEEST, B., VANINGELGEM, F., DE VUYST, L. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, n.9, p.747-757, 2001.

DEVON, D. L. Breaking out of the capsule: recente innovations in probiotic applications. **Ganeden Biotech, Inc.** v.1, p.1-5, 2009.

DIDIERLAURENT, A., SIRARD, J. C., KRAEHENBUHL, J. P., NEUTRA, M. R. How the gut senses its content. **Cell. Microbiol**, v.4, p.61–72, 2002.

FLEMMING, J. S., FREITAS, R. J. S. Avaliação do efeito de prebióticos, 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.

GIBSON, G. R., ROBERFORID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota, introducing the connect of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, p.140-1412, 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 109-116, 2002.

HOSONO, A., LEE, J., AMETANI, A., NATSUME, M., HIRAYAMA, M., ADACHI, T., KAMINOAWA, S. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. **Biosci. Biotech. Biochem**, v.61, p.312–316, 1997.

ITO, N. M. K., MIAJI, C.I., LIMA, A. E., OKABAHASHI, S. Saúde gastrointestinal, manejo e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. **Produção de frangos de corte**, 2004, Campinas. Anais...Campinas: FACTA, p.206-260. 2004.

JIN, L. Z., HO, Y. W. ABDULLAH, N., ALI, M. A., JALALUDIN, S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p. 67-71, 1996.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**. v.3, p.15-190, 1997.

KIM, J. U., KIM, Y., HAN, K. S., OH, S., WHANG, K. Y., KIM, J. N., KIM, S.H. Function of cell bound and released exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.16, p.939–945, 2006.

KIM, Y., OH, S., KIM, S. H. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, p.324–329, 2009.

LAWS, A., GU, Y., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.597–625, 2001

LIM, K. S., HUH, C.S., BAEK, Y.J. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2168-2174, 1993.

LIN, T. Y., CHANG CHIEN, M. F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1419-1423, 2007.

LOOIJESTEIJN, P. J., VAN CASTEREN, W. H. M., TUINIER, R., DOESWIJK-VORAGEN, C. H. L., HUGENHOLTZ, J. Influence of different substrate limitations on the yield, composition and molecular mass of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* in continuous culture. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.116–122, 2000.

MATSUMOTO, K., KOBAYASHI, Y., UHEYAMA, S., WATANABE, T., TANAKA, R., KAN, T., KURODA, A., SUMIHARA, Y. Galactooligosaccharides. In: Oligosaccharides. Production, Properties, and Applications (T. Nakakuki, ed.), **Japanese Technology Reviews**, v.3, n.2, p.90–106, **Gordon and Breach, Science Publishers**, Basel, 1993.

MCCLEARY, D. B. V., BROWN, I. L. Novel Dietary Fibers: The Importance of Carbohydrates in the Diet. **J AOAC. Int**, v.87, p. 681-796, 2004.

MEYER, D., TUNGLAND, B. Non-digestible oligosaccharides: their physiological effects and health implications. In: Advanced Dietary Fibre Technology (B. V. MCCLEARY, L. PROSKY, eds.) p. 455– 470, **Blackwell Publishing**, Oxford, UK. 2001.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **J. Ind. Microbiol.**, v. 6, p. 263-268, 1990.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutrafarmacêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista eletrônica de farmácia**, v.3, p.109-122, 2006.

NAKAJIMA, H., SUZUKI, Y., KAIZU, H., HIROTA, T. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. **J. Food. Sci.**, v.57, p.1327-1329, 1992.

NAKAKUKI, T. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. **Pure Appl. Chem.**, v.74, p.1245–1251, 2002.

NICAISE, P., *et. al.* The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. **Eur. Cytokine Netw**, v.10, p.365–372, 1999.

NICOLE, J., VIEIRA, L. Probiótico, prebiótico e simbiótico, ecossistema digestivo. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 163, p. 34-38, 2000.

O'SULLIVAN, G.C. Probiotics. **British Journal of Surgery**, v.88, p.161-162, 2001.

OYOFO, B. A., DELOACH, J. R., CORRIER, D. E. Effect of carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization in broilers chickens. **Avian Diseases**, v.33, p.531-534, 1989.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.2, p. 385-390, 2003.

PEREIRA, D. I. A.; McCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 4743–4752, 2003.

PESSELA, B. C.; MATEO, C.; FUENTES, M.; VIAN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sephabeads supports decreases product inhibition: complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 33, n. 2-3, p. 199-205, 2003.

PLAYNE, M. J. Galacto-oligosaccharides. In: **Encyclopaedia of Dairy Sciences** (H. ROGINSKI, J.W. FUQUAY, P.F. FOX, eds.), p.1151–1158, Academic Press, San Diego, CA, USA, 2002.

POPPI, L. B. Nota prévia: Avaliação do efeito Antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia Coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 113-119, abr./jun. 2008

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, v.137, n.3, p.830, Mar., 2007.

RUAS-MADIEDO, P., DE LOS REYES-GAVILA'N, C. G. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3, 2005.

RUAS-MADIEDO, P., HUGENHOLTZ, J., ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, n.23, p.163–171, 2002.

RUIJSSENAARS, H. J., STINGELE, F., HARTMANS, S. Biodegradability off food associated extracellular polysaccharide. **Current Microbiology**, v.40, p.194–199, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.42, n.1, p.1-16, jan/mar, 2006.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galactooligosaccharides. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 69-80, 1999.

SANTOS, A., SAN MAURO, M., SANCHEZ, A., TORRES, J.M., MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus spp.* isolated from kefir. **Syst. Appl. Microbiol**, v.26, p.434–437, 2003.

SCHOTERMAN, H. C. Galactooligosaccharides: properties and health aspects. In: **Advanced Dietary Fibre Technology** (D. B. V. MCCLEARY, L. PROSKY, eds.), p. 494– 502, Blackwell Publishing, UK, 2001.

ŞENGÜL, N., ASLIM, B., UÇAR, G.; YÜCEL, N., BOZKURT, H., SAKAOĞULLARI, Z., ATALAY, F. Effects of exopolysaccharide-producing probiotic strains on experimental colitis in rats. **Dis. Colon. Rect**, v.49, p.250-258, 2006.

SERVIN, A.L., COCONIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research**, v.17, p.741-754, 2003.

SHOAF, K., MULVEY, G.L., ARMSTRONG, G.D., HUTKINS, R.W.. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infect. Immun.**, v.74, p.6920–6928, 2006.

SPIEGEL, J. E. *et. al.* Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Techn**, Boston, v.48, p.85-89, 1994.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*, London, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

TANAKA, R., MATSUMOTO, K. Recent Progress on Prebiotics in Japan, Including Galactooligosaccharides. **Bulletin 336, International Dairy Federation**, Brussels, p. 21–27, 1998

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de Bebidas Lácteas Funcionais Fermentadas por Probióticos e Acrescidas de Prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, 26(3): 589-595, jul.-set. 2006.

TRABULSI, L. R., SAMPAIO, M. M. S. C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v.1, Brasil: Nestlé Ltda., 2000, p. 3-11.

WANG, X., GIBSON, G.R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **J. Appl. Bacteriol**, Cambridge, v.74, n.4, p.373–380, 1993.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol**, v.182, p.2675–2679, 2000.

WHO. Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, October (2001). Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf, acesso em 22 de outubro de 2012.

YAMASHITA, K., KAWAI, K., ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharides on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, Fukuoka, v.4, p.961- 966, 1984.

CAPÍTULO II

ESTUDO DO EFEITO DE OLIGOSSACARÍDEOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES NA ATIVIDADE BIFIDOGÊNICA DE LINHAGENS PROBIÓTICAS

RESUMO

Os oligossacarídeos são considerados prebióticos, pois atuam como as fibras, estimulando o crescimento de bactérias da microbiota intestinal. Os probióticos possuem a capacidade de hidrolisar os prebióticos, acidificando o meio devido à produção de ácidos. Isto pode levar a uma diminuição no número de bactérias patogênicas e diminuir a formação de metabólitos tóxicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade dos micro-organismos probióticos: *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb12) em metabolizar os oligossacarídeos GOS, FOS e Yacon (extrato bruto) em diferentes concentrações estimulando a atividade bifidogênica. O controle consistiu no meio MRS (Man, Rogosa e Sharpe) sem fonte de dextrose. O meio MRS (20mL) foi suplementado com (100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg) de GOS, FOS e Yacon; foi inoculado 2mL de cultura probiótica (em concentrações pré-determinadas) e incubados por 12 horas a 37°C em condições de anaerobiose; alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas para avaliar a atividade bifidogênica e a capacidade de acidificação do meio pelos micro-organismos. Os resultados revelaram que os substratos GOS e FOS estimularam o metabolismo dos probióticos estudados, e que o yacon foi menos eficaz se comparados com os demais. Na medida em que se aumentou a concentração dos substratos diminuiu o crescimento dos micro-organismos. Houve a acidificação do meio pelos micro-organismos probióticos. A pesquisa revelou que o aumento das concentrações de oligossacarídeos diminuíram as contagens de prebióticos, diminuindo a atividade bifidogênica.

Palavras-chave: oligossacarídeos, efeito bifidogênico, probióticos.

ABSTRACT

The oligosaccharides are considered prebiotics because they act as fibers, stimulating the growth of bacteria of the intestinal microbiota. Probiotics have the ability to hydrolyze prebiotics, acidifying the medium due to acid production. This can lead to a decrease in the number of pathogenic bacteria and reduce the formation of toxic metabolites. The aim of this study was to evaluate the ability of probiotic microorganisms: *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) and *Bifidobacterium animalis* (Bb12) metabolize oligosaccharides in GOS and FOS Yacon (crude extract) at different concentrations stimulating bifidogenic activity. The control consisted of medium MRS (Man, Rogosa and Sharpe) without dextrose source. The MRS medium (20 ml) was supplemented with (100mg, 200mg, 400mg and 500mg 300mg) of GOS and FOS Yacon; was inoculated 2mL probiotic culture (in pre-determined concentrations) and incubated for 12 hours at 37°C anaerobic conditions, aliquots were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours to evaluate the bifidogenic activity and the ability to acidification of the medium by micro-organisms. The results revealed that the GOS and FOS substrates stimulated the metabolism of probiotics studied, and that the yacon was less effective when compared with others. Increasing the concentration of oligosaccharides reduced the growth of micro-organisms. There acidification of the medium by probiotic micro-organisms. The results revealed that the GOS and FOS substrates stimulated the metabolism of probiotics studied, and that the yacon was less effective when compared with others. To the extent that increased concentration of the substrates decreased the growth of micro-organisms. There acidification of the medium by probiotic micro-organisms. The research revealed that increasing concentrations of oligosaccharides decreased counts of prebiotics, decreasing bifidogenic activity.

Key words: oligosaccharides, bifidogenic effect, probiotics.

1. INTRODUÇÃO

De acordo com Bourlioux *et al.*, (2003) o trato gastrointestinal (TGI) possui uma microbiota com mais de 500 espécies de bactérias. O cólon é o local com a maior concentração de bactérias, atingindo mais de 10^{11} a 10^{12} Unidades Formadoras de colônia (UFC).

Os probióticos são considerados micro-organismos benéficos, e constituem a microbiota do trato-gastrointestinal. Os probióticos podem fazer parte dos chamados alimentos funcionais, cujo principal alvo de ação, é a mucosa intestinal e a sua microbiota. Segundo Rolfe (2000) e Reid (2005) o probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo, que age de forma benéfica no seu receptor, por meio da melhoria do balanço microbiano intestinal.

Várias ações benéficas são atribuídas aos probióticos, principalmente as bifidobactérias e lactobacilos. Eles possuem propriedades, por exemplo, de melhora dos valores nutritivos e terapêuticos dos alimentos, de fortalecimento do sistema imunológico, de equilíbrio da microbiota intestinal, de auxílio no tratamento da intolerância a lactose, de uso na terapia nutricional, de exclusão dos micro-organismos patogênicos, entre outros benefícios (MATSUMOTO *et al.*, 2005; PELUSO *et al.*, 2007; TESHIMA, 2003).

Os oligossacarídeos são considerados prebióticos, fibras não-digeríveis que afetam de maneira benéfica o organismo, estimulando a seleção e o crescimento, e também a atividade de bactérias do cólon intestinal (HUEBNER, 2007; ROBERFROID, 2007). São altamente resistentes ao processo digestivo sendo que, as grandes variedades de ligações glicosídicas podem ser a razão desta resistência. Porém as moléculas dos oligossacarídeos no intestino delgado são hidrolisadas a pequenos oligômeros ou monômeros pelas bactérias da microbiota intestinal (TOMOMATSU, 1994; ROBERFROID, 2007).

Os oligossacarídeos possuem várias ações que lhes conferem o título de alimento funcional. Atualmente têm se estudado a ação dos oligossacarídeos na questão da redução da aderência de micro-organismos patogênicos, bem como os chamados efeitos bifidogênicos.

Estudos têm demonstrado que o uso de prebióticos potencializa a ação dos probióticos na exclusão dos micro-organismos patogênicos. A propriedade de

exclusão ou redução da aderência de enteropatógenos já foi demonstrada, sendo consequência do bloqueio de receptores que seriam utilizados pelo mesmo. A importância dessa propriedade é notável, pois contribui para o efeito protetor dos probióticos contra infecções intestinais (WALKER, 1998).

Os oligossacarídeos possuem efeitos bifidogênicos, porque agem como substratos para as bifidobactérias, estimulando a reprodução e metabolismo da microbiota intestinal benéfica (ROBERFROID, 2007). Os oligossacarídeos podem promover efeitos benéficos para o trato-gastrointestinal de humanos e animais, estimulando o crescimento e a seleção de membros da microbiota intestinal (SHOAF *et al.*, 2006). Pesquisas realizadas no Japão com adultos mostraram que o consumo de 2-5g de oligossacarídeos por dia é suficiente para obter efeito bifidogênico, sem desconfortos gástricos (ITO *et al.*, 1993; ISHIKAWA *et al.*, 1995).

Tanto os prebióticos quanto os probióticos possuem funções de grande importância para a saúde humana. Mas estes quando combinados potencializam estas funções benéficas, tornando-se assim um ótimo alimento funcional.

Os alimentos simbióticos são o resultado da combinação de culturas probióticas com ingredientes prebióticos, esta combinação deve propiciar a sobrevivência do micro-organismo no meio gástrico e desempenhar sua função no intestino (CAPRILES, SILVA e FISBERG, 2005).

O crescimento de bifidobactérias estimulado pelos prebióticos, acidifica o meio reduzindo o pH, decorrente da produção de ácidos, isto leva a uma diminuição no número de bactérias patogênicas, reduzindo a formação de metabólitos tóxicos (SANTOS *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi de avaliar a capacidade dos oligossacarídeos GOS, FOS e Yacon (extrato bruto) em diferentes concentrações, em estimular a atividade bifidogênica de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb12).

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Seleção dos oligossacarídeos

Os oligossacarídeos utilizados no estudo foram: Frutooligossacarídeos (BENEO-Orafti, Brasil), extrato bruto de yacon (Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP), e galactooligossacarídeo, sintetizado por β -galactosidase de

Scopulariops sp., produzido no Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP (SANTOS, 2010).

2.2. Reativação das linhagens probióticas

Foram utilizadas culturas lácticas comerciais (Christian Hansen Lab. Ind. e Com. Ltda) de bactérias lácticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05); em estudo realizado por Santos (2010) estas apresentaram um bom perfil bifidogênico.

Para reativação dos micro-organismos os mesmos foram inoculados, com o auxílio da alça de platina em caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e incubado a 37°C em jarra de anerbiose com reagente (Anaerocult, Merke) por um período de 24 horas. Após este período foi retirada uma alçada do líquido e estriada em uma placa de Petri contendo meio sólido ágar MRS. A incubação foi realizada a 37°C em condições de anaerobiose por um período de 24 horas. A coloração de Gram das colônias desenvolvidas foi realizada para verificar a pureza das culturas e observadas ao microscópio em objetiva de aumento de 100x, com ajuda de óleo de imersão.

2.3. Avaliação da atividade bifidogênica

Foram inoculadas 2mL das linhagens probióticas (em concentrações pré-determinadas; Tabela 1) em 20mL de caldo MRS suplementado com 100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg; de diferentes fontes de oligossacarídeos. Os grupos foram denominados assim de MRS+FOS (frutooligossacarídeos), MRS+YA (yacon) e MRS+GOS (galactooligossacarídeos). Os frascos foram incubados a 37 °C por 12 horas em condições de anaerobiose para então prosseguir com os próximos testes. Foi formulado o meio MRS sem fonte de dextrose como controle do experimento, ou seja, sem nenhuma fonte de carbono.

Para quantificação da população microbiana, empregou-se o método de diluição seriada. As amostras foram acrescentadas em sucessivas diluições e alíquotas de 1mL foram coletadas e plaqueadas em meio MRS pelo método *Pour Plate*. Foram incubadas a 37°C em condições anaeróbicas por 12 h.

A quantificação foi realizada através da contagem total, entre 30 e 300 colônias, e o resultado foi obtido através das médias das triplicatas de cada

amostra, com seu desvio padrão. Foram realizadas contagens nos períodos de incubação de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h.

Tabela 1: Contagem inicial das culturas probióticas para o experimento de bifidogenia. Quantidade expressa em 2 mL de cultura contida em meio MRS.

Cultura probiótica	Contagem de células UFC/mL
<i>Bifidobacterium animalis</i> (Bb-12)	7, 2
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA-05)	6,07

2.4. Avaliação da acidificação do meio

Durante o período de incubação foram analisadas os valores do potencial hidrogênionico (pH) do meio em potenciômetro (**Q400AS-QUIMIS, 2011**) calibrado com tampão a pH 4,0 e 7,0 (MENEZES, 2007).

2.5. Análise estatística

Os resultados das médias foram comparados pelo teste Tukey ($p < 0,05$), verificando se existe diferença entre as amostras, através do programa STATISTICA.

Os demais dados também foram tratados pelo programa STATISTICA e Microsoft Excel Stater 2010.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Reativação das linhagens probióticas

As linhagens de bactérias lácticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), após reativação em meio MRS, se mostraram metabolicamente ativas, fermentando o meio líquido, e no meio sólido formaram colônias típicas (Fig.1). Por meio da técnica de coloração de Gram foi possível verificar a morfologia das linhagens (Fig. 2).



Figura 1: Linhagens de bactérias ácido-láticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), reativação em meio MRS, em condições de anaerobiose 37°C/24 horas.

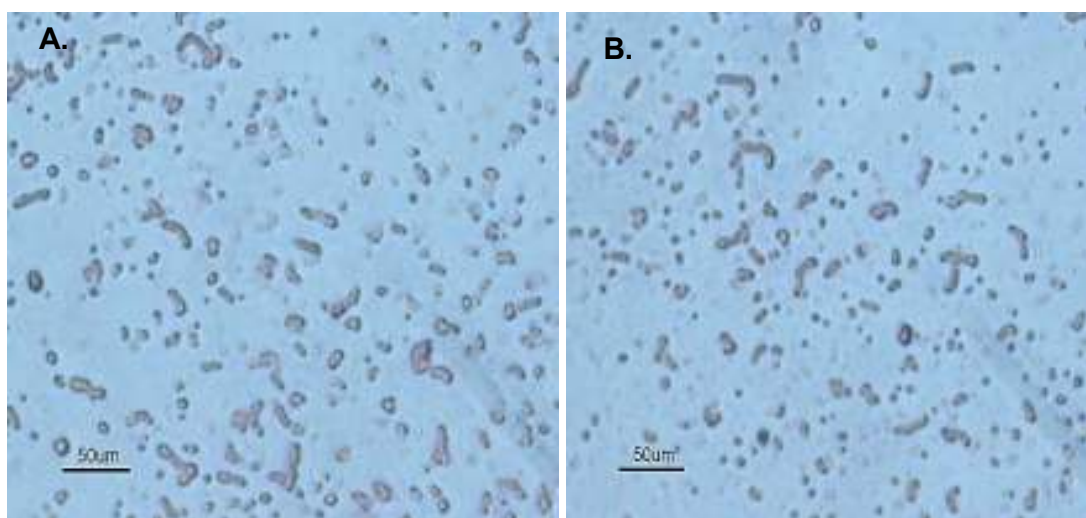


Figura 2: Linhagens de bactérias ácido-láticas **A.** *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e **B.** *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), reativação em meio MRS.

3.2. Avaliação da acidificação do meio

As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às extremas condições que o trato-gastrointestinal oferece, como o baixo pH do suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas; para que deste modo possam manter sua atividade metabólica e exercer seus efeitos benéficos ao hospedeiro (SAAD, 2006).

Os probióticos como as *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* possuem a capacidade de hidrolisar substratos poliméricos complexos, os quais geram gases (H_2 , CO_2 , CH_4) e ácidos orgânicos como: butiratos, propionatos e lactatos (MARCFARLANE, 2008; ROBERFROID, 2007), esta produção de ácidos graxos de cadeia curta acidifica o lúmen intestinal.

Em sistema *in vitro* é possível avaliar a produção de ácidos principalmente pela aferição do potencial hidrogênionico, e controlar as condições do meio. Na figura 3 e 4 estão dispostos os valores de pH resultantes da fermentação em 12 horas das linhagens de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) nos substratos MRS+FOS, MRS+YA e MRS+GOS a 37°C em condições de anaerobiose.

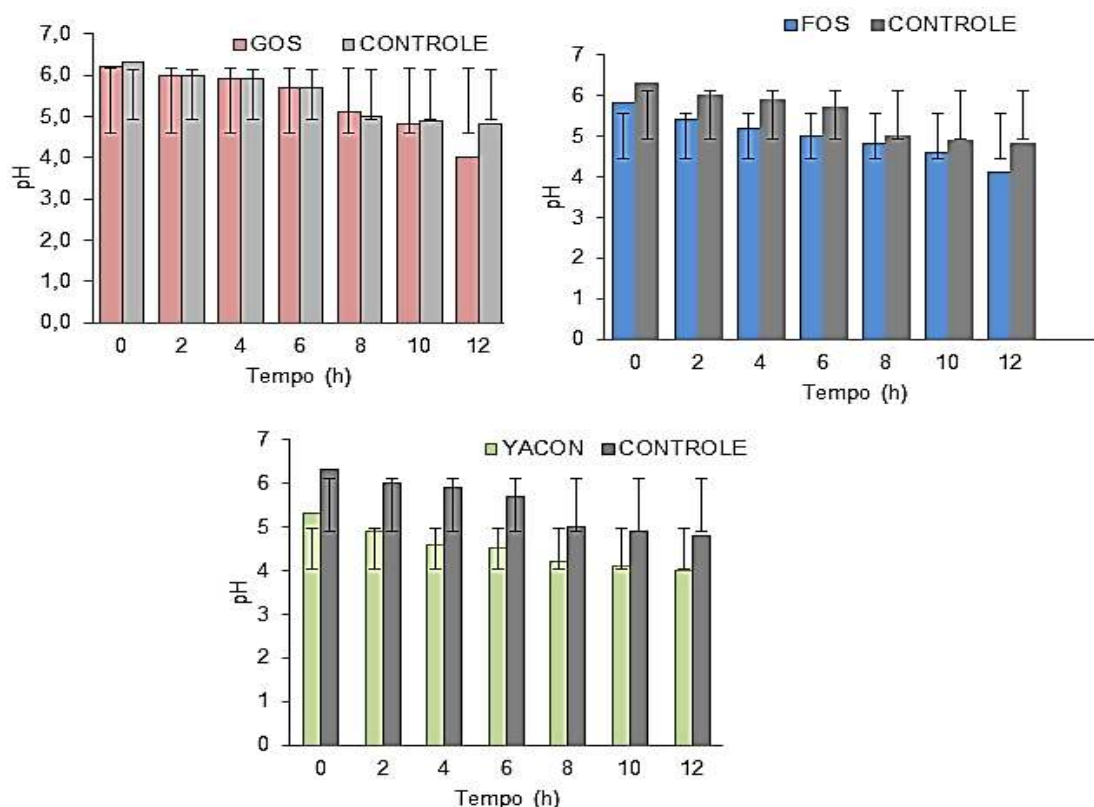


Figura 3: Valores de pH resultantes da fermentação em 12 horas das linhagens de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) em meio MRS+FOS (100mg de FOS), MRS+GOS (100g de GOS) e MRS+Yacon (100g de Yacon) a 37°C em condições de anaerobiose. Meio controle (MRS sem fonte de dextrose).

Houve uma acidificação de todos os substratos para ambas as linhagens probióticas, com exceção de MRS+ Yacon para *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) que não houve alteração de pH, isto indica baixa capacidade de acidificação do micro-organismo nesse meio. Em Menezes (2007) a acidificação do meio foi positiva para todos os probióticos estudados, porém no tempo de 72 horas de fermentação.

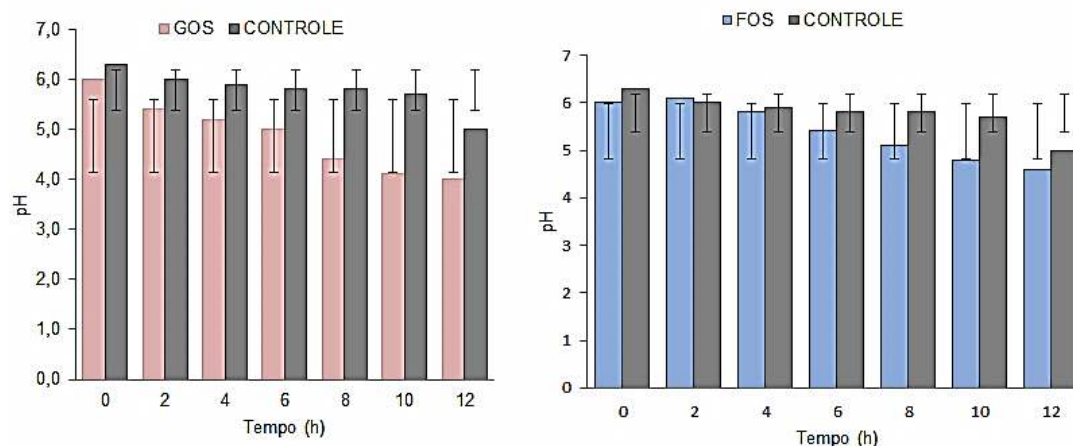


Figura 4: Valores de pH resultantes da fermentação em 12 horas das linhagens de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS+FOS (200mg de FOS), MRS+GOS (200g de GOS) a 37°C em condições de anaerobiose. Meio controle (MRS sem fonte de dextrose).

3.3. Avaliação da atividade bifidogênica

O efeito bifidogênico foi positivo para todos os tratamentos (MRS+FOS, MRS+GOS e MRS+YACON) para as duas linhagens probióticas utilizadas, com exceção de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) com o tratamento MRS+YACON. O efeito bifidogênico foi demonstrado pelas diferenças observadas entre as contagens iniciais e finais ($\Delta \text{LogUFC.mL}^{-1}$).

Nas tabelas 2, 3, 4, 5, e 6 é possível observar o efeito bifidogênico dos diferentes substratos prebióticos, nas diferentes concentrações (100mg, 200mg, 300mg, 400mg e 500mg) e nos diferentes tempos, e seus respectivos controles.

Tabela 2: Avaliação de bifidogenia com *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) usando diferentes concentrações de galactooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose. Valores expressos em LogUFC.ml⁻¹

Tempo (h)	GOS 100mg	GOS 200mg	GOS 300mg	GOS 400mg	GOS 500mg	Controle
0	7,2 ^a ±0,06*	7,2 ^a ±0,06	7,2 ^a ±0,06	7,2 ^a ±0,6	7,2 ^a ±0,06	7,2±0,6 ^c
2	7,4 ^a ±0,01	8,6 ^b ±0,12	7,89 ^b ±0,12	7,86 ^b ±0,1	6,6 ^a ±0,01	5,2 ^a ±0,14
4	7,56 ^b ±0,07	8,79 ^b ±0,12	7,95 ^b ±0,06	7,9 ^b ±0,02	7,3 ^b ±0,02	6,3 ^b ±0,05
6	8,39 ^c ±0,18	9,5 ^c ±0,14	8,2 ^c ±0,07	8,5 ^c ±0,02	7,4 ^b ±0,01	6,0 ^b ±0,01
8	8,4 ^c ±0,17	10,1 ^d ±0,12	8,33 ^c ±0,05	8,6 ^c ±0,08	7,5 ^b ±0,12	7,2 ^c ±0,01
10	8,89 ^d ±0,01	10,2 ^d ±0,02	8,38 ^d ±0,11	8,7 ^d ±0,1	7,4 ^b ±0,29	7,0 ^c ±0,06
12	8,98 ^d ±0,01	11,5 ^e ±0,19	8,78 ^e ±0,06	8,3 ^c ±0,12	7,3 ^b ±0,05	7,2 ^c ±0,01

* Desvio padrão, médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,05) pelo método do teste de Tukey.

Controle: MRS sem fonte de dextrose.

O maior valor de bifidogenia demonstrado para *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) usando GOS foi de 11,5 LogUFC, para a concentração de 200mg no tempo de 12 horas de fermentação.

No estudo de Menezes (2007) o maior valor obtido para LA-05 foi de 8,39 log UFC usando como fonte de carbono xilana. Em Santos (2010) usando o mesmo substrato GOS sintetizado pela β-galactosidase de *Scopulariopsis sp.*, porém em concentração de 25% (v/v) obteve-se um potencial bifidogênico de 10,88 LogUFC nas contagens finais.

Tabela 3: Avaliação de bifidogenia com *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) usando diferentes concentrações de frutooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose. Valores expressos em LogUFC.ml⁻¹

Tempo (h)	FOS 100mg	FOS 200mg	FOS 300mg	FOS 400mg	FOS 500mg	Controle
0	7,2 ^a ±0,06*	7,2 ^a ±0,06	7,2 ^a ±0,06	7,2 ^a ±0,06	7,2 ^d ±0,06	7,2±0,6 ^c
2	7,3 ^a ±0,06	8,53 ^b ±0,09	8,93 ^b ±0,06	7,5 ^c ±0,12	6,52 ^a ±0,40	5,2 ^a ±0,14
4	8,73 ^b ±0,10	9,11 ^c ±0,12	8,83 ^b ±0,12	7,2 ^a ±0,27	6,81 ^b ±0,12	6,3 ^b ±0,05
6	8,93 ^c ±0,06	9,9 ^c ±0,01	9,42 ^c ±0,07	7,4 ^c ±0,45	6,97 ^b ±0,01	6,0 ^b ±0,01
8	8,93 ^c ±0,17	10,3 ^d ±0,01	9,43 ^c ±0,07	7,4 ^c ±0,43	7,03 ^c ±0,04	7,2 ^c ±0,01
10	8,87 ^b ±0,03	10,7 ^d ±0,17	9,58 ^d ±0,2	7,5 ^c ±0,53	7,53 ^d ±0,02	7,0 ^c ±0,06
12	9,45 ^d ±0,08	11,3 ^d ±0,18	10,0 ^d ±0,08	8,04 ^d ±0,06	7,88 ^e ±0,01	7,2 ^c ±0,01

* Desvio padrão, médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,05) pelo método do teste de Tukey.

Controle: MRS sem fonte de dextrose.

Os valores obtidos que mais se destacaram para o efeito bifidogênico com *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) usando diferentes concentrações de frutooligossacarídeo foi de 11,3 Log UFC. Em ambos os casos utilizando o GOS e o FOS como suplemento do meio MRS o melhor potencial bifidogênico foi observado nas concentrações de 200mg respectivamente, com um decréscimo nestes valores na medida em que a concentração do substrato aumenta, nos valores de 500mg de prebiótico e 12 horas de fermentação houve uma redução de 7,35 LogUFC e 7,88 LogUFC nas contagens finais para GOS e FOS, respectivamente.

Na figura 5 é possível observar a taxa de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) usando MRS+GOS (200mg de GOS) e MRS+FOS (200mg de FOS); e o controle MRS sem fonte de dextrose.

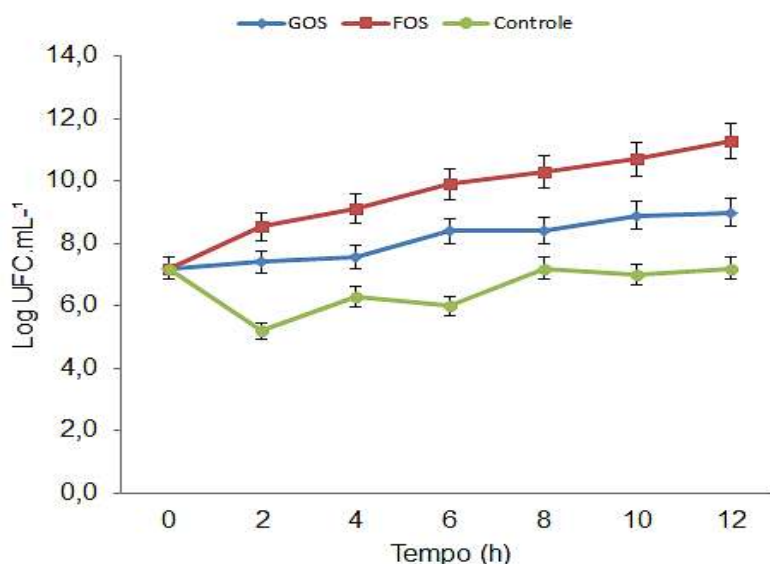


Figura 5: Curva de Crescimento para *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) nos meios MRS+GOS (200mg de GOS) e MRS+FOS (200mg de FOS); e o controle MRS sem fonte de dextrose.

Este resultado demonstra que a influência da A_w (atividade de água) disponível nos substratos para atividade metabólica do micro-organismo pode ser fator limitante de crescimento, pois na medida em que se aumentou a concentração do prebiótico consequentemente diminui a A_w disponível para as atividades metabólicas da célula microbiana. As bactérias são mais exigentes quanto à disponibilidade de água livre, seguidas pelos bolores e leveduras; a baixa atividade de água inibe o crescimento e metabolismo das bactérias (HOFFMANN, 2001)

Pesquisas realizadas com o desenvolvimento de produtos lácteos demonstraram que em queijos de baixa umidade especificamente, adicionados de probióticos, apresentaram uma baixa atividade destes microrganismos devido a pouca A_w , o que inibiu o crescimento e manutenção das linhagens utilizadas (FERREIRA, 2004; CICHOSKI, STEFFENS, BERTOLDI, 2007).

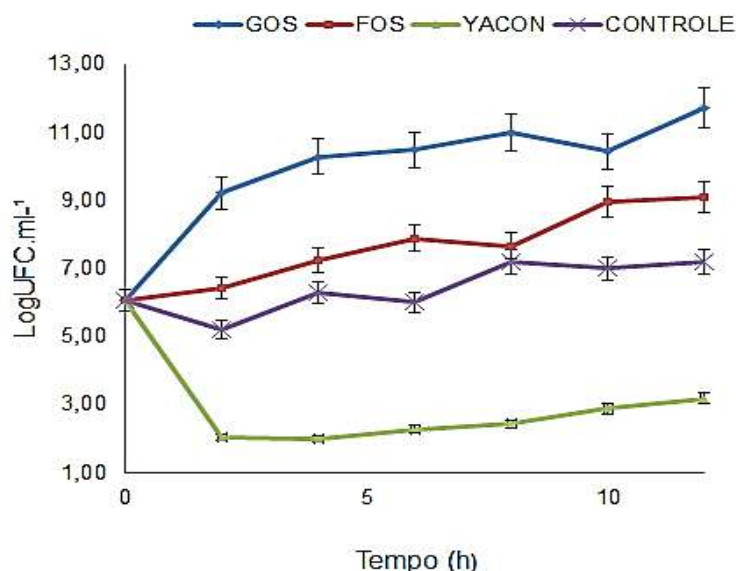


Figura 6: Curva de Crescimento para *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) nos meios MRS+GOS (100mg de GOS), MRS+FOS (100mg de FOS) e MRS+yacon (100mg de FOS); e o controle MRS sem fonte de dextrose.

Tabela 4: Avaliação de bifidogenia com *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) usando diferentes concentrações de frutooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose. Valores expressos em LogUFC.ml⁻¹

Tempo (h)	FOS 100mg	FOS 200mg	FOS 300mg	FOS 400mg	FOS 500mg	Controle
0	6,07 ^a ±0,06	6,07 ^a ±0,06	6,07 ^b ±0,06	6,07 ^c ±0,06	6,07 ^d ±0,06	6,07 ^a ±0,06
2	6,42 ^b ±0,03	6,56 ^b ±0,02	5,83 ^a ±0,05	4,06 ^a ±0,11	4,46 ^b ±0,08	6,2±0,14 ^a
4	7,22 ^c ±0,02	6,35 ^b ±0,27	5,87 ^a ±0,23	5,83 ^b ±0,04	4,67 ^b ±0,13	6,3 ^b ±0,05
6	7,89 ^d ±0,02	6,25 ^b ±0,11	6,15 ^b ±0,03	4,18 ^a ±0,05	4,19 ^a ±0,01	6,0 ^b ±0,01
8	7,65 ^c ±0,04	7,08 ^c ±0,05	7,20 ^c ±0,11	5,65 ^b ±0,07	4,34 ^b ±0,14	7,2 ^c ±0,01
10	8,95 ^e ±0,05	7,26 ^d ±0,05	7,54 ^c ±0,10	5,73 ^b ±0,11	4,52 ^b ±0,05	7,0 ^c ±0,06
12	9,11 ^e ±0,01	7,58 ^d ±0,11	7,91 ^d ±0,02	6,23 ^d ±0,02	5,07 ^c ±0,05	7,2 ^c ±0,01

*Desvio padrão, médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,05) pelo método do teste de Tukey.

Controle: MRS sem fonte de dextrose.

Os melhores valores obtidos para o perfil bifidogênico de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) usando FOS, foi na concentração de 100mg após 12 horas de

fermentação com um índice de crescimento de 9,11LogUFC, também houve uma boa acidificação do meio (Fig.3).

Tabela 5: Avaliação de bifidogenia com *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) usando diferentes concentrações de galactooligossacarídeo, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose. Valores expressos em LogUFC.mL⁻¹

Tempo (h)	GOS 100mg	GOS 200mg	GOS 300mg	GOS 400mg	GOS 500mg	Controle
0	6,07 ^a ±0,06	6,07 ^a ±0,06	6,07 ^a ±0,06	6,07 ^b ±0,06	6,07 ^d ±0,06	6,07 ^b ±0,06
2	9,21 ^b ±0,12	8,25 ^b ±0,11	6,83 ^b ±0,45	5,23 ^a ±0,05	4,59 ^b ±0,05	5,2 ^a ±0,14
4	10,29 ^c ±0,29	8,46 ^b ±0,38	7,31 ^c ±0,26	5,47 ^a ±0,22	4,19 ^a ±0,02	6,3 ^b ±0,05
6	10,48 ^d ±0,28	9,23 ^c ±0,04	7,83 ^c ±0,02	5,93 ^b ±0,04	4,2 ^a ±0,008	6,0 ^b ±0,01
8	11,04 ^e ±0,21	9,43 ^c ±0,16	8,89 ^d ±0,11	6,19 ^b ±0,02	4,74 ^b ±0,03	7,2 ^c ±0,01
10	10,43 ^d ±0,04	10,07 ^d ±0,05	9,1 ^e ±0,03	6,53 ^d ±0,15	5,17 ^c ±0,05	7,0 ^c ±0,06
12	11,7 ^e ±0,15	10,13 ^d ±0,23	9,5 ^e ±0,12	7,18 ^e ±0,05	5,79 ^d ±0,05	7,2 ^c ±0,01

*Desvio padrão, médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,05) pelo método do teste de Tukey.

Controle: MRS sem fonte de dextrose.

O galactooligossacarídeo sintetizado pela β-galactosidase de *Scopulariops sp*, apresentou ser um bom substrato para atividade bifidogênica de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12).

Degnan e Marfarlane (1991) avaliaram o crescimento de oito linhagens de bifidobáctérias e a preferência por tipos de carboidratos, seis das oito linhagens testadas revelaram um alto crescimento (LogUFC) em substrato rico em galactose.

Tabela 6: Avaliação de bifidogenia com *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) usando diferentes concentrações de yacon, em 12 horas de incubação a 37°C em condições de anaerobiose. Valores expressos em LogUFC.ml⁻¹

Tempo (h)	Yacon 100mg	Yacon 200mg	Controle
0	6,07 ^d ±0,06	6,07 ^d ±0,06	6,07 ^b ±0,06
2	4,16 ^b ±0,13	2,03 ^a ±0,16	5,2 ^a ±0,14
4	3,79 ^a ±0,03	2,0 ^a ±0,22	6,3 ^b ±0,05
6	4,19 ^b ±0,15	2,27 ^a ±0,16	6,0 ^b ±0,01
8	5,38 ^c ±0,23	2,43 ^b ±0,12	7,2 ^c ±0,01
10	6,33 ^d ±0,03	2,88 ^b ±0,22	7,0 ^c ±0,06
12	6,81 ^e ±0,05	3,17 ^c ±0,38	7,2 ^c ±0,01

*Desvio padrão, médias marcadas com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p≤0,05) pelo método do teste de Tukey.

Controle: MRS sem fonte de dextrose.

O substrato yacon (extrato bruto) apresentou baixa atividade bifidogênica quando comparado aos demais prebióticos, apesar do yacon ser uma raiz rica em frutanos. O yacon contém grande quantidade de polifenóis, o que neste caso poderia ter relação direta com uma diminuição do potencial bifidogênico, uma vez que neste estudo foi utilizado o extrato bruto do yacon; os polifenóis possuem grande atividade antimicrobiana na maioria das plantas (RECIO, RIOS e VILLAR, 1989).

Pedreschi *et al.* (2003) estudou a capacidade de probióticos *Lactobacillus acidophilus* NRRL-1910, *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, e *Bifidobacterium bifidus* ATCC 15696 em fermentar FOS extraído de Yacon, os resultados revelaram que as bactérias foram capazes de crescerem e assim fermentar o substrato, mesmo as moléculas com alto grau de polimerização.

4. CONCLUSÃO

Os substratos MRS+FOS e MRS+GOS apresentaram que podem estimular a bifidogenia para as linhagens probióticas utilizadas. O substrato MRS+YA apresentou baixa atividade se comparado com os outros substratos.

O aumento das concentrações de oligossacarídeos diminuíram as contagens de prebióticos. Na medida em que houve um acréscimo dos oligossacarídeos no meio MRS diminuiu a atividade bifidogênica, o que mostra que a atividade bifidogênica é dependente da A_w , uma vez, que o acréscimo dos oligossacarídeos diminui o teor de água livre.

Quanto à acidificação do meio houve uma queda do pH, o que indica que os micro-organismos metabolizaram o substrato, produzindo ácidos.

O yacon apesar de ser rico em frutanos neste estudo apresentou baixa atividade bifidogênica se comparado com os outros substratos, fato que pode estar associado aos compostos fenólicos do yacon, já que a amostra estudada se tratava do extrato bruto; a pesquisa sugere que mais estudos sejam realizados sobre potencial bifidogênico utilizando os FOS extraídos do Yacon.

O GOS sintetizado pela β -galactosidase de *Scopulariops sp.* estimulou o crescimento das linhagens estudadas, podendo assim ser considerado um prebiótico eficaz.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOURLIOUX, P., KOLETZKO, B., GUARNER, F., BRAESCO, V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The intelligent intestine", held in Paris. **Am J Clin Nutr.**; n.78, p.675-83. 2003.

CAPRILES, V. D., SILVA, K. E. A., FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no Mercado de alimentos funcionais. **Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v.4, n.6, p 327-335. Nov/dez, 2005.

CICHOSKI, A. J. I, STEFFENS, C., BERTOLDI, C. Bactérias lácticas e mesófilas, lactose, acidez, pH, atividade de água, umidade e cloretos em queijo prato elaborado com leite semidesnatado concentrado. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, n. 355, v.62, p.13. Mar/Abr, 2007.

DEGNAN, B. A., MACFARLANE. G. T. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. **FEMS Microbiol. Lett**, n.84, p.151-156. 1991.

FERREIRA, C. L. L. F. Fatores que afetam o crescimento de microrganismos em queijo. **Revista leite e derivados**, v.15, n. 77. 2004.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **Brasil Alimentos**, n.9, p. 23-30. Julho/Agosto: 2001.

HUEBNER, J., WEHLING, R. L., HUTKINS, R. L. Functional activity of comercial prebiotics. **International Dairy Journal**, n.17, p.770–775. 2007.

ISHIKAWA, F., TAKAYAMA, H., MATSUMOTO, K., KIKUCHI, H., MATSUMOTO, K., KOBAYASHI, Y., YAJIMA, Y. and KAN, T. Effects of β -1-4 linked galactooligosacharides on human fecal microflora. **Bifidus**, n.9, p. 5-18. 1995.

ITO, M., DEUGUCHI, Y., MIYAMORI, A., MATSUMOTE, K. KIKUCHI, H., MATSUMOTO, K., Y., YAJIMA, Y. and KAN, T. Influence of

galactooligosaccharides on the human fecal flora. **J Nutr Sci Vit**, n.39, p.635-640. 1993.

MACFARLENE, G. T., STEED, H., MACFARLENE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 104, n. 2, p. 305-344. 2008.

MATSUMOTO, S., HARA, T., MITSUYAMA, K., NAGOAKA, M., TOMIYASU, N., SUZUKI, A., SATA, M. Probiotic Lactobacillos-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clinical and Experimental immunology**, Oxford, v. 140, n.3, p. 417-426. 2005.

MENEZES, C. R. **Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos**. 2007. 167f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2007.

PEDRESCHI, R., CAMPOS, D., NORATTO, G., CHIRINOS, R., ZEVALLOS, L.C. Andean Yacon root (*Smallantus sonchifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5278-5284. 2003.

PELUSO, I., FINA, D., CARUSO, R., STOLFI, C., CAPRIOLI, F., FANTINI, M. C., CASPANI, G., GROSSI, E., DI IORIO, L., PAONE, F. M., PALLONE, F., MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1730-1737. 2007.

RECIO, M. C., RIOS, J. L., VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. **Phytother. Res.**, v. 3, n. 4, p. 117-125. 1989.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**; v.137, n.3, p.830, Mar., 2007.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health, **Journal of nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SANTOS, E. F., *et al.* Alimentos Funcionais. **Revista de Pesquisas Biológicas da UNIFEV**, São Paulo, n.1, p-13-19, jan/jul., 2006.

SANTOS, R. **Produção e aplicação do prebiótico galactoligossacarídeo como alimento funcional: estudos *in vitro* e *in vivo***. 2010. 155f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2010.

SHOAF, K., MULVEY, G. L., ARMSTRONG, G. D., HUTKINS, R. W. Prebiotic galactooligosaccharides reduce adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to tissue culture cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n.12, p.6920-6928, 2006.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C. L. L. F. (Org.). *Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 35-60, 2003.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosacharides. **Food Technol**, v.48, p.61-65, 1994.

VILHENA, S. M. C; CÂMARA, F.L., KADIHARA, S.T. O cultivo do yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.18, n.1, p.5-8, 2000.

WALKER, W. A., DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p.668-675. 1998.

CAPÍTULO III

PERFIL DE HIDROFOBICIDADE DA SUPERFÍCIE CELULAR DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EM MEIO ENRIQUECIDO COM OLIGOSSACARÍDEOS

RESUMO

A aderência das bactérias seja ela patogênica ou não, envolve uma série de fatores e componentes específicos e inespecíficos, e a adesão faz com que esta mesma não seja eliminada do lúmen intestinal. Os micro-organismos probióticos possuem a capacidade de eliminar os patógenos, e um dos mecanismos de exclusão é por meio de aderência maciça da mucosa onde secretam substâncias e metabólitos que podem impedir a ação dos patogênicos. Esta aderência está ligada também ao perfil de hidrofobicidade da membrana da bactéria, quanto mais hidrofóbica e ácida a membrana celular maior é o potencial de adesão. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a capacidade dos compostos prebióticos galactooligossacarídeos (GOS) e os frutooligossacarídeos (FOS) em estimular o perfil hidrofóbico e ácido das linhagens probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), uma vez, que as mesmas já apresentaram ter bom perfil bifidogênico nestes substratos. As linhagens de bactérias foram reativadas em solução salina tamponada suplementada com 10% de lactose e 10% de peptona (v/v), por 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose; após foi realizado coloração de Gram para confirmação das linhagens. As linhagens de probióticos foram inoculadas em meio MRS+GOS e MRS+FOS (100g respectivamente) por 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose; em seguida foi analisado o perfil de hidrofobicidade e características ácido-básicas da parede celular pelo método MATH (aderência microbiana de hidrocarbonetos). Os resultados revelaram que os prebióticos GOS e FOS estimularam o perfil de adesão e acidez da membrana celular das linhagens probióticas estudadas, quando comparado com o controle meio MRS sem fonte de dextrose. A pesquisa revela que os oligossacarídeos potencializam o perfil hidrofóbico e ácido da membrana celular dos probióticos estimulando sua adesão no trato-gastrointestinal.

Palavras-chave: oligossacarídeos, probióticos, perfil de hidrofobicidade.

ABSTRACT

The adherence of pathogenic bacteria whether or not involves a number of factors and components specific and unspecific adhesion and makes the same is not removed from the intestinal lumen. The probiotic micro-organisms have the ability to eliminate pathogens, and the mechanisms of exclusion are via the mucosa where massive grip secrete substances and metabolites that may prevent the action of pathogenic. This adhesion is also linked to the hydrophobicity profile of the membrane of the bacterium, the more acidic the hydrophobic cell membrane and the greater the potential for adhesion. The objective of this research was to evaluate the ability of compounds galactooligosaccharides prebiotics (GOS) and fructooligosaccharides (FOS) to stimulate acid and hydrophobic profile probiotic strains *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) and *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), once that they already had to have a good profile in these bifidogenic substrates. The bacterial strains were reactivated in buffered saline supplemented with 10% lactose and 10% peptone (v/v) for 24 hours at 37°C under anaerobic conditions; after Gram staining and was performed for confirmation of the strains. The probiotic strains were inoculated in MRS+GOS and MRS+FOS (100g respectively) for 24 hours at 37°C in anaerobic conditions, then analyzed the hydrophobicity profile by the method MATH (microbial adherence hydrocarbon) and characteristics acid-basic cell wall. The results revealed that the prebiotic GOS and FOS esimularam the profile of adhesion and cell membrane acidity of probiotic strains studied, as compared to the MRS control medium without added dextrose. The research reveals that the oligosaccharides enhance the profile and hydrophobic acid cell membrane of probiotics stimulate membership gastrointestinal tract.

Keywords: galactooligosaccharide, probiotics, hydrophobicity profile.

1. INTRODUÇÃO

Os oligossacarídeos desempenham vários efeitos simbióticos, dentre os quais se destaca o efeito da exclusão ou redução dos micro-organismos patogênicos da mucosa intestinal. São vários os mecanismos de ação que confere efeito antiadesivo dos patógenos e a exclusão competitiva; que ocorre através da aderência maciça dos probióticos na mucosa, evitando assim a fixação dos micro-organismos patogênicos. Ambos os casos são chamados de efeito barreira.

A adesão das bactérias à mucosa intestinal sejam elas patogênicas ou não, envolve a participação de adesinas bacterianas, da composição e de receptores da parede celular. A interação entre esses elementos promove a fixação na mucosa impedindo que ela seja eliminada para o exterior do organismo.

A adesão bacteriana depende de interações reversíveis ou irreversíveis. A interação reversível é mediada por condições físico-químicas, hidrofobicidade e cargas (PELLETIERI *et al.*, 1997) e ainda formação de estruturas como os exopolissacarídeos (EPS), que pode ser irreversível (LEIGH e COPLIN, 1992).

Marshall (1971) propõe que a adesão bacteriana ocorre em etapas: i) sendo a primeira reversível, pois a célula microbiana está fracamente aderida à superfície e a única força existente é a de Van der Waals e interações eletrostáticas; ii) a segunda etapa é irreversível pois a bactéria já excretou material formando uma membrana polissacarídica ou protéica denominada de matriz de glicocálix, e assim inicia a formação do biofilme. Lasa (2006) descreve a formação do biofilme de maneira mais detalhada (Figura 1).

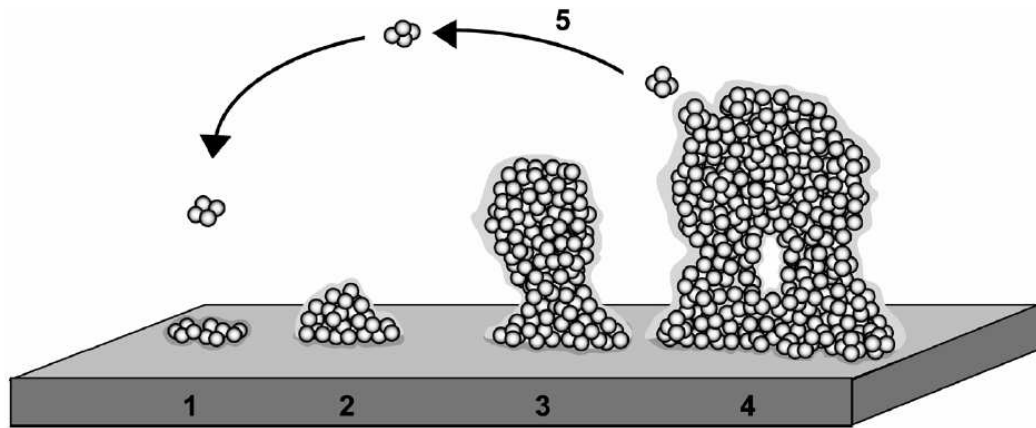


Figura 1: O desenvolvimento de um biofilme. Fase 1º: Fixação inicial de células à superfície. Fase 2º: A produção de matriz extracelular matriz de exopolissacarídeo; Fase 3º: Desenvolvimento inicial da estrutura do biofilme. Fase 4º: Maturação da estrutura do biofilme. Fase 5º: Dispersão de bactérias do biofilme.

Fonte: LASA, 2006.

As bactérias podem ter diferentes tipos de adesividade (MARSHALL, 1992). A adesão dos micro-organismos ocorre em meio aquoso de forma natural e é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos, do tipo do micro-organismo, carga superficial e hidrofobicidade, presença de exopolímeros e nutrientes (CHAVES, 2004). A morfologia da célula e suas estruturas também determinam o seu perfil de adesão (ZOTTOLA, 1995).

O substrato onde a célula microbiana se desenvolve é fundamental para determinar o tipo de adesão, características como pH, temperatura, potencial redox, tempo e forças iônicas; tudo isto influenciam na adesão (OFEK e DOYLE, 1994).

As bactérias em pH neutro apresentam carga elétrica negativa; nas bactérias Gram-positivas a carga negativa é resultado dos polipeptídios do glicocálix e outros ácidos presentes na membrana. Já nas bactérias Gram-negativas a carga está relacionada aos lipopolissacarídeos presentes na membrana e exopolissacarídeos. Quando ocorre diminuição de água do meio o perfil de hidrofobicidade das Gram-negativas aumenta devido a sua membrana ter grande concentração de lipídios e menos peptideoglicano, conforme se observa na figura 2 (WICKEN, 1995; STREVETT *et al.*, 2003).

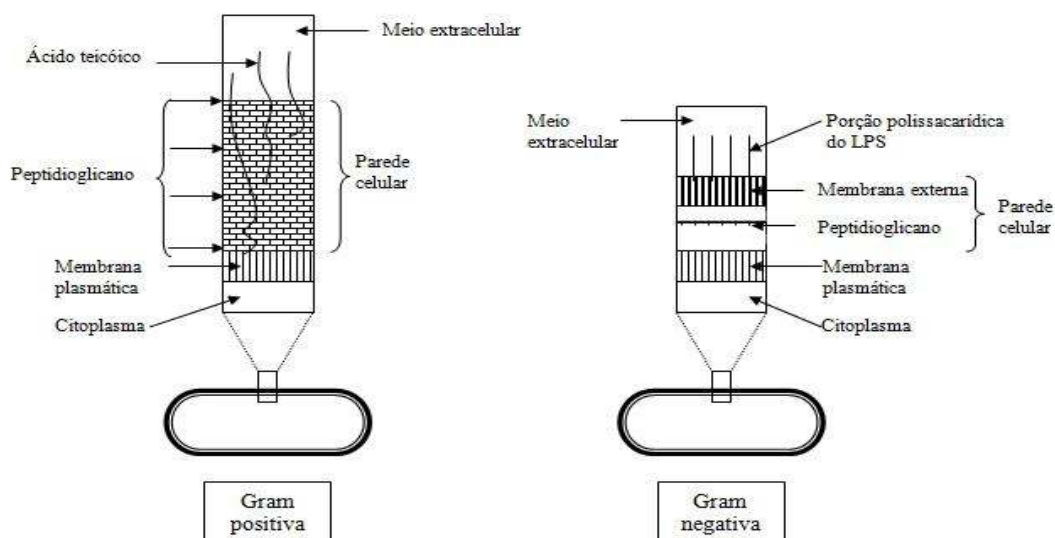


Figura 2: Estruturas da membrana celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Fonte: <http://diariodefarmacologia2010.blogspot.com.br/2011/04/bacterias.html>.

Segundo Van Oss (1997) as interações de adesão não são fáceis de quantificar. Com exceção do perfil de hidrofobicidade, esta é considerada uma força de curto alcance, e mais importante para a adesão bacteriana.

Van Oss e Giese (1995) definem a hidrofobicidade como sendo a energia hidrofóbica de atração que determina o grau de interação entre as moléculas em meio aquoso. O perfil de hidrofobicidade quantifica as interações do tipo ácido base de Lewis que consideram as interações entre doadores e receptores de elétrons (Figura 3). Gilbert Lewis define um ácido como um composto que pode aceitar um par de elétrons e uma base como doadora de pares de elétrons (SUGA, 2011).

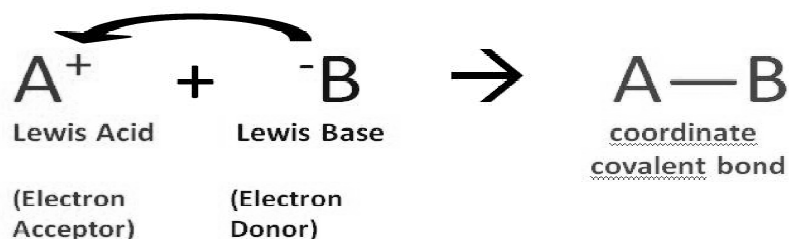


Figura 3: Esquema da Teoria de Lewis sobre interações entre doadores e receptores de elétrons.

Fonte: <http://igorsuga.wordpress.com/tag/g1/>, por SUGA (2011).

É possível determinar o perfil de hidrofobicidade através do teste de hidrocarboneto, cromatografia de interação hidrofóbica, agregação de adição de sais, ou medida de ângulo de contato. O teste de hidrocarboneto fornece apenas um valor relativo para comparação entre micro-organismo e superfície (CHAVES, 2004).

No caso de células bacterianas, uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a hidrofobicidade é a aderência aos hidrocarbonetos, método proposto por Rosenberg (1984), que é geralmente conhecido como MATH (aderência microbiana de hidrocarbonetos) (VAN DE MEIR *et al.*, 1987).

A hidrofobicidade de superfície celular é avaliada através do ensaio (MATH) onde a suspensão de células é misturada com hidrocarbonetos, por um período pré-determinado para permitir a interação ótima das bactérias com a fase de hidrocarboneto. Como resultado, as células podem permanecer na fase líquida ou partição entre o hidrocarboneto líquido de interface ou na fase de hidrocarboneto, dependendo da sua hidrofobia.

Muitos pesquisadores têm modificado o teste MATH original, pois descobriram que aparentemente pequenas variações de condições experimentais, tais como o diâmetro dos tubos de ensaio, o pH do meio de suspensão, e o volume de hidrocarboneto utilizado, pode alterar significativamente a resultados. Hidrocarbonetos alifáticos são mais utilizados, uma vez que os hidrocarbonetos aromáticos podem causar a lise de algumas bactérias (LICHTENBERG, 1985; VANHAECKE, 1988; DONLON, 1993; GEERTSEMA-DOORNBUSCH, 1993).

No estudo de Assunção e Garcia (2002), analisando o comportamento de bactérias lácticas em diferentes substratos contendo prebióticos, foi testado o potencial dos prebióticos em estimular as bactérias em formar os EPS e também o perfil de hidrofocidade para adesão. Os substratos enriquecidos com oligossacarídeos favoreceram a formação destes EPS e também o perfil de adesão.

Pelletier *et al.*, (1997) afirma que bactérias que possuem parede celular mais hidrofóbica e ácida possuem maior capacidade de adesão ao epitélio gastrointestinal. Fato este que foi comprovado no estudo de Barbosa *et. al* (2011), que avaliou o perfil de hidrofobicidade celular de bifidobactérias em

diferentes meios de cultura. Ficou constatado que quanto mais hidrofóbica a bactéria maior capacidade de adesão, sendo estas bactérias indicadas como probióticas, pois atuam excluindo competitivamente os microrganismos patogênicos.

Trabulsi e Sampaio (2000) relatam que o perfil de hidrofobicidade e acidez estão relacionados com a capacidade de adesão e é potencializado na presença de ácidos graxos de cadeia curta, ácido acético e propiônico. Os oligossacarídeos favorecem a produção de ácidos (butirato, acetatos, propianatos) pelas bactérias da microbiota intestinal (ROOBERFROID, 2007).

Evidências mostram que a suplementação de oligossacarídeos pode favorecer o perfil hidrofóbico e ácido da parede celular destes probióticos, melhorando sua adesão à mucosa intestinal e excluindo os microrganismos patogênicos.

O objetivo desse estudo foi de verificar a capacidade que os oligossacarídeos possuem em potencializar a adesão dos probióticos à mucosa intestinal.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Seleção dos oligossacarídeos

Os oligossacarídeos utilizados no estudo foram: frutooligossacarídeos (BENEO-Orafti, Brasil) e galactooligossacarídeo, sintetizado por β -galactosidase de *Scopulariops sp.* no Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP, (SANTOS, 2009).

2.2. Reativação das linhagens probióticas

Foram utilizadas culturas lácticas liofilizadas (Christian Hansen Lab. Ind. e Com. Ltda) de bactérias ácido-lácticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05).

As bactérias foram inoculadas em solução salina tamponada suplementada com 10% de lactose e 10% de peptona (v/v), por 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose; este procedimento foi repetido duas vezes com a finalidade de ativar o metabolismo bacteriano. Em seguida foram plaqueadas pelo método *spread plate* em Agar Nutriente (NA) por 24 horas a 37°C em jarra de anaerobiose

com o reagente Anaerocult (Merck), com a finalidade de observar as características morfológicas da colônia.

2.3. Coloração de Gram para confirmação das linhagens probióticas.

Para a coloração de Gram, foram utilizados 1µL da cultura de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio líquido, espalhando com uma alça de níquel-cromo na superfície da lâmina (área de 1cm x 2cm). Em seguida a lâmina contendo o esfregaço foi conduzida para uma estufa a 50°C/ 5 minutos para secagem.

Após a secagem, quando a lâmina já estava em temperatura ambiente foi adicionado 5µL de cristal violeta por um minuto, o próximo passo foi à retirada do excesso de corante com iodo de Gram (iodo metálico, iodeto de potássio) por 1 minuto, seguido da descoloração com álcool. O passo seguinte foi à coloração com Fucsina de Ziehl (5µL) por 30 segundos. Decorrido o tempo de fixação do corante, foi realizada a lavagem do excesso com água destilada e secagem em ar frio.

A observação das colônias foi ao microscópio, usando uma objetiva com aumento de 100x, com a ajuda de óleo de imersão.

2.4. Meio de cultura enriquecido com prebióticos

Foram inoculadas 1×10^6 UFC/ml das linhagens probióticas em 10mL de caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe) suplementado com 100mg de diferentes fontes de prebióticos (denominados assim de MRS+FOS e MRS+GOS). O controle tratava-se de meio MRS sem fonte de dextrose. As linhagens *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) foram incubadas a 37°C por 12 horas em condições de anaerobiose (em jarra de anaerobiose com o reagente Anaerocult) para então prosseguir com a avaliação do perfil de hidrofobicidade.

2.5. Teste de hidrofobicidade pelo método MATH (Microbial adherence to hydrocarbons) e características ácido-básicas da parede celular.

Para avaliar o perfil de hidrofobicidade foi utilizado o teste MATH, descrito por Rosenberg e Rosenberg (1983) com adaptações referentes ao estudo, pois este sofre influência direta de fatores intrínsecos e extrínsecos do meio de cultura e do tipo de micro-organismo estudado.

Para neutralizar eletricamente a membrana das células bacterianas, 10mL da solução fermentada (*Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) contendo os prebióticos conforme descrito no item 2.4) foram centrifugados a 6000xg por 15 minutos. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com solução tampão de hidróxido de potássio (50 milimolar, pH 7,0) e então foram ressuspensas em solução de nitrato de potássio (0,1 milimolar, pH 6,2).

Foram adicionados 4mL de amostras da suspensão bacteriana (adicionada em nitrato de potássio) para tubos de ensaio individuais (diâmetro, 1,7 cm; comprimento, 15 cm), com 1mL dos seguintes solventes: xilol (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido) e acetato de etila (solvente básico). Deixou a amostra repousar por 5 minutos. Os tubos de ensaio foram agitados à em Vortex (Marca Genie) velocidade máxima durante 2 minutos; em seguida repousaram durante 15 minutos para permitir a separação de fases. Após esse período, foi feita a leitura de absorbância da fase aquosa a 600nm em espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados individualmente para ambas as linhagens de *Bifidobacterium animalis* (Bb -12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) para os tratamentos de MRS+FOS, MRS+GOS e controle. Descrição dos ensaios para leitura de absorbância.

*DO_A ⇒ Branco - 5 mL nitrato de potássio

Amostra – 5 mL nitrato de potássio + Células

DO_A : Densidade óptica da Fase Inicial

*DO_B ⇒ Branco – 4 mL de nitrato de potássio + 1 mL dos solventes por tubo.

Amostra – 4 mL de nitrato de potássio + 1 mL dos solventes por tubo.

DO_B= Densidade óptica na fase onde as células ficou ou não aderida

A porcentagem de adesão bacteriana, com o solvente utilizado, foi de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Hidrofobicidade ou porcentagem de adesão} = \frac{(DO_A - DO_B)}{DO_A} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Reativação das linhagens probióticas

As linhagens probióticas mostraram estar metabolicamente ativas. Através da inoculação em meio sólido e coloração de Gram foi possível verificar algumas características morfológicas das colônias e das estruturas celulares. (Figura 4).

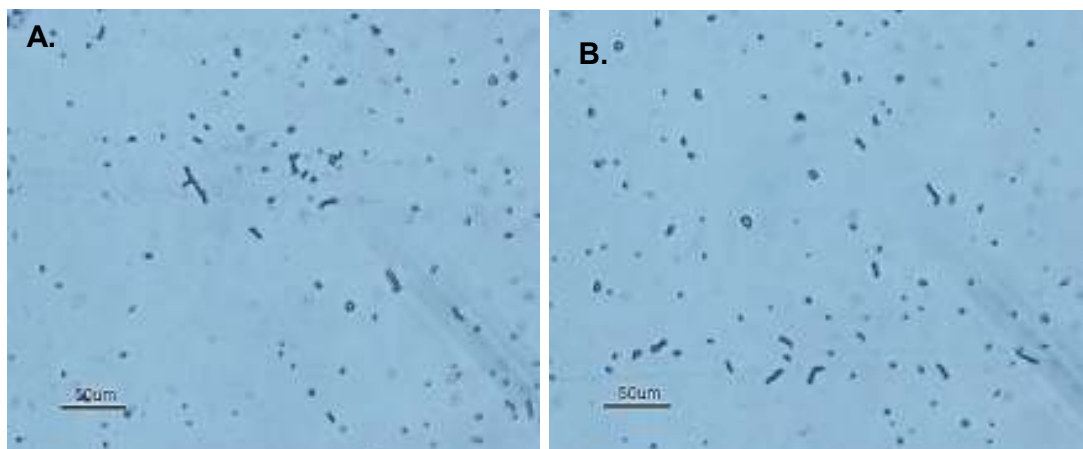


Figura 4: Linhagens de bactérias ácido-láticas **A.** *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e **B.** *Lactobacillus acidophilus* (LA-05). Reativação em solução salina tamponada suplementada com 10% de lactose e 10% de peptona (v/v), por 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

3.2. Teste de hidrofobicidade pelo método MATH e características ácido-básicas da parede celular.

Os resultados revelaram que os prebióticos exercem ação direta sobre o perfil hidrofóbico da superfície celular e sobre as características ácido-básicas das linhagens estudadas, quando comparado com o controle (MRS sem fonte de dextrose).

No tratamento com gactooligossacarídeo a bactéria Bb-12 mostrou-se mais hidrofóbica e ácida, quando comparado com o tratamento com FOS, mas

não houve diferença estatisticamente significativa, em ambas condições a bactéria *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) mostrou boa propriedade probiótica, por apresentar uma membrana celular hidrofóbica e ácida em relação ao controle (Figura 5), o que indica uma maior probabilidade de adesão na mucosa intestinal (PELLETIER *et al.*, 1997).

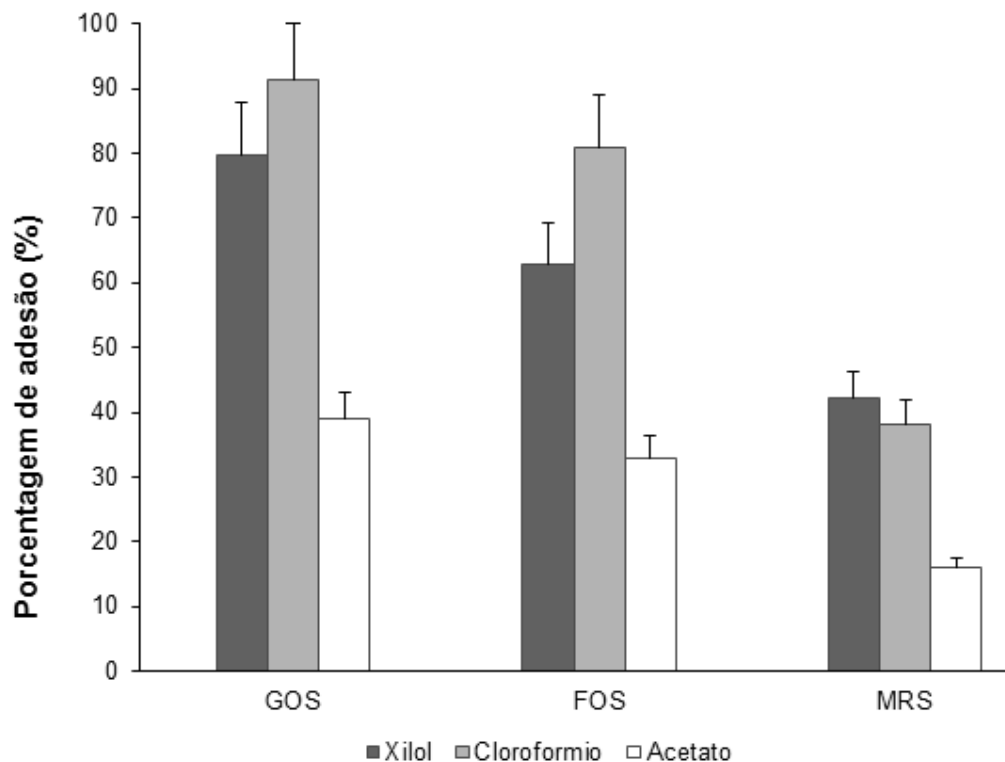


Figura 5: Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12).

MRS sem fonte de dextrose: trata-se do tratamento controle.

No estudo de Barbosa *et. al*, (2011) foi avaliada a capacidade probiótica *in vitro* de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus*, também uma cepa Gram-positiva, por meio do seu perfil de hidrofobicidade. Este revelou apresentar uma superfície celular hidrofóbica e ácida, indicando boa probabilidade de se aderir à mucosa intestinal.

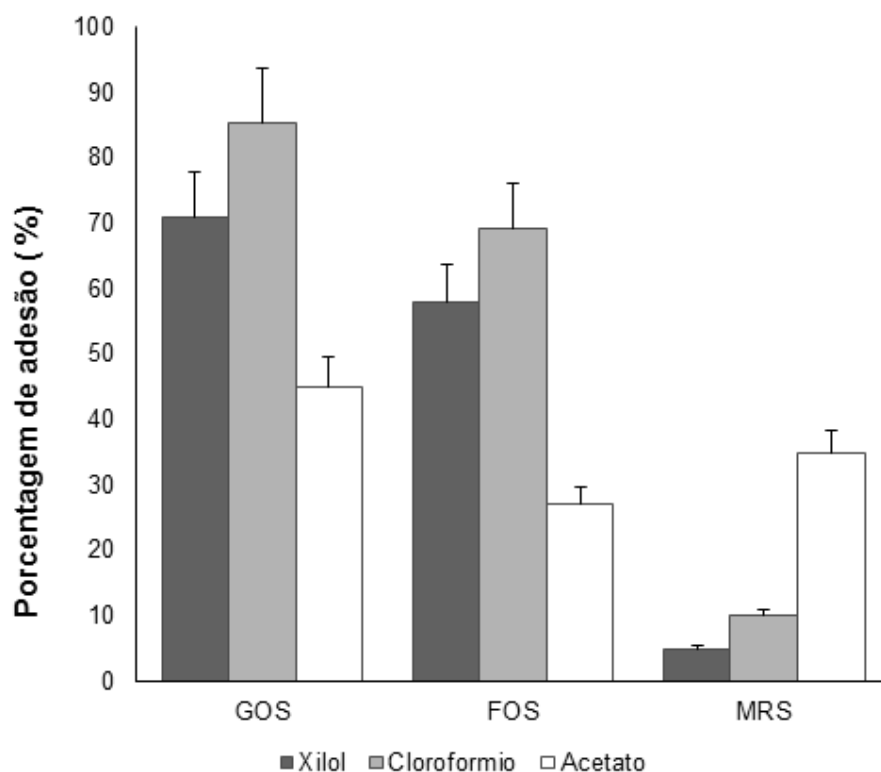


Figura 6: Porcentagem de Hidrofobicidade da parede celular de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05)

MRS sem fonte de dextrose: trata-se do tratamento controle.

Na figura 6, estão dispostos os valores de hidrofobicidade para as linhagens de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e seus respectivos tratamentos, os resultados demonstram que o GOS melhorou o perfil hidrofóbico quando se comparada a característica apolar da célula usando xilol, e a característica ácida da célula bacteriana usando clorofórmio.

O FOS também potencializou o perfil hidrofóbico e ácido para LA05, houve uma diferença significativa entre solvente ácido (clorofórmio) e o solvente básico (acetato de etila), comprovando ainda mais o efeito sobre a superfície celular do probiótico.

No tratamento controle (MRS sem fonte de dextrose) ficou claro como os prebióticos execem papel fundamental na propriedade de adesão dos probióticos na mucosa intestinal, uma vez que o estudo revelou uma baixa hidrofobicidade e membrana celular básica (carga elétrica neutra) para LA-05 na condição do tratamento controle, o que diminui seu perfil de adesão bacteriana, esta depende

em partes de interações físico-químicas: como hidrofobicidade e cargas elétricas (PELLETIER, 1997).

Os probióticos metabolizam os oligossacarídeos liberando ácidos (ácidos graxos de cadeia curta, ácido acético, propiônico e láctico), estes ácidos alteram o pH do meio podendo alterar o perfil hidrofóbico da membrana celular. Este fato pode ser observado neste estudo, uma vez que os tratamentos utilizando os oligossacarídeos aumentaram o perfil hidrofóbico e ácido das linhagens estudadas.

4. CONCLUSÃO

Os prebióticos galactooligossacarídeos e o frutooligossacarídeos se mostraram eficazes para melhorar o perfil hidrofóbico e ácido das linhagens de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), podendo desta maneira potencializar a adesão na mucosa intestinal excluindo os patógenos, fator fundamental para os micro-organismos considerados probióticos.

Os resultados revelam que quanto mais hidrofóbica a membrana maior a acidez; e que a produção de ácidos decorrentes da fermentação do substrato prebiótico aumentam o perfil hidrofóbico e ácido da membrana.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUNÇÃO, C. A. G., GARCIA, S. Estudo do comportamento de bactérias lácticas em substrato contendo prebióticos. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002. Maringá, Paraná. Universidade Estadual de Maringá.

BARBOSA, F.H., BARBOSA. L.P.J.L., NICOLI. J.R. Avaliação da capacidade probiótica de uma linhagem de *Ruminococcus gnavus* da microbiota fecal de seres humanos contra *Clostridium perfringes*. **Estação Científica UNIVAP**, Macapá, v.1, n.1, p 75-88, 2011.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética da formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. Minho, Braga: Universidade do Minho, Portugal. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) Universidade do Minho, Braga 2004.

Diário de Farmácia: bactérias. Disponível em: <http://diariodefarmacia2010.blogspot.com.br/2011/04/bacterias.html>, acesso em 25 de setembro de 2012.

DONLON, B., COLLERAN E. A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria. **Journal Microbiology Methods**. v.17, p.27–37, 1993

GEERTSEMA-DOORNBUSCH, G. I., VAN DER MEI H. C., BUSSCHER, H. J.. Microbial cell surface hydrophobicity: the involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). **J. Microbiol. Methods**. v.18, p. 61–68, 1993

LASA I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology** v.9, p. 21-28, 2006.

LEIGH, J. A., COPLIN, D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.307-346, 1992.

LICHTENBERG, D., ROSENBERG M., SHARFMAN N., OFEK I. A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon. **J. Microbiol. Methods**. v. 4, p.141–146, 1985.

MARSHALL, K. C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **American Society Microbiology News**, v.58, n.4, p.202-207, 1992.

MARSHALL, K. C., STOUT, R., MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v.68, p.337-348, 1971.

OFEK, I., DOYLE, R.J. **Bacterial adhesion to cells and tissues**. In: Ofek I, Doyle RJ, editors. New York: Chapman & Hall; 1994.

PELLETIER, C., BOULEY, C.C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, p.1725-1731, 1997.

ROBERFROID, M. R. Prebiotics: the concept revisited. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.137, p. 830-837, March., 2007.

ROSENBERG, M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v.22, p.289-295, 1984.

ROSENBERG, M., GUTNICK, D., ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p.29-33, 1983.

SANTOS, R; SIMIQUELI, A. P. R; PASTORE, G. M. Produção de galactooligossacarídeo por *Scopulariopsis* sp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.39, n.3, p.682-689, 2009.

STREVETT, K. A., CHEN, G. Microbial surfaces thermodynamics and applications. **Research in Microbiology**, v.154, p.329-335, 2003.

SUGA. I. S. Química e Cotidiano. (2011) Disponível em: <http://igorsuga.wordpress.com/tag/g1/>, acesso em 24 de setembro de 2012.

TRABULSI, L. R., SAMPAIO, M. M. S. C. A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo. **Os Probióticos e a Saúde Infantil**, v.1, Brasil: Nestlé Ltda., 2000, p. 3-11.

VAN DER MEI, H. C., WEERKAMP, A. H., BUSSCHER, H. J. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 6, p. 277-287, 1987.

VAN OSS, C. J. Hydrophobicity and hydrophilicity of biosurfaces. **Current opinion in Colloid Interface Science**, v.2, p.503-512, 1997.

VAN OSS, C. J., GIESE, R. F. The hydrophilicity and hydrophobicity of clay minerals. **Clays and Clay Minerals**, v.43, p. 474-477, 1995.

VANHAECKE, E., PIJCK, J. Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in the BATH test. **Appl. Environ. Microbiol**, v.54, p.1436–1439, 1988.

WANG, X., GIBSON, G.R. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **J Appl Bacteriol**, Cambridge, v.74, n.4, p.373–380, 1993.

WICKEN, A. J. Bacterial cell walls and surfaces, p. 45–70. *In*, D. C. Savage and M. Fletcher (ed.), Bacterial adhesion. **Plenum Publishing Co.**, New York, N.Y. 1985.

ZOTTOLA, E. A., SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry: Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.125-148, 1994.

CAPÍTULO IV

ESTUDO PRELIMINAR DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* (LA-05) EM MEIO LÍQUIDO ENRIQUECIDO COM OLIGOSSACARÍDEOS.

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros produzidos por bactérias, fungos e algas. Estão ligados à parede celular ou são excretados para o meio extracelular, durante o processo de fermentação. Geralmente aumentam a viscosidade dos meios. Os EPS produzidos por bactérias probióticas desempenham efeitos fisiológicos positivos, contribuindo na formação de agregados celulares bacterianos no reconhecimento e adesão à superfície, além de apresentar efeito imunomodulador. O objetivo deste trabalho foi à produção, purificação e quantificação de EPS produzidos por *L. acidophilus* La-5 em caldo MRS enriquecido com prebióticos galactooligossacarídeos e frutooligossacarídeos. O cultivo foi realizado em condições de anaerobiose por um período de 48h. Foram coletadas amostras de 12 em 12 horas, para purificação em centrifugação a 3800xg durante 10 minutos com etanol. A quantificação foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, seguida de leitura em absorbância de 490nm, e análise qualitativa foi realizada através de coloração com vermelho congo por 15 minutos e exame ao microscópio. Os dados foram submetidos a uma curva padrão de glicose ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) para estimar a quantidade de EPS totais em uma amostra. Os resultados revelaram que a maior produção de EPS ($13,53\mu\text{g.mL}$) foi após 48 horas de cultivo em caldo MRS suplementado com GOS sintetizado pela enzima β -galactosidase por *Scopulariopsis sp*, enquanto que o FOS também estimulou a produção ($7,68\mu\text{g.ml}$) em 12 horas seguido de queda de produção após este período. Quanto ao exame microscópico das colorações, foram observados aglomerados e formações celulares do tipo rede nos cultivos contendo GOS e FOS indicando possível formação de EPS nesses casos.

Palavras-chave: exopolissacarídeos, produção, prebióticos.

ABSTRACT

The exopolysaccharides are biopolymers produced by bacteria and fungi and are connected to the cell wall, or are secreted to the extracellular medium during the fermentation process, typically increasing the viscosity of the medium. The EPS produced by probiotic bacteria trigger positive physiological effects, contributing to the formation of cell aggregates in bacterial recognition and adhesion to the surface has immunomodulatory effect. The objective of the research was the production, extraction and quantification of EPS produced by *L.acidophilus* La-5 in MRS broth enriched with prebiotic galactooligosaccharides, fructooligosaccharides. The culture was grown under anaerobic conditions for a period of 48 h, Samples were collected every 12 hours, for purification in centrifugation at 3800xg for 10 minutes with ethanol, and quantified by phenol-sulfuric method followed in reading absorbance at 490nm and qualitative analysis using Gram-staining and microscopic examination. The results were subjected to a standard curve of glucose ($10\mu\text{g.ml}^{-1}$) to estimate the total amount of EPS in a sample, they revealed that the highest yield ($13.53\mu\text{g.ml}$) was after 48 hours of culture broth MRS supplemented with GOS synthesized by the enzyme β -galactosidase by *Scopulariopsis* sp, the FOS stimulated production ($7.68\mu\text{g.ml}$) in 12 hours and then decreased production after this period. The microscopic examination of staining were observed clusters and formations of the cellular network type in the cultures containing GOS and FOS indicating formation of EPS in these cases.

Keywords: exopolysaccharides, produced, prebiotic.

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros hidrossolúveis que estão ligados na parede celular do micro-organismo, e são excretados para o meio extracelular, durante o processo de fermentação. Geralmente aumentando a viscosidade do meio. Estes biopolímeros possuem potencial como aditivos naturais ou ingredientes alimentares funcionais com benefícios econômicos e à saúde (SCHIAVÃO-SOUZA *et al.*, 2007). Não possuem gosto, portanto podem ser usados para desenvolver produtos alimentícios sem alterações no sabor (DUBOC e MOLET, 2001). Os EPS são muito utilizados na indústria de alimentos para aumentar a viscosidade, e diminuir a sinérese dos produtos lácteos (DE VUYST *et al.*, 2001).

Os polissacarídeos possuem massa molecular alta, peso variando de 200 a 300 Kda, e são formados por uma sequência de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Muitas são constituintes da parede celular, a exemplo da membrana externa das bactérias Gram-positivas. Os LPS (lipopolissacarídeos) estão associados covalentemente à superfície celular bacteriana, como os polissacarídeos capsulares (CPS), ou podem ser excretados para o meio extracelular sem se ligar covalentemente com a membrana bacteriana, Neste caso são classificados como exopolissacarídeos (EPS) (CANILHA *et al.*, 2005)

A produção de exopolissacarídeos ocorre durante a fase logarítmica e, para algumas bactérias, continua durante a fase estacionária de crescimento (LAWS *et al.*, 2001). Muitas bactérias possuem a capacidade de produzir polissacarídeos. Os micro-organismos possuem a capacidade de sintetizar polissacarídeos de armazenamento como o glicogênio que está localizado no citoplasma (Figura 1). Outros produzem ainda polissacarídeos estruturais da parede celular como o peptidoglicano; e os lipo e exopolissacarídeos que estarão fixados na membrana externa no caso das bactérias gram-negativas.

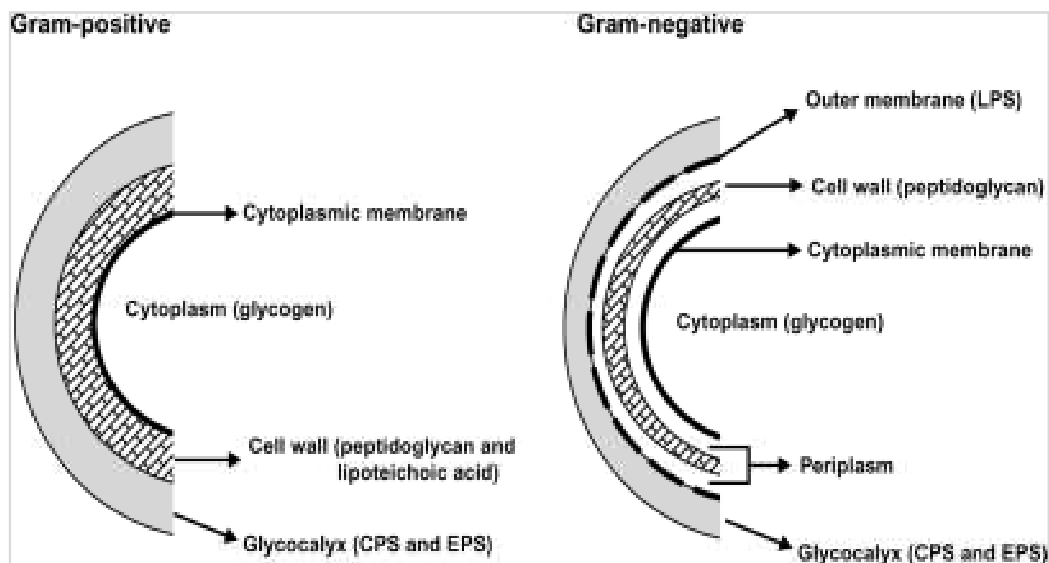


Figura 1: Localização celular de polissacarídeos produzidos por bactérias gram-positivas e Gram-negativas. CPS: Polissacarídeo capsular, EPS: exopolissacarídeo.

Fonte: RUAS-MADIEDO e DE LOS REYES-GAVILA'N (2005)

Os EPS's desempenham papel de proteção para a célula microbiana contra o ataque de fagócitos, antibióticos, dessecação, compostos tóxicos, o ataque de protozoários, estresse osmótico, ajuda na adesão em superfícies e na formação de biofilmes (DE VUYST e DEGEEST, 1999).

Os exopolissacarídeos podem possibilitar vida livre à bactéria, permitindo a aderência e colonização de superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON *et al.*, 1987).

Muitas pesquisas tem sido realizadas para estudar o comportamento da produção de exopolissacarídeos em relação ao tempo de fermentação, temperatura, tipo de substrato, pH e linhagens microbianas (BOELS *et al.*, 2001; PETRY *et al.*, 2000). O pH na produção de EPS está ligado a atividade de enzimas específicas, como das enzimas glicosil-hidrolases, as quais serão responsáveis pela degradação de EPS em longas fermentações. O pH ótimo para a produção de EPS consiste naquele em que os efeitos opostos de produção e degradação estejam balanceados (PHAM *et al.*, 2000; LAWS *et al.*, 2001). A temperatura e o tempo têm grande influência na produção de EPS. Muitas publicações relatam uma temperatura ótima de produção por bactérias ácido-láticas entre 35-37°C (RUAS-MADIEDO e DE LOS REYES-GAVILA'N, 2005; NAVARINI, *et al.*, 2001; LEVANDER *et al.*, 2001; PRASANNA, GRANDISON e

CHARALAMPOPOULOS, 2012). O melhor tempo de produção entre 36-48 horas, onde há um maior rendimento de EPS (PRASANNA, GRANDISON e CHARALAMPOPOULOS, 2012; BOUZAR, CERNING e DESMAZEAUD, 1997).

Diferentes enriquecimentos de meios também foram utilizados, como vários açúcares (glicose e galactose), fontes de proteína (levedura, extrato de fígado e peptonas) e diferentes vitaminas, e atualmente algumas fontes de prebióticos como os oligossacarídeos, a fim de obter os EPS com propriedades funcionais (GOMES, MALCATA e KLAVER, 1998; DE VUYST, VANDERVEKEN, VAN DE VEM e DEGEEST, 1998).

O objetivo deste estudo foi de analisar de forma preliminar a produção de exopolissacarídeos pela bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), em meio enriquecido por oligossacarídeos, e a influência do substrato na produção.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Para produção dos exopolissacarídeos foi utilizada a bactéria ácido-láctica *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) (Christian Hansen Ind. e Com. Ltda). Foi utilizado inóculo de 1×10^6 UFC em 5mL de caldo MRS por 24 horas, a 37°C em anaerobiose. Após este período uma fração de 2mL do inóculo, foi transferido para 50mL de caldo MRS (Man, Rogosa & Shape) suplementado com 25% de fonte de prebióticos, sendo eles assim denominados de: MRS+FOS (Frutooligossacarídeos – Orafit) e MRS+GOS (galacto-oligossacarídeos – Laboratório de Bioaromas, Universidade Estadual de Campinas). O crescimento ocorreu por 48 horas em condições de anaerobiose a 37°C. Alíquotas de 10 mL foram coletadas nos tempos 12h, 24h, 36h e 48 horas para extração e quantificação dos exopolissacarídeos. Durante as coletas, os valores de pH das amostras foram aferidos.

2.2. Extração de exopolissacarídeos (EPS)

A extração foi realizada por centrifugação. O método foi baseado naquele descrito por Schiavão-Souza (2007), com algumas modificações. Para extração foi coletado 10mL da solução fermentada (probiótico + oligossacarídeo), em seguida foi adicionado 250µL de ácido tricloroacético (80%), seguida de agitação

e armazenamento a 4°C por 30 minutos. Após o tempo de armazenamento, as amostras foram centrifugadas a 3800xg durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos de 15 mL e os EPS foram precipitados pela adição de 10mL de etanol frio absoluto (4°C). Após centrifugação a 6000xg a 4°C por 30 minutos, os EPS recuperados foram dissolvidos em água destilada na proporção de 1:1.

2.3. Avaliação qualitativa da formação de exopolissacarídeos (EPS)

A avaliação da formação dos exopolissacarídeos foi avaliada através da coloração com vermelho Congo; este corante possui a propriedade de ligar-se a estrutura de polissacarídeos bacterianos (MURRAY *et al.*, 1994).

Para a coloração, foi coletado 2µL do EPS recuperado (diluído em água destilada), em seguida espalhado sobre a lâmina com o auxílio de uma alça de platina, a lâmina foi seca em ar frio para fixação da amostra de EPS.

Após a secagem da lâmina, foi adicionado 5µL de corante vermelho congo (5%) por 15 minutos. Em seguida foi feita a retirada do excesso do corante com a lavagem em água destilada e a lâmina foi seca em ar frio novamente. A amostra de EPS foi observada ao microscópio (com objetiva de aumento de 60x), para constatar se houve ou não o aparecimento de aglomerados e formação celular do tipo rede, indicando possível formação de EPS nesses casos (ASSUNÇÃO, 2002).

2.4. Avaliação quantitativa da formação de exopolissacarídeos (EPS)

O método mais utilizado para análise quantitativa de EPS é a quantificação de carboidratos solúveis totais em amostras (DUBOIS *et al.*, 1956). O método se baseia na determinação de açúcares por calorimetria, sendo eles: açúcares redutores, polissacarídeos e seus derivados.

A concentração dos carboidratos totais foi determinada usando 1mL dos EPS recuperados diluídos em água destilada (v/v), seguida da adição de 1mL de fenol 5% e 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 5 minutos foi realizada a leitura a 490 nm em espectrofotômetro, para gerar a curva padrão e quantificar cada tratamento. As concentrações foram determinadas a partir de uma curva de calibração da glicose, com padrões de 10 µg mL⁻¹ a 160 µg mL⁻¹, como controle

foi utilizado um branco com 2mL de água destilada. Os resultados foram expressos como EPS-em termos de glicose equivalente ($\mu\text{g mL}^{-1}$ do meio de cultivo) para os meios fermentados, valores estes que foram calculados considerando-se a equação de regressão linear da curva padrão de glicose (Figura 2).

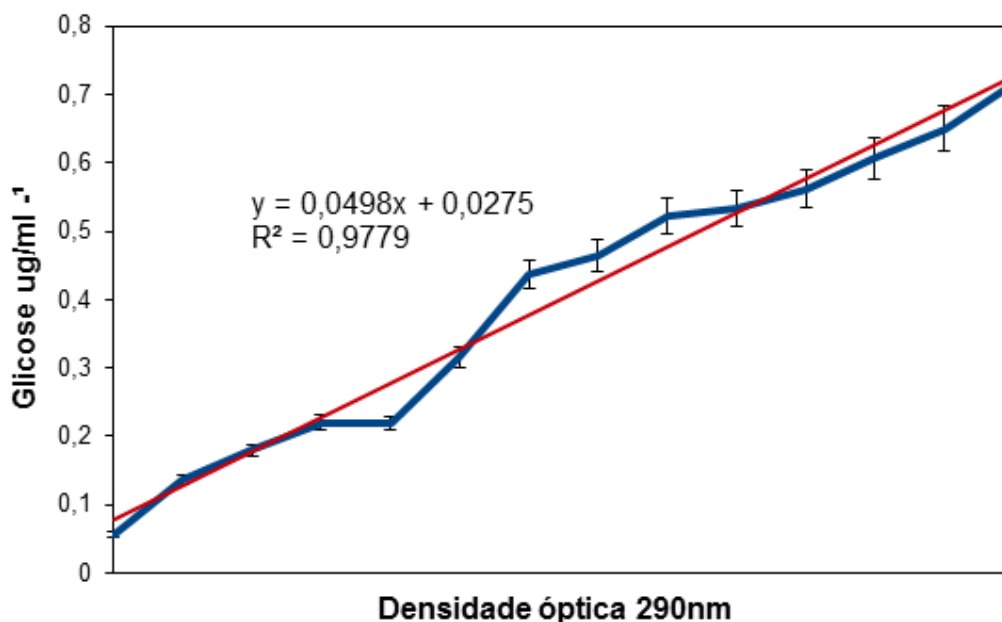


Figura 2: Curva de calibração para estimativa da concentração de carboidratos totais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Produção de exopolissacarídeos

Houve a produção de exopolissacarídeos em meio suplementado com diferentes fontes de prebióticos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05). O prebiótico galactooligossacarídeo estimulou a produção dos exopolissacarídeos (Figura 3) em maior quantidade, quando comparado ao frutooligossacarídeo (Figura 4).

No tratamento de enriquecimento com GOS em 12 horas foi verificado uma produção de $8,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EPS totais, e em 48 horas de $13,56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EPS totais. Estudo realizado por De Souza e Sutherland (1994), estes obtiveram

resultados similares onde os exopolissacarídeos foram sintetizados durante todo o crescimento bacteriano.

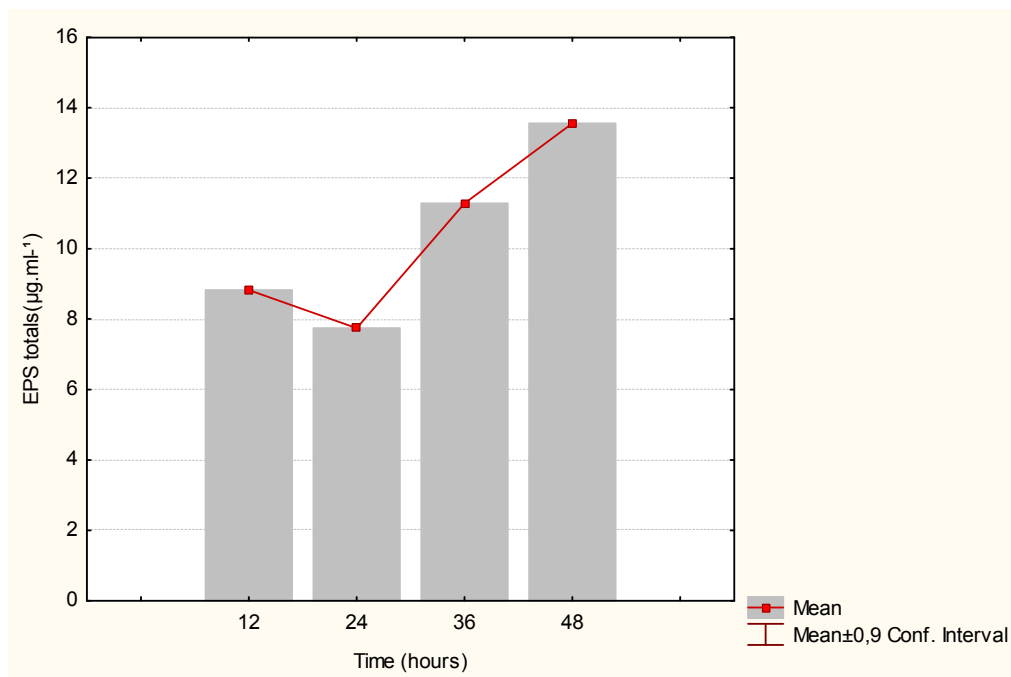


Figura 3: Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com galactooligossacarídeo sintetizado pela enzima β -galactosidase de *Scopulariopsis sp*, durante 48 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

A produção de EPS usando o frutooligossacarídeo em 12 horas foi de 7,68 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de EPS totais, e em 48 horas a produção foi de 3,98 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de EPS totais), houve uma queda na produção de EPS.

A diminuição dos valores de EPS totais após as 12 horas pode estar relacionado com a alteração brusca de pH após as 24 horas de produção (Figura 5). Esta acidificação do meio pode ter alterado o metabolismo do micro-organismo, diminuindo a produção de EPS. Ou ainda desnaturado os EPS já sintetizados.

Algumas enzimas responsáveis por processos metabólicos de transferência de energia são afetadas por mudanças de pH e temperatura, afetando desta forma o balanço energético da célula microbiana (HOFVENDAHL, VANNIEL e HAHNHÄGERDAL, 1999).

Em um estudo realizado por Wisbeck, Furlane e Ninow (2005), verificaram a influência do pH na produção de exopolissacarídeos pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. Os resultados revelaram que a produção de EPS ocorreu entre pH 4,0-6,5; com o ótimo da produção em pH 6,0.

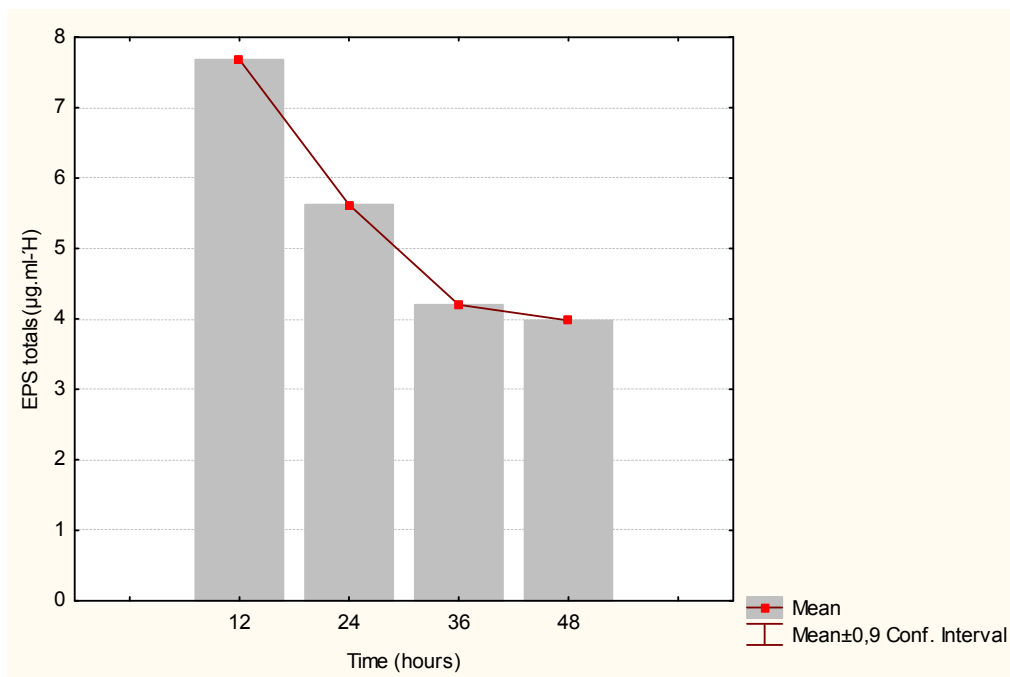


Figura 4: Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com frutooligossacarídeos, durante 48 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

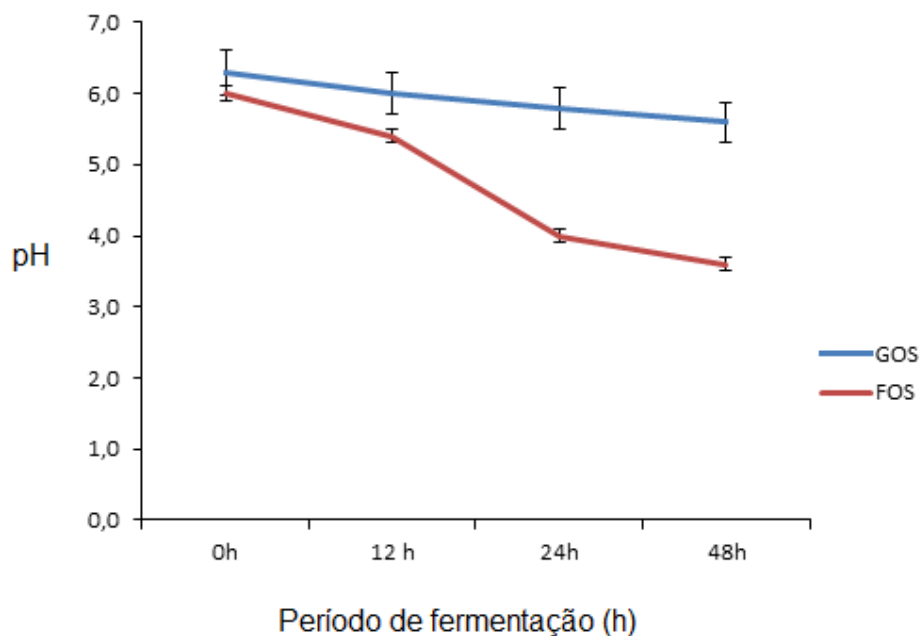


Figura 5: Valores de pH do meio de cultivo líquido (MRS + prebióticos) durante o período de fermentação a 37°C em condições de anaerobiose.

3.2. Análise qualitativa e quantitativa da produção dos exopolissacarídeos

A análise qualitativa revelou a formação de aglomerados tipo rede, o que indica a presença de exopolissacarídeos (Figuras 6 e 7).

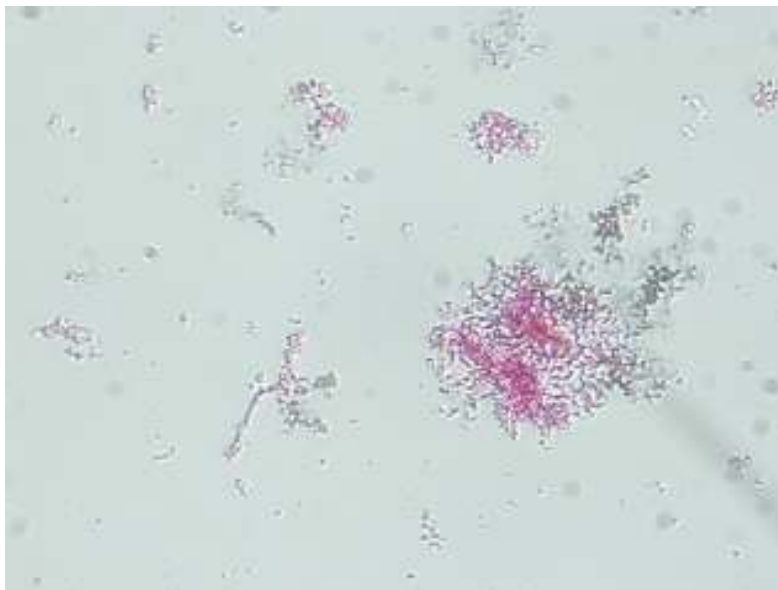


Figura 6: Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com galactooligosacarídeo sintetizado pela enzima

β -galactosidase de *Scopulariopsis sp*, durante 48 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

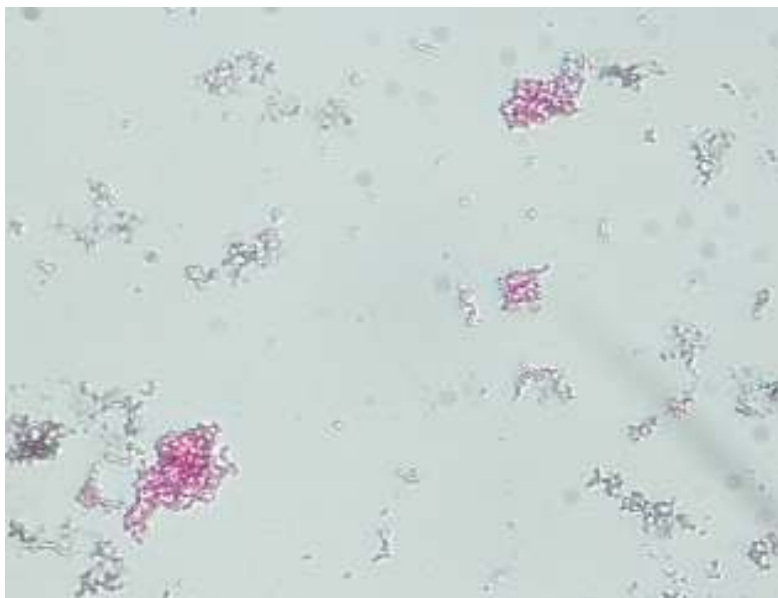


Figura 7: Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com frutooligossacarídeos, durante 12 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

A análise quantitativa pelo método de carboidratos totais em amostras solúveis (DUBOIS *et al.*, 1956), mostrou ser eficaz para quantificar os EPS totais da amostra. A partir da análise de regressão linear o modelo da curva de calibração (Figura 2) pode ser considerado ajustado, com um coeficiente de determinação $R^2 = 0,97$; isto indica bom ajuste do modelo matemático.

4. CONCLUSÃO

A produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com prebióticos mostrou-se eficaz. O galactooligossacarídeo estimulou mais a produção se comparado com o frutooligossacarídeo. O pH neste caso se mostrou fator fundamental no rendimento da produção, e que alterações bruscas de pH podem interferir na síntese de exopolissacarídeos. O pH ácido pode ter afetado no metabolismo microbiano diminuindo a produção. A acidificação do meio pode também ter hidrolisado os EPS sintetizados. Para uma boa produção de EPS um ambiente onde os valores de pH são controlados é fundamental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSUNÇÃO, C. A. G., GARCIA, S. Estudo do comportamento de bactérias lácticas em substrato contendo prebióticos. In: XI ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002. Maringá, Paraná. Universidade Estadual de Maringá.

BOELS, I. C. R., VAN KRANENBURG, R, HUGENHOLTZ, J., KLEEREBEZEM M., DE VOS, W. M. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **Int. Dairy J**, n.11, p.723–732, 2001.

BOUZAR, F., CERNING, J., DESMAZEAUD, M. Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. **J. Dairy Sci**, n.82, p.2310–2317, 1997.

CANILHA, L., *et al.* Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 3: polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, n.20, Dezembro/Janeiro: 2005/2006.

CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Elsevier. Lait**, n.75, p.463-472, 1995.

COSTERTON, J. W., *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

DE SOUZA, A. M., SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.76, p.463-468, 1994.

DE VUYST, L., DE VIN, F., VANINGELGEM, F., DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 11(9), 687–707, 2001.

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

DE VUYST, L., VANDERVEKEN, F., VAN DE VEN, S., DEGEEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. **J Appl Microbiol**, n.84, p.1059-1068, 1998.

DEGEEST, B., VANINGELGEM, F., DE VUYST, L. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, n.9, p.747-757, 2001.

DUBOC, P., MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, n.9, p.759-768, 2001.

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

HOFVENDAHL, K.; VANNIEL, E. W.; HAHNHÅGERDAL, B. Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* ATCC 19435 growing on maltose. **Applied Microbiology and Biottechnology**, Washington, v.51, p.669-672, 1999.

LAWS, A., GU, Y., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.597-625, 2001.

LEVANDER, F., SVENSSON, M., RADSTRO, P. M. Small-scale analysis of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a semi-defined medium. **BMC Microbiology**, v.1, p.23, 2001. Online. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/1/23>. Acesso em 19 de maio de 2012.

LIN, T. Y., CHANG CHIEN, M. F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1419-1423, 2007.

MURRAY, R. G.; DOESTSCH, R. N.; ROBINOW, C. F. Determinative and cytological light microscopy. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. p. 21-40, 1994

NAVARINI, L. A., ABATANGELO, C., BERTOCCHI, E., CONTI, M., BOSCO, F. Isolation and characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* Sfi20. **Int. J. Biol. Macromol**, v.28, p.219–226, 2001

PETRY, S., FURLAN, S., CREPEAU, M. J., CERNING, J., DESMAZEAUD, M. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3427, 2000.

PHAM, P. L., DUPONT, I., ROY, D., LAPOINTE, G., CERNING, J. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Appl. Environ. Microbiol**, v.66, p.2302–2310, 2000.

PRASANNA, P. H. P., GRANDISON, A. S., D. CHARALAMPOPOULOS. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. **Food Research International**, v.47, p.6–12, 2012.

RUAS-MADIEDO, P., DE LOS REYES-GAVILA'N, C. G. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3, 2005.

RUAS-MADIEDO, P., HUGENHOLTZ, J., ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, n.23, p.163–171, 2002.

SCHIAVÃO-SOUZA, T. D., YUHARA, T. T., CASTRO E GARCIA-GOMEZ, R.J.H. Production of exo-polysaccharides by probiotic bacteria: Optimisation of the culture medium. *Braz. J. Food Technol.*, 10 (1), 27-34, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, London, v.8, p.142- 213, 1979.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis and composition of Gram-negative bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Annual. Rev. Microbiol**, v.39, p.243-270, 1985.

WATNICK, P., KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **J. Bacteriol**, v.182, p.2675–2679, 2000.

WISBECK, E.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. Efeito da concentração inicial de glicose e do pH na produção de exopolissacarídeos de potencial antitumoral por *Pleurotus ostreatus* DSM-183. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 2, 2005.

CAPÍTULO V

EFEITO ANTAGÔNICO DAS LINHAGENS *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* E *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* CULTIVADAS EM OLIGOSSACARÍDEOS SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

RESUMO

Os micro-organismos da microbiota intestinal são beneficiados com a ingestão de oligossacarídeos, que são ingredientes alimentares não digeríveis e auxiliam na seleção, crescimento e atividade bacteriana no cólon, levando a um crescimento da microbiota intestinal propiciando efeito benéfico à saúde de indivíduos. A microbiota normal defende o trato-gastrointestinal de micro-organismos patogênicos, por meio de mecanismos de exclusão por competição de nutrientes, produção de ácidos, bacteriocinas, peptídeos, antagonismo, aderência maciça e outros mecanismos. Estes mecanismos de defesa podem ser estimulados pelos oligossacarídeos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o antagonismo das bactérias probióticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) sobre bactérias patogênicas (*Escherichia coli* ATCC 1785, *Staphylococcus aureus* ATCC 5536, *Salmonella choleraesuis* ATCC 1785, e *Yersinia enterocolitica* ATCC 2345) e se os galactooligossacarídeos (GOS), frutooligossacarídeos e o Yacon potencializam o antagonismo. As linhagens probióticas foram reativadas em meio MRS e incubadas por 24 horas a 37°C em anaerobiose. As linhagens patogênicas foram reativadas em meios específicos para cada uma delas, em três passagens consecutivas. Realizou-se coloração de Gram para confirmação das linhagens bacterianas e teste de catalase e oxidase. As bactérias probióticas foram cultivadas em meios MRS+FOS, MRS+GOS, MRS+Yacon, MRS sem fonte de dextrose, e para controle, foi utilizado meio MRS adicionado de NaOH, por 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose, durante este tempo foram coletadas alíquotas para a dosagem do ácido láctico nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. As amostras foram avaliadas, quanto aos valores de pH. A dosagem de ácido foi realizada por espectrofotometria a 425nm, usando uma curva padrão de lactato de lítio. A

avaliação antogônica foi realizada pelo método de difusão em ágar. As análises dos dados revelaram que produção de ácido láctico ocorreu em ambos os substratos e linhagens probióticas, e que quanto maior o tempo de fermentação, maior a produção deste ácido. Quanto à avaliação antagônica os resultados foram positivos sobre todas as linhagens patogênicas se comparados com o meio MRS sem fonte de dextrose, com destaque para o meio MRS+Yacon com halos de inibição superiores a 5mm. Os tratamentos com oligossacarídeos e probióticos inibiram o crescimento das linhagens patogênicas e quando comparados ao tratamento para neutralização dos ácidos (MRS+NaOH) revelaram que a inibição está ligada a produção de ácidos pelas linhagens probióticas. O estudo mostra que os oligossacarídeos estimulam a ação antagônica dos probióticos sobre os micro-organismos patogênicos e ainda que esta inibição do crescimento está ligado com a produção de ácidos pelos probióticos em conjunto com os oligossacarídeos.

Palavras-chave: oligossacarídeos, antagonismo bacteriano, ácidos.

ABSTRACT

The micro-organisms of the intestinal microbiota benefit from ingesting oligosaccharides, which are non-digestible food ingredients and assist in the selection, growth and bacterial activity in the colon, leading to a growth of beneficial intestinal microbiota providing to health of individuals. The normal microbiota supports the gastrointestinal tract-pathogenic micro-organisms by means of exclusion mechanisms by competition for nutrients, production of acids, bacteriocins, peptides, antagonism, adhesion massive and other mechanisms. These defense mechanisms can be stimulated by oligosaccharides. The objective of this research was to evaluate the antagonism of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) and *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) on pathogenic bacteria (*Escherichia coli* ATCC 1785, *Staphylococcus aureus* ATCC 5536, *Salmonella choleraesuis* ATCC 1785, and *Yersinia enterocolitica* ATCC 2345) and if galactooligosaccharides, fructooligosaccharides and Yacon potentiate the antagonism. The probiotic strains were reactivated in MRS medium and incubated for 24 hours at 37°C in anaerobiosis. The pathogenic strains were reactivated in specific media for each of them, in three passages consecutive. Gram performed for confirmation of bacterial strains and catalase test and oxidase. Probiotic bacteria were grown in MRS media FOS, GOS MRS, Yacon MRS MRS without dextrose source, and control was used MRS medium added NaOH for 24 hours at 37 ° C under anaerobic conditions during this time were aliquots collected for the determination of lactic acid at 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 hours. The samples were evaluated regarding the values of pH. The dosage acid was carried out by spectrophotometry at 425nm using a standard curve of lithium lactate. The evaluation was performed by antagonistic agar diffusion method. The analyzes of the data revealed that lactic acid production occurred in both substrates and probiotic strains, and that the longer fermentation greater production of this acid. Regarding evaluation antagonistic results were positive about all pathogenic compared with MRS medium without dextrose source, highlighting the MRS medium Yacon with inhibition zones greater than 5 mm. Treatments with oligosaccharides and probiotics inhibited the growth of pathogenic strains and compared to treatment for neutralization of the acids (MRS NaOH) revealed that the inhibition is attached acid production by the probiotic strains. The

study shows that the oligosaccharides stimulate the antagonistic action of probiotics on pathogenic micro-organisms and that this growth inhibition is connected with acid production by probiotics together with the oligosaccharides.

Keywords: oligosaccharides, bacterial antagonism, acids.

1. INTRODUÇÃO

Para Sullivan e Nord (2002) as bactérias lácticas podem ser utilizadas como probióticos por atuarem no intestino em prol do organismo humano. Os probióticos são definidos como micro-organismos viáveis que promovem ou apoiam um equilíbrio benéfico da população microbiana nativa do trato gastrointestinal. Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (MADI, 2009).

Dentre os micro-organismos do trato intestinal humano, os que mais se beneficiam com a presença de oligossacarídeos são as bifidobactérias e os lactobacilos (MARTINS E BURKERT, 2009).

Os oligossacarídeos são ingredientes alimentares não digeríveis que auxiliam na seleção, crescimento e atividade bacteriana no cólon, levando a um crescimento da microbiota intestinal propiciando efeito benéfico à saúde de indivíduos. São parcialmente hidrolisados no trato gastrointestinal resultando na formação de metabólitos essenciais para a saúde; e são reguladores para a maioria das atividades metabólicas (STEER *et al*, 2000).

As bactérias lácticas constituem um grupo de bactérias Gram-positivas com características metabólicas, fisiológicas e morfológicas bem definidas. Em sua maioria produzem ácido láctico durante a fermentação dos carboidratos, são largamente aplicadas na indústria de alimentos, além de apresentarem capacidade probiótica (AXELSSON, 2004).

O gênero lactobacilos inclui mais de 80 espécies, podem ser homofermentativos, heterofermentativos, anaeróbios e microaerófilos, em sua maioria é ácido-tolerantes, o que, para sua propriedade probiótica, é essencial. São encontrados na cavidade oral, gastrointestinal, no trato-urogenital de humanos e animais (AXELSSON, 2004).

As bifidobactérias geralmente apresentam forma bacilar, bacilos curvos em forma de Y ou V, os meios de cultivo podem determinar esta morfologia. São Gram-positivas, são imoveis e não esporulam; são anaeróbios, crescem em uma temperatura de 38°C, mais resistem até a 46°C (AXELSSON, 2004).

As bactérias ácido-lácticas (BAL) são conhecidas por impedir a invasão por micro-organismos patogênicos. Os efeitos inibitórios destas BAL estão

relacionados com receptores específicos situados na mucosa e adesividade, além de alguns metabólitos, como ácidos, bacteriocinas, peptídeos, exopeptídeos, peróxido de hidrogênio e exopolissacarídeos (BERNET *et al.*, 1993).

A habilidade das BAL em produzir substâncias antimicrobianas é histórica e estas substâncias têm sido usadas para preservar alimentos, como por exemplo, na fabricação de leites fermentados. O processo de fermentação reduz a concentração e carboidratos disponíveis, e aumenta a massa de ácidos que possuem atividade antimicrobiana (OUWEHAND E VESTERLUND, 2004).

Eklund *et al.*, (1980) e Russel (1992) sugerem que a produção de ácidos pelas BAL modificam o pH intracelular dos micro-organismos patogênicos, alterando desta maneira a liberação de prótons dentro do citoplasma levando a uma acidificação do meio e acúmulo de ânions; esta seria a maior causa da inibição do crescimento destes patógenos.

Reid *et al.*, (1987) demonstrou experimentalmente que as cepas de lactobacilos expressam propriedades de adesão, o que lhes permitem inibir a aderência de agentes patogênicos nas células hospedeiras. Com base nestes dados, foi sugerido que os lactobacilos e bifidobactérias podem utilizar o mesmo mecanismo para combater a invasão microbiana gastrointestinal por patógenos.

Evidências experimentais de ensaios clínicos foram publicadas, sobre a eficácia destas bactérias probióticas na prevenção e tratamento de infecções bacterianas e diarreia viral infecciosa (SALMINEN E DEIGHTON, 1992), gastroenterite por *Helicobacter pylori* (SULIVAN E NORD, 2002; CREMONINI *et al.*, 2002) e infecções urovaginal (BRUCE E REID, 1988; CADIEUX *et al.*, 2002).

Na tabela 1 é possível visualizar alguns estudos *in vitro* com cultivo de células de origem gastrointestinal que utilizaram linhagens de lactobacilos e bifidobactérias e que apresentaram atividade antagônica contra agentes patogênicos.

Tabela 1: Estudos *in vitro* com cultivo de células de origem gastrointestinal que utilizaram linhagens de lactobacilos e bifidobactérias e que apresentaram atividade antagônica contra agentes patogênicos.

Linhagens probióticas	Autores
<i>L. acidophilus</i> LB	Coconnier e Bernet, 1993; Lievin-Le Moal, 2002
<i>L. acidophilus</i> HN017	Gopal, 2001
<i>L. johnsonii</i> La	Perez, 2001; Michetti <i>et al</i> , 1999; Tuomola, Ouwehand, e Salminen, 1999; Bernet (1994)
<i>L. rhamnosus</i> DR20	Gopal, 2001
<i>L. casei rhamnosus</i> GG	Lehto e Salminen, 1997; Mack, 1999; Tuomola, Ouwehand, e Salminen, 1999; Santos, 2003.
<i>L. casei subsp. rhamnosus</i> Lcr35	Forestier, 2001.
<i>L. casei Shirota</i>	Tuomola, Ouwehand, e Salminen, 1999; Lee e Puong, 2002; Asahara, 2001.
<i>L. casei</i> GR-1	Chan, 1985; Bruce e Reid, 1988.
<i>L. fermentum</i>	Chan, 1985; Reid, Cook e Bruce, 1987.
<i>L. plantarum</i> 299v	Mack, 1999
<i>Bifidobacterium spp.</i> CA1	Bernet e Brassart, 1993
<i>B. lactis</i> DR10	Gopal, 2001

Fonte: Adaptado, Servin (2004).

Os estudos *in vitro* são confiáveis, mas não representam com clareza as condições gastrointestinais, somente fazem uma simulação destas condições.

A atividade antagônica também pode ser avaliada *in vitro* através do método de difusão em ágar ou também conhecido como *distafusion test*. Zinedine e Faid (2007) avaliaram o potencial antagônico de linhagens probióticas sobre micro-organismos patogênicos usando o método de difusão em ágar e obtiveram resultados positivos na inibição dos patógenos.

Tejero-Sariñena (2012) realizou ensaios pelo método de difusão em ágar para avaliar o efeito antagônico de probióticos sobre cepas patogênicas e a relação com os ácidos orgânicos nesta inibição. Os resultados foram positivos, pois os probióticos agiram inibindo o crescimento dos patógenos, o autor avaliou

ainda se a adição de FOS potencializaria o efeito antagônico. Os resultados revelaram que os tratamentos com FOS apresentaram maior inibição dos patógenos e uma maior produção de ácidos.

O antagonismo de BAL sobre micro-organismos patogênicos já é conhecido e exato na maioria das linhagens probióticas, o objetivo deste estudo é avaliar se os oligossacarídeos adicionados no substrato potencializam este efeito antagônico, por estimular a produção de ácidos.

2. MATERIAIS E METODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Sapucaí (UNIVAS) em Pouso Alegre-MG, nos períodos de fevereiro a julho de 2012.

2.1. Reativação das culturas probióticas

Foram utilizadas culturas lácticas comerciais (Christian Hansen Lab. Ind. e Com. Ltda) de bactérias ácido-lácticas *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05). Em estudo realizado por Santos (2010) estas apresentaram um bom perfil bifidogênico e outras capacidades probióticas definidas. Para reativação dos micro-organismos os mesmos foram inoculados, com o auxílio da alça de platina para caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) e incubadas a 37°C em condições de anaerobiose, por um período de 24 horas.

2.2. Meio de cultura enriquecido com oligossacarídeos

Foram inoculadas 1×10^8 UFC/ml das linhagens probióticas em 10 mL de caldo MRS (suplementado com 100g de diferentes fontes de prebióticos, uma vez, que na avaliação bifidogênica esta concentração estimulou o crescimento das linhagens) denominados assim de MRS+FOS (frutooligossacarídeos, Orafiti), MRS+YA (yacon, Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP) e MRS+GOS; sendo o GOS sintetizado por β -galactosidase de *Scopulariopsis sp.* (Laboratório de Bioaromas DCA/FEA/UNICAMP), e o meio controle MRS sem fonte de dextrose. As linhagens probióticas foram incubadas a 37°C por 24 horas em condições de anaerobiose. Após a fermentação dos substratos estes foram utilizados no teste de avaliação antagônica.

2.3. Dosagem de ácido láctico

A dosagem de ácido láctico foi determinada por espectrofotometria. O ácido láctico foi extraído da solução fermentada suplementada com diferentes prebióticos (MRS sem fonte dextrose, MRS+Yacon, MRS+FOS e MRS+GOS); a extração foi realizada de acordo com o método descrito por Silva (1981) com adaptações. Foi utilizado cloreto de bário (9, 88%), hidróxido de sódio (0, 66 N) e sulfato de zinco, em seguida a dosagem de ácido láctico foi determinada por espectrofotometria a 425nm, utilizando cloreto férrico como reativo de cor.

O padrão para a curva de referência foi o lactato de lítio a 1%. A coleta para a dosagem do ácido láctico foi realizada nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas. As amostras foram avaliadas, quanto aos valores de pH através do uso de um pHmetro (Q400AS-QUIMIS, 2011) calibrado com tampão a pH 4,0 e 7,0 (MENEZES, 2007). Os dados estatísticos foram tratados no programa Statistica 7.0

2.4. Reativação das linhagens patogênicas

Para a avaliação do efeito antagônico bacteriano foram utilizadas cepas de micro-organismos patogênicos: *Escherichia coli* ATCC 1785, *Staphylococcus aureus* ATCC 5536, *Salmonella choleraesius* ATCC 1785, e *Yersinia enterocolitica* ATCC 2345, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre-MG. As culturas foram mantidas em ágar nutriente a -20°C.

As cepas bacterianas foram reativadas em caldos específicos por três passagens consecutivas sendo *E.coli* ATCC 1785 em caldo lactosado, *Staphylococcus aureus* ATCC 5536 em caldo nutriente com 30% NaCl, *Salmonella choleraesius* ATCC 1785 em Caldo Base Selenito, e *Yersinia enterocolitica* em Caldo Base Yersinia com 0,5% de dexosilato de sódio, por 24 horas a 37°C. E em seguida foi realizada coloração de Gram para confirmação da pureza das linhagens bacterianas. Também foi realizada teste de catalase (produção de catalase verificada pela adição de peróxido de hidrogênio nas lâminas), o teste de oxidase utilizando fitas para determinação de oxidase (PROBAC), sendo catalase positiva (alteração para cor rósea) e catalase negativa (não há alteração de cor).

2.5. Avaliação antagônica pelo método de difusão em ágar (*Distafusion test*).

Foram inoculadas 200µl de suspensão bacteriana patogênica em 20 ml de meio de cultura específico, sendo *Escherichia coli* ATCC 1785 em ágar EMB, *Staphylococcus aureus* ATCC 5536 em ágar Manitol Salt, *Salmonella choleraesius* ATCC 1785 em ágar EMB, e *Yersinia enterocolitica* ATCC 2345 no ágar TSB com 0,5% de dexosilato de sódio. Após solidificação do meio de cultura, discos de papel filtro (10 mm de diâmetro) foram impregnados com 200µl de caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe) contendo os probióticos e os oligossacarídeos, fermentados por 24 horas.

As placas foram incubadas a 37°C por 12 horas e a determinação do antagonismo foi feita por meio da medida do halo de inibição, que é a distância entre o disco e formação de colônias.

O sistema controle foi feito com adição de 3g NaOH /L de meio de cultura, para inibição dos ácidos produzidos no efeito simbiótico (POPPI, 2005). E deste modo comparar se o efeito antagônico está relacionado ou não com questão simbiótica e a produção de ácidos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Reativação dos micro-organismos

A reativação dos micro-organismos probióticos *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), foi positiva apresentaram morfologia característica, o que foi comprovada pela coloração de Gram, e ao teste de catalase (produção de catalase verificada pela adição de peróxido de hidrogênio nas lâminas), que também apresentaram como catalase-negativa.

Já a reativação dos micro-organismos patogênicos também foi positiva. A confirmação das linhagens ocorreu por meio do cultivo em meios de culturas seletivos, pela coloração de Gram e pelos testes de catalase e oxidase (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados de provas bioquímicas realizadas com as linhagens patogênicas.

Linhagens patogênicas	Catalase	Oxidase
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1785	+	—
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5536	+	—
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 2345	+	—
<i>Salmonella choleraesius</i> ATCC 1785	+	—

3.2. Dosagem de ácido láctico e acidificação do meio

As análises dos dados da dosagem revelaram que a produção de ácido láctico ocorreu em todos os substratos e linhagens probióticas, e que quanto maior o tempo de fermentação maior a produção deste ácido (Figura 2 e 3).

Analizando a curva padrão de lactato de lítio através da regressão linear o modelo pode ser considerado ajustado, com um coeficiente de determinação $R^2=0,96$ (Figura 1).

A produção de ácido láctico foi maior para o tratamento usando galactooligossacarídeo, para ambas as linhagens *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05), se comparado com o frutooligossacarídeo e Yacon. Nota-se que os valores de ácido láctico acompanham o decréscimo do pH, ou seja, está estritamente ligado com a acidificação do meio (Figura 4 e 5). O micro-organismo *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) produziu em 24 horas de fermentação 52,34 g.L⁻¹ de ácido láctico, enquanto que o micro-organismo *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) produziu em 24 horas de fermentação 36,21 g.L⁻¹ de ácido láctico, o que já era esperado, uma vez que, o gênero Lactobacilos são os melhores produtores de ácido láctico .

Os resultados mostram que a suplementação de oligossacarídeos no meio MRS estimulou a produção do ácido láctico, quando comparado ao tratamento controle MRS sem fonte de dextrose.

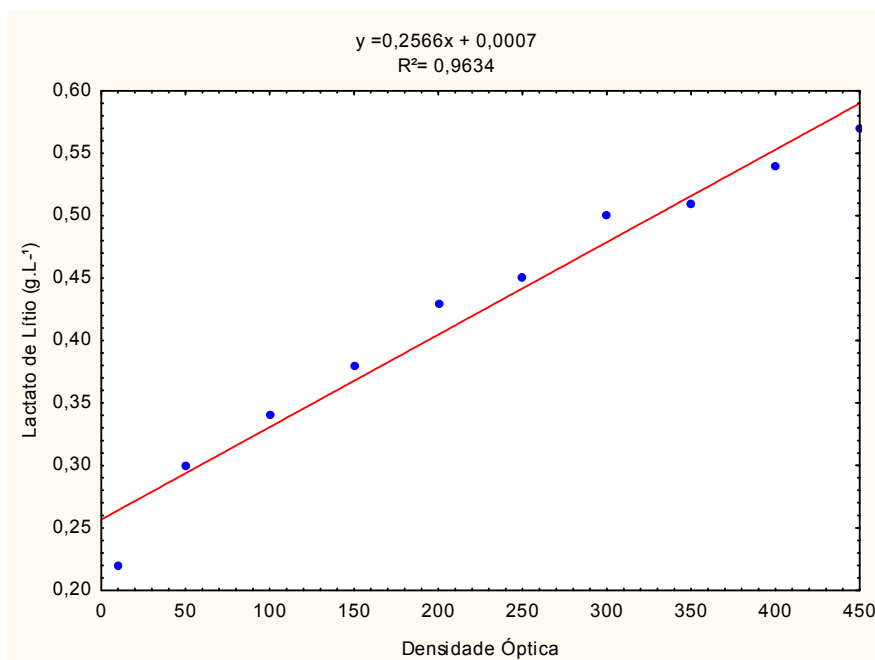


Figura 1: Curva de padrão para estimar a concentração de ácido láctico.

A quantidade de ácido láctico produzido foi semelhante ao estudo de Oliveira e Sousdaleff (2009) que obtiveram ótimos valores de produção de ácido láctico usando *Lactobacillus casei* em substrato de melaço-de-cana em diferentes concentrações, valores de até 58,86 g.L⁻¹ após 24 horas de fermentação.

Haully (2003), usando também melaço de cana e *Lactobacillus curvatu*, obteve uma produção de ácido láctico de 30,5 g.L⁻¹ de ácido, e usando MRS como controle produziu 32,6 g.L⁻¹ em 48 horas a 37°C.

Oliveira (2000) usando melaço-de-cana tratado com a enzima invertase e o micro-organismo *Lactobacillus curvatus*, obteve valores de 34 e 35,2 g.L⁻¹ de ácido láctico em fermentação contínua a 37°C.

Segundo Gottschalk (1986) os lactobacilos produzem quase que exclusivamente ácido láctico a partir da degradação da glicose (a taxa de 1,8 mol/mol de glicose), e as bifidobactérias produzem mais acetato que ácido láctico.

No estudo de Kajiwara *et. al* (2002) foi avaliado a capacidade bifidogênica, produção de ácido láctico e ácido acético por *Bifidobacterium spp*, em meio suplementado com mel, FOS e GOS; os substratos estimularam eficazmente a produção dos ácidos e o crescimento do micro-organismo.

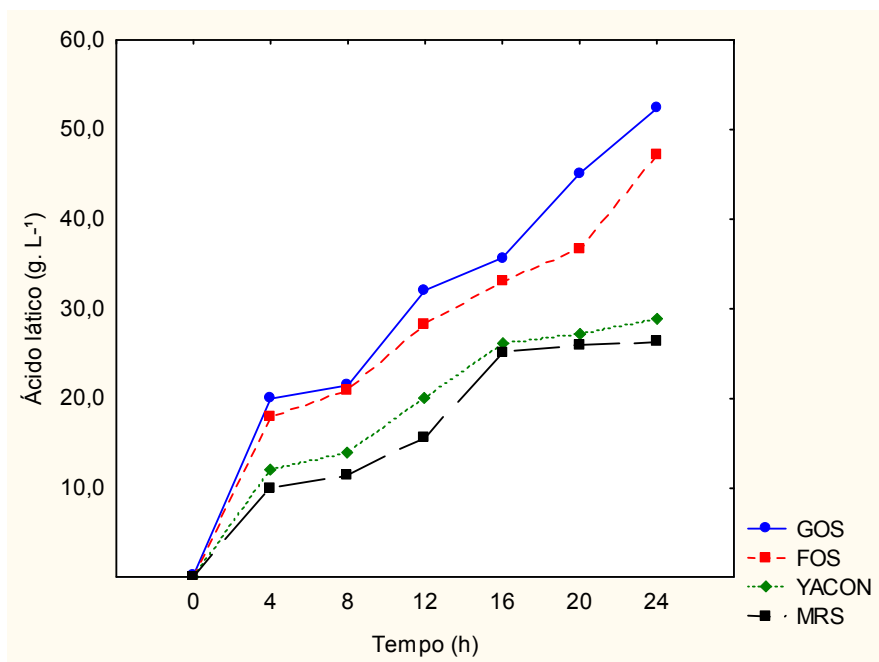


Figura 2: Produção de ácido láctico por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com oligossacarídeos, durante 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

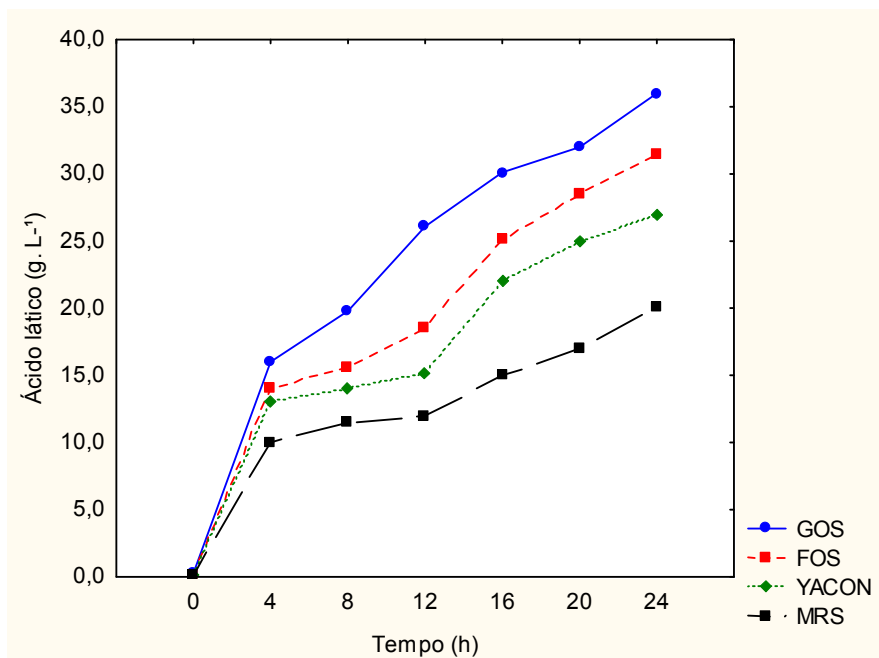


Figura 3: Produção de ácido láctico por *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) em meio MRS suplementado com oligossacarídeos, durante 24 horas a 37°C em condições de anaerobiose.

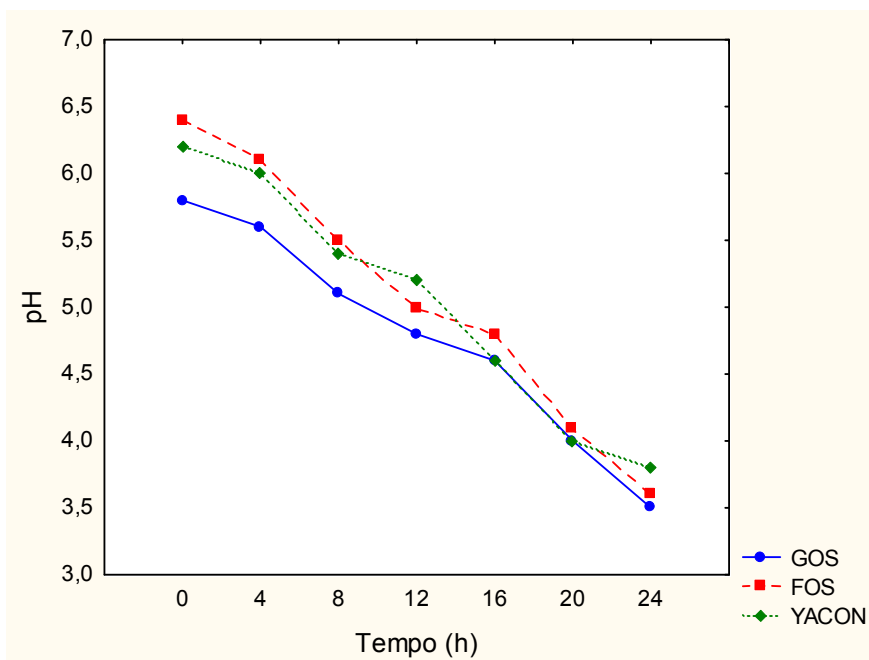


Figura 4: Valores de pH resultantes da fermentação em 24 horas das linhagens de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com FOS, GOS e Yacon a 37°C em condições de anaerobiose.

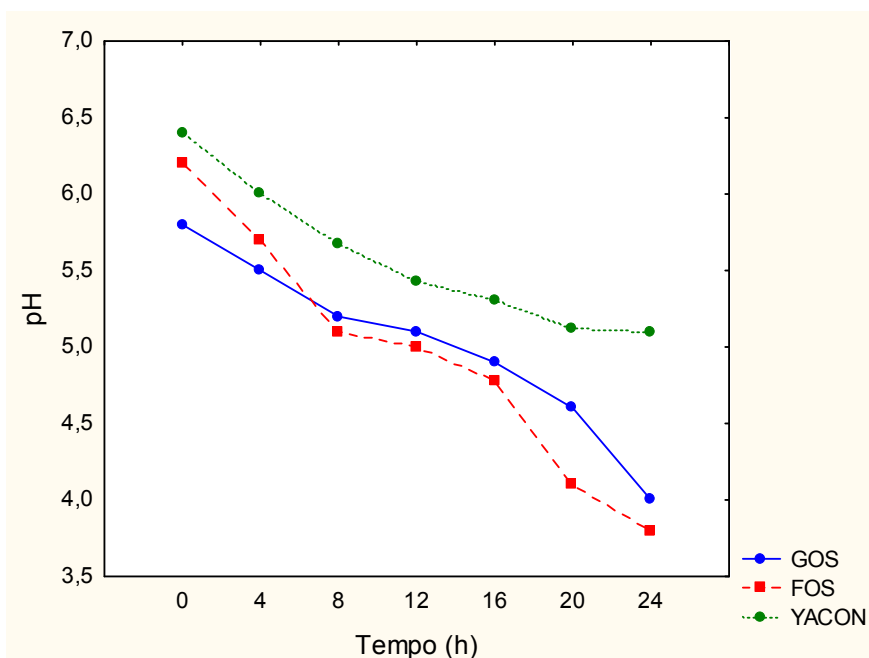


Figura 5: Valores de pH resultantes da fermentação em 24 horas das linhagens de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) em meio MRS suplementado com FOS, GOS e Yacon a 37°C em condições de anaerobiose.

3.3. Avaliação antagônica pelo método de difusão em ágar (*Distafusion test*).

O antagonismo das linhagens *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) e *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) sobre as linhagens patogênicas foi positiva para GOS, FOS e Yacon. Houve a formação de halos de inibição em torno do disco contendo a solução inibitória (Figura 6 e 8).

O tratamento com *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) usando o Yacon apresentou atividade sobre as linhagens patogênicas, principalmente para *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesius* com halo de inibição de 7,1mm e 6,5mm, respectivamente (Figura 6). Não há dados consistentes na literatura científica para que se possam discutir os resultados obtidos sobre a inibição destas linhagens patogênicas usando Yacon. Há apenas estudos utilizando Yacon como alimento funcional e os resultados das pesquisas cada vez mais mostram o potencial desta aplicação.

O Yacon é um alimento rico em polifenóis (VILHENA *et. al.*, 2000), como ácidos clorogênico, ferúlico e caféico; quercetina e flavonoides como catequinas e proantocianidinas (SIMONOVSKA *et al.*, 2003). Os polifenóis possuem grande atividade antimicrobiana na maioria das plantas (RECIO, RIOS, VILLAR, 1989). Uma das possíveis causas da inibição do crescimento das linhagens patogênicas pode ter ocorrido por estas substâncias.

Os demais substratos GOS e FOS também apresentaram atividade antagônica para todas as bactérias patogênicas, porém em níveis mais baixos que o Yacon, com halos menores de 3,5mm.

Zinedine e Faïd (2007) avaliaram *in vitro* através do método de difusão em ágar as linhagens de *B. bifidum*, *B. longum* e *B. infantis* quanto à capacidade antagônica sobre bactérias patogênicas *L. monocytogens*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. aureus*, obteve resultados de inibição de halos de 1,5 a 3,2 mm, os melhores valores de inibição foram para *L. monocytogens*.

A capacidade inibitória das bifidobactérias sobre patógenos se dá principalmente devido à produção de acetatos, os quais apesar de serem produzidos em menores concentrações do que o ácido láctico possui um efeito inibitório mais definido, uma vez que sua constante de dissociação é maior do que a do ácido láctico (PIARD e DESMAZEAUD, 1991).

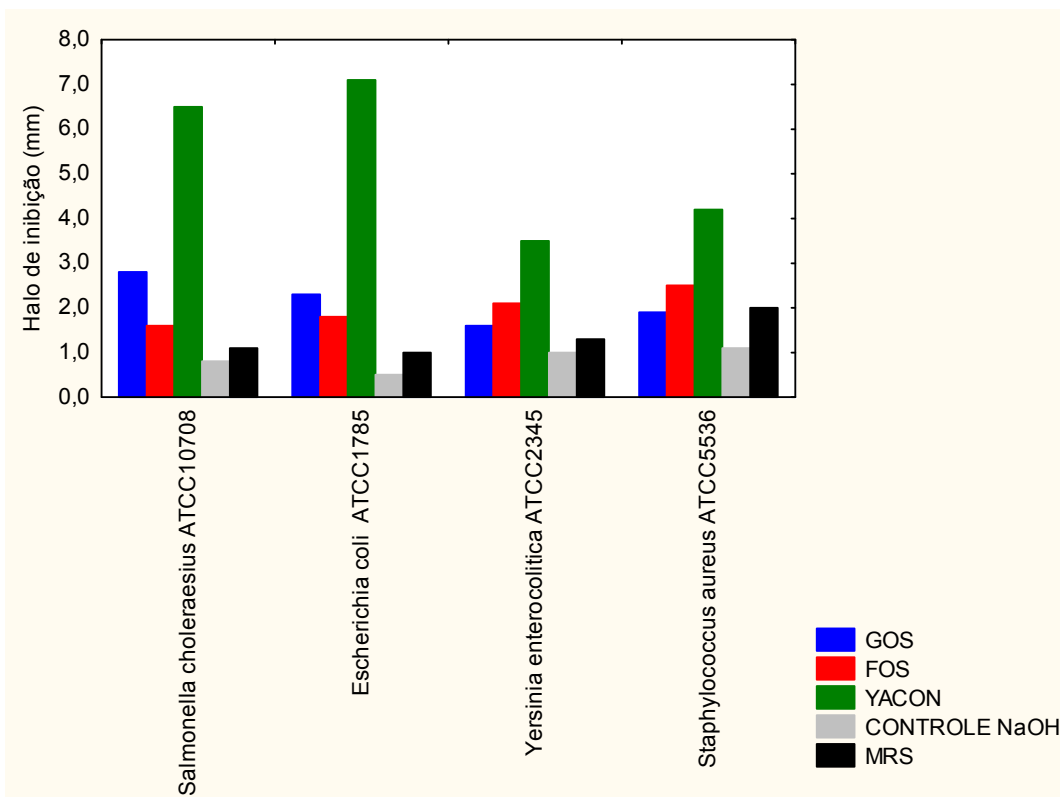


Figura 6: Avaliação antagônica de *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) cultivada em oligossacarídeos (GOS 100g, FOS 100g, Yacon 100g) sobre linhagens patogênicas. **Controle:** Meio MRS adicionado de 3g /L de NaOH.

Searle *et al* (2010) usou GOS sintetizado por galactosidase de *Bifidobacterium bifidum* na redução da adesão e crescimento de *Salmonella typhimurium*. O resultado revelou que o GOS inibiu a adesão e o crescimento do micro-organismo patogênico.

No tratamento com *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) cultivado em oligossacarídeos o antagonismo ocorreu sobre todas as linhagens patogênicas (Figura 8), sendo que o Yacon foi o que se mostrou mais eficaz dos substratos com halo de inibição de 6,2 mm para *Salmonella choleraesius* e 7,0mm para *E. coli*.

A solução fermentada de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em substrato GOS se mostrou eficaz principalmente sobre *Salmonella choleraesius* com halo de inibição de 3,5mm; já com o substrato FOS o maior halo de inibição foi de 2,8mm para *E. coli* e 2,3 para *Staphylococcus aureus* (Figura 7).

Garcia (1999) obteve resultados de inibição por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) frente a duas linhagens de *E. coli* de origem humana e duas cepas de origem suína.

Mangoni *et al* (2011) isolou 16 linhagens de lactobacilos de origem suína e avaliou sua capacidade para inibir o crescimento de *E.coli* através do método de difusão em ágar. Apenas três isolados foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*.

Redondo (2008) analisou a capacidade antagônica de linhagens probióticas *E. faecium* e *L. helveticus* ssp *jugurti* sobre as linhagens patogênicas *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes*, e *Salmonella enteritidis*, através do método de *spot-on-the-lawn* (semelhante ao de difusão em ágar) e obteve resultados em que as linhagens probióticas não inibiram o crescimento das linhagens patogênicas.

No estudo de Pereira (2007) foi avaliada a capacidade antagônica de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, os valores de inibição foram positivos com halos de inibição de 14,75mm e 15,0mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente.

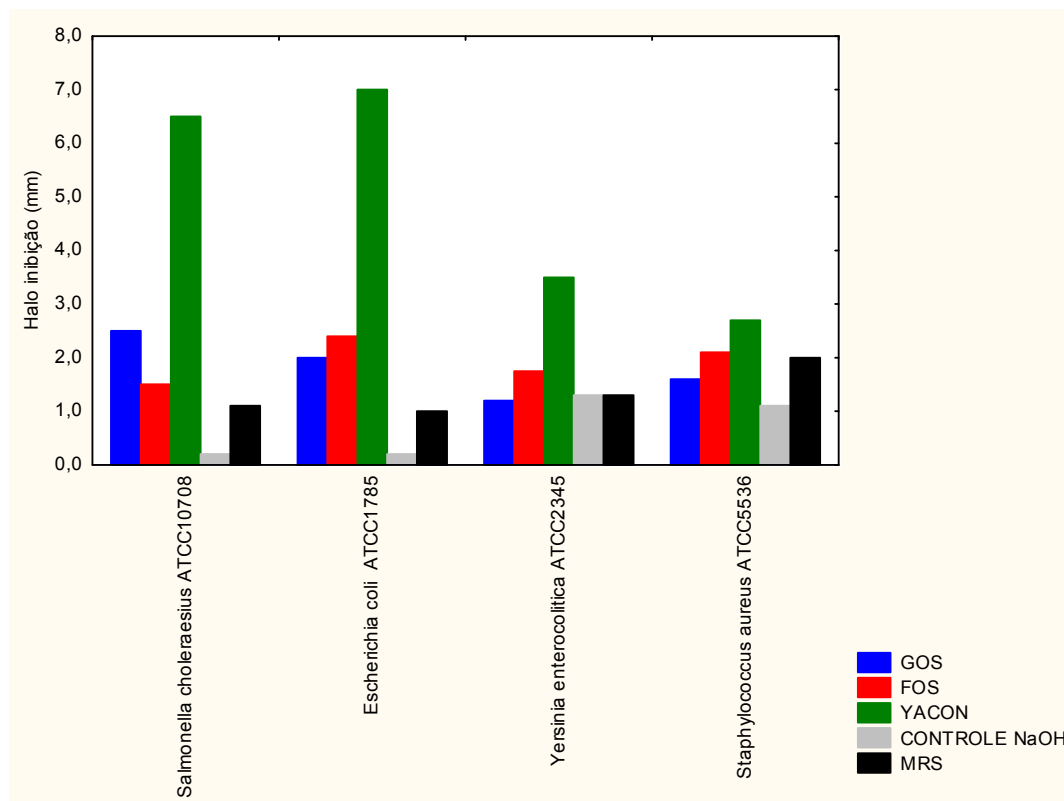


Figura 7: Avaliação antagônica de *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) cultivado em oligossacarídeos (GOS 100g, FOS 100g, Yacon 100g) sobre linhagens patogênicas. **Controle:** Meio MRS adicionado de 3g /L de NaOH.

O tratamento controle (meio MRS) foi adicionado de uma base NaOH, para neutralizar a solução e deste modo avaliar se há uma ação direta ou não dos ácidos produzidos sobre o antagonismo. Observando as figuras 6 e 7 pode-se perceber que o tratamento controle apresentou baixos valores de inibição se comparado aos demais tratamentos; confirmando desta maneira que os ácidos possuem ação sobre o antagonismo bacteriano.

A atividade antimicrobiana dos ácidos láctico e acético é devido ao fato de que estes ácidos, quando na forma não dissociada, atravessam a membrana celular microbiana reduzindo o pH dentro da célula, o que irá interferir nas funções metabólicas, como a translocação de substratos e a fosforilação oxidativa (NARDI *et al.*, 1999).

Tejero-Sariñena (2012) avaliou a atividade antagônica de linhagens de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus* através do método de difusão em ágar, avaliou também a relação entre os ácidos produzidos

e a ação antagônica através da neutralização dos ácidos, sobre as linhagens patogênicas de *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium difficile*; os resultados revelaram que a neutralização reduziu o efeito antagônico.

Os resultados da pesquisa de Tejero-Sariñena (2012) fortalecem os resultados obtidos neste estudo que os oligossacarídeos potencializam o efeito antagônico e que a produção de ácidos pelas linhagens probióticas tem papel fundamental nesta inibição contra patógenos.

Na pesquisa de Keersmaecker *et al.* (2006) a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus rhamnosus* GG contra *S. Typhimurium* foi mediada pelo ácido láctico também.

Os ácidos orgânicos podem ser um dos principais mecanismos que medeiam à atividade antimicrobiana (TEJERO-SARIÑENA, 2012).

4. CONCLUSÃO

Foi possível observar neste estudo que as linhagens probióticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) possuem antagonismo sobre as cepas patogênicas, e que o cultivo em substrato contendo oligossacarídeos estimulou esta ação antagônica.

Observou-se que houve a produção de ácido láctico durante a fermentação, e que os oligossacarídeos GOS e FOS foram bons substratos para a linhagem *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) produzir o ácido láctico. E ainda que a acidificação do meio ocorreu paralelamente com a produção do ácido láctico.

Analizando o tratamento controle realizado com a neutralização do substrato através da adição de NaOH, para ambas linhagens probióticas observa-se que os halos de inibição sobre as linhagens patogênicas foram menores em relação aos demais tratamentos. Este resultado indica que os ácidos podem exercer papel fundamental na inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos.

Os resultados utilizando o substrato Yacon (extrato bruto) onde houve grande inibição sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis* indicam que mais estudos devem ser realizados avaliando este potencial antimicrobiano, e se há uma relação direta com os frutanos ou compostos fenólicos do Yacon nesta inibição.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. p.1-66. SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. AND OUWEHAND, A. (ed.), 3rd edition Marcel Dekker, New York. 2004.

ASAHARA, T., NOMOTO, K., WATANUKI, M., YOKOKURA, T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, p.1751–1760, 2001.

BERNET, M. F., BRASSART, D., NEESER, J. R., SERVIN, A. L. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen–cell interactions. **Appl. Environ. Microbiol**, v.59, p.4121–4128, 1993.

BERNET, M. F., BRASSART, D., NEESER, J.R. SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, v.35, p.483–489, 1994.

BRUCE, A.W. AND REID, G. Intravaginal instillation of *lactobacilli* for prevention of recurrent urinary tract infections. **Can. J. Microbiol**, v.34, p.339–343, 1988.

CADIEUX, P., BURTON, J., GARDINER, G., BRAUNSTEIN, I., BRUCE, A.W., KANG, C.Y., REID, G. *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. **JAMA**, v.287, p.1940–1941. In: **Can. J. Microbiol**, v.34, p.339–343, 2002.

CHAN, R. C., REID, G., IRVIN, R. T., BRUCE, A. W., COSTERTON, J. W. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. **Infect. Immun**, v.47, p.84–89, 1985.

COCONNIER, M. H., BERNET, M. F., CHAUVIERE, G., SERVIN, A. L., Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. **J. Diarrhoeal Dis. Res**, v.11, p.235–242, 1993.

CREMONINI, F., DI CARO, S., COVINO, M., ARMUZZI, A., GABRIELLI, M., SANTARELLI, L., NISTA, E. C., CAMMAROTA, G., GASBARRINI, G., GASBARRINI, A. Effect of different probiotic preparations on anti-*Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. **Am. J. Gastroenterol**, v.97, p.2744–2749, 2002.

DIDIERLAURENT, A., SIRARD, J. C., KRAEHENBUHL, J. P., NEUTRA, M. R. How the gut senses its content. **Cell. Microbiol**, v.4, p.61–72, 2002.

EKLUND, T. The effect of sorbic acid and esters of para-hydrobenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. **Journal Gen. Microbiol.**, v.131, p.73–76. 1985.

FORESTIER, C., DE CHAMPS, C., VATOUX, C., JOLY, B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Res. Microbiol**, v.152, p.167–173, 2001.

GARCIA, S. **Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para o uso como probiótico**. Londrina 1999. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

GOPAL, P. K., PRASAD, J., SMART, J., GILL, H. S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Int. J. Food Microbiol**, v.67, p.207–216, 2001.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial metabolism**. 2nd ed. New York: Springer Verlag,. 380p. 1986

HAULY, M. C. O, OLIVEIRA, A. R., OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.1, p.133-142, jan./jun., 2003.

JIN, L. Z., HO, Y. W., ABDULLAH, N., ALI, M. A., JALALUDIN, S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p. 67-71, 1996.

KAJIWARA, S., GANDHI, H., USTUNOL, Z. Effect of honey on the growth of and acid production by human Intestinal *Bifidobacterium* spp.: An *in vitro* commercial oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Protection**, v.65, n.1, p.214–218, 2002.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**. v.3, p.15-190, 1997.

KEERSMAECKER, S. C. J., VERHOEVEN, T. L. A., DESAIR, J., MARCHAL, K., VANDERLEYDEN, J., NAGY, I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiol Lett**, v.259, p.89-96, 2006.

LEE, Y. K., PUONG, K. Y. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate. **Br. J. Nutr**, v.88 (Suppl. 1), 2002.

LEHTO, E. M., SALMINEN, S. J. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* GG spent culture supernate: only a pH effect. **FEMS. Immunol. Med. Microbiol**, v.18, p.125–132, 1997.

LIEVIN-LE MOAL, V., AMSELLEM, R., SERVIN, A. L., COCONNIER, M. H. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a

diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. **Gut**, v.50, p.803–811, 2002.

MACK, D. R., MICHAIL, S., WEI, S., MCDOUGALL, L., HOLLINGSWORTH, M. A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. **Am. J. Physiol**, v.276, p.941–950, 1999.

MADI, L., Prebióticos e Probióticos. **Revista Food Ingredients**, n.1, p.29, jan./fev., 2008.

MANGONI, K. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína**. 68f. Paraná. 2009. Tese (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual do Oeste do Paraná; 2009.

MARTINS, A. R., BURKERT, C. A. V. Galacto-oligossacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Braz. J. Food Technol.**, v.12, n.3, p.230-240, jul./set. 2009.

MENEZES, C. R. **Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos**. 2007. 167f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2007.

MICHETTI, P., *et. al.* Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. **Digestion**, v.60, p.203–209, 1999.

MITSUOKA, T. Intestinal Bacteria and Health. **Harcourt Brace Javanovich Japan Inc.** Tokyo, 1978.

NARDI, R. D., COSTA SANTOS, A. R. M., CARVALHO, M. A. R., FARIAS, L. M., BENCHETRIT, L. C., NICOLI, J. R. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus sp.* isolated from the rat fecal microbiota. **Anaerobe**, v.5, p.409-411, 1999.

NICAISE, P., *et. al.* The intestinal microflora regulates cytokine production positively in spleen-derived macrophages but negatively in bone marrow-derived macrophages. **Eur. Cytokine Netw**, v.10, p.365–372, 1999.

OLIVEIRA, A. R., BUZATO, J. B., OLIVEIRA, A. S., HAULY, M. C. O. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus*, em fermentação contínua, utilizando melaço de cana-de-açúcar previamente tratado com invertase. **Revista Científica da UNOPAR**, Londrina, v.2, n.2, p.1-7, 2000.

OLIVEIRA, R.F., SOUSDALEFF, M., LIMA, M. V.S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Braz. J. Food Technol.**, VII BMCFB, junho/2009.

OUWEHAND, A. C, VESTERLUND, S. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen S, Ouwehand A, von Wright A (eds.), **Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects**, 3rd ed. Marcel, Dekker, New York. 375–395, 2004.

PEREIRA, G. V., *et. al.* Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PEREZ, P. F., *et. al.* Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *lactobacilli*: an in vitro study. **Appl. Environ. Microbiol**, v.67, p.5037–5042, 2001.

PIARD, J.C., DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism and products. **Lait**, v.71, p.525-541, 1991.

POPPI, L. B. Nota prévia: Avaliação do efeito Antagônico de espécies de *Lactobacillus* sobre *Escherichia Coli* 0157:H7 e *Listeria monocytogenes*. **Braz. J. Food Technol.**, v. 11, n. 2, p. 113-119, abr./jun. 2008

RECIO, M. C., RIOS, J. L., VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature in 1978-1988. **Phytother. Res.**, v.3, n.4, p.117-125, 1989.

REDONDO, N. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.** Araraquara, 2008. 109f. Tese (Mestrado em Alimentos e Nutrição) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP.

REID, G., COOK, R. L., BRUCE, A. W. Examination of strains of *lactobacilli* for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. **J. Urol.** v.138, p.330–335, 1987.

RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. **J Appl Bacteriol.**, v. 73, p.363–370, 1992.

SALMINEN, S., DEIGHTON, M. Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states. **Dig. Dis**, v.10, p.227–238, 1992.

SANTOS, A., SAN MAURO, M., SANCHEZ, A., TORRES, J.M., MARQUINA, D. The antimicrobial properties of diferente strains of *Lactobacillus spp.* isolated from kefir. **Syst. Appl. Microbiol**, v.26, p.434–437, 2003.

SANTOS. R. **Produção e aplicação do prebiótico galactoligossacarídeo como alimento funcional: estudos *in vitro* e *in vivo*.** 2010. 155f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; Campinas. 2010.

SEARLE, L. E. J. *et. al.* Purified galactooligosaccharide, derived from a mixture produced by the enzymic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* adhesion and invasion *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.1428–1439, 2010.

SILVA, J. D. **Análise de alimentos** (Métodos químicos e biológicos). Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1981. 166p.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENESEK, S.; VALENTOVA, K.; ULRICHOVA, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography**, v.1016, n. 1, p. 89- 98. 2003.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.405–440, 2004.

SERVIN, A.L., COCONIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research**, v.17, p.741-754, 2003.

STEER, T., CARPENTER, H., TUOHY, K., GIBSON, G. R. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro-and prebiotics. **Nutr Res Rev**, v.13, p.229-254, 2000.

SULLIVAN, A., NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.20, p.313–319, 2002.

TEJERO-SARIÑENA, S., BARLOW, J., COSTABILE, A., GIBSON, G. R., ROWLAND, I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v.18, p.530-538, 2012.

TUOMOLA, E. M., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v.26, p.137–142, 1999.

VILHENA, S. M. C., CÂMARA, F.L., KADIHARA, S.T. O cultivo do yacon no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.18, n.1, p.5-8, 2000.

ZINEDINE, A., FAID. M., Isolation and Characterization of Strains of Bifidobacteria with Probiotic Proprieties *In vitro*. **World J. Dairy e Food Sci.**, v.2 n.1, p.28-34, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

Os micro-organismos agem benéficamente na microbiota intestinal, contribuindo para manter a simbiose.

A simbiose entre bactérias probióticas e oligossacarídeos resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, caracterizando uma melhor qualidade de vida.

Os substratos MRS+GOS e MRS+FOS estimularam a bifidogênia para as linhagens LA-05 e Bb-12; o extrato bruto de yacon apresentou baixa atividade quando comparado com os outros substratos. O aumento da concentração de oligossacarídeos no meio diminuiu a contagem de probióticos, caracterizando que a atividade bifidogênica é dependente da Aw presente no meio.

A aderência microbiana na mucosa intestinal está ligada ao perfil de hidrofobicidade da membrana celular, quanto mais hidrofóbica e ácida a membrana celular maior o potencial de adesão da bactéria. O estudo revelou que os oligossacarídeos GOS e FOS estimularam o perfil de adesão e acidez da membrana celular das linhagens probióticas estudadas, quando comparado com o controle meio MRS sem fonte de dextrose.

A produção de EPS por *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) em meio MRS suplementado com oligossacarídeos foi eficaz. O galactooligossacarídeo estimulou mais a produção se comparado com o frutooligossacarídeo. E que alterações bruscas de pH podem interferir na produção destes EPS.

As linhagens probióticas *Lactobacillus acidophilus* (LA-05) e *Bifidobacterium animalis* (Bb-12) possuem antagonismo sobre as cepas patogênicas, e que o cultivo em substrato contendo oligossacarídeos estimulou a ação antagônica, e também a produção de ácidos. O extrato bruto de yacon apresentou maior ação antagônica sobre os micro-organismos patogênicos quando comparado com os demais tratamentos. Estudos devem ser desenvolvidos com a finalidade de investigar as propriedades antimicrobianas dos FOS extraídos do yacon.

Mais pesquisas são necessárias para avaliar o comportamento simbiótico das linhagens probióticas na presença de oligossacarídeos. E também a

produção de EPS produzidos por bactérias lácticas e sua aplicação como alimento funcional.

ANEXOS

Apresentações em forma de pôster. Evento: **16° IUFOST, Word Congresses of Food Science and Technology**. Foz do Iguaçu, Brasil: 2012.



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled

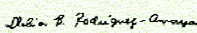
PRODUCTION, EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF EXOPOLYSACCHARIDES IN LIQUID MEDIUM ENRICHED WITH PREBIOTIC GALACTOOLIGOSACCHARIDES SYNTHESIZED BY THE ENZYME -GALACTOSIDASE SCOPULARIOPIS SP.

authored by

Adami, A. A. V.; Santos, R.; PASTORE, G.M.; Silvério, M.T

was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology"**, held at Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.


Gláucia Maria Pastore
Chair


Delia B. Rodriguez-Amaya
Scientific Committee Chair


FUNDACÃO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO


LAMET


ATACTUS


IUFOST

e7e2.3a00 4705.0901 f1bc.3a20 f6a5.0c59



Certificate of Appreciation

16th IUFOST | World Congress of Food Science and Technology

We certify that the paper entitled

EVALUATION OF SUPPLEMENTATION PREBIOTCS ON LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS METABOLISM FOR THE PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDES

authored by Silvério, M.T; Adami, A. A. V.; Santos, R.; PASTORE, G.M

was presented in the Poster Session at the **16th World Congress of Food Science and Technology : "Addressing Global Food Security and Wellness through Food Science and Technology"**, held at Foz do Iguaçu, Parana, Brazil, on August 5 - 9, 2012.


Gláucia Maria Pastore
Chair


Delia B. Rodriguez-Amaya
Scientific Committee Chair


FUNDACÃO DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO


LAMET


ATACTUS


IUFOST

9935.0930 f383.20d1 111a.5831 fd47.0ec5