

Fermentação de *Lactobacillus plantarum* em soro de tofu para produção de exopolissacarídeos

Alceu Alves Azambuja

Trabalho apresentado à disciplina BIO7016 – Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito para conclusão do Curso de Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: Márcio José Rossi

COORIENTADOR: Carla Maísa Camelini

Florianópolis
2014

Azambuja, A.A.

Fermentação de *Lactobacillus plantarum* para produção de exopolissacarídeos [TCC]. Alceu Azambuja; Orientador, Márcio José Rossi - Florianópolis, SC, 2014.

58 p.

Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas.

1. Bactéria ácido láctica. 2. Cultivo submerso. 3. Concentração. 4. Nanofiltração I. Rossi, Márcio José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Curso de Ciências Biológicas. III. Fermentação de *Lactobacillus plantarum* para produção de exopolissacarídeos.

Alceu Alves Azambuja

Fermentação de *Lactobacillus plantarum* em soro de tofu para produção de exopolissacarídeos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2014.

Profa Dra Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA

Dr. Márcio José Rossi
Presidente

Dr. José Miguel Müller
Examinador

MSc. Douglas Henrique Cardoso Cortez
Examinador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que participaram de minha jornada acadêmica.

Aos grupos SIMBIOSIS, AISEC Florianópolis, ao DMS, a FEJESC, a Liga Empreendedora Florianópolis, a Voe Ideias e a Agência Veterana.

Aos meus amigos Bia, Vandy, Bidu, Benito, Thiago, Renato, Cris, João, Brunão, Leticia, Uchoa, Fran, Ana e Fe. Aos meus irmãos e camaradas da Frat. πkAu Gustavo, Raphael, Lucas, Luan e Ziemath.

E um agradecimento muito especial à Carla, que colaborou com todo seu conhecimento e paciência na produção deste trabalho, à minha mãe Valquiria que teve a sorte de ter um filho como eu, minha irmã Karine que apesar dos pesares nos damos bem, ao meu padrasto Tio Sérgio que a mais de 10 anos é meu paizão e à minha afilhada Iris.

Resumo

Os alimentos funcionais podem trazer benefícios fisiológicos específicos, além da propriedade de alimentar e nutrir, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis, como os probióticos e prebióticos. Dentre os probióticos está o *Lactobacillus plantarum*, que pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL). A obtenção de energia desses microrganismos ocorre pela fermentação de carboidratos produzindo ácido láctico, e também exopolissacarídeos (EPS) no meio de cultivo. Os EPS apresentam aplicações tecnológicas consideráveis, que se destacam em setores da indústria de alimentos, sendo amplamente utilizados por suas propriedades prebióticas. Para explorar a obtenção dos EPS foi estabelecido um processo de produção de biomassa de *L. plantarum* em biorreator *Airlift* com controle das variáveis de processo, que permitiu a padronização dos EPS obtidos. O cultivo foi realizado em dois substratos líquidos, meio MRS e soro de tofu suplementado (STS), inoculado em um escalonamento de 10% do volume final. Para concentração dos EPS empregou-se a técnica de nanofiltração e para a separação foi realizada precipitação com etanol. O cultivo controlado em biorreator permitiu obter um rendimento em biomassa de 2,7 g.L⁻¹ e 3,2 g.L⁻¹, de EPS de 210 mg.L⁻¹ e 350 mg.L⁻¹ nos meios MRS e STS, respectivamente. No processo de nanofiltração a 35 °C e 6 bar foi obtido o extrato concentrado no final do processo com FRV 4,0 e aumento de 80 % dos teores de EPS presentes no concentrado. Verificou-se que a maior parte da resistência ao fluxo foi causada pela camada polarizada de 59,37 %, seguida da resistência pela membrana de 39,8 %, enquanto a resistência devido ao *fouling* foi responsável por apenas 0,83 % da resistência total. Verificou-se que a utilização de soro de tofu

incrementou a produção de EPS e a nanofiltração foi eficiente para a concentração de compostos prebióticos a partir do cultivo de *L. plantarum*.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas, cultivo submerso, nanofiltração, concentração

Abstract

Functional foods can have specific physiological benefits, in addition to the property of feed and nurture, thanks to the presence of physiologically healthy ingredients, such as prebiotics and probiotics. Among the probiotic ones is *Lactobacillus plantarum*, a bacteria belonging to lactic acid bacteria (LAB) group. In these microorganisms, energy obtention happens by fermenting carbohydrates into lactic acid and exopolysaccharides (EPS) on culture media. EPS present considerable technological applications that stand out in food industry, being widely used for its prebiotic properties. In order to explore EPS obtention a biomass production process for *L. plantarum* was set up in an airlift bioreactor, with process control, allowing EPS production standardization. Cultivation was performed in two liquid substrates, MRS medium and supplemented tofu whey (STS), inoculated in a scaling of 10% of the final volume. For EPS concentration, a nanofiltration technique was used and for separation ethanol precipitation was used. Controlled cultivation in bioreactor allowed for yield values of 2.7 g.L⁻¹ and 3.2 g.L⁻¹ (biomass) and 210 mg.L⁻¹ and 350 mg.L⁻¹ (EPS) in MRS and STS, respectively. At the end of the nanofiltration process at 35°C and 6 bar, a concentrated extract was obtained with VRF 4.0 and an 80 % increase on EPS content. It was verified that most of flow resistance was caused by the polarized layer (59.37 %), followed by membrane resistance (39.8 %), while fouling resistance was responsible for only 0.38% of total resistance. Thus, it was observed that supplemented tofu serum increased EPS production and nanofiltration process was efficient for concentration of these prebiotic compounds from *L. plantarum* culture media.

Keywords: lactic acid bacterium, submerged cultivation, nanofiltration, concentration

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 Composição do soro de tofu (ST).

Tabela 2 Composição dos meios de cultura caldo nutriente (CN), Man Rogosa e Sharpe (MRS) e soro de tofu suplementado (STS).

Figura 1 Análise de parâmetros de crescimento do *L. plantarum* no meio MRS.

Figura 2 Análise de parâmetros de crescimento do *L. plantarum* no meio STS.

Figura 3 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do *L. plantarum* em biorreator *Airlift*. Meio de cultura MRS.

Figura 4 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do *L. plantarum* em biorreator *Airlift*. Meio de cultura STS.

Figura 5 Análise do μ_x e μ_{EPS} do cultivo de *L. plantarum* no meio de cultura MRS.

Figura 6 Análise do μ_x e μ_{EPS} do cultivo de *L. plantarum* no meio de cultura STS.

Figura 7. Decaimento do fluxo ao longo do processo de nanofiltração para extrato de STS.

Figura 8 Fluxo de permeado em função da temperatura de processamento sobre a água e o extrato do cultivo de *L. plantarum* em STS.

Figura 9 Fluxo de permeado em função da pressão de processamento sobre a água e o extrato do cultivo de *L. plantarum* em STS.

Figura 10. Concentração de EPS ao longo do processo de nanofiltração em STS.

Figura 11. Média das duplicatas da concentração de EPS ao longo do processo de nanofiltração em STS.

Figura 12. Percentual de resistência no fluxo de permeado causado pela resistência total da membrana (R_t), resistência da membrana (R_m), resistência do fouling (R_f), resistência por polarização (R_p).

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivo Específico	5
3 Revisão da literatura	7
3.1 Bactérias ácido lácticas	7
3.2 Lactobacillus plantarum	8
3.3 Polissacarídeos.....	10
3.4 Soro de tofu	12
3.5 Biorreator.....	13
3.6 Nanofiltração	15
4. Material e Métodos.....	17
4.1 Microrganismo.....	17
4.2 Procedimentos de desinfecção e esterilização	17
4.3 Meios de cultura	18
4.4 Preparo do inóculo.....	19
4.5 Cultivo em biorreator Airlift.....	20
4.6 Separação das células	20
4.7 Concentração dos EPS.....	21
4.8 Precipitação e separação dos EPS.....	21

4.9 Métodos analíticos.....	22
4.9.1 Conservação das amostras	22
4.9.2 Determinação da biomassa	22
4.9.3 Determinação de glicose	23
4.9.4 Cálculo da velocidade específica de crescimento e produção de EPS	24
4.9.5 Determinação dos EPS.....	24
4.9.6 Cálculo do fator de redução volumétrica.....	25
4.9.7 Cálculo das resistências da membrana de nanofiltração.....	26
5. Resultados e Discussão.....	29
5.1 Cultivo em biorreator e estudos cinéticos.....	29
5.2 Nanofiltração	35
6. Conclusões.....	45
7. Referências	47

1. Introdução

O interesse por diferentes produtos obtidos por meio de processos biotecnológicos fermentativos utilizando microrganismos tem aumentado nos últimos anos. Entre os produtos de relevante significância estão os alimentos funcionais, nutracêuticos e os medicamentos obtidos de fontes naturais. Esses produtos podem ser obtidos pela sua extração, utilização integral dos microrganismos ou recuperação de sua biomassa principalmente na indústria.

Os alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis. As substâncias biologicamente ativas encontradas nestes alimentos podem ser classificadas como: probióticos e prebióticos.

Os probióticos são microrganismos não patogênicos que quando administrados em quantidades adequadas exercem benefícios para a saúde do hospedeiro, dentre estes incluem as bactérias ácido láticas (BAL). Essas bactérias compreendem um grupo amplo de microrganismos, mas que apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. Dentre essas características estão a capacidade de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de sabor e aroma, além dos metabólitos como o ácido lático e exopolissacarídeos (EPS).

Os EPS são fibras incluídas no grupo de prebióticos, que são definidos como ingredientes de alimentos não digeríveis que podem beneficiar o hospedeiro no sentido de selecionar a microbiota intestinal. O *L. plantarum* é

uma alternativa viável de utilização como probiótico e também como prebiótico, pois secretam elevadas quantidades de EPS no meio de cultivo.

A fermentação desses microrganismos pode ser realizada em biorreator com meios de cultura quimicamente definidos utilizados em pesquisas de laboratório. Os nutrientes ideais para composição dos meios de cultura para cultivo de BAL estão presentes na composição do meio elaborado por Man, Rogosa & Sharpe (1960), denominado MRS. Porém, em escala industrial, por razões econômicas, são utilizados substratos complexos de composição variável, subprodutos de outras indústrias. Esses substratos devem ser adaptados para o cultivo por meio de processos de extração, suplementação e balanceamento da composição do meio visando aumentar o rendimento da produção do microrganismo selecionado, utilizando experimentos de triagem previamente ao cultivo em biorreatores.

Como alternativa ao meio MRS existe o soro de tofu, originado da fabricação de “queijos” de soja, é um subproduto com baixa aplicação industrial devido ao seu elevado conteúdo de água, mas com uma quantidade considerável de sólidos totais, por esses motivos o resíduo pode ser utilizado como substrato na fermentação de *L. plantarum* e obtenção de EPS.

O potencial desses produtos vem sendo explorado pelas indústrias de alimentos, utilizando processos de separação e concentração. A separação de polissacarídeos, de acordo sua massa molar, pode ser utilizada para purificação de extratos brutos.

O processo de concentração por membranas tem sido amplamente utilizado com a finalidade de manter a alta qualidade desses compostos. Esse processo é baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas através de

membranas. A nanofiltração faz uso de membranas com menores diâmetros de poros, sendo mais eficiente na concentração dos polissacarídeos bioativos.

Nesse contexto, estudar a produção e extração de EPS em meios de cultura que aproveitem resíduos da indústria alimentícia é extremamente importante para o desenvolvimento e crescimento de setores da própria indústria alimentícia.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer processos eficientes de produção e extração de EPS de *L. plantarum* cultivada em diferentes substratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar qual meio de fermentação proporciona maior rendimento na produção dos EPS;
- Determinar parâmetros de crescimento de *L. plantarum* visando a produção de EPS;
- Concentrar o extrato EPS de *L. plantarum* por nanofiltração em condições ideais de operação;
- Realizar a extração de EPS do meio de cultivo e quantificar seu teor no concentrado e no permeado.

3 Revisão da literatura

3.1 Bactérias ácido lácticas

As BAL compreendem um grupo amplo de microrganismos, que apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. Elas não são definidas sistematicamente com base em relações evolutivas, mas sim em um grupo funcional utilizado por microbiologistas para as bactérias que são inofensivas tanto para a qualidade alimentar quanto para a saúde humana e que crescem espontaneamente fermentando alimentos (D'SOUZA et al., 2002). São bactérias Gram-positivas, no formato de cocos, bacilos ou bacilos cocóides, não esporulantes, geralmente imóveis. Pertencem a este grupo as famílias Lactobacillaceae e Streptococcaceae. A obtenção de energia desses microrganismos ocorre pela fermentação de carboidratos produzindo ácido láctico, podendo ser homo ou heterofermentativas. As homofermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose e as heterofermentativas produzem ácido láctico em menor quantidade e também produzem etanol e, em alguns casos, ácido acético e dióxido de carbono (CO₂) (FRANCO, LANDGRAF, 1996; MASSAGUER, 2005).

Embora sua principal função quanto a conversão fermentativa dos açúcares presentes nas matérias-primas seja a produção de ácido láctico, elas são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em peptídeos anti-microbianos e EPS, que se caracterizam por ser uma variedade de metabólitos de propriedades importantes com componentes de sabor e

aroma característicos, e de melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados (DE VUYST, DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002).

Os EPS produzidos por BAL apresentam aplicações tecnológicas consideráveis que se destacam em alguns setores da indústria de alimentos, sendo ainda amplamente utilizadas na produção de alimentos por suas propriedades probióticas (TORINO et al., 2005).

Dentro das BAL tem o gênero *Lactobacillus*, que tem microrganismos encontrados no intestino de seres humanos e outros animais, com seu número variando de acordo com as espécies, a idade do hospedeiro ou a localização dentro do intestino. Desses organismos apenas algumas espécies são envolvidas em processos fermentativos industriais e residem no intestino humano, sendo estas *L. crispatus*, *L. gasseri*, e *L. plantarum* (CATALOUK, GOGEBAKAN, 2004).

3.2 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma espécie de bactéria do enorme e diversificado gênero de *Lactobacillus*, que compreende cerca de 90 espécies. Por tradição os indivíduos desse gênero foram divididos em três grupos funcionais, dependendo das suas capacidades de fermentação, os obrigatoriamente homofermentativos (Grupo I), os facultativos heterofermentativos (Grupo II) e os obrigatoriamente heterofermentativos (Grupo III) (KANDLER, WEISS, 1986). Os indivíduos do Grupo I são capazes de fermentar exclusivamente hexoses em ácido lático, enquanto que os do Grupo II além de fermentarem hexoses em ácido lático são capazes de

fermentar pentoses e/ou glutamato. Já os pertencentes ao Grupo III fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono.

O *L. plantarum* é facultativa heterofermentativa e se difere das demais *Lactobacillus* spp. pois tem o genoma relativamente grande, o que indica a capacidades para se adaptar a diversas condições diferentes (KLEEREBEZEM et al., 2003). Inclui a capacidade de fermentar muitos carboidratos diferentes e uma alta tolerância ao baixo pH (DAESCHEL, NES, 1995). Isso ocorre devido ao fato do *L. plantarum* frequentemente predominarem nos alimentos de forma espontânea e também sobreviverem à passagem através das condições ácidas do estômago humano, onde o pH é geralmente inferior a 4,0 (JOHANSON et al., 1993). Essa BAL também pode possuir atividade da tanase (OSAWA et al., 2000; VAQUERO et al., 2004), e são capazes de metabolizar os ácidos fenólicos (BARTHELMEBS et al., 2000; BARTHELMEBS et al., 2001).

Essa espécie de bactéria é versátil e encontrada em uma variedade de nichos ambientais, ocorrendo frequente e espontaneamente, em número elevado, na maioria dos alimentos fermentados, especialmente quando o alimento tem como base material vegetal, por exemplo, azeitonas em salmoura (FERNÁNDEZ GONZALEZ et al., 1993), alcaparras (PULIDO et al., 2005) , chucrute (DEDICATORIA et al., 1981; PLENGVIDHYA et al., 2007), pickles (MCDONALD et al., 1993). Essas bactérias têm grande importância em produtos como o leite e seus derivados. Elas são usadas como culturas iniciadoras na indústria e na fermentação do alimento animal, uma vez que contri buem para a conservação, o sabor e a textura dos fermentados (DE VUYST, DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002).

Por outro lado, o *L. plantarum* pode estar envolvido na deterioração de alimentos, tais como carne, vinho (BENEDUCE et al., 2004) ou suco de

laranja (ALWAZEER et al., 2002), e é encontrado geralmente no sistema gastrointestinal humano desde a boca até ao reto (MOLIN et al., 1993; AHRNÉ et al., 1998).

3.3 Polissacarídeos

Os polissacarídeos pertencem a uma classe de polímeros constituídos de monômeros de açúcar de cadeias longas, elevado peso molecular e hidrossolúvel. Atuam como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes e encapsuladores (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Por apresentarem tais características, são amplamente utilizados em formulações de produtos nutricêuticos e prebióticos.

Os prebióticos são definidos como ingredientes de alimentos não digeríveis que podem beneficiar o hospedeiro no sentido de selecionar a microbiota intestinal (BROWNAWELL et al., 2012). Já a atividade biológica dos polissacarídeos depende de sua estrutura química, relacionada ao tipo da cadeia principal e de suas ramificações, da massa molar, e da solubilidade em água (ZHANG et al., 2013).

A capacidade de produzir esses polissacarídeos é verificada em diferentes microrganismos, como fungos e bactérias. Eles são gomas hidrossolúveis que apresentam características vantajosas na sua utilização pela indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras. Sua aplicabilidade oferece vantagens sobre as de outras fontes de origem vegetal ou animal, pois a produção ocorre independentemente das condições climáticas e disponibilidade de matéria-prima. Os parâmetros de produção são controlados e estabelecidos de acordo com as melhores condições para o microrganismo (GRANDI, 2010).

Os polissacarídeos são conhecidos como biopolímeros e sua classificação é feita de acordo com a localização morfológica em três grupos: intracelulares, localizados no citoplasma da célula e usados como fonte de carbono, integrantes da parede celular, como os peptidoglicanos e ácidos teicóicos; e extracelulares associados ou não à célula microbiana (CERNING, 1990; 1995). Quando são excretados para o meio extracelular, denominados EPS, podem estar aderidos à célula na forma de cápsula, associados com a sobrevivência celular, ou sintetizados e excretados na forma de um polissacarídeo livre de aspecto limoso, com pouca ou nenhuma aderência celular (SUTHERLAND, 1972; CERNING, 1990).

No ambiente natural, os EPS oferecem proteção natural à célula microbiana contra agentes de dessecação, fagocitose, antibióticos, compostos tóxicos variados, estresse osmótico, adesão às superfícies sólidas e formação de biofilmes, além de contribuírem para o reconhecimento celular (DE VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002). Sua síntese depende de um maquinário enzimático próprio de cada espécie, e um exemplo de microrganismo capaz de converter açúcares em EPS são as BAL.

Essa capacidade de produzir EPS é altamente variável entre as BAL, característica que depende tanto do microrganismo quanto da composição do meio de fermentação e das condições de crescimento. (GAMAR et al., 1997; DE VUYST et al., 1998).

Na indústria de alimentos, a aplicação dos polissacarídeos de origem microbiana oferecem vantagens sobre os polímeros de outras fontes. Tais vantagens estão relacionadas principalmente à produção sob condições controladas, que possibilita a utilização de diferentes substratos e maior rapidez na obtenção do produto, sem necessitar de grande espaço para a produção,

tornando-se assim uma classe alternativa para utilização na indústria. Produtos lácteos fermentados por bactérias produtoras de EPS têm sido relacionados com uma elevada viscosidade e um menor grau de sinérese, quando comparados com produtos produzidos por outras não produtoras de EPS (CERNING, 1990; MARSHALL, RAWSON, 1999).

3.4 Soro de tofu

O soro de tofu (ST) é um subproduto do processo de produção do “queijo” de soja, recentemente este tem sido utilizado no lugar do soro de leite e outros meios de crescimento para o cultivo de bactérias ácido lácticas (NGUYEN et al., 2003).

Dentre as vantagens de utilizar o ST como alternativa é seu baixo valor comercial (NGUYEN et al., 2003) e o fato do material ser considerado um problema ambiental e industrial (PEÑAS et al., 2006). O ST é uma fonte rica de carbono, como sacarose, rafinose, estaquiase e os oligossacarídeos, que é consumida pelas bactérias ácidas lácticas, além de ser considerado uma fonte rica em proteínas e sais minerais (SHURTLEFF & AOYAGI, 1984). Nguyen et al. (2003) avaliaram o crescimento de *L. paracasei* ssp. *paracasei* em soro de tofu, e como resultados obtiveram uma elevada contagem de células viáveis, superior aquelas observadas em cultivo utilizando soro de leite (NGUYEN et al., 2003).

Estas condições levam a uma substituição eficiente e bem aceita pelo mercado entre os meios sintéticos, como o meio desenvolvido por Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (MAN et al., 1960), produzido especialmente para

crescimento de bactérias ácido lácticas, e o ST com suplementação, que é um meio de cultura de baixo custo pode alavancar a produção de prebióticos.

3.5 Biorreator

Os cultivos em biorreatores são utilizados nos processos biotecnológicos para o aumento da escala produtiva de microorganismos, antibióticos, enzimas, hormônios, anticorpos, cultura de células e tecidos vegetais (ZHANG et al., 1995; CAMACHO et al., 2001; MARTIN et al., 2004; MARTIN et al. 2005).

Os biorreatores podem ser divididos de acordo com o processo de fermentação podendo ser no estado sólido e fermentação submersa (FSm).

Para a FSm existem diferentes tipos de biorreatores, sendo os fermentadores aerados os mais utilizados na indústria (CRUEGER; CRUEGER, 1990). Pela adaptação dos reatores químicos feita no início do desenvolvimento dos bioprocessos. Cerca de 90 % é de tanque agitado tradicional representa a maioria dos biorreatores utilizados, sendo a minoria restante é representada pelos biorreatores pneumáticos, sem agitação mecânica como os *Airlifts* e colunas de bolhas (CHISTI, 1989).

Os biorreatores de tanque agitado apresentam algumas desvantagens para o cultivo de certos microorganismos, principalmente devido ao alto grau de agitação requerido para a transferência de oxigênio, causando danos às células pela alta tensão de cisalhamento das pás do agitador (NIENOW, 1998). Já o biorreator *Airlift* evita esse problema, já que o sistema de circulação do fluido no biorreator é gerado pela diferença de densidade do líquido dividido em duas zonas distintas, onde somente uma recebe a injeção de ar. A

circulação do fluido no biorreator *Airlift* afeta a turbulência, a transferência de massa gás-líquido e de calor, e também as forças de cisalhamento que os micro-organismos estão expostos, e às quais possuem limites de tolerância (CHISTI; MOO-YOUNG, 1988).

A FSm é uma área que tem se desenvolvido nas últimas décadas, possibilitando um maior controle do processo, menor risco de contaminação, e obtenção de biomassa com maior pureza, já que a biomassa é facilmente separada do meio de cultivo e os polissacarídeos isolados. Além disso, é possível recuperar os polissacarídeos secretados pela bactéria no meio de cultura durante o seu desenvolvimento, aumentando o rendimento do processo (CAMELINI et al., 2010).

As pequenas bolhas de ar no biorreator aumentam a área superficial de transferência de oxigênio e o tubo de corrente de ar uniformiza as forças de cisalhamento por todo biorreator, fatores que incrementam a produção de biomassa (KUNAMNENI et al., 2007).

Uma das grandes vantagens do biorreator *Airlift* é a simplicidade do projeto e da construção (MORESI, 1981), possibilitando uma manutenção fácil e barata. A ausência de partes mecânicas móveis para a agitação reduz o perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e a esterilização. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SIEGEL, ROBINSON, 1992), tornando-se atrativo para utilização em processos aeróbios.

Outra vantagem dos *Airlifts* sobre os demais biorreatores, em processos biológicos, está relacionada ao fato da força de cisalhamento, devida à turbulência, sobre as células ou *pellets* suspensos no meio, ser muito menor.

O campo de cisalhamento também é mais homogêneo, sendo relativamente constante ao longo do biorreator, apresentando padrões de escoamento melhor definidos (MERCHUK, 1986). Mesmo com sobreposição de movimentos ao acaso, há total direcionalidade do escoamento do líquido (SIEGEL, ROBINSON, 1992). Um fluxo menos turbulento parece ter um efeito positivo na produção de células sensíveis ao cisalhamento. Já foi demonstrado experimentalmente, que mesmo em meios altamente viscosos, o uso de biorreatores *Airlift* pode ser vantajoso (KESSLER et al., 1993).

As vantagens dos biorreatores *Airlift* são os fracos campos de cisalhamento, boa capacidade de mistura e operação asséptica por longos períodos, tornados possíveis graças à eliminação dos agitadores, selos e conexões. Produção contínua de cerveja, vinagre, ácido cítrico e biomassa de levedura, bactérias e fungos, tem sido conduzida em *Airlifts* com diferentes capacidades de trabalho (MORESI, 1981).

3.6 Nanofiltração

Para a separação dos polissacarídeos produzidos no cultivo, em função de sua massa molar, pode ser utilizada a cromatografia líquida, seguida de precipitação por solventes orgânicos. O etanol é o principal álcool utilizado para a recuperação dos polissacarídeos (MIZUNO et al., 1990; CAMELINI et al., 2005). Geralmente, o volume de álcool necessário para uma recuperação total do polissacarídeo tem proporção de 3:1 de extrato aquoso contendo os polissacarídeos. Essa quantidade é elevada e gera resíduos na recuperação do produto.

No entanto, uma alternativa que pode ser utilizada para reduzir o volume do extrato com polissacarídeo, concentrar o volume do extrato com polissacarídeo e separar as moléculas pela sua massa molar são as membranas de filtração densas ou microporosas. Esse processo contribui para a diminuição da quantidade de álcool utilizado na precipitação, conjuntamente com a possibilidade de seleção do polissacarídeo de interesse. A tecnologia permite um aumento da produção do polissacarídeo visando a escala piloto e industrial.

A tecnologia de membranas em processos biotecnológicos tem sido utilizada na área de concentração e separação de compostos bioativos. A separação de polissacarídeos conforme sua massa molar, assim como de oligossacarídeos, pode ser utilizada para purificar extratos brutos (BOTELHO-CUNHA et al., 2010).

O processo de concentração por membranas tem sido amplamente utilizado com a finalidade de manter a alta qualidade desses compostos. Esse processo é baseado no princípio da permeação seletiva de moléculas através de membranas, denominado nanofiltração (NF; MELLO et al., 2010).

A NF faz uso de membranas com menores diâmetros de poros, sendo mais eficiente na concentração dos polissacarídeos bioativos (CAMELINI, 2010). Além disso, os processos com membranas apresentam vantagens como o uso de baixas temperaturas; baixo consumo de energia; redução do impacto ambiental, devido à eliminação do uso de solventes; além da manutenção das propriedades creditadas a estes compostos (XU et al., 2004; MELLO et al., 2010).

4. Material e Métodos

4.1 Microrganismo

Utilizou um isolado de *L. plantarum* (CCT 0580, ATCC 8014) adquirido na forma liofilizada da Coleção Tropical de Culturas André Tosello, Campinas, SP. O isolado foi reidratado conforme orientação do fornecedor e cultivada em meio de cultivo MRS, sendo mantida em tubos *ependorf* com meio MRS contendo 20 % de glicerol a 24° C até a sua utilização.

4.2 Procedimentos de desinfecção e esterilização

A esterilização de meios de cultura e utensílios foi realizada em autoclave a 121 °C e 1 atm. Os meios de cultura, com volumes inferiores a 1 L foram esterilizados durante 15 min, já os meios de cultura em volumes de 5 L, para fermentações em biorreator *Airlift* foram esterilizados durante 30 min.

Todos os materiais e acessórios para manipulação direta com a bactéria foram esterilizados durante 20 min. O biorreator *Airlift* de aço inox foi esterilizado durante 45 min com vapor a 121 °C, gerado por uma autoclave de 20 L, conectada por uma derivação da entrada de ar. Os procedimentos de inoculação dos meios e de repicagens foram realizados sob condições assépticas em capela de fluxo laminar.

4.3 Meios de cultura

Foram utilizados os meios para fermentação Caldo Nutriente, MRS e o soro de tofu (fornecido pela empresa **Tofutura Indústria de Alimentos Ltda**), além de soro de tofu suplementado. A composição desses meios é apresentada na Tabela 1 e na Tabela 2.

Determinações analíticas	ST
Proteínas (% m/v)	0,35±0,02
Carboidratos (% m/v)	0,85±0,02
Lipídios (% m/v)	<0,10
Umidade (% m/v)	98,44±0,01
Cinzas (% m/v)	0,36±0,01
Acidez total (mL sol. N 100 mL⁻¹)	1,78±0,04
pH	5,20±0,01
Sólidos solúveis (° Brix)	2,1±0,01
Condutividade elétrica (µS/cm)	3,75±0,07
Isoflavonas totais (mg L⁻¹)	33,50±0,17

Tabela 1 Composição do soro de tofu (ST).

Ingredientes	CN (g.L ⁻¹)	MRS (g.L ⁻¹)	STS (g.L ⁻¹)
Peptona	5	10	-
Extrato de Carne	1,5	10	-
Extrato de Levedura	1,5	5	1
Glicose	-	20	11,5
Tween 80	-	1	1
Citrado de Amônio	-	2	-
Acetato de Sódio	-	5	-
MgSO ₄	-	0.1	0.2
MnSO ₄	-	0.05	0.05
K ₂ HPO ₄	-	-	1,4
Citrato de Sódio	-	-	3
KH ₂ PO ₄	-	2	1
Cloreto de sódio	5	-	-

Tabela 2 Composição dos meios de cultura caldo nutriente (CN), Man Rogosa e Sharpe (MRS) e a suplementação do soro de tofu (STS).

4.4 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir da bactéria ativada em um escalonamento de 10% V/V, ou seja, partindo de um inóculo inicial de 2 mL armazenado em glicerol estéril 20 % a -20 °C, foi inoculado em 20 mL de caldo nutriente e esse por sua vez inoculado em 200 mL, tanto para o meio MRS quanto para o meio STS. Cada etapa do escalonamento foi realizada a 30 °C por 18 h, até atingir um volume de inóculo final para o biorreator *Airlift* de 5 L. Todo procedimento foi realizado em pH inicial de 6,0, corrigido com HCl 1 mol.L⁻¹.

4.5 Cultivo em biorreator *Airlift*

Para padronizar a produção de EPS e o cultivo de *L. plantarum* foi feito cultivo nos meios MRS e STS em biorreator *Airlift* com pH, temperatura e aeração controlados. O cultivo foi realizado a uma temperatura de 30 °C. Com a função de auxiliar na manutenção do pH em 6,0 foi utilizado HCl/NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Também foram utilizados de 0,2 a 0,4 mL.L⁻¹ do antiespumante polipropilenoglicol no meio de cultivo. O biorreator *Airlift* foi programado para manter as condições de O₂ acima do valor crítico.

Durante os cultivos foram coletadas amostras de 30 mL a cada 2 h, e essas foram avaliadas quanto a biomassa produzida (gravimetria), EPS produzido e glicose consumida ao longo do cultivo.

4.6 Separação das células

Após o cultivo, os meios de cultura e as amostras foram centrifugados para separação dos microrganismos a 1100g por 30 min e congelados a -4°C até sua utilização para análises e concentração por nanofiltração.

Os microrganismos separados das amostras foram desidratados a 55 °C, até peso constante e pesados em balança de precisão. Os dados foram utilizados para medir o aumento de biomassa ao longo do cultivo em biorreator. O sobrenadante da centrifugação foi utilizado na etapa de NF dos EPS.

4.7 Concentração dos EPS

A concentração dos polissacarídeos por membranas foi realizada no Laboratório de Separação por Membranas (LABSEM), Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.

Para concentração dos polissacarídeos totais foi utilizada uma membrana de NF em um equipamento piloto operando com fluxo tangencial. Foi utilizada uma membrana orgânica de polifluoreto de vinilideno com ponto molar de corte de 150-300 g.mol⁻¹ e área filtrante útil de 0,9m² (Modelo HL2521TF, GE Osmonics®, Filadélfia, EUA).

Dezesseis litros de extrato polissacarídico foram submetidos à NF por aproximadamente 90 min, sendo este o tempo necessário para concluir a operação de concentração em um sistema sem reciclo de permeado, atingindo um fator de redução volumétrico (FRV) igual a 4,0.

Os parâmetros de operação controlados durante o processo de NF foram 35±1 °C, e pressão transmembranar de 6 bar, para serem preservadas as propriedades do extrato. Esta concentração foi realizada a partir da reciclagem do concentrado e remoção do permeado utilizando 16 L de extrato aquoso. As amostras de concentrado e permeado foram coletadas em diferentes tempos do procedimento, relacionados aos valores de FRV de 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0.

4.8 Precipitação e separação dos EPS

Para a separação dos compostos foi realizada precipitação por solventes orgânicos. O solvente utilizado foi o EtOH 96 °GL, principal álcool utilizado para a recuperação dos EPS, na proporção de 3:1 de extrato aquoso. As amostras foram centrifugadas a 1100 g durante 15 min, e os precipitados foram desidratados a 55 °C, até peso constante, e pesados em balança de precisão.

No cultivo em biorreator *Airlift* o volume de 500 µL das amostras foram adicionados 1000 µL de etanol PA para precipitação dos polissacarídeos, e submetidas à centrifugação. Já nas amostras da NF alíquotas de 40 mL dos retentados dos diferentes FRV, foram adicionados 80 mL de EtOH 96 °GL para precipitação dos polissacarídeos e determinação por gravimetria.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Conservação das amostras

As amostras de 30 mL retiradas ao longo do cultivo em biorreator foram armazenadas congeladas a -4 °C para posterior análise do aumento de biomassa e consumo de glicose. Já na NF foram retiradas amostras de 40 mL tanto do retentado quanto do permeado de cada FRV, estas foram também congeladas a -4 °C para posterior análise de quantidade de EPS retido no processo.

4.9.2 Determinação da biomassa

A concentração celular foi determinada através da massa seca, para isso, amostras de volume conhecido foram filtradas em papel de filtro previamente pesado e secadas a 55 °C até peso constante (tempo mínimo de 48 h). A concentração celular foi, então, determinada pela Equação 1:

$$X = \frac{(m_{a+f} - m_f)}{V_a} \quad (1)$$

Onde:

X = concentração de biomassa (g.L⁻¹)

m_{a+f} = massa da amostra seca + massa do papel filtro (g)

m_f = massa do papel filtro (g)

V_a = volume da amostra (L)

O mesmo processo serviu para calcular a quantidade de EPS produzida ao longo dos cultivos em biorreator *Airlift* e no processo de NF.

A taxa de conversão de substrato em biomassa foi calculada seguindo a equação 2.

$$Y_{S/x} = \frac{S_f - S_0}{X_f - X_0}$$

4.9.3 Determinação de glicose

A concentração de glicose nas amostras de cultivo foi determinada pelo método enzimático GOD, fundamentado na clássica reação de Trinder, envolvendo a oxidação da D-glicose, pela glicose oxidase, a ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de peroxidase, reage com o fenol e 4-amino pantipirina para formar uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra, podendo ser medida por espectrofotometria. Neste estudo, foi utilizado o reagente comercial *Glicose Liquiform* da Labtest. A determinação da absorbância em espectrofotômetro foi feita a 480 nm, uma curva padrão de glicose foi preparada com concentrações na faixa de 0 a 3 g.L⁻¹.

4.9.4 Cálculo da velocidade específica de crescimento e produção de EPS

Pelo fato da concentração celular aumentar durante um cultivo descontínuo, aumentando conseqüentemente a concentração das enzimas responsáveis pela transformação do substrato, seria mais coerente analisar o valor da velocidade instantânea com relação à referida concentração celular. A velocidade específica de crescimento celular e a produção de EPS foram determinadas pelo método proposto por Le Duy e Zajic (HISS, 2001).

4.9.5 Determinação dos EPS

A massa molar e a quantificação do polissacarídeo de maior massa molar nas amostras do cultivo foram determinadas por CLAE-IR utilizando a coluna TSK Gel 5000 PW (7.8×300 mm, Tosoh Corporation) com pré-coluna

acoplada no cromatógrafo Perkin Elmer série 200 com detector de Índice de Refração Perkin Elmer série 200a acoplado ao detector UV a 280 nm, fase móvel NaOCH_3 0,003 mol.L^{-1} , fluxo 1 mL.min^{-1} . A curva padrão foi realizada com padrões dextranas de massa molar de 12 a 2.000 g.mol^{-1} (Sigma, EUA) com concentração de 3 mg.mL^{-1} e injeção de 20 μL . As amostras foram analisadas na concentração de 3 mg.mL^{-1} dissolvidas na fase móvel.

4.9.6 Cálculo do fator de redução volumétrica

Para a NF o FRV foi calculado pela razão entre o volume inicial de extrato polissacarídico utilizado na alimentação e o volume final de concentrado após a NF. Durante a NF foi medido o fluxo do permeado J ($\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$), a cada cinco minutos e calculado de acordo com a Equação 3:

$$J = \frac{V_p}{t \cdot A_p} * (L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}) \quad (3)$$

Onde:

J = fluxo permeado

V_p = volume permeado

t = tempo

A_p = área de permeação

O desempenho do processo de filtração foi medido baseado na quantidade de EPS presente no concentrado. Amostras do concentrado e do

permeado foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, durante o ensaio, cada um relacionado com os valores FRV. A eficiência do processo foi determinada tendo em conta a porcentagem de polissacarídeos retidas, o que demonstra a capacidade da membrana para filtrar o compostos de interesse. A porcentagem de retenção foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_c}\right) * 100 \quad (4)$$

Onde:

C_p = concentração total de polissacarídeo no permeado

C_c = concentração total de polissacarídeo no concentrado

Antes de realizar o processo de concentração do EPS o permeado do fluxo foi medido com água filtrada, adotando as mesmas condições descritas anteriormente. O valor obtido a partir do fluxo de permeado com água foi utilizada como referência para verificar o estado da membrana após o uso e limpeza. Antes de depois de cada experimento, o equipamento foi limpo com uma solução alcalina (0,1 %), seguindo as instruções do fabricante.

4.9.7 Cálculo das resistências da membrana de nanofiltração

Depois de realizada a NF, as resistências do fluxo do permeado foram determinadas. As análises de resistências foram baseadas na limpeza da membrana com água, considerando diferentes fenômenos de reversibilidade/irreversibilidade. Nessa condição, as diferentes taxas de fluxo

resultaram em diferentes incrustações e resistências polarizadas. Neste estudo, foi calculado a resistência total (R_t) utilizando o valor final de fluxo (j_f), mais o valor de viscosidade do permeado (μ_p) e da pressão transmembrana (P_t) utilizada no experimento. Estes cálculos estão presentes na Equação 5.

$$J_f = \frac{P_t}{\mu_p * R_t} \Rightarrow R_t = \frac{P_t}{\mu_p * J_f} \quad (5)$$

A resistência da membrana (R_m) foi determinada utilizando o valor de viscosidade da água (μ_w) e o valor do fluxo medido com água no início do experimento enquanto a membrana foi limpa (J_w), conforme a Equação 6.

$$J_w = \frac{P_t}{\mu_w * R_m} \Rightarrow R_m = \frac{P_t}{\mu_w * J_w} \quad (6)$$

A resistência causada por *fouling* (R_f) foi determinada usando a Equação 7. Esse procedimento foi realizado utilizando o fluxo de água filtrada através da membrana após a remoção da camada polarizada, lavando-a com água (J_{wf}).

$$J_{wf} = \frac{P_t}{\mu_w * (R_m + R_f)} \Rightarrow R_f = \frac{P_t}{\mu_w * J_{wf}} - R_m \quad (7)$$

Desde que R_t é a soma das resistências R_m , R_f , e R_p , a resistência produzido pela polarização, causada pela concentração e a existência de uma camada de gel de polarização (R_p), foi determinado pela diferença entre os parâmetros, presente na Equação 8.

(8)

$$\mathbf{R}_t = \mathbf{R}_m + \mathbf{R}_f + \mathbf{R}_p \Rightarrow \mathbf{R}_p = \mathbf{R}_t - \mathbf{R}_m - \mathbf{R}_f$$

5. Resultados e Discussão

5.1 Cultivo em biorreator e estudos cinéticos

Os dados representados entre as Figuras 1 a 6 referem-se aos cultivos submersos em biorreator *Airlift* em meio MRS e STS, para produção de biomassa e EPS de *L. plantarum*. Embora para o cultivo em meio STS não se tenha amostras iniciais suficientes para afirmar a existência de uma fase lag, no meio MRS observou-se uma fase lag de pelo menos 5 h. Os cultivos foram conduzidos durante 45 h, apesar da glicose ter sido consumida em menos tempo. Esse maior tempo foi devido à complexidade nutricional dos meios.

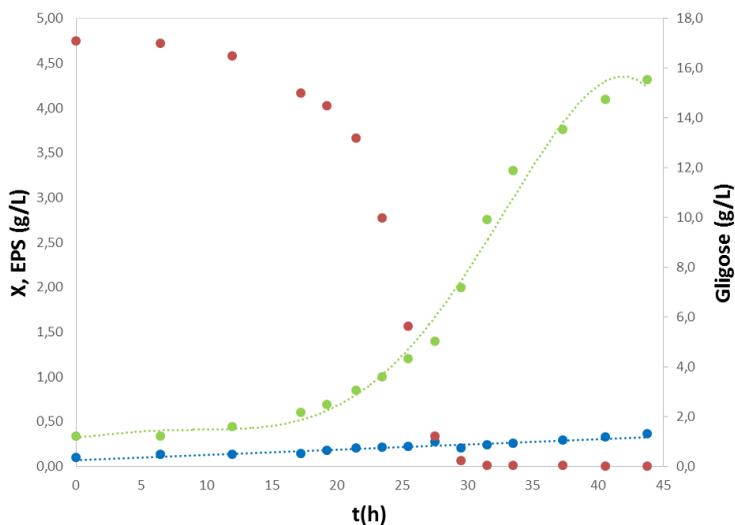


Figura 1 Análise das grandezas de crescimento do *L. plantarum* no meio MRS (●) X(g.L⁻¹), (●)glicose, (●)EPS (g.L⁻¹).

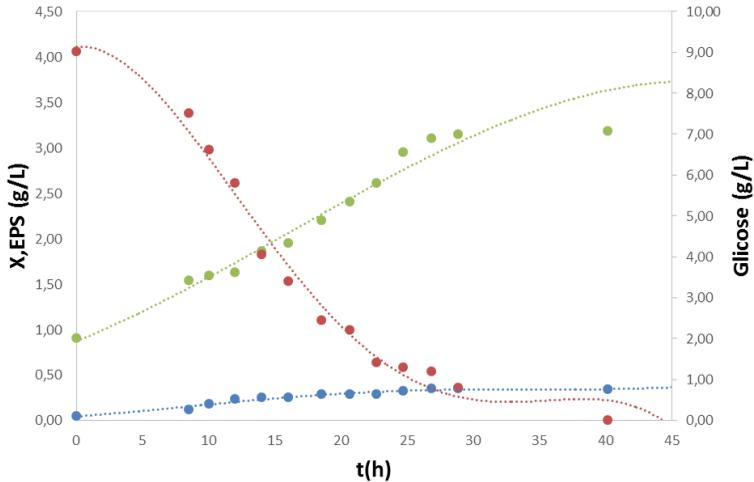


Figura 2 Análise das grandezas de crescimento do *L. plantarum* no meio STS (●) X (g.L^{-1}), (●) glicose, (●) EPS (g.L^{-1}).

Ao final de 30 h de cultivo obteve-se uma concentração final de biomassa de $2,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ para os meios MRS e STS, respectivamente. A taxa de conversão em biomassa foi de 20,5% para o cultivo em MRS e de 19,8 % para o cultivo em STS, com 41 e 45 h, respectivamente. Vale ressaltar que Feltrin et al. (1998) obtiveram até $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa de *L. plantarum* em cultivo a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ com duração de 24 h no meio MRS.

A continuidade do crescimento do *L. plantarum* em meio STS após o término da glicose deve-se ao consumo de outros nutrientes presentes no soro de tofu, como sacarose, rafinose, estaquiose e oligossacarídeos (OUNIS et al., 2007). O mesmo ocorreu no meio MRS com o consumo das proteínas do extrato de carne e peptonas.

Nas Figuras 1 e 2 observa-se que a produção de EPS acompanhou o aumento da biomassa ao longo do tempo para os dois cultivos, fato este também observado por Zhang et al. (2013) em seus estudos com *L. plantarum*.

O pH se manteve estabilizado em torno de 6,0 e o biorreator manteve as condições de O₂ acima do valor crítico para ambos os cultivos Figuras 3 e 4. A concentração crítica foi determinada preliminarmente com valor de 10 %.

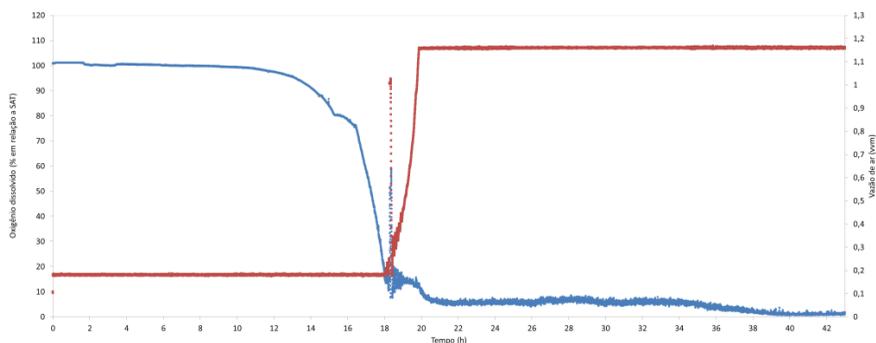


Figura 3 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do *L. plantarum* em biorreator *Airlift*. Meio de cultura MRS. (●) OD, (●) vvm

Embora os cultivos tenham sido conduzidos em condições não críticas para o oxigênio, o cultivo em meio MRS esteve mais no limite dessa condição, provavelmente por causa da maior concentração de células e nutrientes metabolizados em maior velocidade, conforme se observa nas velocidades específicas nas Figuras 5 e 6.

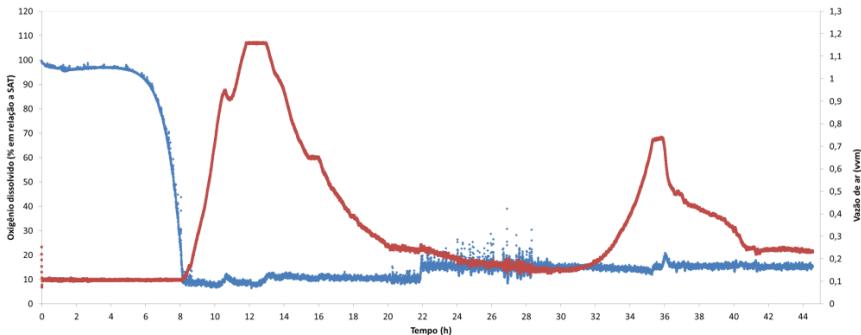


Figura 4 Variação da concentração de oxigênio dissolvido e vazão de ar durante o cultivo do *L. plantarum* em biorreator *Airlift*. Meio de cultura STS. (●) OD, (●) vvm.

Foi observado que o *L. plantarum* produziu dois EPS de massas molares $2,9 \times 10^5$ Da e $1,7 \times 10^6$ Da. Esses EPS foram encontrados tanto no meio MRS, quanto no STS utilizado no cultivo. Após a purificação do EPS de maior massa molar, por diálise, esse foi utilizado como padrão para quantificação por HPLC-IR. O rendimento máximo desse polissacarídeo foi de 210 mg.L^{-1} e 350 mg.L^{-1} para os meios MRS e STS, respectivamente, com 30 h de cultivo (Figura 1 e 2)

Zhang et al. (2013) obtiveram em seus experimentos com *L. plantarum* em MRS a produção de 69 mg.L^{-1} de EPS com massa molar de $1,15 \times 10^6$ Da. Já Tallon et al. (2003) verificaram em cultivo também em meio MRS a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a produção de 126 mg.L^{-1} e de $135,8 \text{ mg.L}^{-1}$ a $18 \text{ }^\circ\text{C}$, e encontraram dois EPS distintos de $8,5 \times 10^5$ Da e 4×10^4 Da. O EPS de elevada massa molar foi escolhido para o monitoramento, por HPLC-IR, nos cultivos devido a sua considerável atividade biológica como anti-oxidante (Zhang et al., 2013).

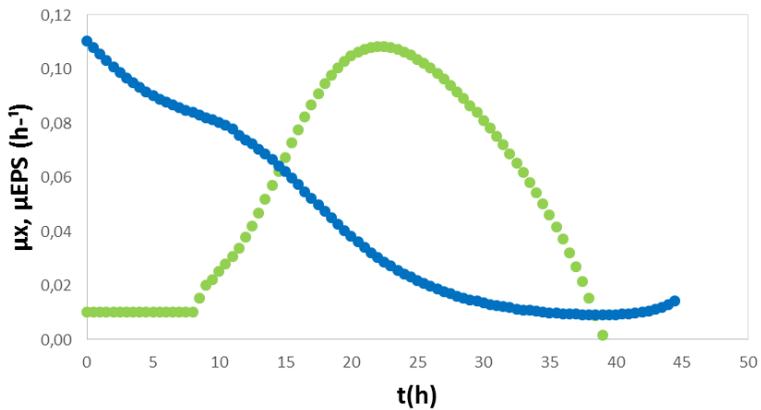


Figura 5 Análise do μ_x e μ_{EPS} do cultivo de *L. plantarum* no meio MRS. (●) μ_x , (●) μ_{EPS}

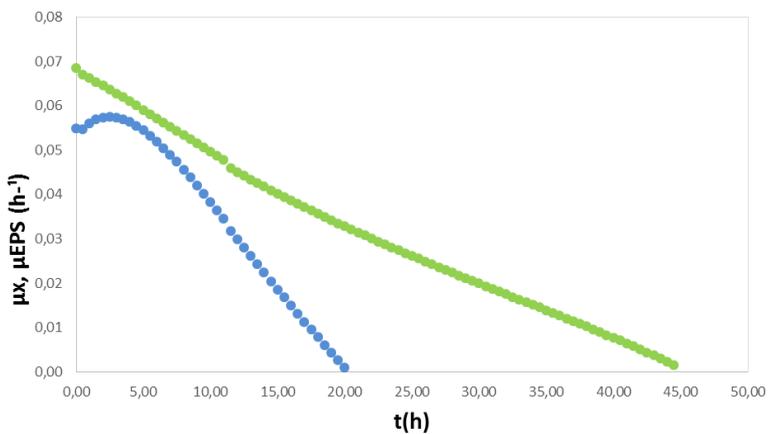


Figura 6 Análise do μ_x e μ_{EPS} do cultivo de *L. plantarum* no meio STS. (●) μ_x , (●) μ_{EPS}

É importante observar que diferentes EPS podem ser obtidos com *L. plantarum* controlando-se fatores como pH, temperatura e OD, e que a composição do meio de cultura parece não afetar o tamanho dessas moléculas.

Comparando os cultivos, o meio STS foi mais favorável dentro de 30 h de cultivo tanto para o aumento de biomassa quanto para a produção de EPS, nas mesmas condições operacionais. Entretanto, sem a suplementação de glicose no soro de tofu o crescimento não ocorre. Essa foi também uma constatação em ensaios preliminares de cultivo. Pode-se dizer que o soro de tofu é um suplemento nutricional importante para o crescimento e formação de EPS, mas não como um meio em si para crescimento.

As diferenças encontradas em cada um dos experimentos em relação à quantidade de biomassa, EPS e massa molecular de EPS encontrados confirma as observações de Ruasmadiedo et al. (2002) e De Vuyst et al. (1999), de que fatores exógenos, tais como fonte de carbono, oxigênio dissolvido e tempo de cultivo interferem na produção de EPS e no crescimento do *L. plantarum*.

A Figura 6 mostra também que o cultivo no meio STS foi realizado com facilidade pelas células, acompanhado pela produção de EPS, o que não aconteceu no meio MRS (Figura 5). Isso é constatado pelo perfil de velocidade específica de crescimento, onde as células no meio STS iniciaram o cultivo numa velocidade alta, enquanto no meio MRS as células atingem a velocidade máxima em 25 h, embora essa velocidade tenha sido, tanto no máximo quanto na média, maior que no meio STS.

5.2 Nanofiltração

O processo de separação por membranas tem sido bastante utilizado em cultivos com BAL para separação de lactato, ácido lático e até mesmo do próprio microrganismo, mecanismos descritos por Timmer et al. 1994, Dey et al. 2012 e Sikder et al. 2012 em seus trabalhos. Embora não tenha nenhum trabalho descrevendo a utilização deste processo para separação de EPS, Camellini et al. (2013) realizaram um processo semelhante para separação de EPS de *A. subrufescens*, tornando plausível a comparação da forma de extração e comportamento da membrana de nanofiltração utilizada no experimento.

O comportamento do fluxo de permeado (J) durante a NF de extratos de *L. plantarum* é demonstrado na Figura 7. Verificou-se o declínio em função do tempo, e a média do fluxo foi de $9,0 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, os processos foram realizados a uma temperatura e pressão fixa de $35 \pm 1^\circ\text{C}$, 6 bar, respectivamente e teve duração de 90 min. O fluxo permeado médio obtido para o extrato da biomassa fúngica de *A. subrufescens* foi de $58,9 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, e $26,8 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ para o seu meio de cultivo (CAMELINI et al. 2013).

A diferença entre o fluxo de permeado de água e do extrato indica a formação de uma camada de gel polarizada e ao *fouling*, fenômenos normalmente presentes nos processos de separação por membranas. Esses fenômenos colaboraram para a redução do fluxo de permeado em cerca de 60 %.

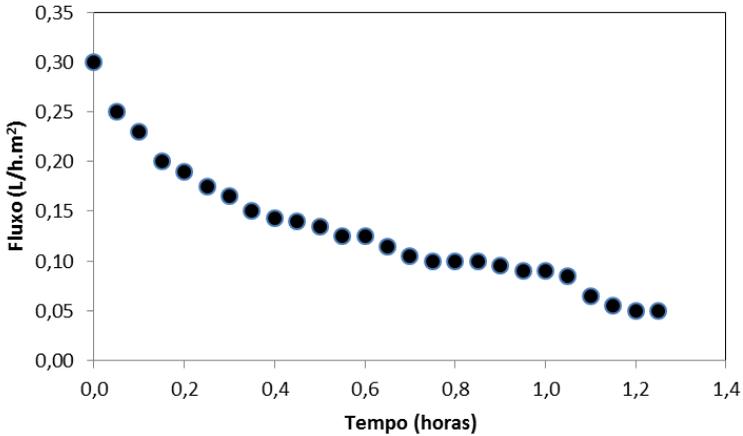


Figura 7. Decaimento do fluxo ao longo do processo de nanofiltração para extrato de STS.

A influência da temperatura e da pressão durante a NF do extrato de cultivo de *L. plantarum* foi comparado com fluxo de água, e os resultados estão expressos nas Figuras 8 e 9, respectivamente. Os efeitos da pressão e da temperatura no fluxo do permeado foram caracterizados pela diferença entre a os fluxos de permeado para água e para o extrato de STS, alterando a temperatura de 20 a 45 °C e a pressão de 1 a 7 bar.

A Figura 8 mostra o fluxo sobre efeito da temperatura a uma pressão constante de 6 bar com variação da temperatura, é possível notar um pequeno aumento do fluxo de permeado com o aumento da temperatura, porém este aumento é baixo quando comparado com o que Camelini et al. (2013) encontraram em seus experimentos com extratos aquosos fúngico, resultando em um aumento de até 30 % do fluxo com o aumento da temperatura.

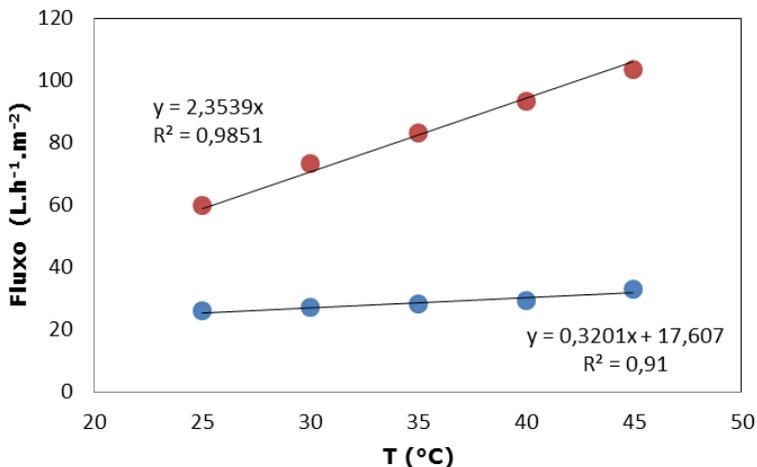


Figura 8. Fluxo de permeado em função da temperatura de processamento sobre a água e o extrato do cultivo de *L. plantarum* em STS (●) extrato (●) água.

A Figura 9 mostra o fluxo sobre efeito da pressão a uma temperatura constante de 35 °C com variação da pressão, demonstrando que o aumento da pressão resultou num aumento de fluxo de 30 %.

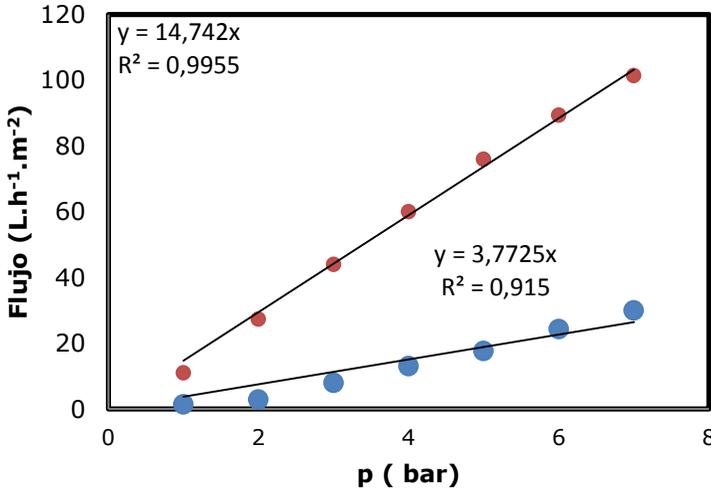


Figura 9. Fluxo de permeado em função da pressão de processamento sobre a água e o extrato do cultivo de *L. plantarum* em STS (●) extrato (●) água.

As Figuras 10 e 11 apresentam os dados de EPS na amostra inicial e nos concentrados do meio de cultura, representando as duplicatas e a média dos valores verificados em cada amostra, respectivamente. Verifica-se que o teor de EPS no concentrado em diferentes valores de FRV foram todos diferentes do resultado encontrado para o extrato inicial.

Analisando separadamente cada um dos gráficos, observa-se na Figura 10 que a concentração dos EPS ao longo do tempo é equivalente à uma equação polinomial, ou seja quanto maior for o FRV maior será a quantidade de exopolissacarídeo precipitada após o processo de NF, aumentando de forma exponencial os compostos precipitados.

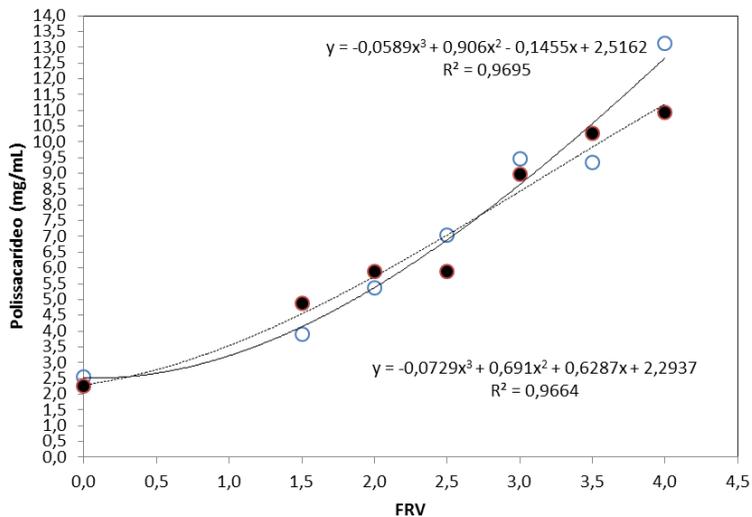


Figura 10. Concentração de EPS ao longo do processo de nanofiltração em STS

Já a média das duplicatas, representado na Figura 11 leva à uma equação linear, e à medida que for aumentando seu FRV a concentração de compostos tende a aumentar porém em uma menor proporção quando se compara com a amostras analisadas separadamente.

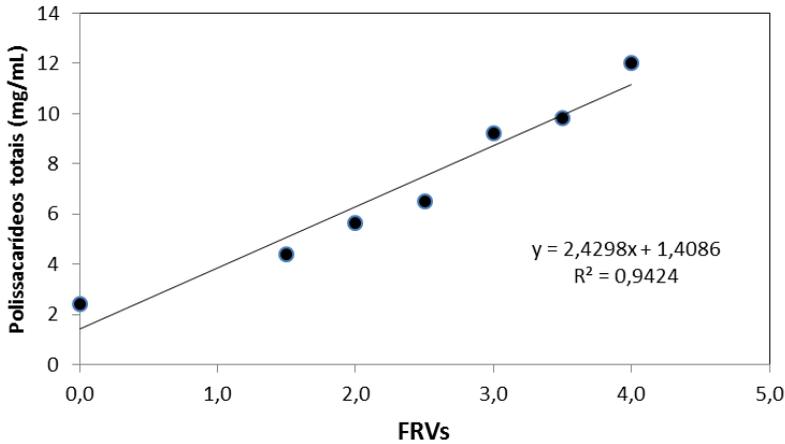


Figura 11. Média das duplicatas da concentração de EPS ao longo do processo de nanofiltração em STS.

Após a NF, com a média das duplicatas, verificou-se o aumento de 80 % dos teores de EPS presentes no concentrado, com um rendimento de 12,4 g.L⁻¹ no FRV 4. Dessa forma, verificou-se que a utilização de soro de tofu incrementou a produção de EPS e a NF foi eficiente para a concentração desses compostos prebióticos a partir do meio de cultivo de *L. plantarum*. Comportamento semelhante foi observado por Camelini *et al.* (2013) na concentração por membranas de diferentes extratos fúngicos aquosos, que teve as maiores porcentagens de retenção nos FRVs 5, 6 e 7 de até 92 %.

De acordo com a Figura 12 observa-se que a maior parte da resistência ao fluxo foi causada pela camada polarizada de 59,37 %, seguida da resistência pela membrana de 39,8 %, enquanto a resistência devido ao *fouling* foi responsável por 0,83 % da resistência total, comparando com os dados obtidos por Camelini *et al.* (2013), observamos uma grande diferença nas resistências

da membrana, esta obteve aproximadamente 90% causado pela resistência por polarização, seguido pela resistência da membrana representando aproximadamente 10 %, e por último a resistência devido ao *fouling* chegando a quase 0 %. A resistência de *fouling* apresentada em ambos experimentos indica que após o experimento teve recuperação total da membrana possibilitando reutilizar a mesma membrana em outros experimentos.

A maior influência da polarização por concentração pode ocorrer devido à presença dos polissacarídeos, mas também aos sais e de carbono residual presente no meio de cultura. É importante salientar que a resistência causada pela polarização por concentração pode ser reduzida por meio da alteração das condições operacionais. Dessa forma, é possível obter maiores fluxos permeados com a mesma alimentação alterando-se as condições de operação. Já o *fouling*, é considerado um fenômeno irreversível, que aumentaria os custos operacionais com a diminuição da permeação (Listiarini *et al.*, 2009).

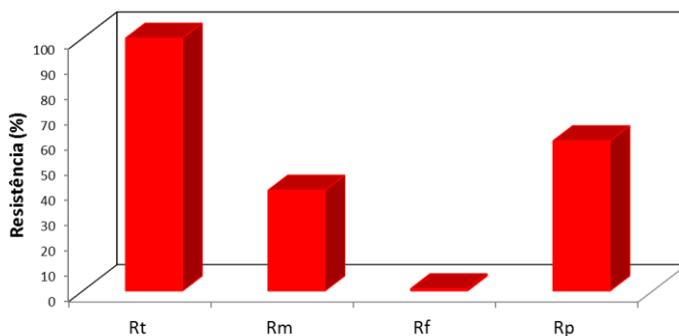


Figura 12. Percentual de resistência no fluxo de permeado causado pela resistência total da membrana (Rt), resistência da membrana (Rm), resistência do fouling (Rf), resistência por polarização (Rp).

Vale ressaltar que a filtração tangencial possui uma série de vantagens, tais como baixo consumo de energia, simplicidade de operação, alta seletividade e eficiência na separação. Além disso, é possível a obtenção de produtos com maior qualidade devido à baixa temperatura do processo, e a preservação das suas características estruturais e nutricionais (Mulder, 2000).

6. Conclusões

1. A produção da biomassa de *L. plantarum* pode ser realizada eficientemente em biorreator *Airlift*, tomando o cuidado para utilizar meios mais diluídos, permitindo concentrações celulares mais baixas.
2. O soro de tofu pode ser utilizado como um suplemento nutricional para a produção de EPS, mas não como um meio de cultura *per si*.
3. Foi observado produção de EPS com massas molares de $2,9 \times 10^5$ e $1,7 \times 10^6$ Da, que após purificação em HPLC-IR representou um rendimento de 350 mg.L^{-1} em meio STS. Os tipos de EPS parecem depender mais das condições operacionais de cultivo, do que das condições do meio de cultura.
4. Para a obtenção dos EPS totais, de elevadas massas molares, a membrana de nanofiltração permitiu a concentração dos extratos de até quatro vezes em relação ao seu volume inicial, colaborando para a diminuição da quantidade de etanol necessária para a precipitação dessas moléculas e aumentando o rendimento em 80 % dos EPS extraídos.

7. Referências

ALWAZEER, D.; CACHON, R.; DIVIES, C.; **Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice.** Journal of Food Protection. v.10, p. 1586-1589, 2002.

AHRNÉ, S.; NOBAEK, S.; JEPPSSON, B.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E.; MOLIN, G.; **The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa.** Journal Applied Microbiology. v.85, p.88-94, 1998.

BARTHELMEBS, L.; DIVIES, C.; CAVIN, J-F. **Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism.** Applied and Environmental Microbiology. v.66, p. 3368-3375, 2000.

BARTHELMEBS, L.; DIVIES, C.; CAVIN, J-F. **Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*.** Lait, v. 81, p. 161-171, 2001.

BENEDUCE, L.; SPANO, G.; VERNILE, A.; TARANTINO, D.; MASSA, S. **Molecular characterization of lactic acid population associated with wine spoilage.** Journal Basic of Microbiology. v. 44, p. 10-16, 2004.

BOTELHO-CUNHA, V.A.; MATEUS, M.; PETRUS, J.C.C.; PINHO, M.N. **Tailoring the enzymatic synthesis and nanofiltration fractionation of**

galacto-oligosaccharides. Biochemistry Engineering Journal, v. 50, p. 29-36, 2010.

BROWNAWELL, M.A.; CAERS, W.; GIBSON, G.R.; KENDALL, C.W.C.; LEWIS, K.D.; RINGEL, Y.; SLAVINS, J.L. **Prebiotics and the health benefits of fiber: current regulatory status, future research, and goals.** The Journal of Nutrition, v. 142 (5), p. 962-974, 2012.

CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; MIRÓN, A. S.; PASCUAL, V. G.; CHISTI, Y. **Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress.** Enzyme and Microbial Technology, v. 29, p.602-610, 2001.

CAMELINI, C.M. **Caracterização estrutural e atividade vasculogênica de β -glucanas isoladas de frutificações de *Agaricus brasiliensis* em diferentes estágios de maturação: implicações na produção de nutracêuticos.** *Dissertação* (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC, Florianópolis. 2005.

CAMELINI, C.M. **Produção de Biomassa do fungo *Agaricussubrufescens* por processos fermentativos sólido e submerso para obtenção de polissacarídeos bioativos.** 210f. *Tese* (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC, Florianópolis. 2010.

CAMELINI, C.M.; REZZADORI K.; BENEDETTI, S.; PRONER, M.C.; FOGAÇA, L.; AZAMBUJA, A.A; GIACHINI, A.J; ROSSI, M.J.; PETRUS,

J.C.C Nanofiltration of polyssacharides from *Agaricus subrufescens*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, p.9993-100002 2013.

CATALOLUK, O.; & GOGEBAKAN, B. Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. FEMS Microbiology Letters, v. 236(1), p. 7–12, 2004.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, v. 87, p.113-130, 1990.

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

CHISTI, M. Y. Airlift Bioreactors. Nova Iorque: Elsevier AppliedSciences, p. 345, 1989.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Prediction of liquid circulation in airlift reactors with biological media. Journal of Chemical Technology Biotechnology, v. 42, p. 211-219, 1988.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. Substrates for industrial fermentation. In: Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. Tradução Thomas D. Brock. Wisconsin: Science Tech Publishers, p. 59-63. 357 p. 1990.

DAESCHEL, M.A.; NES, I.F. ***Lactobacillus plantarum*: physiology, genetics and applications in foods.** Food Biotechnology Microorganisms. v. 21, p. 721-743, 1995.

DEDICATORIA, R.F.; ASPIRAS, R.B.; SANCHEZ, P.C. (1981). **The fermentation inoculation with lactic acid bacteria to increase the nutritive value of sauerkraut.** Kalikasan v. 10, p. 214-219, 1981.

D'SOUZA, A.L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, J.; BULPITT, C.J. **Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis.** *BMJ* p.324: 1361, 2002.

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

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

DEY, P.; LINNANEM, L.; PAL, P. **Separation of lactic acid from fermentation broth by cross flow nanofiltration: membrane characterization and transport modelling.** Desalination, v. 288, p. 47-57, 2012.

FELTRIN, V.P.; SANT'ANNA, E.S.; PORTO, A.C.S.; TORRES R.C.O. **Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar.** Brazilian Archives of Biology and Technology. v.43, 1998.

FERNÁNDEZ, G.M.J.; GARÍA, P.G.; FERNÁNDEZ, A.G.; QUINTANA, M.C.D. **Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar.** Journal Applied Bacteriology. v. 75: p. 226-233, 1993.

FRANCO, B.G.M.F.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** Editora Atheneu, São Paulo, SP, Brasil, 1996.

GAMAR, L.; BLONDEAN, K.; SIMONET, J. M. **Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83.** Journal of Applied Microbiology, v.83, p.281-287, 1997.

GRANDI, A. Z. **Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Instituto de Biociências, São José do Rio Preto. 2010.

JOHANSON, M.L.; MOLIN, G.; JEPPSSON, B.; NOBAEK, S.; AHRNÉ, S.; & BENGMARK, S. **Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora.** Applied and Environmental Microbiology. v.59, p. 15-20, 1993.

KANDLER, O.; WEISS, N. **Regular, nonsporing Gram-positive rods, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore. v. 2, p. 1208-1234, 1986.**

KESSLER, W.R.; POPOVIC, M.K.; ROBINSON, C.W. **Xanthan production in a external-circulationsloop airlift bioreactors.** The Canadian Journal of Chemical Engineering. v.71, p.101-106, 1993.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; van KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.P.; LEER, R.; TARCHINI, R.; PETERS, S.A.; SANDBRINK, H.M.; FIERS, M.W.E.J.; STIEKEMA, W.; LANKHORST, R.M.K.; BRON, P.A.; HOFFER, S.M.; GROOT, M.N.N.; KERKHOVEN, R.; de VRIES, M.; URSING, B.; de VOS, W.M.; SIEZEN, R.J. **Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1.** Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. v. 100, p.1990-1995, 2003.

KUNAMNENI, A; PRABHAKAR, T.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P.
Investigation of continuous cyclodextrin glucanotransferase production by the alginate-immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. in an airlift reactor. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, p. 1538-1542, 2007.

LISTIARINI,K.; CHUN,W.; SUN, D.D.; LECKIE, J.O.; **Fouling mechanism and resistance analyses of systems containing sodium alginate, calcium,**

alum and their combination in dead-end fouling of nanofiltration membranes. Journal of Membrane Science, v.344, p. 244–251, 2009.

McDONALD, L.C.; SHIEH, D.H.; FLEMING, H.P.; McFEETERS, R.F.; THOMPSON, R.L. **Evaluation of malolactic-deficient strains of *Lactobacillus plantarum* for use in cucumber fermentations.** Food Microbiology. v. 10, p. 489-99, 1993.

MAN, J.C., ROGOSA, M. and SSHARPE, M.E. **A medium for the cultivation of lactobacilli.** Applied Bacteriology, v.23, p. 130-135,1960.

MARSHALL, V. M.; RAWSON, H. L. **Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt.** International Journal of Food Science and Technology. v.34, p.137-143, 1999.

MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. **The role of bioreactors in tissue engineering.** Trends in Biotechnology. v. 22, n. 2, p. 80-86, 2004.

MARTIN, Y.; VERMETTE, P. **Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances.** Biomaterials, v. 26, p. 7481-7503, 2005.

MASSAGUER, P.R. **Microbiologia dos processos alimentares.** Editora Varela, São Paulo, SP, Brasil, 2005.

MELLO, B.C.B.S.; PETRUS, J.C.C.; HUBINGER, M. D. **Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration.** Journal Food Engineering, v. 96, p. 533-539, 2010.

MERCHUK, J.C. **Gas holdup and liquid velocity in a two-dimensional airlift reactor.** Chemical Engineering Science v. 41, p. 11-16, 1986.

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. **Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from “Himematsutake”, the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill.** Agricultural Biological Chemistry, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MOLIN, G.; JEPPSSON, B.; JOHANSSON, M.L.; AHRNÉ, S.; NOBAEK, S.; STAHL, M.; BENGMARK, S. **Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. Associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines.** Journal Applied Biotechnology. v.74, p.314-323, 1993.

MORESI, M. **Optimal design of airlift fermenters.** Biotechnology. Bioeng. v.23, p. 2537-2560, 1981.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**, 2nd edn. Kluwer, Dordrecht, 2000.

NGUYEN, T.L.; CHAMPAGNE, B.H.L.; GOULET, J. **Growth of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* on tofu whey.** International Journal of Food Microbiology. v. 89, p. 67-75. 2003.

NIENOW, A.W. **Hydrodynamics of stirred bioreactors.** Applied Mechanical Review. v. 51, p. 3-32, 1998.

OSAWA, R.; KUROISO, K.; GOTO, S.; SHIMZU, A. **Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods.** Applied and Environmental Microbiology. v. 66, p. 3093-3097, 2000.

OUNIS, B.W.; CHAMPAGNE, C.P.; MAKHLOUF, J.; BAZINET, L. **Utilization of tofu whey pre-treated by electromembrane process as a growth medium for *Lactobacillus plantarum* LB17.** Desalination, v. 229, p. 192-203, 2007.

PENÑAS, E.; PRÉSTAMO, G.; POLO, F.; GOMEZ, R. **Enzymatic proteolysis, under high pressure of soybean whey: Analysis of peptides and the allergen Gly m 1 in the hydrolysates.** Food Chemistry. v. 99, p. 569-573, 2006.

PLENGVDHYA, V.; BREIDT, F.; LU, ZHONGJING; FLEMING, H.P. **DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentation.** Applied and Environmental Microbiology. v.73, p. 7697-7702, 2007.

PULIDO, R.P.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; CANAMERO, M.M.; GÁLVEZ. **Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture dependant methods.** Applied and Environmental Microbiology. v.71, p. 7872-7879, 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, p.163-171, 2002.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **Tofu and soy milk production In the Book of Tofu.** The Soyfoods Center. v.2, 1984.

SIEGEL, M.H.; ROBINSON, C.W. **Application of airlift gas-liquid-solid reactors in Biotechnology.** Chemical Engineering Science. v.47, p. 3387-3394, 1992.

SIKDER, J.; CHAKRABORTY, S.; PAL, P.; DRIOLLE, E.; BHATTACHARJEE, C.; **Purification of lactic acid from microfiltrate fermentation broth by cross-flow nanofiltration.** Biochemical Engineering Journal, v. 69, p. 130-137, 2012.

SUTHERLAND, I. W. **Bacterial exopolysaccharides.** Advances in Microbiology and Physiology, v.8, p.143-213, 1972.

TALLON, R.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M.C.; **Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56.** Research in Microbiology. v. 154, p. 705-712, 2003.

TIMMER, J.M.K.; KROMKAMP, J.; ROBBERTSEN, T. **Lactic acid separation from fermentation broths by reverse osmosis and nanofiltration.** Journal of Membrane Science, v. 92, p. 185-197, 1994.

TORINO, M. I.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. **Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.68, p.259-265, 2005.

VAQUERO, I.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. **Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine.** International Journal of Food Microbiology. v. 96, p. 199-204, 2004.

XU, L.; LAMB, K.; LAYTON, L.; KUMAR, A. **A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing.** Food Research International, v. 37, p. 867-874, 2004.

ZHANG, Z.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. **Effects of the hydrodynamic environment and shear protectants on survival of erythrocytes in suspension.** Journal of Biotechnology, v. 43, p. 33-40, 1995.

ZHANG, L.; LIU, C.; ZHAO, Y.; ZHANG, X.; ZENG, W.; YANG, Z.; LI, S. **Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus***

plantarum C88. International Journal of Biological Macromolecules. v.54, p. 270-275, 2013.