



## PRODUÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE PROBIÓTICOS EM BIORREATORES DE CÉLULAS IMOBILIZADAS

Graziela Bruschi Brinques<sup>1</sup>, Marco Antônio Z. Ayub<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (BIOTECLAB-ICTA)  
Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)  
R. Eng. Luis Englert, s/n. Campus Central. CEP: 90040-040 - Porto Alegre - RS - BRASIL,  
E-MAIL: [grazibb@enq.ufrgs.br](mailto:grazibb@enq.ufrgs.br), [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br)

Tradicionalmente os processos fermentativos são realizados em biorreatores empregando células livres no meio de cultivo para a obtenção de uma imensa diversidade de produtos. No entanto, atualmente, a utilização de biorreatores com células imobilizadas (CI) tem atraído bastante o interesse pois esta tecnologia apresenta, geralmente, inúmeras vantagens em relação a metodologia convencional com células em suspensão. Fermentação contínua com CI oferece a possibilidade de redução de ciclos de processos, redução de custos, minimização do espaço físico de planta necessário para o processo e manufatura de produtos mais uniformes. A realização de alguns, se não todos, estes benefícios pode alavancar esta nova metodologia, tornando-a uma das tecnologias mais populares entre os processos fermentativos industriais. O objetivo deste trabalho é a otimização do processo de cultivo de células imobilizadas de Lactobacilos em soro de leite, visando a obtenção de probióticos com viabilidade comercial. Na primeira etapa dos trabalhos foi realizada a seleção de bactérias lácticas em uma coleção de bactérias do BIOTECLAB-ICTA extraída de queijos coloniais em um trabalho prévio realizado. Aquelas que apresentaram maior produção de biomassa em 48h em meio de cultivo MRS foram selecionadas para o prosseguimento do trabalho.

**Palavras Chaves:** células imobilizadas, probióticos, biorreatores.

### 1 INTRODUÇÃO

Tecnologias em imobilização de células vêm amplamente sendo desenvolvidas desde o início dos anos 80 e, milhares de documentos a respeito de CI estão atualmente disponibilizados em sites científicos, apresentado inúmeros procedimentos para a imobilização de células. A maior parte dos dados publicados para os sistemas com CI trata da operação de biorreatores nos quais ocorre a biossíntese ou bioconversão, conduzindo a uma ampla gama de compostos, variando desde metabólitos primários a biomoléculas de alto valor (JUNTER, JOUENNE, 2004).

As principais vantagens das culturas de CI sobre as culturas convencionais (células livres) são citadas a seguir:

– como as CI são capazes de se multiplicar durante a metabolização do substrato enquanto permanecem confinadas dentro de uma estrutura

de imobilização, alta densidade de célula pode ser esperada neste tipo de cultura, levando a altas taxas volumétricas de reação;

– a habilidade de crescer em uma condição de imobilização faz com que seja possível regeneração das culturas de CI, seguindo sua operação em condições hostis de incubação, tais como em um meio pobre em nutrientes ou na presença de compostos tóxicos;

– o uso da biomassa anexada ou aprisionada em um suporte assegura a retenção eficiente da biomassa durante bioprocessos contínuos mesmo a altas taxas de diluição;

– facilidade nas operações posteriores ao processo de fermentação, em particular nas separações célula/líquido;

– aumento da estabilidade operacional e de armazenamento na atividade celular;

– capacidade de reutilização do biocatalítico de CI;



## OKTOBER FÓRUM 2005 – PPGEQ

– altos rendimentos de produtos específicos.

Como um dos obstáculos tecnológicos para a implementação da tecnologia em escala industrial, a resistência à transferência de massa dentro das matrizes de imobilização se destaca. Há a falta de dados quanto às características da transferência de massa, à mistura e de conhecimento da forma como os nutrientes se difundem da fase líquida até a matriz e de como os compostos metabolizados se difundem da matriz até a fase de líquido *bulk* (PILKINGTON, et al., 1998; JUNTER, JOUENNE, 2004).

A utilização de células imobilizadas para a obtenção de probióticos se destaca como um processo de grande interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica. Probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares microbiológicos que afetam benéficamente o seu hospedeiro pela melhora do balanço microbiano intestinal. As bactérias ácido lácticas são reconhecidas por seu potencial probiótico, como no alívio da intolerância à lactose, diminuição de colesterol, diminuição da incidência de diarreia, estimulação do sistema imune, controle de infecções, atuação como antibiótico, supressão de tumores e proteção contra câncer de cólon, bexiga; pela manutenção do balanço da microflora intestinal (SCHEINBACH, 1998; CHAMPAGNE et al., 2005).

A seleção da cepa é uma etapa crítica para o desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos, pois nem todas podem ser facilmente produzidas industrialmente devido ao seu baixo rendimento ou dificuldade de permanecer viva durante o processo/estocagem. Outra característica importante a cerca da seleção é o potencial de toxicidade dos microrganismos. No caso especial das bactérias ácido lácticas, elas estão sendo consumidas durante toda a história em diversas populações com segurança (CHAMPAGNE et al., 2005).

Como comentado anteriormente, uma das características mais importantes da tecnologia de CI é o aumento da resistência das células a condições adversas do meio. Portanto, a utilização da técnica de imobilização de células em biorreatores se mostra como uma factível metodologia para a obtenção de probióticos resistentes. O estudo completo de um novo processo de CI probióticas em biorreatores é um trabalho de vanguarda, uma vez que a maioria dos estudos realizados neste campo são fragmentados, não comportando todos os aspectos envolvidos na obtenção dos probióticos em CI.

O presente projeto visa o estudo da otimização do processo de cultivo de células imobilizadas de Lactobacilos em soro de leite, visando a obtenção de probióticos com viabilidade comercial. Este trabalho contempla a primeira etapa do projeto que é a seleção de bactérias lácticas descritas como probióticas pela literatura em uma coleção de bactérias do ICTA extraída de queijos coloniais em um trabalho prévio já realizado.

### 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se a seleção de bactérias lácticas descritas como probióticas pela literatura em uma coleção de bactérias do ICTA extraída de queijos coloniais em um trabalho prévio já realizado.

#### 2.1 Preparação dos microrganismos

Cento e vinte diferentes bactérias isoladas de soro de queijo colonial identificadas como sendo do gênero Lactobacilos foram inoculadas em 5 mL de caldo MRS (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o crescimento, seguiu-se a análise por coloração de gram para verificar a presença única de bacilos gram positivos.

#### 2.2 Teste de crescimento

Os isolados recuperados foram inoculadas (100 µL) em 5 mL de caldo MRS (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 h. Após as 24 h, o inóculo foi transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de caldo MRS (Oxoid) e estes foram incubados em shaker (100 rpm) por 48 h a 37 °C. Para a recuperação das células, duas alíquotas de 10 mL do meio com crescimento foi centrifugado a 2500 g por 10 min a 4 °C e enxaguado duas vezes com água destilada. As células então recuperadas foram secas em estufa a 70 °C por 72 h para determinação do peso seco. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 são apresentados os valores de biomassa em peso seco obtidos nos testes de crescimento. Observa-se que houve ampla diversidade de rendimento. Foram selecionados os 12 microrganismos que apresentaram maior produção de biomassa para ser realizada a identificação da espécie por testes bioquímicos pelo MAA/ICBS/UFRGS. A elevada conversão de biomassa é uma importante variável para a seleção de uma cepa de probiótico a ser utilizada em alimentos, uma vez que altos níveis de células normalmente são recomendados para que uma quantidade viável de células consiga chegar ao trato intestinal e ter atividade celular para desempenhar seu papel benéfico.



## OKTOBER FÓRUM 2005 – PPGEQ

Tabela 1: Rendimento de biomassa em peso seco.

Cod. Bact.	Massa (g/L)	Cod. Bact.	Massa (g/L)
9	1.1100	79	1.3175
13	1.4150	80	1.0725
18	1.6330	81	1.2350
35	0.7800	83	0.8000
38	1.5100	84	1.6600
39	1.5500	88	2.2700
57	1.6625	106	1.4325
58	1.0400	108	1.3500
68	0.5325	109	1.5600
70	0.7525	111	0.9100
73	1.4575	112	0.0100
74	1.4675	114	1.5525
75	1.2575	115	1.6350
77	1.5200	116	1.5400
78	1.4600	117	1.5050

#### 4 PRÓXIMAS ETAPAS DE TRABALHO

As etapas a serem realizadas no próximo ano de trabalho são:

- proposição de um modelo matemático para um biorreator em leito fixo com CI e otimização das suas condições de alimentação;
- teste de diferentes tipos de suportes para imobilização das bactérias ácido lácticas contemplando variáveis como concentração do material polimérico, tamanho das partículas imobilizadas e relação entre a proporção da solução polimérica e quantidade de biomassa;
- teste de resistência das partículas de imobilizante à condições de estresse ambiental;
- experimentos para determinação da difusividade de lactose na matriz imobilizante/
- testes de crescimento e desempenho do(s) microrganismos em shaker e, posteriormente em biorreator, com células livres e imobilizadas.

#### 5 AGRADECIMENTOS

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- CHAMPAGNE, C. P.; Gardner, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food and Nutrition**, v.45, p. 61-84, 2005.
- JUNTER, G. A., JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the

proteome...or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v.22, p.633-658, 2004.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.18, n.2&3, p.237-255, 1998.

SCHEINBACH, S. Probiotics: functionality and commercial status. **Biotechnology Advances**, v.16, n.3, p.581-608, 1998.