

MARIA ROSA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO
DE PROBIÓTICOS E SUA UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO
DE POEDEIRAS COMERCIAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Tecnologia Química, área de
concentração em Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientador: Prof. Dr. Sebastião G. Franco

CURITIBA

2001

MARIA ROSA MACHADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO
DE PROBIÓTICOS E SUA UTILIZAÇÃO NA ALIMENTAÇÃO DE
POEDEIRAS COMERCIAIS**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química – com concentração em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Orientador:

Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. SEBASTIÃO GONÇALVES FRANCO
Setor de Ciências Agrárias, UFPR



Prof. Dr. RENATO JOÃO SOSSELA DE FREITAS
Setor de Tecnologia/UFPR

Curitiba, 30 de Março de 2001

*Aos meus pais Antonio e Maria
Adorides, por me ensinarem com
amor a perseverança e a dedicação.*

*Ao meu esposo Jaime, pelo seu
amor e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar durante toda a minha vida.

Ao Professor Doutor Carlos Ricardo Soccol, pelo estímulo e acompanhamento durante a orientação desta dissertação.

Ao Professor Doutor Sebastião Gonçalves Franco, pelo apoio, incentivo e co-orientação desta dissertação.

Ao Professor Doutor Renato Sossela de Freitas, por ter aceitado avaliar este trabalho.

À Maria Carolina R. dos Santos, Maria Giovana B. Pagnoncelli, Mitiyo F. Miyaoka, Adenise L. Woicienchowski e Cristiane V. Tagliari, pela fiel amizade e constante incentivo nos momentos de maior dificuldade.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos: Adriane, Cristina, Maria Lúcia, Ana Maria, Flávera, Saul, Sandro, Débora, Júlio e Professor Giovani, pela amizade e experiências compartilhadas.

À Professora Doutora Nina Waszczynskyi, pela dedicação ao curso de Mestrado.

Ao Professor Doutor Luís Mário Fedalto, pelo auxílio na análise estatística dos resultados obtidos no experimento de campo.

Aos funcionários da Fazenda Experimental da UFPR, pelo auxílio na coleta de dados.

À CAPES, pelos suporte financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

Às minhas primas Karla e Flávia e à minha tia Cleuza, com as quais é bom compartilhar a vida.

À toda minha família, pelo carinho e apoio durante esta etapa de minha vida.

RESUMO

A produção de ovos comerciais tem passado por grandes avanços em termos de linhagens muito mais produtivas e de rações mais saudáveis. Todo esse progresso leva obrigatoriamente ao estudo de novas técnicas de produção e melhorias na qualidade das rações, visando atender as exigências nutricionais da linhagem e diminuindo o uso indiscriminado de antibióticos. Uma das alternativas é o uso de probióticos na ração, o qual se baseia no princípio da simbiose, onde há associação de microrganismos da flora normal com os *Lactobacillus* de ação probiótica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho de poedeiras comerciais frente à ação de probióticos. Também objetivou-se a otimização das condições físicas e nutricionais para uma melhor produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum* utilizando o melaço de cana-de-açúcar como meio de cultivo de baixo custo. Para tanto foram testadas diversas condições nutricionais e físicas, e finalmente fez-se uma cinética da produção de biomassa viva com vistas à confirmação dos resultados obtidos na otimização. A produção ótima de biomassa viva foi de 5080 mg/L de meio de melaço de cana-de-açúcar a 7% e extrato de levedura a 2,7% nas condições ideais de fermentação: temperatura de 35°C, pH 7,0 e tempo de cultivo de 24 a 48 horas. Quanto à produção de ovos não houve aumento significativo, porém as poedeiras que receberam ração contendo probiótico apresentaram maior resistência a doenças que afetam o trato intestinal.

Palavras-chave: Probiótico, galinhas poedeiras, *Lactobacillus fermentum*, melaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The commercial egg production has passed through great advances in terms of much more productive ancestries and more healthful feed. All this progress necessary leads to the study of new techniques of production and improvements in the quality of the feed, aiming the nutritional requirements of the ancestries and diminishing the indiscriminate antibiotic use. One of the alternatives is the use of probiotics in the feed, which is base on the principle of the symbiosis, where it has an association of microorganisms of the normal flora with the probiotics lactobacillus. The objective of this research was to evaluate the performance of commercial laying hens and the quality of the eggs under the action of lactobacillus probiotics. Also, this research studied the optimization of the physical and nutritional conditions to obtain maximum biomass yield of *Lactobacillus fermentum*, using sugar cane molasses as a low cost culture medium. Several nutritional and physical conditions were tested, and finally, a kinetic study of the biomass production was made in order to confirm the results obtained from the optimizations processes. Results showed that the maximum biomass yield was 5080 mg/L of culture medium with 7% of sugar cane molasses and 2,7% of yeast extract, under ideal fermentation conditions: temperature of 35°C, pH 7,0 and 24 the 48 hours fermentation. Concerning to the egg production, it seems that it was not been significantly increased, however the laying hens that had received the feed with probiotics (*Lactobacillus fermentum* biomass) had showed greater resistance to illnesses that affect the digestive system.

Word-key: probiotics, laying hens, *Lactobacillus fermentum*, sugar cane molasses.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. OBJETIVOS	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. POEDEIRAS COMERCIAIS	3
2.1.1. Produção e consumo de ovos	3
2.1.2. Sanidade avícola	6
2.2. PROBIÓTICO	6
2.2.1. Histórico	6
2.2.2. Mecanismo de ação dos probióticos	8
2.2.2.1. Competição por sítios de ligação	8
2.2.2.2. Competição por nutrientes	8
2.2.2.3. Produção de substâncias antibacterianas	9
2.2.2.4. Estímulo ao sistema imunológico	10
2.2.3. Requisitos para um microrganismo ser um probiótico	10
2.2.4. Segurança para o consumo humano	13
2.3. PROBIÓTICOS PARA POEDEIRAS COMERCIAIS	13
2.3.1. Flora intestinal das poedeiras comerciais	16
2.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA PREPARAÇÕES PROBIÓTICAS	21
2.4.1. Fermentação	21

2.4.1.1. Fermentação láctica	21
2.4.1.2. Fermentação alcoólica	23
2.5. BACTÉRIAS LÁCTICAS	23
2.5.1. Características gerais do gênero <i>Lactobacillus</i>	24
2.5.1.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	26
2.5.1.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	28
2.5.1.3. <i>Lactobacillus fermentum</i>	28
2.6. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS	29
2.6.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.7. CANA-DE-AÇÚCAR	30
2.7.1. Panorama da produção de cana-de-açúcar	31
2.7.2. Melaço de cana-de-açúcar	32
2.8. PROGRAMA DE ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. MATERIAL	36
3.1.1. Microrganismo	36
3.1.2. Matéria –prima	37
3.1.3. Equipamentos	37
3.2. MÉTODOS	38
3.2.1. Métodos analíticos	38
3.2.1.1. Determinação do pH	38
3.2.1.2. Açúcares redutores	38
3.2.1.3. Açúcares totais	39
3.2.2. Avaliação do melaço de cana-de-açúcar	39
3.2.3. Manutenção de cepas	39
3.2.4. Contagem de células viáveis	40
3.2.5. Determinação de biomassa	41
3.2.6. Ensaio de otimização para a produção de biomassa	41
3.2.6.1. Adição de fonte de nitrogênio	41
3.2.6.2. Primeiro planejamento experimental (2^{6-2})	41
3.2.6.3. Segundo planejamento experimental (2^{5-1})	42
3.2.6.4. Terceiro planejamento experimental (2^{4-0})	43
3.2.6.5. Quarto planejamento experimental (2^2)	44
3.2.7. Cinética da produção de biomassa viva de <i>Lactobacillus fermentum</i> em bioreator	44
3.2.7.1. Preparo do inóculo	45

3.2.7.2. Preparo do meio	45
3.2.7.3. Fermentação em bioreator	45
3.2.7.4. Avaliação do fermentado	46
3.2.8. Liofilização	46
3.2.8.1. Determinação da viabilidade das células liofilizadas	47
3.2.9. Estudo cinético do crescimento celular <i>Lactobacillus fermentum</i> em meio comercial MRS	47
3.2.10. Produção de probiótico para experimento de campo	47
3.2.10.1. Preparo do inóculo para a fermentação	48
3.2.10.2. Fermentação do substrato	48
3.2.11. Viabilidade do probiótico liofilizado durante a estocagem	48
3.2.12. Avaliação da atividade probiótica em poedeiras comerciais	49
3.2.12.1. Local e instalações	49
3.2.12.2. Animais	50
3.2.12.3. Alimentação	50
3.2.12.4. Manejo	53
3.2.12.5. Variáveis estudadas	53
3.2.12.6. Análise estatística	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	54
4.2. CONDIÇÕES NUTRICIONAIS	55
4.2.1. Fontes de nitrogênio	55
4.3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA (CÉLULAS VIÁVEIS)	56
4.3.1. Primeira otimização	57
4.3.2. Segunda otimização	61
4.3.3. Terceira otimização	64
4.3.4. Quarta otimização	66
4.4. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Lactobacillus fermentum</i> EM MEIO A BASE DE MELAÇO DE CANA	70
4.5. VIABILIDADE DO PROBIÓTICO LIOFILIZADO DURANTE A ESTOCAGEM	75
4.6. ANÁLISE ECONÔMICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Lactobacillus fermentum</i>	76
4.7. ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OVOS	78
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PIANTEL ESTIMADO GALINHAS POEDEIRAS (MILHARES DE CABEÇAS)	4
TABELA 2-	PRODUÇÃO DE OVOS – BRANCOS E VERMELHOS (MILHARES DE CAIXAS COM 30 DÚZIAS).....	5
TABELA 3-	CONSUMO DE OVOS (BILHÕES DE UNIDADES)	5
TABELA 4-	NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE MICRORGANISMOS NO TRATO ALIMENTAR DE POEDEIRAS	20
TABELA 5-	CLASSIFICAÇÃO DOS <i>Lactobacillus</i> EM SUBGÊNEROS.....	26
TABELA 6-	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^{6-2})	42
TABELA 7-	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^{5-1})	43
TABELA 8-	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^{4-0})	43
TABELA 9-	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^2)	44
TABELA 10-	RAÇÃO EXPERIMENTAL COM NÍVEL DE ÓLEO DE 0%	51
TABELA 11-	ANÁLISE CALCULADA DA RAÇÃO COM 0% DE ÓLEO	52
TABELA 12-	RAÇÃO EXPERIMENTAL COM NÍVEL DE ÓLEO DE 2,52%	52
TABELA 13-	ANÁLISE CALCULADA DA RAÇÃO COM 2,52% DE ÓLEO	52
TABELA 14-	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA	54
TABELA 15-	ETAPAS DE UM EXPERIMENTO UTILIZANDO FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS	57
TABELA 16-	PRIMEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO (2^{6-2})	58
TABELA 17-	SEGUNDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO (2^{5-1})	62
TABELA 18-	TERCEIRO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FRACIONÁRIO (2^{4-0})	65
TABELA 19-	QUARTO PLANEJAMENTO COMPLETO (2^2).....	67
TABELA 20-	PARAMÊTROS CINÉTICOS PARA <i>Lactobacillus fermentum</i>	70
TABELA 21-	ANÁLISE ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	COMPETIÇÃO POR NUTRIENTES	9
FIGURA 2-	BACTÉRIAS NÃO PATOGÊNICAS ESTIMULAM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA	10
FIGURA 3-	<i>SACCHARUM OFFICINARUM</i>	31
FIGURA 4-	PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA ÚLTIMA DÉCADA	32
FIGURA 5-	FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR	34
FIGURA 6-	ESTAÇÃO DE AVICULTURA	49
FIGURA 7-	GALINHAS HISSEX WHITE E GALINHAS BROWN	50
FIGURA 8-	PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, APÓS 48 HORAS DE CULTIVO.....	55
FIGURA 9-	DIAGRAMA DE PARETO PARA RENDIMENTO – PRIMEIRA OTIMIZAÇÃO	60
FIGURA 10-	DIAGRAMA DE PARETO PARA RENDIMENTO – SEGUNDA OTIMIZAÇÃO	64
FIGURA 11-	DIAGRAMA DE PARETO PARA RENDIMENTO – TERCEIRA OTIMIZAÇÃO	66
FIGURA 12-	SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA RENDIMENTO	69
FIGURA 13-	CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DURANTE 48 HORAS	71
FIGURA 14-	VELOCIDADE DE DEGRADAÇÃO DE GLICOSE EM FUNÇÃO DO TEMPO	72
FIGURA 15-	CURVA DE CRESCIMENTO DO <i>Lactobacillus fermentum</i> LPB.....	73
FIGURA 16-	VELOCIDADE DE CRESCIMENTO DO <i>Lactobacillus fermentum</i>	73
FIGURA 17-	EVOLUÇÃO DOS RENDIMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO	75
FIGURA 18-	VIABILIDADE CELULAR DURANTE A ESTOCAGEM DE <i>Lactobacillus fermentum</i> LPB LIOFILIZADO.....	76
FIGURA 19-	PRODUÇÃO MÉDIA DE OVOS	78
FIGURA 20-	PRODUÇÃO MÉDIA DE OVOS EM RELAÇÃO A LINHAGEM	79

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- ESPÉCIES FREQUENTEMENTE USADAS EM PRODUTOS PROBIÓTICOS	12
QUADRO 2- AÇÃO E IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NO TRATO DIGESTIVO	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

CCT – Coleção de Culturas Tropicais

C.A. - Citrato de amônio

°C – graus Celsius

d - dias

F. D. - Fosfato dibásico

E. L. - Extrato de levedura

g – grama

g/L – gramas por litro

h - hora

Kg\ L – quilograma por litro

L – litro

m - mês

M. C. - Melaço de cana-de-açúcar

ML – mililitro

S. M. - Sulfato de magnésio

μL – microlitro

UFC – unidade formadora de colônia

V/v – volume/volume

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a avicultura mundial passou por um aumento significativo, pesquisadores e produtores começaram a observar que determinadas cepas bacterianas haviam se tornado resistentes aos antibióticos utilizados indiscriminadamente como promotores de crescimento, sendo necessário o uso de outros aditivos (PEDROSO, MORAES e ARIKI, 1999).

Ao se pesquisar alternativas para a substituição dos antibióticos na produção animal, foi centralizado as atenções em um dos mecanismos de defesa natural dos animais, os microrganismos presentes no trato gastrintestinal. Assim os probióticos passaram a ser uma alternativa eficaz de substituição dos antibióticos, agindo como promotores de crescimento e no tratamento de distúrbios gastrintestinais (MARUTA, 1993).

Os probióticos são definidos como “cultura pura ou composta de microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural” (FULLER, 1989).

Para a produção de *Lactobacillus* com atividade probiótica utiliza-se meio de cultivo MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960), e este meio apresenta um custo muito elevado, sendo este um dos problemas para a produção de biomassa em grande escala.

A cana-de-açúcar é uma importante cultura agrícola do país e se constitui por diversos subprodutos como o melaço de cana-de-açúcar, o qual, é um substrato rico em açúcares fermentecíveis e minerais, tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias lácticas. E além de apresentar baixo custo, favorecendo o seu uso na produção em grande escala.

1.1. OBJETIVOS

O presente trabalho visa os seguintes objetivos:

- Produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum*, com atividade probiótica, utilizando meios de cultivo de baixo custo, como melaço de cana-de-açúcar;
- Otimização das condições físicas e nutricionais para uma maior produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum*;
- Análise econômica do meio utilizado como meio de cultivo;
- Formulação de um probiótico utilizando o *Lactobacillus fermentum* isolado do trato digestivo de frango caipira;
- Estudo dos efeitos do probiótico em poedeiras comerciais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. POEDEIRAS COMERCIAIS

2.1.1. Produção e consumo de ovos

Nas últimas décadas as pesquisas científicas conduziram ao desenvolvimento e melhoramento das linhagens de poedeiras comercial, alterando a sua evolução natural, e dando origem às ‘poedeiras comerciais’. Foi a partir desses estudos, que se encaixam na ‘Revolução Agrícola’, que a avicultura mundial passou a experimentar um aumento significativo nos volumes de produção (ANTUNES, 2000). A avicultura industrial vem obtendo altas taxas de crescimento, com base principalmente em dois fatores essenciais: um adequado e consistente suprimento de ração de boa qualidade atendendo as necessidades das linhagens e o controle de doenças para a manutenção de uma boa saúde animal (FERREIRA e OLIVEIRA, 1996).

No Brasil houve um aumento estimado de poedeiras comerciais em 1999 de 8% maior que em 1998, e vem se recuperando após a grande redução registrada em 1997. Em 2000 o plantel de poedeiras se manteve estável (TABELA 1).

Em 1999 a produção brasileira de ovos aumentou 17,5% em relação à produção de 1997 (TABELA 2), e este aumento deve-se ao incremento de novas técnicas e o uso de rações mais bem elaboradas, visando sempre manter um menor custo de produção.

O ovo de galinha é um dos alimentos mais consumidos no mundo, tanto pelo baixo custo como por razões de culturas gastronômicas. Formosa é o país que mais consome ovos com um consumo de 340 unidades per capita, o Brasil está em 25 °

lugar com um consumo per capita no ano de 1999 de 90 ovos, com um aumento de 8,4% quando comparado a 1998 onde o consumo foi de 83 ovos (TABELA 3) (SILVA, 2000).

TABELA 1 - PLANTEL ESTIMADO DE GALINHAS POEDEIRAS (MILHARES DE CABEÇAS).

	1996	1997	1998	1999	2000
Janeiro	60.754	50.573	55.319	60.389	62.912
Fevereiro	60.510	51.049	55.788	60.956	62.552
Março	58.630	51.254	55.627	61.216	62.248
Abril	57.525	50.836	55.552	60.579	61.590
Maio	56.330	51.035	55.384	59.970	60.808
Junho	54.905	51.288	54.970	60.023	60.094
Julho	54.316	51.344	55.627	60.197	60.235
Agosto	53.865	52.045	56.182	60.644	60.365
Setembro	53.837	53.254	57.310	61.567	60.455
Outubro	53.517	53.646	58.087	61.735	59.088
Novembro	53.755	54.200	58.847	62.326	61.215
Dezembro	54.076	54.358	59.458	62.784	58.847
Média	56.002	52.074	56.513	61.032	60.867
Total	672.020	624.882	678.151	732.386	730.409

FONTE: UBA - União Brasileira de Avicultura

**TABELA 2 - PRODUÇÃO DE OVOS – BRANCOS E VERMELHOS
(MILHARES DE CAIXAS COM 30 DÚZIAS).**

	1996	1997	1998	1999	2000
Janeiro	4.005	2.807	3.050	3.339	3.497
Fevereiro	4.006	2.841	3.075	3.377	3.509
Março	3.909	2.872	3.118	3.435	3.498
Abril	3.786	2.886	3.139	3.435	3.471
Maio	3.732	2.897	3.132	3.414	3.441
Junho	3.645	2.920	3.131	3.406	3.425
Julho	3.566	2.902	3.136	3.400	3.400
Agosto	3.510	2.911	3.141	3.401	3.387
Setembro	3.525	2.953	3.185	3.434	3.386
Outubro	3.508	2.979	3.221	3.448	3.309
Novembro	3.514	2.997	3.259	3.460	3.428
Dezembro	3.549	3.024	3.290	3.472	3.259
Média	3.688	2.916	3.156	3.418	3.417
Total	44.255	34.989	37.877	41.021	41.010

FONTE: UBA - União Brasileira de Avicultura

TABELA 3 - CONSUMO DE OVOS (BILHÕES DE UNIDADES).

Consumo	1990	1997	1998	1999
Mundial	440,431	632,456	647,901	660,600
Brasil %	2,7	2,0	2,1	2,5

FONTE: UBA - União Brasileira de Avicultura

2.1.2. Sanidade avícola

Por meio do Comitê de Sanidade Avícola foi instituído oficialmente pelo documento n. 61 de 7 de março de 1997 o Programa Nacional de Sanidade Avícola, embora já existente desde 19 de setembro de 1994. Espera-se com isso aumentar a oferta de produtos sanitariamente controlados visando atender às regras sanitárias do mercado interno e externo (SANIDADE, 1998).

Segundo autores descritos por REQUE (1999), as doenças infecciosas são de grande importância, porque as epidemias podem disseminar-se rapidamente numa criação, provocando a mortalidade, perda da comercialização e redução na postura. Algumas dessas doenças podem ser transmitidas ao homem, no caso das salmoneloses, e esta contaminação ocorre através da ingestão de carnes ou ovos insuficientemente cozidos.

2.2. PROBIÓTICO

2.2.1. Histórico

A palavra ‘probiótico’, significa ‘em prol da vida’, e foi usada pela primeira vez em 1965 por LILLY e STILLWELL, os quais descreveram substâncias secretadas por um microrganismo que estimula o crescimento de um outro, o oposto de ‘antibiótico’(SULLIVAN et al. 1992). Seguiram-se inúmeros trabalhos sobre microrganismos com ação benéfica e em 1974 PARKER usou o termo para descrever suplemento alimentar para animais e definiu como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio de microrganismos intestinais. Foram estudados diferentes microrganismos com o propósito de conhecer e oferecer proteção contra infecção por patógenos intestinais e evitando o uso de antibióticos.

Observou-se a complementação das definições antecessoras, com a adequação à alguma característica peculiar. FULLER (1989), definiu probiótico como ‘Suplemento alimentar composto de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal’. HAVENAAR et al (1992), complementando a definição proposta por FULLER (1989), definiram probiótico como ‘Cultura pura ou composta de microorganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam o hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural’.

O efeito protetor da microbiota industrial contra a colonização por patógenos é conhecido há muitos anos, METCHNIKOFF (1907) foi o primeiro a observar que agricultores búlgaros que consumiam leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* apresentavam maior longevidade, o que levou à suposição de RETTGER e CHAPLIN (1921) de que este efeito benéfico era proveniente da colonização intestinal pelo *L. acidophilus*, os quais demonstraram uma influência positiva na flora normal do trato gastrointestinal por prevenir a putrefação, prolongando a vida (SMITH, 1991).

Em aves, os trabalhos de NURMI e RANTALA (1973) demonstraram que a microbiota de aves adultas normais apresentavam efeito protetor em pintos, contra a infecção por *Salmonella* spp., e no mesmo ano TORTURETO indicou melhoria nos índices zootécnicos, como melhor conversão alimentar e aumento no ganho de peso em aves que receberam *L. acidophilus*. Em 1977, KRUGER et al. conduziram estudos com poedeiras da raça Leghorn, com o intuito de investigar a possibilidade de interação entre culturas de *Lactobacillus* acrescentadas à dieta e estabelecer uma relação com a produção de ovos.

Os probióticos destinados ao consumo animal são denominados de DFM (Direct Fed Microorganisms), e vêm sendo empregados na prevenção, terapia e

manejo, como uma alternativa ao emprego de doses subclínicas de antibióticos (FERREIRA e TESHIMA, 2000).

2.2.2. Mecanismo de ação dos probióticos

O mecanismo de ação dos probióticos não é conhecido com exatidão, a maioria dos mecanismos agem pela combinação de vários fatores, como competição por sítios de ligação, produção de substâncias antibacterianas, estímulo ao sistema imunológico e competição por nutrientes (JIN et al. 1997; ROSAT e PFEIFER, 1998).

2.2.2.1. Competição por sítios de ligação

Algumas espécies específicas de bactérias produtoras de ácido láctico agem por exclusão competitiva com patógenos, através do bloqueio dos receptores das bordas dos microvilos, eliminando a colonização por microrganismos patogênicos, e protegendo também os vilos e a superfície absorviva de toxinas irritantes produzidas pelos microrganismos patogênicos e permitindo a regeneração da mucosa intestinal lesada (FERREIRA e OLIVEIRA, 1996; FOX, 1988; JIN et al. 1997).

2.2.2.2. Competição por nutrientes

JIN et al. (1997) e FOX (1988) explicam que no intestino, os microrganismos do probiótico realizarão uma rápida metabolização de substratos (açúcares, vitaminas, aminoácidos, proteínas), tornando-os indisponíveis aos patógenos e, por consequência, impedindo a proliferação destes. (FIGURA 1).

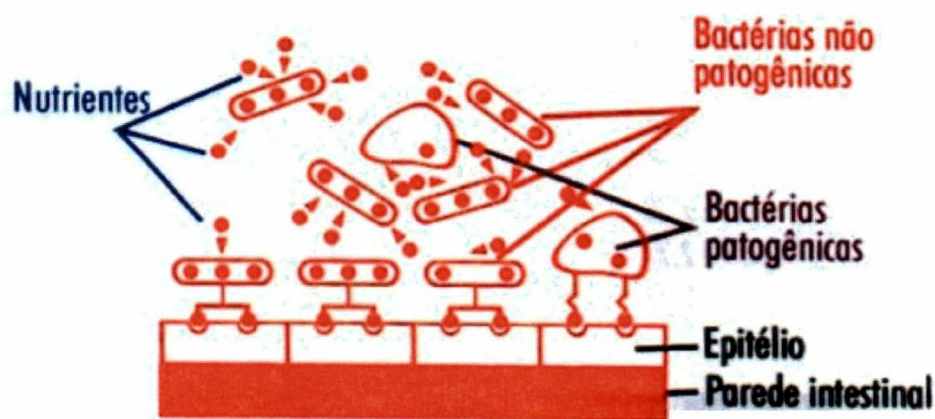


FIGURA 1 - COMPETIÇÃO POR NUTRIENTES.
 FONTE: FERREIRA e KUSSAKAWA, 1999.

2.2.2.3. Produção de substâncias antibacterianas

As bactérias probióticas podem produzir e liberar compostos como as bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio.

TAGG (1976), citado por REQUE (1999), define bacteriocinas como sendo de natureza protéica e têm ação bactericida com estreito espectro de inibição, elas são ativas contra organismos que estão intimamente relacionados, entretanto, bacteriocinas de organismos Gram positivos possuem um amplo espectro de inibição a espécies Gram positivas e são também ativas contra outras espécies Gram negativas.

Diversas espécies de *Lactobacillus* produzem antibióticos como os *L. acidophilus* que produzem acidolina e lactolina, o *L. plantarum* produz lactolina, essas substâncias inibem o crescimento de *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Listeria* sp. e *Escherichia coli*.

Segundo CHERRINGTON et al. (1996), citado por ANDREATTI e SAMPAIO (2000), a produção bacteriana de ácidos acéticos e lácticos reduz o pH

intestinal, criando condições desfavoráveis para o crescimento de bactérias patogênicas, incluindo o crescimento de bactérias Gram negativas.

2.2.2.4. Estímulo ao sistema imunológico

Alguns gêneros de bactérias intestinais, como os *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium*, estão diretamente relacionados com o estímulo da resposta imune, por meio do aumento da produção de anticorpos (FIGURA 2), ativação de macrófagos, proliferação de células T, produção de interferon, produção de IgA em resposta aos microrganismos enteropatogênicos, e podem acelerar a função fagocítica do sistema retículo-endotelial (JIN et al. 1997; FOX, 1988; MATSUZAKI e CHIN, 2000).

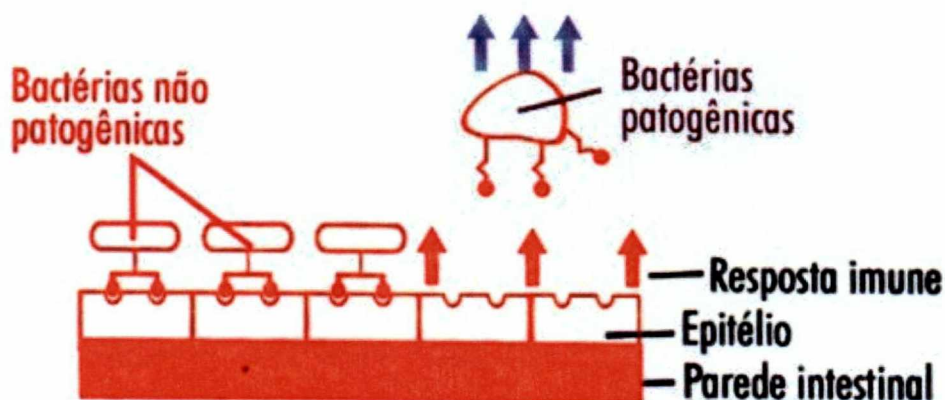


FIGURA 2 - BACTÉRIAS NÃO PATOGÊNICAS ESTIMULAM A RESPOSTA IMUNOLÓGICA.

FONTE: FERREIRA e KUSSAKAWA, 1999.

2.2.3. Requisitos para um microrganismo ser um probiótico.

Para que um probiótico seja efetivo é necessário que ele opere sobre uma variedade de diferentes condições ambientais e sobreviva em muitas diferentes formas. O probiótico poderá apresentar as seguintes características:

- 1) Ser um habitante normal do trato gastrointestinal do hospedeiro, ou auxiliar o crescimento destes (leveduras);
- 2) Sobreviver e colonizar rapidamente o intestino;
- 3) Sobreviver às condições adversas no trato gastrointestinal, como bile, sucos gástricos, pancreáticos e entéricos;
- 4) Ter capacidade antagonista às bactérias intestinais indesejáveis, produzindo substâncias tóxicas a estas, como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio;
- 5) Não ser tóxico e/ou patogênico;
- 6) Capaz de ser preparado como um produto viável em escala industrial;
- 7) Continuar estável e viável por longos períodos, sobre condições de estocagem e de campo;
- 8) Ter efeito benéfico comprovado no animal hospedeiro (FULLER, 1992; KLAENHAMMER e KULLEN, 1999).

Utilizam-se as bactérias gram positivas produtoras de ácido láctico, habitantes naturais do trato gastrointestinal e que agem efetivamente como probióticos, aderindo ao epitélio intestinal e colonizando o trato. Outros como *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyo* e *Bacillus bifidum* são utilizados combinados, isolados ou às vezes associados a leveduras, enzimas e outros agentes, com a finalidade de auxiliar as bactérias produtoras de ácido láctico na sua colonização (MARUTA, 1993).

Dentre estes, os microrganismos mais utilizados são *Bacillus subtilis* (classificado como transitório no trato gastrointestinal, pois não possui a capacidade de se fixar ao epitélio intestinal, mas a de auxiliar na multiplicação e colonização dos produtores de ácido láctico); *Lactobacillus acidophylus* (bactéria que produz

ácido láctico a partir da fermentação de açúcares, é anaeróbia facultativa e exigente nutricionalmente, necessitando para o seu crescimento das vitaminas: niacina, riboflavina e ácido fólico); *Enterococcus faecium* (são microrganismos bastante agressivos e um pouco mais resistente a altas temperaturas do que os *Lactobacillus*) (FERREIRA e KUSSAKAWA, 1999).

Os probióticos podem conter uma única espécie ou várias espécies de microrganismos. O QUADRO 1 apresenta uma lista de bactérias e outros microrganismos que são usados nas preparações probióticas.

QUADRO 1 - ESPÉCIES USADAS EM PRODUTOS PROBIÓTICOS.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. longum</i>
<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. breve</i>
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. fermentum</i>	
<i>L. helveticus</i>	
Outros	
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>	
<i>Lactococcus lactis lactis e cremoris</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides dextranum</i>	
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	
<i>Saccharomyces boulardii</i>	
<i>Escherichia coli</i>	

FONTE: SULLIVAN et al. (1992).

2.2.4. Segurança para o consumo humano

O uso de probióticos na ração animal apresenta benefícios aos consumidores de alimentos de origem animal, uma vez que os mesmos se mostram mais exigentes quanto à segurança dos produtos, os quais não deverão provocar nenhuma reação adversa no organismo, quando utilizados no lugar dos tradicionais antibióticos. Estudos realizados recentemente têm fornecido indicações positivas quanto à qualidade da carcaça e redução ou eliminação de prováveis resíduos de medicamentos na carne e nos ovos para o consumo humano (FERREIRA e OLIVEIRA, 1996).

Segundo JUVEN et al. (1991), citado por FERREIRA e OLIVEIRA (1996), os efeitos benéficos no uso de *Lactobacillus* como probióticos se estende a produção de substâncias antagônicas de largo espectro, que agem sobretudo, em espécies patogênicas para o homem.

O uso de probióticos traz importantes benefícios, como o controle de doenças como a salmonelose e o aumento do desempenho sem causar danos ao consumidor, como o que acontece com os antibióticos, pois eles podem causar resistência bacteriana quando ingeridos.

2.3. PROBIÓTICOS PARA POEDEIRAS COMERCIAIS

O equilíbrio entre os diferentes componentes da microbiota intestinal é fundamental para o funcionamento normal e saudável da função digestiva e geral do hospedeiro. A alta incidência e o constante estresse a que estão expostas as aves em condições normais de criação, invariavelmente, podem alterar o equilíbrio intestinal

e predispor as aves a diversas infecções, além de reduzir os índices de produtividade (ZIPRIN e DELOACH, 1993; ANDREATTI e SAMPAIO, 2000).

Para assegurar a manutenção da flora microbiana desejável, utilizam-se aditivos agregados às dietas das aves, como os promotores de crescimento, os quais deprimem os microrganismos considerados indesejáveis e proporcionam um meio favorável para os microrganismos desejáveis.

A legislação brasileira, defini aditivo intencional como: “toda substância ou mistura de substâncias, dotadas ou não de valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, sabor e cor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento” (Decreto nº 986 de 21.10.1969, BRASIL, 1998).

Na avicultura é comum o uso de aditivos com função de promotores de crescimento, como os antibióticos, quando desordens intestinais acometem as aves, alguns aditivos são empregados para tratamento, como os antibióticos, drogas antioccidianas, enzimas, probióticos e outros (FERRREIRA e OLIVEIRA, 1996).

LANCINI (1994) agrupou os aditivos úteis para as aves em:

I – promotores de crescimento (antimicrobianos, probióticos, enzimas-beta-gluconase, acidificantes: ácido fórmico, acético, propiônico, fumárico, cítrico, láctico, tartárico e málico); II – Enzimas; III – Beta – adrenérgicos, catecolaminas; IV – Anticoccidianos: monensina, salinomicina; V – Antifúngicos; VI – Antioxidantes; VII – Pigmentos.

A partir da década de 80, tanto pesquisadores quanto produtores começaram a observar que determinadas cepas bacterianas tornaram-se resistentes aos antibióticos

utilizados indiscriminadamente como promotores de crescimento, e que uma parcela considerável da flora normal do trato gastrointestinal havia sido diminuída ou até mesmo eliminada devido a sua ação não seletiva, sendo necessário o uso de outros aditivos (PEDROSO, MORAES e ARIKI, 1999). Além deste problema, nos últimos anos tem ocorrido a proibição por vários países principalmente da comunidade européia do emprego de doses subclínicas de antibióticos e restrições à importação de produtos de origem animal, exigindo-se que estes sejam livres de antibióticos (FERREIRA e TESHIMA, 2000).

Ao se pesquisar alternativas para a substituição dos antibióticos na produção animal, estudiosos centralizaram suas atenções em um dos mecanismos de defesa natural dos animais, os microrganismos presentes no trato gastrointestinal. Assim, os probióticos passaram a ser uma alternativa eficaz de substituição dos antibióticos, agindo como promotor de crescimento no tratamento de diarreias alimentares e/ou bacterianas (MARUTA, 1993).

Diversos autores citados por JERNIGAN et al. (1985), conduziram trabalhos utilizando diferentes aditivos na alimentação de poedeiras, demonstrando que estes aditivos possuem efeitos positivos na produção de ovos. Mencionam também que o uso de culturas de microrganismos com ação probiótica diminui as infecções gastrointestinais.

CERNIGLIA et al. (1983) constataram que o uso de probióticos associado a uma dieta com proteínas melhora a qualidade dos ovos como aumento do peso e do tamanho dos mesmos. Estudos demonstraram que tratamentos com culturas de flora com exclusão competitiva da mucosa e misturas de bactérias gram positivas e negativas e lactose dietética reduziram significativamente o número de salmonelas, com a diminuição desses microrganismos em 55% nas galinhas e obtendo-se ovos

livres da contaminação por *Salmonella* (CORRIER et al., 1995; BLANKENSHIP et al., 1993).

Há dois aspectos extremamente positivos no uso dos probióticos na avicultura, o primeiro é a melhora nos índices zootécnicos, como aumento no ganho de peso e melhor conversão alimentar em frangos de corte e incremento da produção de ovos em galinhas poedeiras e o segundo é a redução da colonização intestinal por alguns patógenos, incluindo *Salmonella* ssp (NAHASHON et al., 1996; CORRIER et al., 1995).

Em alguns países há restrição no uso comercial de probióticos, devido à exigência dos órgãos responsáveis em que a composição destes produtos seja totalmente conhecida e discriminada, porém este fato contraria constatações científicas atuais de que culturas definidas são menos efetivas que culturas indefinidas (CORRIER et al., 1995). Segundo ANDREATTI e SAMPAIO (2000), inúmeros trabalhos têm sido realizados visando a obtenção de produto contendo bactérias totalmente conhecidas e em quantidades pré-determinadas, com o intuito de eliminar a possibilidade da transmissão de patógenos.

2.3.1. Flora intestinal das poedeiras comerciais

O trato digestivo das galinhas poedeiras é habitado por uma microbiota que tem sua formação iniciada imediatamente após o nascimento das aves, constituindo importante barreira contra a colonização de microrganismos potencialmente patogênicos como *Salmonella* ssp. Geralmente os primeiros gêneros e espécies bacterianas que colonizam o trato intestinal persistem ao longo da vida do hospedeiro, passando a compor a microbiota intestinal (MILES, 1993).

Existem basicamente duas situações de flora microbiana: uma primeira representada pelos microrganismos que possuem uma relação direta com o epitélio

do tubo digestivo, e uma segunda que é encontrada na luz intestinal e que está diretamente ligada ao meio em que o animal vive, mas se multiplicando mais rapidamente do que sua eliminação pelo peristaltismo intestinal, o que ocorre com algumas espécies de *Lactobacillus* e *Enterococcus* (GUSILS et al., 1999; MILES, 1993). Outras espécies bacterianas não apresentam capacidade de aderir ao epitélio intestinal, assim como tão pouco se multiplicam em tempo que compense a eliminação pelo peristaltismo, mas permanecem no intestino se agregando a outras bactérias, que por sua vez estão aderidas à mucosa entérica (GUSILS et al., 1999).

Esta população microbiana pode ser considerada desejável mantendo condições de higiene do animal ou indesejável ocasionando transtornos gastrointestinais (QUADRO 2). Estes microrganismos desejáveis exercem ação simbiótica, quanto aos microrganismos indesejáveis podem exercer ação prejudicial ou até patogêno.

Da flora intestinal das aves, 90% é formada por bactérias facultativas produtoras de ácido láctico (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, etc.) e bactérias anaeróbicas estritas (*Fusobacterium*, *Eubacterium*, etc.). Os 10% restantes consistem de *Escherichia coli*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, entre outros (FOX, 1988).

QUADRO 2 - AÇÃO E IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NO TRATO DIGESTIVO.

Efeitos benéficos	No hospedeiro	Na produção
a) Fermentação da fibra e resíduos da digestão, com aumento no valor energético do alimento e liberação ou síntese de minerais, aminoácidos, vitaminas e ácidos graxos		
b) Colonização preventiva do tubo digestivo por microrganismos benéficos	Aumento da eficiência alimentar e reprodutiva e maior resistência a doenças e ao estresse	Aumento da produção
c) Ação antagônica e competição exclusiva com microorganismos potencialmente patogênicos		
Efeitos prejudiciais	No hospedeiro	Na produção
a) Fermentação indesejável no meio intestinal com formação de cadaverina, aminas tóxicas e outras toxinas, além de destruição de nutrientes		
b) Aumento na produção de gases e diminuição do aproveitamento da energia dos alimentos	Diminuição da eficiência alimentar e reprodutiva, deficiências nutricionais leves	Diminuição na produtividade e na produção
c) Aumento da sensibilidade ao estresse ambiental e de manejo e ao estresse fisiológico		
Efeitos patogênicos	No hospedeiro	Na produção
a) Infecções e irritação da mucosa gastrintestinal com predisposição a gastrites e diarreias		
b) Infecções localizadas no trato digestivo, com febre e diarreias	Aparecimento de diarreias, infecções paralelas, diminuição no consumo	Aumento da mortalidade e diminuição drástica da produtividade
c) Desgaste geral do sistema imunológico e predisposição ao aparecimento de outras doenças		

FONTE: TOYO, 1998.

Existem microrganismos como os *Lactobacillus* encontrados em todo o trato digestivo das galinhas (TABELA 4), que são capazes de sobreviver as diferenças de pH que no papo é de 4 a 5 e na moela o pH é de 1 a 2 e a sobrevivência destes microrganismos depende da tolerância a ácidos. Os principais tipos de *Lactobacillus* presentes no trato digestivo de galinhas poedeiras são: *L. casei*, *L. salivarius*, *L. fermentum*.

No ceco há alta contagem de células viáveis (10^{11} de bactérias por grama de conteúdo) e microflora complexa, os microrganismos presentes são aneróbios obrigatórios (FULLER, 1992).

JIN et al. (1997) explicam que as aves submetidas a vários fatores de estresse tendem a induzir a um desequilíbrio na microflora intestinal, com prejuízos ao mecanismo de defesa corporal da ave, causando uma baixa performance produtiva de galinhas poedeiras e infecções intestinais provocando diarreias e anemias.

Se a tensão do estresse for muito grande e crônica, haverá liberação de corticóides endógenos diminuindo a secreção de mucina e, com isso, o número de bactérias que a utilizam se reduz e o número de bactérias coliformes aumenta, podendo também aparecer infecções ocasionadas por *Salmonella*, comprometendo a saúde da ave e a qualidade do produto (BABA et al., 1991; PASCUAL et al., 1999).

TABELA 4 - NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS DOS PRINCIPAIS GRUPOS DE MICRORGANISMOS NO TRATO ALIMENTAR DE POEDEIRAS.

Microrganismos	Contagem de células viáveis do conteúdo (Log ₁₀ médio de 5-7 aves)							
	Intestino delgado						ceco	fezes
	Papo	Moela	Seção	Seção	Seção	Seção		
			1	2	3	4		
<i>E. coli</i>	1,7	-	2,0	1,7	1,7	2,7	5,6	6,1
Clostrídios	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	9,0	2,0
Enterococos	4,0	3,7	4,0	4,0	3,7	4,2	6,7	6,5
Lactobacilos	8,7	7,3	8,0	8,2	8,2	8,6	8,7	8,5
Leveduras	2,7	-	1,7	-	1,7	-	2,0	1,7
Anaeróbio obrigatoriamente esporogênico	não	-	-	-	-	-	10,0	9,0
Estreptococos anaeróbios	-	-	-	-	-	-	10,0	8,7

= log < 1,0.

(-) = pode não estar presente.

FULLER (1992).

2.4. PRODUÇÃO DE BIOMASSA PARA PREPARAÇÕES PROBIÓTICAS

2.4.1. Fermentação

A fermentação é um processo pelo qual os carboidratos e substâncias similares oxidam, liberando energia na ausência de aceptores externos de elétrons (O_2) (JAY, 1994).

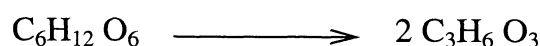
TORTORA, FUNKE e CASE (2000), definem fermentação como processo que:

- Libera energia de açúcares ou moléculas orgânicas, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, purinas e pirimidinas.
- Não requer oxigênio (mas algumas vezes pode ocorrer na presença deste).
- Não requer o uso do ciclo de Krebs ou uma cadeia de transporte de elétrons.
- Utiliza uma molécula orgânica comoceptor final de elétrons.
- Produz somente pequenas quantidades de ATP (somente uma ou duas moléculas de ATP para cada molécula de material inicial) devido ao fato de grande quantidade da energia original da glicose permanecer nas ligações químicas dos produtos finais orgânicos, tais como ácido láctico ou etanol.

2.4.1.1. Fermentação láctica

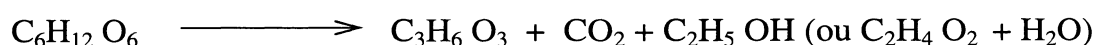
As bactérias lácticas são classificadas de acordo com os produtos finais do metabolismo da glicose em bactérias lácticas homofermentativas e bactérias lácticas heterofermentativas (JAY, 1994).

As bactérias lácticas homofermentativas transformam uma molécula de glicose em duas moléculas de ácido láctico utilizando a via da hexose-difosfato (via de Embden-Meyerhof-Parnas) com a formação de 2 ATPs e 2NADH, o qual é reoxidado em NAD (DESMAZEAUD e ROISSART, 1994).



Muitas bactérias lácticas homofermentativas, além do ácido láctico, produzem etanol, acetato e formiato quando a fermentação ocorre em meio alcalino, não se trata de um desvio da via, e sim uma parte do piruvato se transforma em acetil CoA. Em condições de excesso de nutrientes, o piruvato é quantitativamente transformado em lactato, e quando em condições de carência o piruvato é transformado em etanol e acetato, este mecanismo favorece as bactérias porque durante a conversão do piruvato em acetato ocorre a síntese de ATP (JAY, 1994; LARPENT, 1995; CAMPBELL, 2000).

As bactérias lácticas heterofermentativas transformam uma molécula de glicose ou outra hexose pela via da pentose-fosfato ou hexose-fosfato em uma molécula de ácido láctico, uma de dióxido de carbono e uma molécula de etanol ou acetato de acordo com o substrato usado (DESMAZEAUD e ROISSART, 1994).



Segundo JAY (1994), as bactérias lácticas heterofermentativas são mais importantes que as homofermentativas desde o ponto de vista da produção de componentes de aroma tais como o acetaldeído e o diacetil. As diferenças quanto a produtos finais da fermentação existentes entre as bactérias homofermentativas e heterofermentativas quando é degradada a glicose é consequência de diferenças básicas do tipo genético e fisiológico.

2.4.1.2. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica começa com a glicólise de uma molécula de glicose para obter duas moléculas de ácido pirúvico e duas moléculas de ATP e segue-se inúmeras reações até a formação de etanol. Este tipo de fermentação é um processo de baixo rendimento energético porque a maioria da energia contida na molécula de glicose original permanece no etanol, o produto final.

A fermentação alcoólica é realizada por algumas bactérias e leveduras. O etanol produzido pela levedura *Saccharomyces* é utilizado para a produção de bebidas alcoólicas, e o dióxido de carbono produzido pelas leveduras causa o crescimento na massa de pão (LARPENT, 1995; TORTORA, FUNKE e CASE, -2000).

2.5. BACTÉRIAS LÁCTICAS

Normalmente são consideradas como bactérias lácticas, as bactérias que produzem ácido láctico como principal característica. Este grupo é constituído pelos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pedicoccus*, também podem ser incluídos neste grupo os gêneros *Microbacterium*, *Eubacterium*,

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* (LARPENT, 1995; JAY, 1994).

Segundo DAESCHEL (1989), os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* (grupo N estreptococcus), *Leuconostoc* e *Pedicoccus* são capazes de produzirem substâncias inibitórias, estas substâncias são produzidas em pequenas quantidades e incluem peróxido de hidrógeno, diacetil, bacteriocinas, e produtos de reações secundárias.

A importância das bactérias lácticas está relacionada com a higiene e a capacidade de desenvolver as propriedades organolépticas dos alimentos fermentados por meio da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as bactérias lácticas transformam os nutrientes fundamentais dos produtos agrícolas em compostos com propriedades organolépticas complexas. Essas atividades bioquímicas permitem às bactérias lácticas modificar pouco a pouco a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados e contribuir para o desenvolvimento das suas qualidades gastronômicas. Além dessas funções de ordem tecnológica, atribui-se também às bactérias lácticas, que ingere-se vivas, atividades probióticas (PIARD, LOIR e LANGELLA, 1999; HIGASKINO, 1998).

2.5.1. Características gerais do gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* apresentam-se sob a forma de bastonetes, variando de longo e fino, para curtos como os cocobacilos, a formação de cadeia é comum, não esporulam e a mobilidade não é usual, são Gram positivos e com o aumento da idade e acidificação da cultura começam a tornar Gram negativos. O ácido láctico em alguns casos é o único produto final (fermentação láctica homofermentativa) e

em outros casos ocorre a produção de etanol, acetato e dióxido de carbono (fermentação láctica heterofermentativa). Em geral os *Lactobacillus* são aerotolerantes, porém algumas espécies como as encontradas no intestino dos animais são anaeróbias estritas.

Requerem um complexo nutricional de aminoácidos, vitaminas, sais, carboidratos fermentáveis. São acidúricos com um pH ótimo entre 6,5 – 4,5, são capazes de crescerem a temperaturas inferiores a 5° C e outras a temperatura tão altas como 45° C (KLEIN et al, 1998; LARPENT, 1995).

O gênero *Lactobacillus* foi dividido em três subgêneros: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium*.

O grupo I – *Thermobacterium* é formado por *Lactobacillus* obrigatoriamente homofermentativos (TABELA 5), as hexoses são fermentadas exclusivamente pela via de Embdem-Meyerhof-Parnas em ácido láctico e as pentoses e os gluconatos não são assimilados.

O grupo II – *Streptobacterium* inclui os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos (TABELA 5), fermentam as hexoses quase que exclusivamente em ácido láctico seguindo a via de Embdem-Meyerhof-Parnas, em condições de carência, produzem como outros produtos da fermentação ácido acético e ácido fórmico e as pentoses são fermentadas em ácido láctico e acético.

O grupo III – *Betabacterium* corresponde aos *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios (TABELA 5), as hexoses são fermentadas em ácido láctico e acético, etanol e dióxido de carbono e as pentoses são fermentadas em ácido láctico e acético (KLEIN et al., 1998; LARPENT, 1995).

Segundo FERREIRA e GILLILAND (1988), um dos principais fatores limitantes de crescimento máximo de bactérias ácido láctica é a produção de ácido, no qual a produção de biomassa pára em meio de pH muito baixo.

TABELA 5 - CLASSIFICAÇÃO DOS *LACTOBACILLUS* EM SUBGÊNEROS

<i>Thermobacterium</i>	<i>Streptobacterium</i>	<i>Betabacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bavaricus</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii delbrueckii</i> spp.	<i>L. carnis</i>	<i>L. cellobiosus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>L. casei casei</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. casei rhamnosus</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. jensenii</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. hilgardii</i>
<i>L. delbrueckii lactis</i> spp	<i>L. sake</i> (ADH +)	<i>L. trichodes</i>
		<i>L. fructivorans</i>
		<i>L. desidiosus</i>
		<i>L. heterohiochi</i>
		<i>L. san francisco</i>

FONTE: LARPENT (1995).

2.5.1.1. *Lactobacillus acidophilus*

Os *Lactobacillus acidophilus* fazem parte do grupo I – *Thermobacterium*, obrigatoriamente homofermentativas. São bastonetes com arredondamento, geralmente 0,6 – 0,9 por 1,5 – 6 µm, encontram-se sozinhos, em pares ou em cadeias curtas, não são móveis e nem flagelados. A colônia usualmente é rugosa e

não é caracteristicamente pigmentada, a temperatura ótima é 35 – 38° C e a produção de biomassa ocorre a pH inicial de 5 – 7, e pH ótimo 5,5 – 6,0 (DELLAGLIO et al., 1994).

As espécies de *Lactobacillus acidophilus* apresentam benefícios para o controle de patógenos intestinais, melhoramento na utilização da lactose, redução do nível de colesterol no soro e atividade anticarcinogênica.

1. Controle de patógenos intestinais – os *L. acidophilus* possuem propriedades antimicrobianas contra espécies bacterianas indesejáveis como *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Staphylococcus aureus*. A inibição pode ser devido a uma interação complexa de vários fatores, principalmente a produção de substâncias antibióticas (DALY, 1991; LARPENT, 1995).
2. Melhoramento na utilização da lactose – a intolerância a lactose e má-digestão da lactose ocorrem devido à falta de uma quantidade suficiente da enzima β -galactosidase no intestino delgado, a ingestão de iogurte e outros leites fermentados fornecem um benefício, pelo fato de certas culturas bacterianas possuírem a enzima β -galactosidase.
3. Redução do nível de colesterol no soro – os *L. acidophilus* possuem a habilidade de remover colesterol quando estes são desenvolvidos na presença de bile, em anaerobiose.
4. Atividade anticarcinogênica - os *L. acidophilus* podem reduzir o nível de enzimas como β -glicosidase, β -glicoronidase, nitroredutase e azo-redutase, as quais são consideradas fatores do processo carcinogênico (DALY, 1991; JAY, 1994).

2.5.1.2. *Lactobacillus plantarum*

Os *Lactobacillus plantarum* pertencem ao grupo II – *Streptobacterium*, onde estão incluídos os *Lactobacillus* heterofermentativos facultativos. São bastonetes com pontas arredondadas, reto, geralmente 0,9 – 1,2 µm de largura por 3 – 8 µm de comprimento, ocorrem sozinhos, em pares, ou em cadeias curtas, usualmente não apresentam flagelos e nem mobilidade, as colônias formadas são lisas, convexas e inteiras. A temperatura ótima de crescimento é entre 30 – 35° C, toleram temperaturas em torno dos 15° C, mas geralmente não toleram 45° C (DELLAGLIO et al., 1994).

O *Lactobacillus plantarum* A₆, isolado de *Manihot esculenta* variedade Ngansa, quando em condições adequadas, excreta alta quantidade de α-amilase (60 U/mL), assim obtendo ácido láctico provindo de amido, onde esta síntese de amilase é uma rara característica de bactérias ácido lácticas (GIRAUD et al., 1991).

2.5.1.3. *Lactobacillus fermentum*

Os *Lactobacillus fermentum* estão incluídos ao grupo III – *Betabacterium*, o qual corresponde aos *Lactobacillus* heterofermentativos obrigatórios. São bacilos curtos, preferivelmente quadrados, variando em tamanho 0,5 – 1,0 por 3,0 ou mais µm, algumas vezes em pares ou cadeias, não são móveis, as colônias são geralmente lisas ou algumas rugosas, convexas, de bordos regulares ou ligeiramente irregulares, freqüentemente translúcidas, não são pigmentadas, porém raras espécies produzem pigmentos alaranjado. A temperatura ótima de crescimento é entre 30 – 35° C, não toleram temperaturas em torno dos 15° C, mas geralmente toleram bem 45° C (DELLAGLIO et al., 1994).

A produção de ácido láctico é de 50% do total do carbono da glicose, isto se deve ao fato de o *L. fermentum* ser um heterofermentativo obrigatório, em os outros 50% de carbono vão se transformar em acetato, etanol e dióxido de carbono (LARPENT,1995).

YU e TSEN (1993), citados por REQUE (1999), demonstraram que o *L. fermentum* isolado do ceco de aves foi resistente ao suco gástrico de pH 2,0 e tolerante aos sais biliares (tolerância superior a 80%).

2.6. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS LEVEDURAS

As leveduras constituem um ramo menor dos fungos e é muito heterogêneo, com um número de 500 espécies agrupadas em 60 gêneros, entretanto elas são de extrema importância por suas atividades bioquímicas, sendo que algumas realizam fermentações utilizadas desde as origens da civilização, é o caso da fermentação alcoólica. As leveduras são classificadas em três grupos de fungos superiores: *Ascosporogênicas* (vinculadas aos ascomicetos), *Balistoporogênicas* (vinculadas aos basidiomicetos pela forma e modo de liberação dos esporos) e *Anascosporogênicas*.

Seu caráter comum é o estado unicelular permanente ou predominante e a ausência de verdadeiro micélio cenocítico, diferenciam-se por forma e tamanho celular, modos de reprodução e atividades bioquímicas (assimilação e fermentação de diversos substratos carbonados (BOCQUET, 1985; BELIN, 1995).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam esporos usualmente arredondados ou ovais, raramente em forma de chapéu, angular ou reniforme, comumente um ou quatro esporos conjugados podem ocorrer, a reprodução é vegetativa por botão multilateral (BELIN, 1995).

2.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é a principal espécie utilizada pelo homem, por efetuar a fermentação alcoólica, muito utilizada para fabricar vinho, cerveja, bem como é utilizada na panificação, sendo uma levedura de grande importância econômica. As células da *S. cerevisiae* são elípticas, medindo de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura, reproduzem-se por brotamento, durante o processo de brotamento, o núcleo divide-se por constrição e uma porção dele entra no broto juntamente com outras organelas (PELCZAR, CHAN e KRIEQ, 1996).

2.7. CANA-DE-AÇÚCAR

A origem presumível da cana-de-açúcar é o norte da Índia, há referência ao açúcar datando do ano 500 d. C. No Egito, no século IX e X, a produção do açúcar teve grande importância na economia do país havendo exportação desse produto. Os árabes levaram a cana para o norte da África e o Sul da Europa, nos séculos XI e XII as cruzadas levaram o açúcar para toda Europa, e, assim, propagaram seu comércio e seu uso. No Brasil, o plantio iniciou-se em São Vicente em 1522, com a cana trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Sousa e em 1533 a cana foi levada para Pernambuco. Os primeiros engenhos do Brasil foram montados pouco tempo depois em Pernambuco, a indústria do açúcar cru foi importante em São Paulo, antes da época da mineração, e na Bahia e em Pernambuco (BASTOS, 1987).

A cana-de-açúcar utilizada pertence a família granínea, gênero *Saccharum* e espécie *Saccharum officinarum* L. (FIGURA 3), atualmente é feito o cultivo de cana híbrida = *Saccharum spp*, uma mistura de várias espécies como *S. sinensis* (chinesa, japonesa), *S. robustum* (da Nova Guiné), *S. barben* (indiana), *S. edule* (MEIRELLES, ROBIN e LIMA, 1988).

FIGURA 3 - *Saccharum officinarum*



MEIRELLES, ROBIN e LIMA, 1988

2.7.1. Panorama da produção de cana-de-açúcar

Na FIGURA 4 é possível visualizar a produção brasileira de cana-de-açúcar na última década, com um visível aumento na produção o que possibilita utilização de seus derivados como o melaço de cana-de-açúcar para a obtenção de bioprodutos.

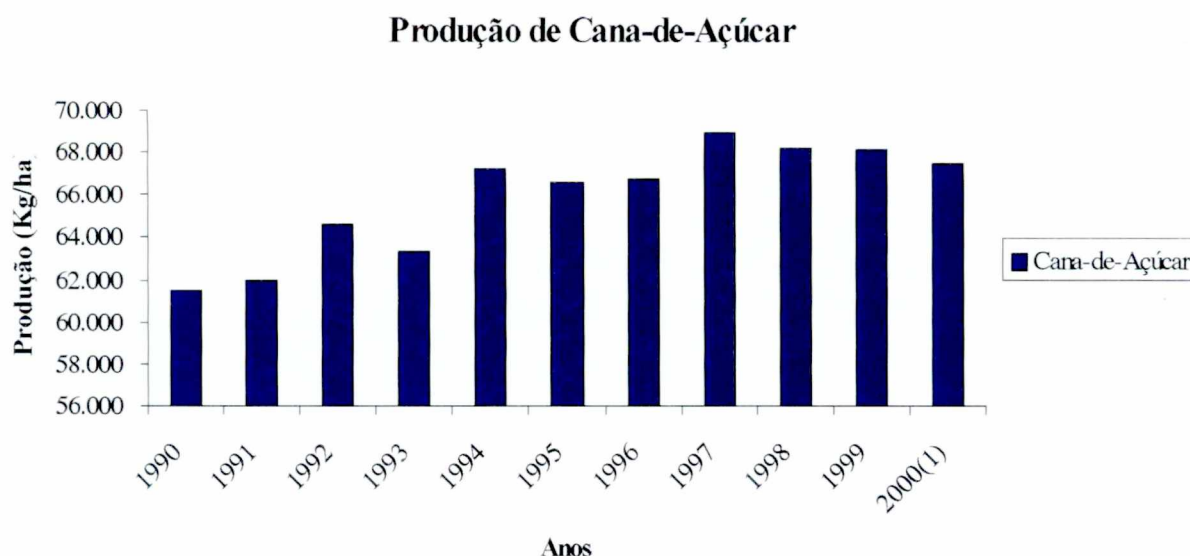


FIGURA 4 – PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA ÚLTIMA DÉCADA.
IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

2.7.2. Melaço de cana-de-açúcar

O melaço é um subproduto do processo de extração e refinação de sacarose (FIGURA 5), quer seja de cana ou beterraba, visando a recuperação do açúcar. O melaço de cana-de-açúcar caracteriza-se por ser um líquido xaroposo de cor marron-escura, muito denso, contendo sacarose e todos os produtos originais do caldo de cana e mais aqueles formados durante o processamento, além de apresentar um bom conteúdo de vitaminas como a biotina na concentração de 2,5 mg/g . A sua composição é função de vários fatores, tais como natureza e qualidade da matéria-prima (variedade, idade, sanidade, maturação, adubação e irrigação); métodos de fabricação (sistema de extração, de clarificação, de cristalização, de centrifugação entre outros); sistema e tempo de armazenamento (DIEZ e YOKOYA, 1996).

Segundo DELGADO (1975), citado por FELTRIN et al. (2000), o melaço cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentecíveis e minerais, tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio, sendo considerado um bom substrato para o cultivo de bactérias lácticas.

Para o desenvolvimento ou crescimento de qualquer microrganismo é preciso que o substrato preencha as necessidades nutricionais do mesmo que seja economicamente viável, o melaço de cana-de-açúcar possui na sua composição uma grande quantidade de açúcares fermentecíveis e é considerado um resíduo de fácil manipulação, baixo custo, com grande potencial e muitas aplicações em nível industrial (LIMA, 1987).



FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

MEIRELLES, ROBIN e LIMA, 1988.

2.8. PROGRAMA DE ALIMENTAÇÃO DE POEDEIRAS COMERCIAIS

Os resultados de suplementação com probióticos em dietas de galinhas poedeiras mostram efeitos estatísticos significativos no aumento da produção de ovos.

HADDADIN et al (1996), demonstram que dietas com espécies selecionadas de *Lactobacillus acidophilus*, em nível de quatro milhões de células viáveis por grama de alimento, obtiveram aumento nos níveis de produção de ovos e conversão alimentar que foram altamente significativos (8% e 14,8%, respectivamente) em comparação ao controle.

TORTUERO e FERNÁNDEZ (1995), investigando a atuação de probióticos em aves, utilizaram dois probióticos, uma mistura de *Lactobacillus* (*L. casei* e *L. acidophilus*) e o *Bacillus cereus*, constatando que ambos os agentes incrementaram o peso dos ovos quando comparados os resultados com os índices obtidos pelas aves não suplementadas com probióticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida na UFPR, no Laboratório de Processo Biotecnológico – LPB (cultivo de cepas, otimizações, cinética do processo e análises do fermentado), no Laboratório de Química Analítica Aplicada (composição química do substrato) e os testes experimentais do probiótico foram realizados no aviário do Centro de Estações Experimentais do Cangüiri, Setor de Ciências Agrárias da UFPR.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Microrganismos

Foram utilizadas quatro diferentes cepas, sendo três bactérias e uma levedura:

- *Lactobacillus fermentum* LPB

Isolada do trato digestivo de frango caipira.

- *Lactobacillus acidophilus* (CCT 0329)

Procedente da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, Campinas – SP.

- *Lactobacillus plantarum* A6

Procedente do Instituto IRD (Institut de Développement e Recherche) Montpellier, França.

As cepas de lactobacilos encontravam-se repicadas em ágar MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960) e foram ativadas em caldo MRS estéril a 35°C por 48 horas.

- *Saccharomyces cerevisiae*

Isolado do fermento biológico fresco de pão (marca Itaiquara) em caldo YM (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, dextrose 1% e ágar bacteriológico 2%, pH final 6,2) e incubada em aerobiose a 30° C por 48 horas.

3.1.2. Matéria-prima

Foi utilizado melaço de cana-de-açúcar, e caldo de cana-de-açúcar adquiridos no comércio local de Curitiba.

3.1.3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas análises, otimização e produção de probióticos estão relacionados a seguir:

- autoclave vertical de laboratório (PHOENIX - MDL AV 75);
- balança analítica (SCIEN TECH 120 x 0,0001);
- câmara de fluxo laminar (TROX - MDL FL V);
- Espectrofotômetro (MILTON ROY - MDL 20D);
- Estufa bacteriológica (FANEM), com termostato automático;
- Jarra de anaerobiose (PROBAC – 2,5 L);
- Liofilizador (TERRONI – LH 1500);
- Biorreator (INCELTCH – LH SGI);

- Microscópio ótico binocular (LEITZ WETZLAR - 590505);
- Potenciômetro (LABSTORE - PL 800);
- Banho-maria (TECNAL – TE-184);
- Criobotijão de nitrogênio líquido (MVE – SC20/20);
- Medidor da atividade de água (AQUALAB, CX2T).

3.2. MÉTODOS

Os métodos físicos, físico-químicos e os demais métodos de análise utilizados para otimização, acompanhar a fermentação e avaliar a ação do probiótico estão descritos a seguir:

3.2.1. Métodos analíticos

3.2.1.1. Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados por processo eletrométrico em potenciômetro, devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0.

3.2.1.2. Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi – Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), o qual se baseia na reação colorimétrica dos açúcares da amostra com o reativo cupro-alcalino formando óxido cuproso, que na presença do reativo arsênio-molibdato de Nelson forma um complexo de óxido-molibdenico de coloração azul estável, cuja absorbância

máxima ocorre em 535nm. Para a curva padrão foi utilizada solução de glicose contendo 100µg do açúcar/mL de solução.

3.2.1.3. Açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método de Somogyi – Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

3.2.2. Avaliação do melaço de cana-de-açúcar

A avaliação da composição química do melaço de cana-de-açúcar , foi determinada de acordo com as seguintes metodologias (IAL, 1985):

- Umidade: método termogravimétrico (100-105° C)
- Cinzas: método termogravimétrico (500-550° C)
- Proteínas: método Kjeldahl
- Açúcares redutores em glicose: método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).
- Açúcares totais: método Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945).

3.2.3. Manutenção das cepas

Para a manutenção das cepas, foi criado um banco de cepas com o intuito de preservar a linhagem com suas características originais durante um longo período de tempo sem que ocorram mudanças morfológicas, fisiológicas ou genéticas. Evitando assim os riscos de contaminação, seleção de células atípicas

(variantes ou mutantes) e possível perda da linhagem que podem ocorrer durante o repique.

Previamente obteve-se uma concentração ótima de biomassa em meio apropriado. Para os lactobacilos o meio utilizado foi caldo MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960), este meio fermentado foi centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos com uma temperatura de 4°C, retirado o sobrenadante e reservado em tubo estéril, acrescentado ao sedimento 1,5 ml de glicerol 10% e 0,5 ml do sobrenadante reservado. Foram distribuídas alíquotas de 1,0 mL em criotubos, logo em seguida os criotubos foram resfriados a – 4°C por 30 minutos para permitir que o glicerol penetre e envolva as bactérias, após o resfriamento procedeu-se o congelamento dos criotubos em nitrogênio líquido a – 196°C (MURO e LUCHI, 1989).

A reativação foi feita colocando os criotubos rapidamente em banho de água a 37°C até os cristais de gelo derreterem, os criotubos foram abertos e o conteúdo dispensado em meio de cultura adequado ao crescimento. Para fazer o controle da viabilidade e pureza das culturas congeladas, as reativações foram feitas após 3 a 4 dias de estocagem no nitrogênio líquido (MURO & LUCHI, 1989).

3.2.4. Contagem de células viáveis

A contagem de células viáveis foi determinada pela técnica de semeadura “pour plate” de 1 mL das amostras previamente diluídas em 9 mL de água peptonada 0,1%, em placas de petri com ágar MRS e incubadas em estufa a 37°C por 48 horas em anaerobiose para *Lactobacillus acidiphilus* e *Lactobacillus fermentum*, e aerobiose a 30°C por 48 horas para o *Lactobacillus plantarum* (GIRAUD et al., 1991). Para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o meio utilizado foi o ágar YM (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%,

peptona 0,5%, dextrose 1% e ágar bacteriológico 2%, pH final 6,2) e incubada em aerobiose a 30° C por 48 horas. Sendo o resultado expresso em unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) de amostra.

3.2.5. Determinação de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada pela medida de peso seco, a amostra foi lavada duas vezes com água deionizada com ciclos de centrifugação de 11.400 rpm por 15 minutos e secagem a 105° C por 24 horas.

3.2.6. Ensaios de otimização para a produção de biomassa

Neste estudo os ensaios foram realizados segundo planejamento experimentais (HAALAND, 1989; BARROS et al., 1996).

3.2.6.1. Adição de fonte de nitrogênio

O melaço de cana-de-açúcar é um meio pobre em fonte de nitrogênio sendo necessário a adição de alguma fonte de nitrogênio seja inorgânico ou orgânico, para suprir as necessidades nutricionais do *Lactobacillus fermentum*, favorecendo a produção de células viáveis.

Foi realizado um experimento para determinar qual a melhor fonte de nitrogênio, neste experimento foram testados extrato de levedura na concentração de 0,4%, extrato de carne a 0,8% e peptona de caseína a 1%.

3.2.6.2. Primeiro planejamento experimental (2^{6-2})

Com base nos resultado do experimento 3.2.6.1., a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura. Então foi realizado um planejamento experimental fatorial fracionário de 6 fatores em dois níveis (nível -1 e nível +1) em duplicata com duas repetições do ponto central, totalizando 36 ensaios distintos. O objetivo deste estudo foi investigar a influência dos sais, do extrato de levedura (fonte de nitrogênio), concentração de melaço de cana-de-açúcar (fonte de carbono) e o tempo na produção de células viáveis (biomassa). As variáveis utilizadas no planejamento estão demonstradas na TABELA 6.

TABELA 6 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^{6-2}).

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível + 1
Concentração de substrato	3%	5%	7%
Extrato de levedura	0,4%	0,8%	1,2%
Fosfato dipotássico	0,0%	0,2%	0,4%
Citrato de amônio	0,0%	0,2%	0,4%
Sulfato de magnésio	0,00%	0,02%	0,04%
Tempo de fermentação	16 horas	24 horas	32 horas

3.2.6.3. Segundo planejamento experimental (2^{5-1})

No segundo planejamento experimental fatorial fracionário de 5 fatores em dois níveis (nível -1 e nível +1) em duplicata com duas repetições do ponto central, totalizando 36 ensaios distintos. O objetivo deste estudo foi investigar a influência do extrato de levedura (fonte de nitrogênio), concentração de melaço de cana-de-açúcar (fonte de carbono), do tempo de fermentação, taxa de inóculo e pH inicial. As variáveis estudadas no planejamento estão demonstradas na TABELA 7.

TABELA 7 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL (2^{5-1}).

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível + 1
Concentração de substrato	3%	5%	7%
Extrato de levedura	0,6%	1,2%	1,8%
Taxa de inóculo	5%	10%	15%
Tempo de fermentação	24 horas	32 horas	40 horas
PH inicial	5	6	7

3.2.6.4. Terceiro planejamento experimental (2^{4-0})

O terceiro planejamento experimental fatorial fracionário foi realizado com o objetivo de estudar possíveis mudanças nos efeitos das variáveis sobre a produção biomassa (células viáveis), visto que novas faixas de estudo foram estabelecidas para alguns fatores do segundo planejamento. As variáveis deste planejamento estão demonstradas na TABELA 8.

TABELA 8 – PLANEJAMENTO ESPERIMENTAL (2^{4-0})

Variáveis	Nível -1	Nível 0	Nível + 1
Concentração de substrato	3%	5%	7%
Extrato de levedura	0,9%	1,8%	2,7%
Taxa de inóculo	10%	15%	20%
Tempo de fermentação	32 horas	40 horas	48 horas

3.2.6.5. Quarto planejamento experimental (2^2)

O quarto planejamento experimental foi um completo, onde foi realizado apenas com duas variáveis, taxa de inóculo e tempo de acordo com a TABELA 9, com o objetivo de avaliar o aumento da produção em um meio já estabelecido no terceiro planejamento

TABELA 9 - PLANEJAMENTO ESPERIMENTAL (2^2).

Nível	Taxa de inóculo %	Tempo h
-1	20	32
0	30	40
+1	40	48

Os planos experimentais, equações probabilísticas, gráficos de Pareto e de superfície de resposta foram obtidos com o uso do programa STATGRAPHICS, versão 7.0 (STATGRAPHICS, 1993).

3.2.7. Cinética da produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum* em bioreator

Ao final da otimização, com as condições ótimas de fermentação já determinadas, para um estudo mais aprofundado, e para determinar o tempo em que o *Lactobacillus fermentum* entra na fase de declínio foi realizado a cinética de produção de biomassa por meio de fermentação em bioreator, o qual provê o meio ambiente ideal para o crescimento e atividades do microrganismo.

3.2.7.1. Preparo do inóculo

O preparo do inóculo iniciou-se com a reativação da cepa de *Lactobacillus fermentum* mantida congelada em nitrogênio líquido, a reativação foi realizada de acordo com o item 3.2.2. A cepa de *Lactobacillus fermentum* foi semeada em tubo de ensaio contendo meio de melaço de cana-de-açúcar e incubada a 35°C por 48 horas.

3.2.7.2. Preparo do meio

O melaço de cana-de-açúcar foi diluído a 7% em água deionizada e logo em seguida filtrado, para retirar as partículas sólidas em suspensão presentes no melaço, acrescentou-se extrato de levedura a 2,7% como fonte de nitrogênio. O pH foi ajustado para 7,0 com o auxílio de HCl 0,5 M e NaOH 1 N. Após o ajuste do pH o meio foi esterilizado em autoclave 121°C por 15 minutos.

3.2.7.3. Fermentação em bioreator

Foi realizado um cultivo de *Lactobacillus fermentum* em bioreator com capacidade de 2000 mL, nas seguintes condições:

- Volume de meio → 1500 mL de meio de cultivo com a composição de 7% de melaço de cana-de-açúcar e 2,7% de extrato de levedura com pH de 7,0.
- Taxa de inóculo → 20% (v/v), para 1500 mL de meio foram adicionados 300 mL de inóculo, perfazendo um volume de trabalho de 1800 mL.
- Agitação → 80 RPM apenas para evitar que as células sedimentem no fundo do bioreator e procurando incorporar o mínimo possível de partículas de ar.
- Temperatura → 35°C.
- pH → constante de 6,0, para manter o pH foi adicionado automaticamente hidróxido de sódio (120g/L) – 3 N.

- Tempo de fermentação → 48 horas.

3.2.7.4. Avaliação do fermentado

Durante a fermentação foram realizadas amostragens em intervalos de duas horas, para verificar o crescimento celular, consumo de açúcar e concentração de biomassa, cujas determinações seguiram metodologias descritas nos itens 3.2.3.; 3.2.1. e 3.2.4, respectivamente.

3.2.8. Liofilização

Ao final da fermentação foi retirado o fermentado do bioreator, e centrifugado a uma velocidade de 6.000 RPM em uma temperatura de 4°C por 10 minutos, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o sedimento (biomassa) ressuscitado com uma solução tampão fosfato 0,2 M com pH 7,0.

Centrifugou-se novamente o sedimento ressuscitado com uma velocidade de 6.000 RPM em uma temperatura de 4°C por 10 minutos, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento acrescentou-se leite desnatado (esterilizado por UHT, longa vida da marca Batavo) e por meio de agitação foi ressuscitado as células.

Retirou-se alíquotas desta suspensão e foi colocado em frasco de penicilina (1/3 do volume do frasco). Procedeu-se o congelamento em freezer a -20°C, em seguida os frasco foram congelados em nitrogênio líquido -196°C. Após o congelamento em nitrogênio, os frascos foram transferidos para o liofilizador para a liofilização por 17 h a 0,3 mbar.

Ao termino da liofilização abriu-se um frasco para medir a atividade de água, a qual deveria estar entre 0,04 – 0,07 em uma temperatura de 22°C, e os

demais frascos foram lacrados e armazenados à temperatura ambiente (PALMFELDT, 2000).

3.2.8.1. Determinação da viabilidade das células liofilizadas

A liofilização envolve várias etapas e durante o processo pode ocorrer a morte das células de *Lactobacillus fermentum* com uma diminuição na concentração final do produto. Para realizar o estudo da viabilidade das células durante a estocagem é necessário saber a concentração de células ao termino da liofilização.

Após a liofilização, foi aberto um frasco de penicilina contendo o liofilizado e ressuspendido todo o conteúdo em 100 mL de caldo MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960) por agitação a 200 RPM durante 5 minutos, logo em seguida deixou-se o erlenmeyer com o caldo e as células em repouso por 12 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi realizado a contagem de acordo com o item 3.2.4.

3.2.9. Estudo cinético do crescimento celular do *Lactobacillus fermentum* LPB em meio comercial MRS

Com o intuito de verificar o crescimento do *Lactobacillus fermentum* e o seu comportamento fermentativo no meio comercial MRS, foi realizado uma fermentação seguindo a metodologia descrita por REQUE (1999).

3.2.10. Produção de probiótico para experimento de campo

Foram utilizadas as cepas de *Lactobacillus* e de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) apresentadas no item 3.1.1.

3.2.10.1. Preparo do inóculo para a fermentação

O preparo do inóculo iniciou-se com a reativação das cepas mantidas congeladas em nitrogênio líquido, a reativação foi realizada de acordo com o item 3.2.3. As cepas de *Lactobacillus* foram semeadas em tubo de ensaio e incubadas a 35°C por 48 horas. Para *Saccharomyces cerevisiae* o meio utilizado foi o caldo YM, temperatura de 30°C a 200 rpm por 24 horas.

3.2.10.2. Fermentação do substrato

Foi inoculado em caldo MRS e em caldo YM, conforme a exigência das cepas, 10% (v/v) do inóculo de *Lactobacillus* e da levedura em relação ao volume total. A fermentação foi realizada nas mesmas condições de temperatura, e necessidade de agitação ou não do inóculo, porém variou o tempo de fermentação: para *Lactobacillus acidophilus* o tempo foi de 36 horas, *Lactobacillus fermentum* LPB 30 horas, *Lactobacillus plantarum* A6 12 horas e *Saccharomyces cerevisiae* de 24 horas.

3.2.11. Viabilidade do probiótico liofilizado durante a estocagem

Foi avaliado a viabilidade do *Lactobacillus fermentum* LPB após a liofilização, em sua forma de apresentação, em pó, durante a estocagem em temperatura ambiente. Para está análise foram realizado contagens quinzenal das células no liofilizado conforme item 3.2.4.

3.2.12. Avaliação da atividade probiótica em poedeiras comerciais

Para avaliar a atividade probiótica das cepas estudadas, foi realizado um experimento de campo, utilizando poedeiras comerciais. Foram utilizados quatro cepas diferentes (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* LPB, *Lactobacillus plantarum* A6 e *Saccharomyces cerevisiae*).

3.2.12.1. Local e instalação

O estudo foi realizado no aviário experimental do Centro de Estações Experimentais do Cangüiri, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (FIGURA 6).



FIGURA 6 - ESTAÇÃO DE AVICULTURA

3.2.12.2. Animais

Foram alojados 192 galinhas da raça Hissex linhagem White e 128 galinhas da raça Hissex linhagem Brown em fase de postura (FIGURA 7).

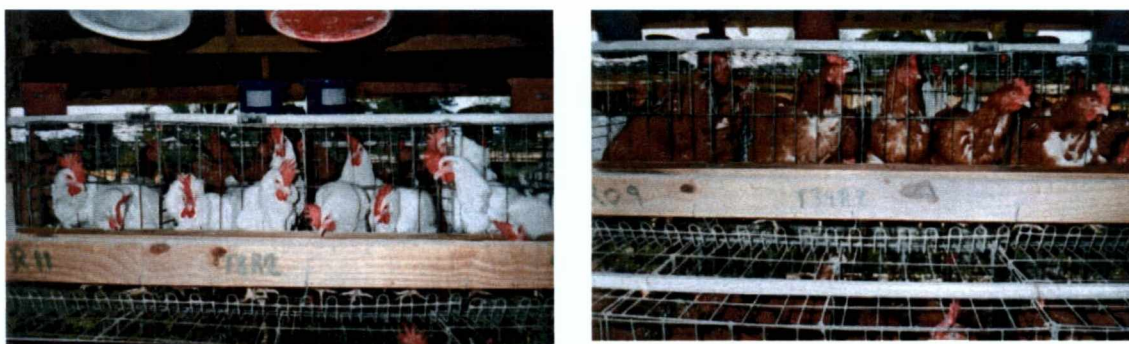


FIGURA 7 - GALINHAS HISSEX WHITE E GALINHAS BROWN

3.2.12.3. Alimentação

Foram utilizadas dietas formuladas com dois níveis de óleo (0% e 2,52%) como mostram as TABELAS 10 e 12 e a análise calculada dos componentes das rações são demonstrados nas TABELAS 11 e 13, as aves brancas receberam 110 g/dia de ração e as vermelhas 115 g/dia, foram quatro tratamentos sendo o primeiro contendo probiótico formado por *Lactobacillus fermentum* com uma concentração de 10^{-10} UFC/g, o segundo tratamento formado por uma mistura de *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae* com concentração de 10^{-10} UFC/g, o terceiro tratamento apresentavam um probiótico comercial formado por *Bacillus cereus* modificado com concentração de 10^{-10} UFC/g e o quarto tratamento não apresentava probiótico na sua formulação. O experimento teve duração de 11 meses.

TABELA 10 – RAÇÃO EXPERIMENTAL COM NÍVEL DE ÓLEO DE 0%.

Ingredientes	Quantidade (Kg)
Milho moído	61,850
Farelo de soja	27,210
Farelo de trigo	0,000
Óleo de soja	0,000
Fosfato bicálcico	1,660
Calcário	8,490
Casca de arroz	0,160
Sal comum	0,390
Premix (vitaminas e minerais)	0,100
Metionina	0,130
Lisina	0,010
Total	100,000

TABELA 11 – ANÁLISE CALCULADA DA RAÇÃO COM 0% DE ÓLEO

Componentes	Quantidade
Proteína %	17,00
Energia metab. Kcal/Kg	2.250
Cálcio %	3,50
Fósforo disponível %	0,45
Metionina %	0,43
Metionina + cisteína %	0,71
Lisina %	0,95
Sódio %	0,18
Ácido linoleico %	1,47
Fibra bruta	3,35

TABELA 12 – RAÇÃO EXPERIMENTAL COM NÍVEL DE ÓLEO DE 2,52%.

Ingredientes	Quantidade (Kg)
Milho moído	53,750
Farelo de soja	27,090
Farelo de trigo	4,380
Óleo de soja	2,520
Fosfato bicálcico	1,620
Calcário	8,500
Casca de arroz	1,510
Sal comum	0,390
Premix (vitaminas e minerais)	0,100
Metionina	0,140
Total	100,000

TABELA 13 – ANÁLISE CALCULADA DA RAÇÃO COM 2,52% DE ÓLEO.

Componentes	Quantidade
Proteína %	17,00
Energia metab. Kcal/Kg	2.450
Cálcio %	3,50
Fósforo disponível %	0,45
Metionina %	0,43
Metionina + cisteína %	0,71
Lisina %	0,95
Sódio %	0,18
Ácido linoleico %	2,65
Fibra bruta %	3,61

3.2.12.4. Manejo

As aves foram alojadas em gaiolas de arame galvanizado medindo 30x40x45 sendo 02 aves vermelhas ou 03 aves brancas por gaiola, onde cada repetição constou de 04 gaiolas, distribuídas em delineamento inteiramente casualizado.

3.2.12.5. Variáveis estudadas

- Produção diária de ovos: foram feitas as contagens diárias dos ovos para cada tratamento.
- Pesagem dos ovos: foram realizadas as pesagens dos ovos a cada 28 dias.

3.2.12.6. Análise estatística

O experimento foi analisado através dos quadrados mínimos, sendo utilizado o programa computacional SAEG (EUCLIDES et al., 1982).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Sabendo-se que o melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentecíveis, foi feita a sua composição química, de modo a fazer uma avaliação das condições nutricionais para o uso do mesmo como substrato, na produção de biomassa de *L. fermentum*.

Como mostrado na TABELA 14, a seguir, o melaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos apresentou 55,20% de açúcares totais, sendo 19,54% constituído de açúcares redutores em glicose. Considerando que para o crescimento de qualquer microrganismo o substrato deve atender as necessidades nutricionais e energéticas do mesmo (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio), foi observado que o melaço de cana-de-açúcar é um meio pobre em fonte de nitrogênio, sendo necessário a adição de fontes de nitrogênio ao meio para favorecer o crescimento das bactérias lácticas.

TABELA 14 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO MELAÇO DE CANA.

Componentes	Melaço de cana-de-açúcar (%)
Proteínas	0,51
Umidade	16,44
Cinzas	0,92
Açúcares totais	55,20
Açúcares redutores	19,54

4.2. CONDIÇÕES NUTRICIONAIS

4.2.1. Fontes de nitrogênio

Foi realizado um experimento utilizando melaço de cana-de-açúcar a 10% com três fontes de nitrogênio orgânicas, com o intuito de verificar em qual dessas três fontes os *Lactobacillus fermentum* cresceriam melhor.

De acordo com a FIGURA 8, o extrato de levedura 0,8% apresentou um melhor rendimento em nível de biomassa quando comparado com o meio MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960), utilizado como padrão, e as demais fontes de nitrogênio, e isso se deve a composição do extrato de levedura, que segundo DIFCO (1984) o extrato de levedura é um excelente estimulador do crescimento bacteriano, por apresentar alto conteúdo de vitaminas do complexo B.

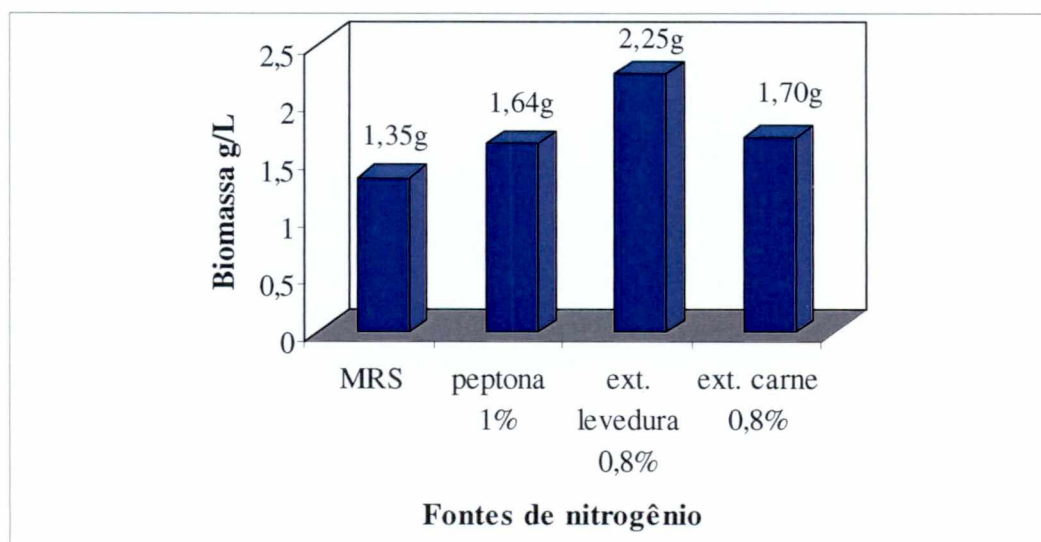


FIGURA 8 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA UTILIZANDO DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO, APÓS 48 HORAS DE CULTIVO A 35°C .

4.3. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA (CÉLULAS VIÁVEIS)

Segundo HAALAND (1989), citado por MACHADO (2000), a maior parte dos processos biotecnológicos não possui modelos teóricos que possam ser usados para explicar o desenvolvimento do processo, em consequência a resolução do problema é empírica. Contudo existem limitações de tempo e recursos, tornando a produtividade do processo de importância crítica. Dessa forma, o planejamento e a resolução dos problemas utilizando ferramentas estatísticas resulta em uma resolução melhor das possibilidades de maximizar a eficiência e produtividade de problemas empíricos.

Um experimento deve passar pelas seguintes etapas: “*screening*” (seleção), otimização e verificação dos dados (TABELA 15). Assim, experimentos de “*screening*” são aqueles em que são incluídas diversas variáveis. Eles fazem parte da primeira etapa da investigação, e por incluírem diversos fatores, não possuem muita informação por fator. Seu objetivo é a redução do problema, descobrindo quais são as variáveis realmente importantes e qual a direção a tomar nos próximos experimentos. A proposta da **otimização** é a construção de um modelo matemático que possa prever o comportamento do processo investigado, encontrando a região de ótima resposta. Para tanto requer muita informação sobre cada fator, necessitando, assim, que se inclua somente os fatores com influência significativa em relação aos outros. E, finalmente, a **verificação** é feita para comprovar o modelo determinado, e explicar o processo nas condições experimentadas.

TABELA 15 – ETAPAS DE UM EXPERIMENTO UTILIZANDO FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS

Etapas	Objetivo	Descrição
Screening	Identificar fatores mais importantes	Muitos fatores – resultados imprecisos
Otimização	Construir modelo	Poucos fatores – região ótima
Verificação	Confirmar os resultados	Repetir as melhores condições

FONTE: HAALAND, 1989.

4.3.1. Primeira otimização

A partir dos componentes minerais no meio comercial MRS, foi feito um planejamento experimental para a otimização do uso dos mesmos, também foram avaliadas as variáveis: concentrações do melaço de cana e de extrato de levedura e o tempo de fermentação, para investigar as variáveis que influenciaram de forma significativa a produção de biomassa (células viáveis de *Lactobacillus fermentum*). O experimento foi um planejamento fracionário $2^{(6-2)}$ em duplicata com duas repetições do ponto central, totalizando 36 ensaios distintos, apresentados na TABELA 16, bem como o rendimento de biomassa (células viáveis) obtido em cada ensaio.

Segundo BARROS, SCARMÍNIO e BRUNS (1996), os modelos fracionários como o deste experimento são usados para o estudo de diversas variáveis de uma só vez. Eles servem somente para mostrar quais fatores (variáveis) são os mais importantes e como a sua modificação afeta o processo. A melhor maneira de visualização dessas influências é o diagrama de Pareto, no qual é colocado, graficamente, a magnitude dos efeitos (mostrados do maior para o menor) dos dados na variável resposta. Assim é demonstrado as variáveis realmente importantes.

TABELA 16 – PRIMEIRO PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO 2⁽⁶⁻²⁾.

Ensaio	M.C. %	E. L. g/L	F. D. g/L	C. A. g/L	S. M. g/l	Tempo h	Rendimento Biomassa g/L
1	7	1,2	0,4	0,4	0,04	32	2,40
2	7	1,2	0,4	0,0	0,04	16	2,00
3	7	1,2	0,0	0,4	0,00	16	2,20
4	7	1,2	0,0	0,0	0,00	32	<u>3,00</u>
5	7	0,4	0,4	0,4	0,00	16	0,50
6	7	0,4	0,4	0,0	0,00	32	2,34
7	7	0,4	0,0	0,4	0,04	32	1,08
8	7	0,4	0,0	0,0	0,04	16	1,02
9	3	1,2	0,4	0,4	0,00	32	2,52
10	3	1,2	0,4	0,0	0,00	16	1,20
11	3	1,2	0,0	0,4	0,04	16	0,70
12	3	1,2	0,0	0,0	0,04	32	1,60
13	3	0,4	0,4	0,4	0,04	16	0,96
14	3	0,4	0,4	0,0	0,04	32	1,67
15	3	0,4	0,0	0,4	0,00	32	1,23
16	3	0,4	0,0	0,0	0,00	16	0,50
17*	5	0,8	0,2	0,2	0,02	24	1,13
18*	5	0,8	0,2	0,2	0,02	24	1,16
19	7	1,2	0,4	0,4	0,04	32	2,71
20	7	1,2	0,4	0,0	0,04	16	2,10
21	7	1,2	0,0	0,4	0,00	16	2,20
22	7	1,2	0,0	0,0	0,00	32	<u>3,18</u>
23	7	0,4	0,4	0,4	0,00	16	0,50
24	7	0,4	0,4	0,0	0,00	32	2,76

Ensaio	M.C. %	E. L. g/L	F. D. g/L	C. A. g/L	S. M. g/l	Tempo h	Rendimento Biomassa g/L
25	7	0,4	0,0	0,4	0,04	32	1,17
26	7	0,4	0,0	0,0	0,04	16	1,16
27	3	1,2	0,4	0,4	0,00	32	2,27
28	3	1,2	0,4	0,0	0,00	16	0,83
29	3	1,2	0,0	0,4	0,04	16	1,52
30	3	1,2	0,0	0,4	0,04	32	1,70
31	3	0,4	0,4	0,0	0,04	16	1,07
32	3	0,4	0,4	0,4	0,04	32	1,13
33	3	0,4	0,0	0,0	0,00	32	1,41
34	3	0,4	0,0	0,4	0,00	16	0,72
35*	5	0,8	0,2	0,2	0,02	24	1,20
36*	5	0,8	0,2	0,2	0,02	24	1,12

* Ponto central

Os melhores resultados da produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum* para este planejamento foram obtidos por meio da composição apresentada nos ensaios 4 (3,00 g/L) e 22 (3,18 g/L). É possível observar que no ensaio 4 e na sua repetição (ensaio 22) os valores da produção de biomassa foram bem próximos, confirmando a melhor composição do meio neste planejamento.

Os efeitos principais das variáveis (ao passar do nível -1 para o nível +1) em 32 horas de fermentação podem ser observados no Diagrama de Pareto (FIGURA 9), onde também é possível verificar quais variáveis apresentaram efeito estatisticamente significativo sobre a produção de biomassa de *L. fermentum*.

Analisando as variáveis melaço de cana, extrato de levedura e o tempo ao passarem de 3%, (nível -1) para 7% (nível +1), 0,4 g/L (nível -1) para 1,2 g/L (nível +1) 16 horas (nível -1) para 32 horas (nível +1) respectivamente houve um incremento de aproximadamente 2,0 g/L na produção de biomassa de *L. fermentum*.

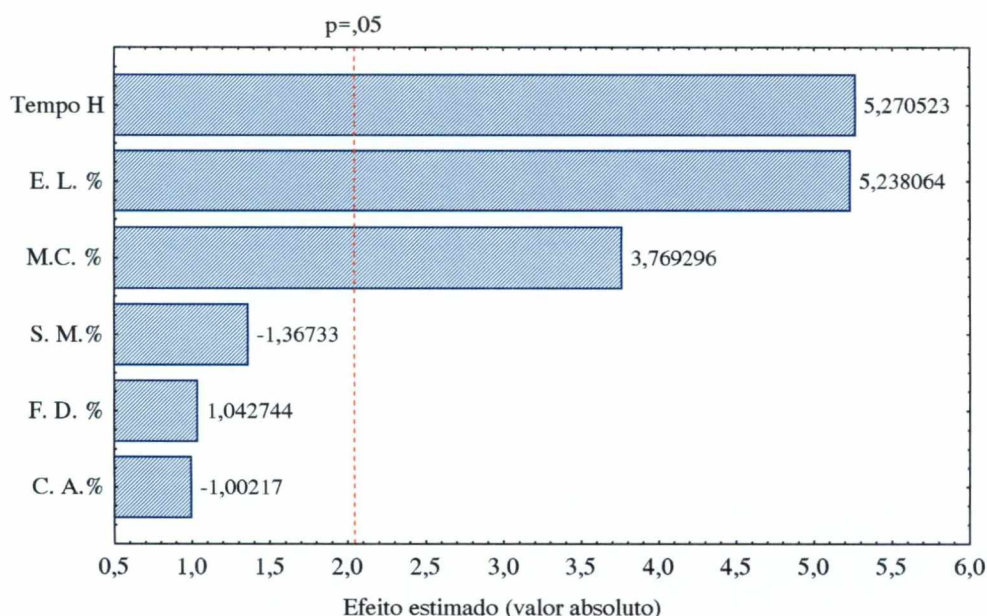


FIGURA 9 – DIAGRAMA DE PARETO PARA RENDIMENTO – PRIMEIRA OTIMIZAÇÃO.

De acordo com o Diagrama de Pareto, o aumento do tempo de fermentação e das concentrações do extrato de levedura e do melaço de cana-de-açúcar influenciaram significativamente a um nível de 95% de confiança ($p = 0,05$) a produção de biomassa. Considerando-se que valores negativos no Diagrama de Pareto significa que o aumento da resposta é inversamente proporcional ao aumento daquele fator, ao observar-se a FIGURA 9, percebe-se que dois sais tiveram efeito negativo na suplementação do meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar para produção de *L. fermentum*.

Segundo DELGADO (1975), citado por FELTRIN et al. (2000), o melaço de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentecíveis e sais minerais, tais como manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio. A adição de sais, como fonte de minerais, ao meio representou um excesso que pode contribuir para a inibição do crescimento bacteriano.

No experimento seguinte, foram mantidos os mesmos níveis para o melaço de cana, e não foram utilizados os sais, variando o pH inicial, extrato de levedura, taxa de inóculo e tempo de fermentação gerando um experimento fracionário $2^{(5-1)}$.

4.3.2. Segunda otimização

Na segunda otimização foram testados as variáveis concentração de extrato de levedura, taxa de inóculo, pH inicial, tempo de fermentação e para o melaço de cana foram usados os mesmos níveis da primeira otimização (3%, 5% e 7%) com o intuito de investigar as variáveis que influenciaram de forma significativa a produção de biomassa. O experimento foi um planejamento fracionário $2^{(5-1)}$ em duplicata com duas repetições do ponto central, totalizando 36 ensaios distintos, apresentados na TABELA 17.

Os ensaios 1 (4,03 g/L) e 19 (3,83g/L), sendo este último repetição do ensaio 1, apresentaram os melhores resultados da produção de biomassa. Demonstrando ser a melhor condição para produção de biomassa de *L. fermentum*.

TABELA 17 – SEGUNDO PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO 2⁽⁵⁻¹⁾.

Ensaio	M.C. %	E. L. g/L	Taxa de Inóculo %	Tempo h	pH inicial	Rendimento biomassa g/L
1	7	1,8	15	40	7	<u>4,03</u>
2	7	1,8	15	24	5	2,79
3	7	1,8	5	40	5	1,79
4	7	1,8	5	24	7	1,25
5	7	0,6	15	40	5	2,67
6	7	0,6	15	24	7	1,93
7	7	0,6	5	40	7	1,93
8	7	0,6	5	24	5	1,12
9	3	1,8	15	40	5	2,30
10	3	1,8	15	24	7	1,85
11	3	1,8	5	40	7	1,18
12	3	1,8	5	24	5	1,24
13	3	0,6	15	40	7	2,65
14	3	0,6	15	24	5	1,98
15	3	0,6	5	40	5	1,63
16	3	0,6	5	24	7	1,46
17*	5	1,2	10	32	6	1,34
18 *	5	1,2	10	32	6	1,78
19	7	1,8	15	40	7	<u>3,83</u>
20	7	1,8	15	24	5	2,77
21	7	1,8	5	40	5	1,60
22	7	1,8	5	24	7	1,13
23	7	0,6	15	40	5	2,46

Ensaio	M.C. %	E. L. g/L	Taxa de Inóculo %	Tempo h	pH inicial	Rendimento biomassa g/L
24	7	0,6	15	24	7	1,94
25	7	0,6	5	40	7	2,38
26	7	0,6	5	24	5	1,30
27	3	1,8	15	40	5	3,05
28	3	1,8	15	24	7	1,49
29	3	1,8	5	40	7	1,26
30	3	1,8	5	24	5	1,11
31	3	0,6	15	40	7	2,01
32	3	0,6	15	24	5	2,31
33	3	0,6	5	40	5	1,84
34	3	0,6	5	24	7	1,63
35*	5	1,2	10	32	6	1,37
36*	5	1,2	10	32	6	1,56

* Ponto central

Analisando o Diagrama de Pareto (FIGURA 10), a taxa de inóculo e o tempo de fermentação foram os que apresentaram uma melhor influência significativa positiva a um nível de 95% de confiança ($p = 0,05$) para a produção de biomassa, ambos sugerindo que valores maiores levariam a um aumento da variável resposta. Neste experimento não houve nenhuma variável resposta com efeito negativo, apenas a concentração de extrato de levedura e o pH não tiveram influência significativa.

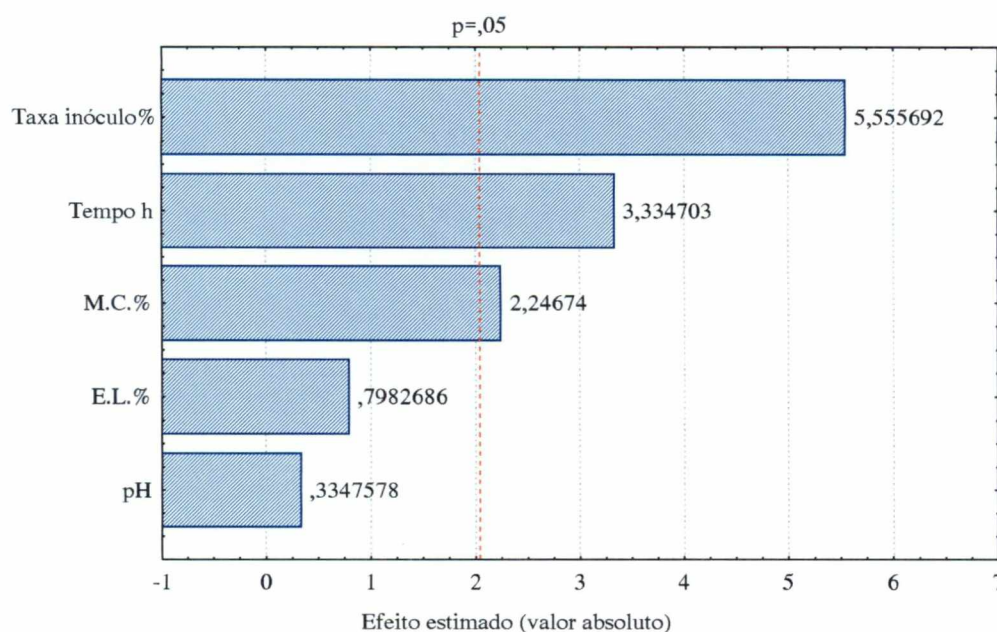


FIGURA 10 – DIAGRAMA DE PARETO PARA RENDIMENTO – SEGUNDA OTIMIZAÇÃO.

Por meio da análise do Diagrama de Pareto (FIGURA 10), fica bem explícito a necessidade de mais um experimento, no qual o pH inicial é fixado em 7,0, variando as concentrações do melaço de cana, extrato de levedura e taxa de inóculo, também foram estudado os diferentes tempo de fermentação, resultando em um planejamento fracionário $2^{(4-0)}$.

4.3.3. Terceira otimização

Para esta otimização foram mantidos os mesmos níveis do experimento anterior para o melaço de cana e pH inicial de 7,0, foram testados as concentrações de extrato de levedura, taxa de inóculo e o tempo de fermentação, para investigar as variáveis que influenciaram de forma significativa a produção de biomassa. O experimento foi um planejamento fracionário $2^{(4-0)}$ com três repetições do ponto central, totalizando 19 ensaios distintos, apresentados na TABELA 18.

TABELA 18 – TERCEIRO PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO 2⁽⁴⁻⁰⁾.

Ensaio	M.C. %	E.L. g/l	Taxa de inóculo %	Tempo. h	Rendimento biomassa g/L
1	7	2,7	20	32	3,51
2	7	2,7	10	48	3,71
3	7	2,7	20	48	<u>4,44</u>
4	7	2,7	10	32	3,49
5	7	0,9	20	48	3,79
6	7	0,9	20	32	2,30
7	7	0,9	10	48	2,49
8	7	0,9	10	32	2,00
9	3	2,7	20	48	2,86
10	3	2,7	20	32	2,77
11	3	2,7	10	48	2,83
12	3	2,7	10	32	2,02
13	3	0,9	20	48	2,88
14	3	0,9	20	32	2,14
15	3	0,9	10	48	2,64
16	3	0,9	10	32	2,42
17*	5	1,8	15	40	3,05
18*	5	1,8	15	40	3,50
19*	5	1,8	15	40	3,26

* Ponto central

De acordo com os resultados expressos na TABELA 18, o ensaio 3 (4,44 g/L) foi o qual apresentou uma melhor produção de biomassa, determinando a melhor condição de fermentação, bem como a melhor composição do meio.

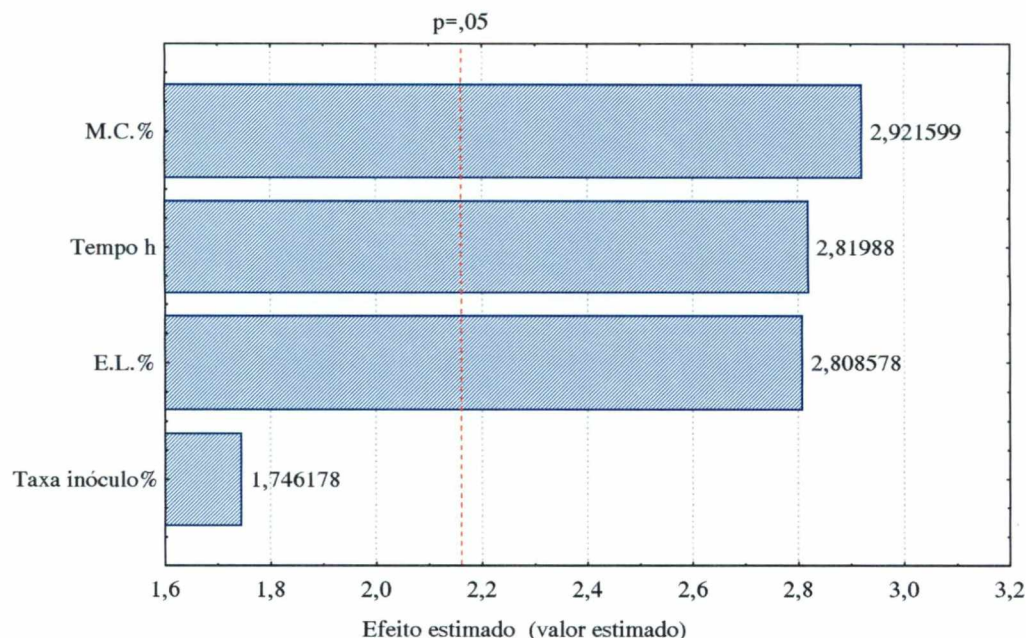


FIGURA 11 – DIAGRAMA DE PARETO PARA REDIMENTO – TERCEIRA OTIMIZAÇÃO.

Observando-se o Diagrama de Pareto (FIGURA 11), as variáveis de maior influência na produção de biomassa de *L. fermentum* a um nível de 95% de confiança ($p = 0,05$) são as concentrações de melaço de cana no meio de cultivo, seguido do tempo de fermentação e a concentração de extrato de levedura.

Embora a análise dos Diagramas de Pareto das três otimizações sugiram que a concentração de melaço de cana deve ser maior, as análises do consumo de açúcares durante a fermentação demonstraram que concentrações acima de 7% de melaço ocorre ao final da fermentação um excesso de açúcares não fermentados, indicando que não é necessário o uso de maiores concentrações de melaço de cana.

4.3.4. Quarta otimização

Para esta otimização optou-se em manter as concentrações de melaço de cana 7%, extrato de levedura 2,7% e pH inicial de 7,0 foram testados a concentração de inóculo e o tempo de fermentação. Foi realizado um

experimento completo $2^{(2)}$ em duplicata com duas repetições do ponto central, totalizando 20 ensaios distintos, apresentados na TABELA 19.

TABELA 19 – QUARTO PLANEJAMENTO COMPLETO $2^{(2)}$.

Ensaio	Taxa de inóculo %	Tempo h	Rendimento biomassa g/L
1	20	32,0	3,75
2	20	48,0	4,12
3	40	32,0	4,02
4	40	48,0	<u>4,67</u>
5	16	40,0	4,11
6	44	40,0	3,86
7	30	29,0	3,93
8	30	51,0	3,65
9*	30	40,0	3,86
10*	30	40,0	3,85
11	20	32,0	3,67
12	20	48,0	3,93
13	40	32,0	3,91
14	40	48,0	<u>4,58</u>
15	16	40,0	3,39
16	44	40,0	3,92
17	30	29,0	3,50
18	30	51,0	4,34
19*	30	40,0	4,06
20*	30	40,0	3,98

* Ponto central

Segundo HAALAND (1989), citado por MACHADO (2000) e BARROS, SCARMÍNIO e BRUNS (1996), experimentos completos com poucas variáveis ao contrário dos experimentos de screening (como itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3) são métodos que podem utilizar a ferramenta de superfície de resposta (FIGURA 14). A qual pode ser mostrada num gráfico tridimensional, onde a altura corresponde à variável resposta, ou em curvas de nível (contorno de resposta), onde diferentes cores representam os níveis da variável resposta. A metodologia de superfícies de resposta é constituída de duas etapas distintas: a modelagem e o deslocamento, estas etapas são repetidas tantas vezes quanto forem necessárias. Assim chega-se ao ponto ótimo, quando o nível (superior, ou inferior, de acordo com o caso) aparecer inteiro no centro da superfície, sugerindo que o aumento ou diminuição de qualquer fator irá afetar negativamente a variável resposta.

A equação do modelo experimental que gerou a superfície de resposta é dada por:

$$\text{Biomassa} = 5,256 - 0,076\text{taxa inóculo \%} - 0,055\text{tempo h} + 0,001\text{taxa inóculo}^2 \% + 0,001\text{tempo}^2 \text{ h} + 0,001\text{taxa inóculo \%} \times \text{tempo h}.$$

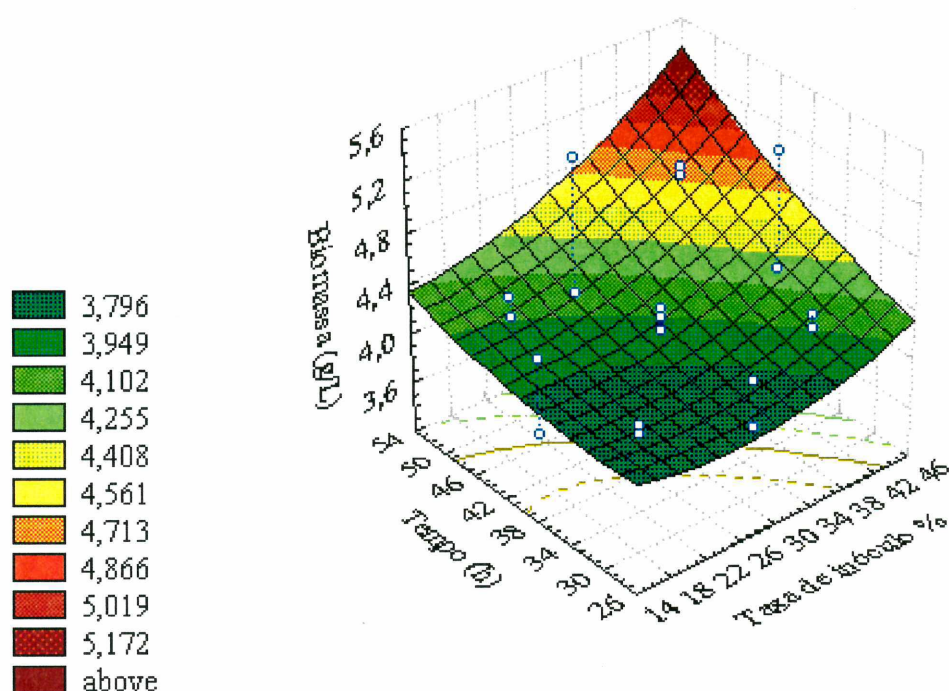


FIGURA 12 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O RENDIMENTO.

Observando-se a superfície de resposta (FIGURA 12) acima, percebe-se que foi obtido a maior produção de biomassa com um maior taxa de inóculo e para um tempo acima de 40 horas de fermentação. Nessa otimização atingiu-se uma produção máxima de 4,67 g/L, ou seja, um aumento de quase 5 vezes em relação à fermentação em meio comercial (caldo MRS). Obteve-se as condições ideais de fermentação: temperatura 35° C; tempo 48 horas; pH inicial 7,0; melaço de cana-de-açúcar 7%; extrato de levedura 2,7% e taxa de inóculo de 40%.

Com este experimento encerraram-se as otimizações da produção de biomassa de *L. fermentum* em um meio de cultivo de baixo custo, sendo comprovado um aumento de quase cinco vezes quando comparado a produção em meio comercial o MRS.

4.4. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Lactobacillus fermentum* EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE CANA

Na TABELA 20 estão os parâmetros cinéticos do crescimento celular e a evolução da produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB em bioreator de 2 litros (marca – INCELTECH – LH SGI), nas condições otimizadas.

TABELA 20 – PARAMÊTROS CINÉTICOS PARA *Lactobacillus fermentum*.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Biomassa (mg/L)	ln X	rs=dS/dt	Qs (h-1)	ΔS	ΔX	μx (h-1)
0	36,7	100	4,61					
2	34,6	290	5,67	1,05	0,003621	2,1	190	0,1296
4	32,9	450	6,11	0,85	0,002889	3,8	350	0,2100
6	28,54	740	6,61	2,18	0,002449	8,16	640	0,2325
8	25,31	1200	7,09	1,62	0,001840	11,39	1100	0,2482
10	20,34	1600	7,38	2,49	0,001553	16,36	1500	0,2404
12	15,9	2200	7,70	2,22	0,001009	20,8	2100	0,2373
14	10,41	3250	8,09	2,75	0,000845	26,29	3150	0,2219
16	6,3	3810	8,25	2,06	0,000539	30,4	3710	0,1956
18	5,12	4300	8,37	0,59	0,000137	31,58	4200	0,0188
20	4,5	4570	8,43	0,31	0,000068	32,2	4470	0,0170
22	3,12	4710	8,46	0,69	0,000046	33,58	4610	0,0150
24	2,87	4800	8,48	0,13	0,000026	33,83	4700	0,0094
30	2,43	4850	8,49	0,07	0,000015	34,27	4750	0,0017
36	2,11	4930	8,50	0,05	0,000011	34,59	4830	0,0027
42	2,06	4990	8,52	0,01	0,000002	34,64	4890	0,0020
48	2,06	5080	8,53	0,00	0,000000	34,64	4980	0,0029

Pode-se observar que foi possível obter um consumo de cerca de 95% do meio de cultivo alternativo, com uma produção máxima de biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB da ordem de 5,1 g/L após 48 horas de cultivo. Este valor de biomassa obtido, quando comparado aos valores máximos produzidos (1,3 g/L) em meio de cultura tradicional (MRS), constata-se que foi possível obter um ganho de produtividade de ordem de 400% quando utilizamos o meio de cultivo alternativo à base de melaço de caldo de cana-de-açúcar e extrato de levedura.

A FIGURA 13 apresenta a evolução do consumo da fonte de carbono expressa em açúcares redutores e a produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB após 48 horas de cultivo. Estes resultados demonstram a potencialidade do uso destes meios de cultivo alternativos de baixo custo para a produção de biomassa bacteriana com características probióticas.

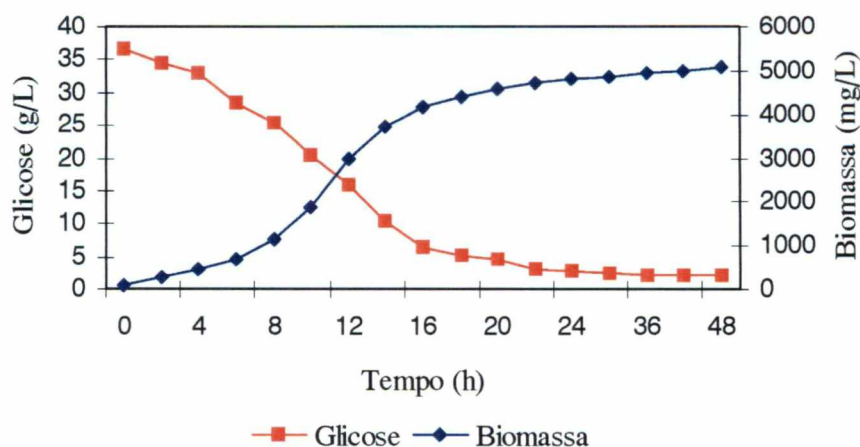


FIGURA 13 – CONSUMO DE GLICOSE E PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM O MEIO DE CULTIVO À BASE DE MELAÇO DE CANA EM FUNÇÃO DO TEMPO.

Observa-se que o maior consumo de substrato (açúcares redutores) ocorre entre 4 horas e 16 horas de cultivo, portanto é neste período que ocorre a velocidade máxima de consumo de substrato, a qual atinge seu valor máximo de 1,98 g/L.h.

Após 16 horas de cultivo observa-se uma redução no consumo de açúcares, nota-se que após 24 horas estabiliza-se permanecendo com valores próximos de zero até o final da fermentação, que ocorreu após 48 horas (FIGURA 14).

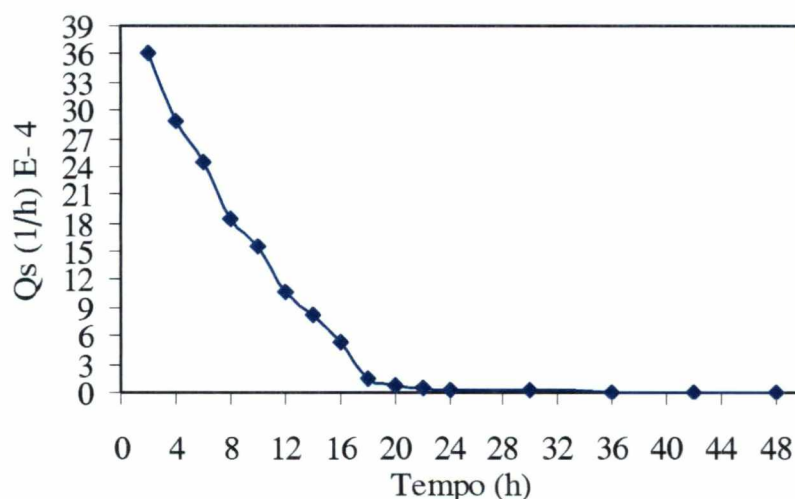


FIGURA 14 – VELOCIDADE DE DEGRADAÇÃO DA FONTE DE CARBONO ESPRESSO EM AÇÚCARES REDUTORES EM FUNÇÃO DO TEMPO.

É possível observar que o meio de cultivo alternativo utilizado na produção de biomassa bacteriana de *Lactobacillus fermentum* LPB propicia condições nutricionais tão favoráveis ao crescimento das células que não se constata a presença da fase lag (FIGURA 15). Verifica-se que o crescimento exponencial das células se inicia após 4 horas de cultivo e se estende até 16 horas.

Após este tempo constata-se uma queda acentuada na velocidade específica de crescimento do *Lactobacillus fermentum* LPB (FIGURA 16), provavelmente devido à exaustão de algum macro ou micro nutriente importante presente no meio de cultivo.

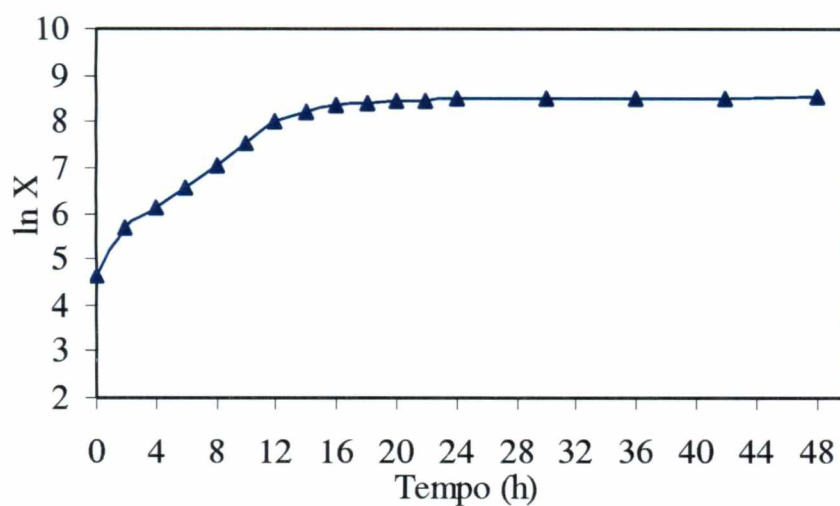


FIGURA 15 – CURVA DE CRESCIMENTO DO *Lactobacillus fermentum* LPB.

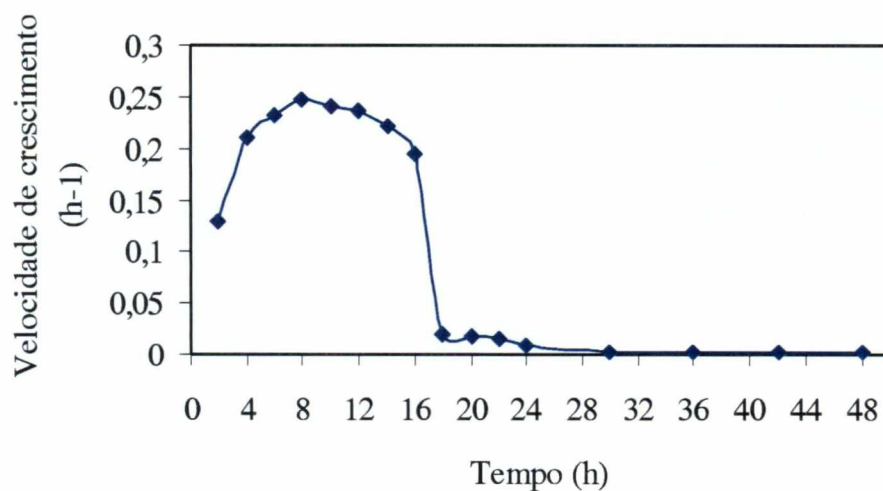


FIGURA 16 – VELOCIDADE DE ESPECÍFICA DE CRESCIMENTO DO *Lactobacillus fermentum* LPB.

Observa-se ainda que este período de redução na velocidade específica de crescimento ocorre entre 16 e 24 horas de cultivo, após este período a velocidade específica de crescimento do *Lactobacillus fermentum* LPB atinge valores próximos de zero, conforme TABELA 20 e FIGURA 16.

Na FIGURA 16 e TABELA 20 observa-se uma ligeira variação nos valores máximos da velocidade específica de crescimento entre 4 e 16 horas, neste período a velocidade máxima deveria ser constante, e as variações observadas deve-se provavelmente aos erros de amostragem feito na retirada das alíquotas nos diferentes tempos de cultivo.

Os resultados presentes na TABELA 20 e FIGURAS 13, 14, 15 e 16 demonstram claramente que o processo de produção de biomassa celular de *Lactobacillus fermentum* LPB, nestas condições, se encerra após 24 horas de cultivo, pois após este tempo não existe mais nenhum crescimento celular expressivo que justifique a condução do cultivo até 48 horas. Esta interrupção e descarga do bioreator após 24 horas permitirá ganhos expressivos de tempo e produtividade na produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB.

A FIGURA 17 mostra a evolução das taxas de consumo do meio alternativo em função das taxas de produção de biomassa celular de *Lactobacillus fermentum* LPB, pode-se observar que existe uma correlação de perfeita linearidade entre esse dois parâmetros.

Através do ângulo de inclinação da reta obtida pode-se calcular graficamente o rendimento global da biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB produzida em função da quantidade de substrato consumido, no qual o rendimento foi de 150 mg de biomassa de *Lactobacillus fermentum* LPB para cada grama de substrato consumido.

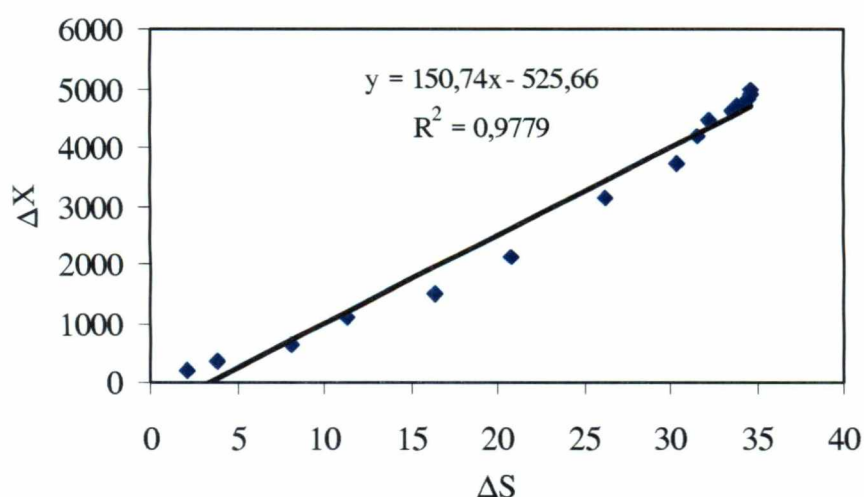


FIGURA 17 - EVOLUÇÃO DOS RENDIMENTOS EM FUNÇÃO DO TEMPO.

Ao final de 48 horas de cultivo de *Lactobacillus fermentum* em bioreator, a biomassa foi de 5080 mg/L um pouco maior que a biomassa obtida na quarta otimização, e com um número de células viáveis de 8×10^{10} UFC/ mL, e isso se deve ao pH ter sido constante, porque segundo FERREIRA & GILLILAND (1988) um dos principais fatores limitantes de crescimento máximo de bactérias ácido láctica é a produção de ácido, no qual a produção de biomassa pára em meio de pH muito baixo.

4.5 VIABILIDADE DO PROBIÓTICO LIOFILIZADO DURANTE A ESTOCAGEM

Observando-se a FIGURA 18 é possível verificar que logo após a liofilização a concentração de células viáveis era de $6,7 \times 10^{12}$ UFC/g de *Lactobacillus fermentum* e a atividade de água era de 0,05 a uma temperatura de 22°C, observa-se que após 90 dias d estocagem o probiótico liofilizado reduz para

$3,2 \times 10^{-11}$ UFC/g e a atividade de água continuou inalterada e esta concentração permanece inalterada até 150 dias..

Segundo PALMFELDT (2000) e MURO e LUCHI (1989), a liofilização é um método econômico e eficiente de preservação a longo prazo de bactérias ácido lácticas mantendo estáveis as características do microrganismo, evitando mutações e a redução exagerada do número de células viáveis.

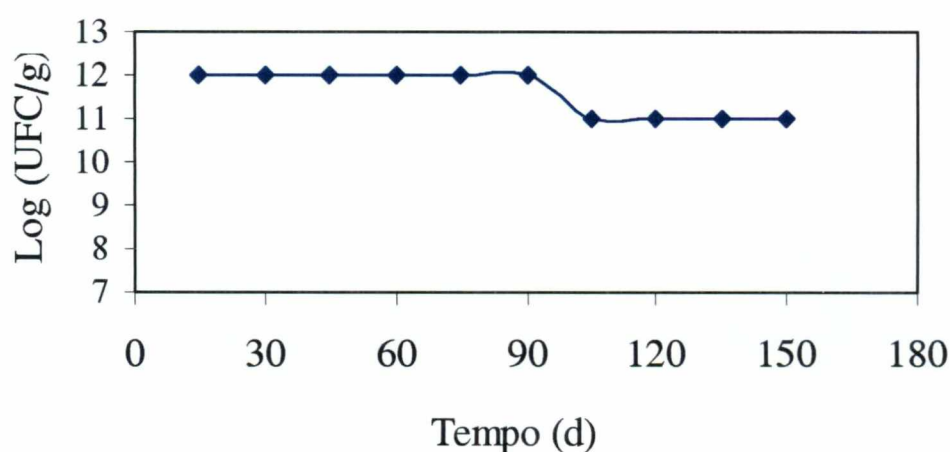


FIGURA 18 - VIABILIDADE CELULAR DURANTE ESTOCAGEM DE *Lactobacillus fermentum* LPB LIOFILIZADO.

4.6 ANÁLISE ECONÔMICA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Lactobacillus fermentum* LPB EM MEIO ALTERNATIVO

Para avaliar o custo da produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum*, em meio de cultivo comercial MRS (DE MAN, ROGOSA e SHARP, 1960) marca MERK, com a seguinte composição: peptona de caseína 10 g/L, extrato de carne 8 g/L, extrato de levedura 4 g/L, glicose 20 g/L, fosfato de potássio dibásico 2 g/L, citrato de amônio dibásico 2 g/L, acetato de sódio 5 g/L, sulfato de magnésio 0,2 g/L e sulfato de manganês 0,04 g/l. E avaliar o custo em

meio à base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura, foi realizado uma análise econômica destes meios.

A produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum* foi superior no meio de melaço. Em 1000 L de meio comercial MRS, após o cultivo do microrganismo, obteve-se 1,3 Kg de biomassa viva com um custo de R\$39.672 (trinta e nove mil, seiscentos e setenta e dois reais); utilizando 1000 L de meio a base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura para o cultivo do mesmo microrganismo obteve-se 5 Kg de biomassa viva tendo um custo de R\$3.474 (três mil, quatrocentos e setenta e quatro reais).

Considerando-se os valores acima, para também se obter 5 Kg de biomassa viva em meio comercial MRS, seria necessário 3.846L deste meio e custo seria de R\$152.585 (Cento e cinquenta e dois mil, quinhentos e oitenta e quatro reais) (TABELA 21).

TABELA 21 – ANÁLISE ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

Meio de cultivo	Biomassa (Kg)	Custo (R\$)
*Meio alternativo 1	5	3.474
**Meio alternativo 2	5	3.170
Meio MRS	5	152.585

* Meio alternativo 1 = meio à base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura

** Meio alternativo 2 = meio à base de caldo de cana-de-açúcar e extrato de levedura

4.7 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE OVOS

Através da análise estatística realizada pelo programa SAEG, foi verificado que a administração dos probióticos (*Lactobacillus fermentum*, mistura de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Saccharomyces cerevisiae* e o probiótico comercial) não apresentaram efeito significativo sobre a produção de ovos, quando comparados com os tratamentos que não receberam probiótico, e observou-se que seguiu a curva normal de postura das aves (FIGURA 19).

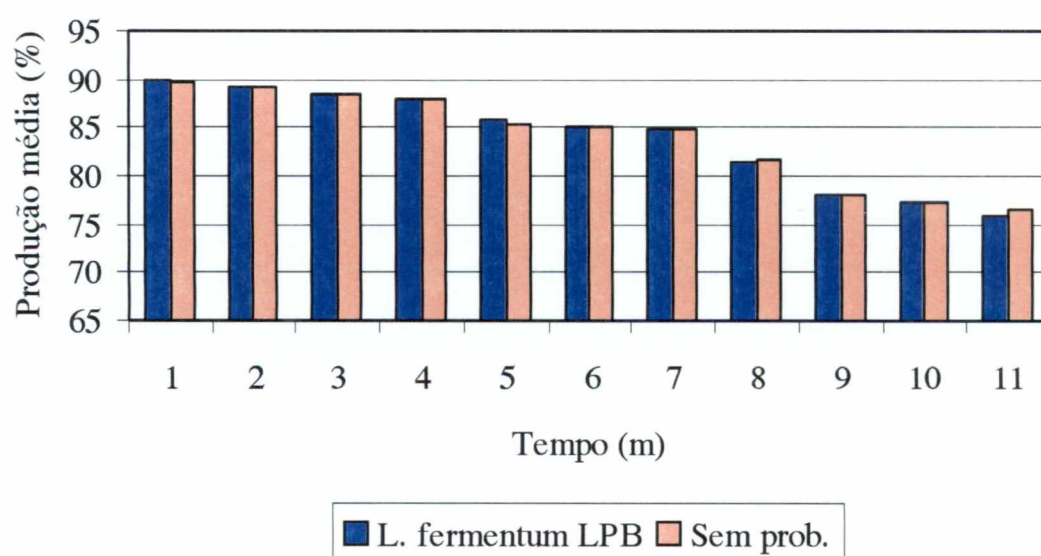


FIGURA 19 - PRODUÇÃO MÉDIA DE OVOS.

Observando a FIGURA 19, que no 5^o período houve uma queda na produção de ovos das aves que não receberam probiótico, devido a um surto de colibacilose e foi possível observar que as aves dos tratamentos com probiótico na ração apresentaram uma maior resistência à doença e sem diminuição brusca na produção de ovos. Evidenciando-se que a utilização de probiótico na ração confere as aves mais resistência aos surtos de doenças entéricas.

O sistema de criação dessas aves em gaiolas suspensas sem contato com o solo diminui a incidência de doenças entéricas, isto justifica que durante os 11 períodos de experimento detectou-se apenas um surto de colibacilose.

A FIGURA 20 demonstra que a produção de ovos das aves vermelhas foi superior a produção de ovos das aves brancas, e isto é comum para esta linhagem, pois as aves vermelhas são mais produtivas.

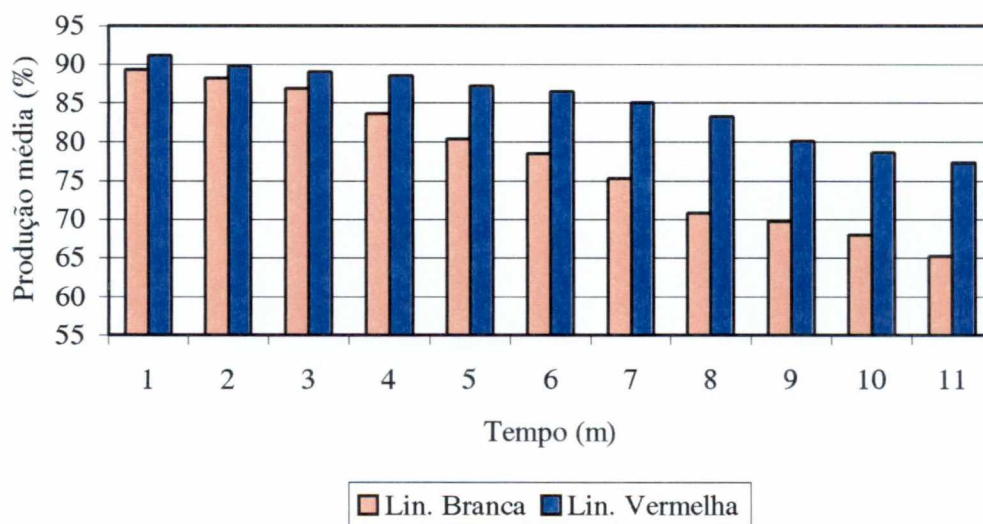


FIGURA 20 – PRODUÇÃO MÉDIA DE OVOS EM RELAÇÃO A LINHAGEM.

A administração de probiótico na ração das poedeiras favoreceu a resistência a doenças entéricas, como surtos de colibacilose, a qual é comum nas poedeiras devido o estresse que elas são submetidas. Durante todo o período do experimento as poedeiras que receberam probióticos na ração não precisaram ser medicadas.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu avaliar o efeito de diferentes fatores que influenciam a produção de biomassa viva de *Lactobacillus fermentum* no meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura. A partir destes resultados puderam-se determinar as condições ótimas que possibilitam o alcance das mais elevadas concentrações em termos de produção de biomassa.

Por meio das otimizações feitas, os principais pontos observados foram:

- Testando-se diferentes fontes de nitrogênio, o extrato de levedura é a que mais favoreceu a produção de biomassa, e apresenta um baixo custo.
- Os melhores parâmetros fermentativos foram: tempo de fermentação de 48 horas, taxa de inóculo de 20%, temperatura de incubação de 35°C e pH inicial de 7,0.
- A melhor formulação do meio de cultivo é o uso de 7% de melaço de cana-de-açúcar, 2,7% de extrato de levedura e pH do meio de 7,0.

Através da otimização foi possível obter uma produção de biomassa de *Lactobacillus fermentum* de 5080 mg/L, enquanto que utilizando meio de cultivo MRS comercial obteve-se 1360 mg/L de biomassa, ou seja utilizando o meio de cultivo a base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura a produção de biomassa é aproximadamente 4 vezes maior.

Na análise econômica dos meios utilizados é possível observar que o meio de cultivo de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura necessário para produzir 5 Kg de biomassa de *Lactobacillus fermentum* tem um custo de R\$ 3.474 (três mil,

quatrocentos e setenta e quatro reais), e para obter a mesma quantia de biomassa em meio comercial MRS o custo seria de R\$152.585 (Cento e cinquenta e dois mil, quinhentos e oitenta e quatro reais).

Esta análise econômica demonstra que o meio de cultivo à base de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura apresenta um baixo custo e é um ótimo meio para a produção de *Lactobacillus* com ação probiótica.

A administração de probiótico na ração das poedeiras favoreceu a resistência a doenças entéricas, como surtos de colibacilose, a qual é comum nas poedeiras devido o estresse que elas são submetidas. Durante todo o período do experimento, as poedeiras que receberam probióticos na ração não precisaram ser medicadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREATTI, R. L.; SAMPAIO, H. M. Probióticos e Prebióticos. **Avicultura Industrial**, p. 16-32, maio, 2000.

ANTUNES, R. Máquinas de ovos. **Avicultura Industrial**, p. 22-23, outubro, 2000.

BABA, E.; NAGAISHI, S.; FUKATA, T.; ARAKAWA, A. Tha role of intestinal microflora on the prevention of *Salmonella* colonization in gnotobiotic chickens. **Poultry Science**, v. 70, p. 1902-1907, 1991.

BARROS, N. T.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, 1996; 299p.

BASTOS, E. **Cana-de-açúcar: o verde mar de energia**. São Paulo, 1987; 103p.

BELIN, J. M. Las levaduras. *In*: BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia Alimentaria**. Zaragoza, 1995. P.19-33.

BLANKENSHIP, L. C.; BAILEY, J. S.; COX, N. A.; STERN, N. J.; BREWER, R.; WILLIAMS, O. Two-step mucosal competitive exclusion flora treatment to diminish *Salmonellae* in commercial broiler chickens. **Poultry Science**, v. 72, p. 1667-1672, 1993.

BOCQUET, J. Generalidades sobre os microrganismos. *In*: SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo, 1985. P. 11-46.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Decreto n. 986, de 21 de outubro de 1969: referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. *In*: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO.

Compêndio da legislação de alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos. São paulo, 1998. V. 1.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed. 2000.

CERNIGLIA, G. J.; GOODLING, A. C.; HERBERT, J. A. The response of layers to feeding *Lactobacillus* fermentation products. **Poultry Science**, v. 62, p. 1399-1402, 1983.

CORRIER, D. E.; NISBET, D. J.; SCANLAN, C. M.; HOLLISTER, A. G.; CALDWELL, D. J.; THOMAS, L. A.; HARGIS, M.; TOMKINS, T.; DELOACH, J. R. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce *Salmonellae* colonization. **Poultry Science**, v. 74, p. 1093-1100, 1995.

DAERSCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v. 43, n. 1, p. 164-166, jan., 1989.

DALY, C. Biotechnology group meeting probiotics – fact or fictio?: Lactic acid bacteria and milk fermentations. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 51, p. 539-570, 1991.

DELLAGLIO, F. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. V.1. 25-70.

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

DESMAZEAUD, M. J.; ROISSART, H. Métabolisme générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. V.1. 25-70.

DIEZ, J. C.; YOKOYA, F. Fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar por processo descontínuo utilizando *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39 (2), p. 419-426, 1996.

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, n 1, p. 119-124, 2000.

FERREIRA, C. L.; GILLILAND, S. E. Bacteriocin involved in premature death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM during growth at pH 6. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 2, p. 306-315, 1988.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K. C. K. Probióticos: uso de probióticos na alimentação de frango de corte. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 8, p. 40-43, 1999.

FERREIRA, A. J. P.; OLIVEIRA, D.R. Probióticos: naturais, saudáveis e eficientes. **Aves & Ovos**, v. 12, n. 8, p. 24-29, abr., 1996.

FERREIRA, c. l. l.; teshima, e. Prebióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 22-25, 2000.

FOX, S. M. Probiotics: Intestinal inoculants for production animals. **Veternary Medicine**, v. 83, n. 8, p. 806-829, 1988.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. **Probiotics the scientific basis**. Chapman & Hall, 1992; 398 p.

GIRAUD, E.; BRAUMAN, A.; KELEKE, S.; LELONG, B.; RAIMBAULT, M. Isolation and physiological study of amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 379-383, 1991.

GUSILS, C.; CHAIA, A. P.; GONZÁLEZ, S.; OLIVER, G. *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. **Journal of Food Protec**, v. 62, p. 252-256, 1999.

HADDADIN, M. S. Y.; ABDULRAHIM, S. M.; HASHLAMOUN, E. A. R.; ROBINSON, R. K. The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. **Poultry Science**, v. 75, p. 491-494, 1996.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUISVELD, J. H. H.; FULLER, R. Selection of strains for probiotics use. In: FULLER, R. **Probiotics the scientific basis**. Chapman & Hall, 1992. P. 209-224.

HIGASKINO, . E. K. **Isolamento de bactérias da flora intestinal, com características probióticas de ação antimicrobiana**. Curitiba, 1998. 69f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas**, 3 ed. São Paulo, 1985.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**, Zaragoza: Acribia, 1994; p. 442-449.

JIN, L. Z.; HO, T. W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v. 53, p. 351-368, 1997.

JERNIGAN, M. A.; MILES, R. D.; ARAFA, A. S. Probiotics in poultry nutrition – a review. **World's Poultry Science Journal**, v. 41, p. 99-107, 1985.

KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. Seletion and desing of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 45-57, 1999.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KRUGER, W. F.; BRADLEY, J. W.; PATTERSON, R. H. The interaction of gentian violet and *Lactobacillus* organisms in the diet of Leghorn hens. **Poultry Science**, v. 56. P. 1729-1732, 1977.

LANCINI, J. B. Fatores exógenos na função gastrintestinal-aditivos. In: FUNDAÇÃO APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Fisiologia da digestão e absorção das aves**. Campinas, p. 99-126, 1994.

LARPENT, J. P. Las bacterias lácticas. In: BOURGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia Alimentaria**. Zaragoza, 1995. P. 3-17.

LIMA, U. A. **Tecnologia das fermentações**. v. 1. São Paulo. 1987, 285 p.

MACGADO, C. M. M. **Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agroindústria do café**. Curitiba, 2000, 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MARUTA, K. Probióticos e seus benefícios. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Santos, p. 203-219, 1993.

MATSUZAKI, T.; CHIN, J. Modulating immune responses with probiotic bacteria. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 67-73, 2000.

MEIRELLES, C. E.; ROBIN, P.; LIMA, V. E. **Segurança na cultura da cana-de-açúcar**, 1988, 37 p.

MILES, R. D. Manipulation of the microflora of gastrointestinal tract: natural ways to prevent colonization by pathogens. In: **Altech biotechnology in the feed industry**. 1993, p. 133-150.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de Microrganismos**, Campinas, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1989, 65 p.

NAHASHON, S. N.; NAKAUE, H. S.; MIROSH, L.W. Performance of single comb white leghorn fed a diet supplemented with a live microbial during the growth and egg laying phases. **Animal Feed Science Technology**, v. 57, p. 25-38, 1996.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. **Nature**, v. 241, p. 210-211, 1973.

PALMFELDT, J. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 235-238, 2000.

PASCUAL, M.; HUGAS, M.; BADIOLA, J. I.; MONFORT, J. M.; GARRIGA, M. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4981-4986, 1999.

PEDROSO, A. A.; MORAES, V. M. B.; ARIKI, J. Effects of protein and probiotic (*Bacillus subtilis*) level in pullets and laying hens diets. **Brasilian Journal of Poultry Science**. v. 1, p. 49-54, 1999.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEQ, N.R . **Microbiologia**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, v. 2. 1996.

REQUE, E. F. **Isolamento, estudos fisiológicos e identificação de probiótico (*Lactobacillus fermentum*) para uso em frangos de corte**. Curitiba, 1999, 93f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

ROSAT, J. P.; PFEIFER, A. **Efeitos dos probióticos na alimentação: evidências clínicas do seu efeito estimulante sobre a imunidade natural do intestino**. Resumo do 42º Seminário Nestlé Nutrition, 1998; 44p.

SANIDADE: sob controle. **Avicultura Industrial**. Porto Feliz: Gessulli, n. 1052, p. 12-18, fev., 1998.

SILVA, A. B. O panorama da produção nacional e mundial de aves e ovos. **Aves & Ovos**, v. 16, n. 4, p. 33-43, 2000.

SMITH, J. Biotechnology group meeting probiotics – fact or fiction?. **Journal chemistry Technology and Biotechnology**, v. 51, p. 539 – 570, 1991.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 61-68, 1945.

SULLIVAN, M. G. O.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. C. °; COLLINS, J. K. Probiotic bacteria: myth or reality?. **Trends in Food Science & Technology**, [S.1.], v. 3, p. 309-314, 1992.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TORTUERO, F. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. **Poultry Science**, Champaign, v. 52, p. 197-203, 1973.

TORTUERO, F.; FERNÁNDEZ, E. Effects of inclusion of microbial cultures in barley-based diets fed to laying hens. **Animal feed science and Technology**, v. 53, p. 255-265, 1995

TOYO. **Manual Toyo – efeitos dos probióticos**. São Paulo, 1998.

ZIPRIN, R. L.; DELOACH, J. R. Comparison of probiotics maintained by *In Vivo* passage through laying hens and broilers. **Poultry Science**, v. 72, p. 628-635, 1993.