

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Dissertação

Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja

Helena Reissig Soares Vitola
Bacharela em Química de Alimentos

Pelotas, 2017

Helena Reissig Soares Vitola

Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de Orientação: Prof. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V845b Vitola, Helena Reissig Soares

Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja / Helena Reissig Soares Vitola ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2017.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Lactobacillus casei. 2. Biocatalizador. 3. Probiótico. 4. Viabilidade celular. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 664

Helena Reissig Soares Vitola

Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja

Dissertação aprovada, como requisito final, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 23/02/2017

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (Presidente)
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Doutor em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Mirian Ribeiro Galvão Machado
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Márcia Arocha Gularte
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Graciele Daiana Funck
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

A Deus, por me permitir concluir mais este ciclo em minha vida e exercer a profissão, pela qual me apaixonei.

Aos meus pais por me apoiarem em todas as decisões tomadas e, por sempre acreditarem em mim.

Aos meus familiares, por tornarem momentos difíceis alegres e estarem sempre ao meu lado, mesmo com alguns quilômetros de distância.

Aos meus amigos pelos momentos de companheirismo e confissões, sem eles a caminhada não seria a mesma.

Aos meus colegas de laboratório por todos os ensinamentos e pela amizade.

Aos meus orientadores Ângela Maria Fiorentini e Wladimir Padilha da Silva que com todo carinho e dedicação passaram ensinamentos para uma vida inteira, sendo não apenas mestres, mas acima de tudo, amigos.

Meu muito obrigada a todo vocês por fazerem parte da minha história.

Resumo

VITOLA, Helena Reissig Soares. **Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja.** 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Bactérias ácido lácticas, com potencial probiótico, são consideradas de grande interesse para o mercado de alimentos funcionais, os quais estão em expansão, devido à contribuição desses alimentos à saúde dos indivíduos. Objetivou-se no presente estudo isolar, caracterizar bactérias ácido lácticas com potencial probiótico e imobilizar em grãos de soja, a fim de manter sua viabilidade durante o armazenamento. Foram realizados testes para isolamento e caracterização (coloração de Gram, presença de catalase, propriedades tecnológicas, fermentação de carboidratos) dos isolados a partir de silagem de colostro bovino; avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica (atividade das enzimas, hemolisina, DNase e gelatinase, susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico e perfil plasmidial), avaliação do potencial probiótico (simulação da tolerância ao trânsito gastrointestinal, capacidade de auto-agregação, co-agregação, hidrofobicidade, atividade da enzima β galactosidase e atividade antagonista), avaliação da produção de exopolissacarídeos, identificação molecular, imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja e microscopia eletrônica de varredura do biocatalizador. Dos isolados caracterizados como bactérias ácido lácticas, seis foram eleitos em testes preliminares (potencial tecnológico, resistência a diferentes concentrações de bile e fermentação de açúcares), três apresentaram-se seguros microbiologicamente e um caracterizou-se como potencialmente probiótico. A bactéria selecionada para imobilização, SCL3, pertencente ao gênero *Lactobacillus* da espécie *casei*, produtora de exopolissacarídeo, passou por processo fermentativo que permitiu a adsorção de células na superfície dos grãos de soja. A imobilização possibilitou a viabilidade das células em concentração de $6,23 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e $6,71 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ até o final do 30^o dia de armazenamento após secagem (liofilização) e em refrigeração, respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização das células aderidas a superfície dos grãos de soja.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus casei*; biocatalizador; probiótico, viabilidade celular.

Abstract

VITOLA, Helena Reissig Soares. **Lactic acid bacteria isolated from bovine colostrum silage: Probiotic potential and viability of cellular immobilization using as support soybean grains.** 2017. Dissertation (Master's Degree in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2017.

Lactic acid bacteria, with probiotic potential, are considered of great interest for the functional food market, which are expanding due to the contribution of these foods to the health of individuals. The objective of this study was to isolate, characterize lactic acid bacteria with probiotic potential and immobilize them in soybean grains, in order to maintain their viability during storage. Isolation and characterization tests (Gram staining, presence of catalase, technological properties, carbohydrate fermentation) of the isolates were carried out from bovine colostrum silage; Evaluation of microbiological safety parameters (enzyme activity, hemolysin, DNase and gelatinase, susceptibility to antimicrobials of clinical use and plasmid profile), evaluation of probiotic potential (simulation of gastrointestinal transit tolerance, self-aggregation capacity, co-aggregation, Hydrophobicity, β -galactosidase enzyme activity and antagonist activity), evaluation of exopolysaccharide production, molecular identification, cellular immobilization using as support soybean grains and scanning electron microscopy of the biocatalyst. Of the isolates characterized as lactic acid bacteria, six were selected in preliminary tests (technological potential, resistance to different concentrations of bile and fermentation of sugars), three were microbiologically safe and one was characterized as potentially probiotic. The bacterium selected for immobilization, SCL3, belonging to the genus *Lactobacillus* of the *casei* species, exopolysaccharide producer, undergoes a fermentative process that allowed the adsorption of cells on the surface of the soybean grains. The immobilization made possible the viability of the cells at a concentration of 6.23 log CFU.g⁻¹ and 6.71 log CFU.g⁻¹ until the end of the 300 day of storage after drying (lyophilization) and in refrigeration, respectively. Scanning electron microscopy allowed the cells to adhere to the surface of the soybean grains.

KEYWORDS: *Lactobacillus casei*; biocatalyst; probiotic, cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Métodos de imobilização celular.....	18
Figura 2 Eletroforese em gel de agarose.....	47
Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição centesimal do colostro até completa transição para leite.....	15
Tabela 2	Composição físico-química média dos grãos de soja.....	22
Tabela 3	Análise da susceptibilidade dos isolados de silagem de colostro bovino a antimicrobianos de uso clínico.....	46
Tabela 4	Contagem de células viáveis (log UFC.mL ⁻¹) dos isolados de silagem de colostro bovino quando submetidos a passagem pelo trato gástrico simulado.....	48
Tabela 5	Contagem de células viáveis (log UFC.mL ⁻¹) dos isolados de silagem de colostro bovino quando submetidos a passagem pelo trato intestinal simulado.....	49
Tabela 6	Percentual de auto-agregação dos isolados de silagem de colostro bovino em função do tempo e temperatura.....	50
Tabela 7	Percentual de co-agregação dos isolados de silagem de colostro bovino a <i>E. coli</i> ATCC 8739 em função do tempo.....	51
Tabela 8	Percentual de hidrofobicidade dos isolados de silagem de colostro bovino após a extração com hidrocarboneto xileno.....	51
Tabela 9	Espectro de inibição da atividade antimicrobiana produzida pelos isolados de silagem de colostro bovino.....	53

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	OBJETIVOS.....	12
	2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3	CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
	3.1 Micro-organismos probióticos e bactérias ácido lácticas (BAL).....	13
	3.2 Silagem de colostro bovino.....	15
	3.3 Imobilização celular.....	17
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
4	CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO - Potencial probiótico de <i>Lactobacillus casei</i> SCL3 e imobilização em grãos de soja.....	34
	Resumo.....	35
	1. Introdução.....	36
	2. Material e Métodos.....	38
	3. Resultados e Discussão.....	44
	4. Conclusão.....	57
	5. Referências bibliográficas.....	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

1 INTRODUÇÃO

2 Nas últimas décadas, a população vem demonstrando uma maior
3 preocupação com a saúde, o que influencia na busca por alimentos que tragam
4 benefícios aos indivíduos. Os alimentos com alegação de propriedade funcional são
5 aqueles que possuem componentes, que além de suas funções nutritivas básicas,
6 fornecem melhorias fisiológicas ou reduzem o risco de doenças crônicas, segundo a
7 Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2008).

8 Enquadrados na categoria de alimentos funcionais, os produtos probióticos
9 são caracterizados por conterem micro-organismos vivos, no momento do consumo.
10 De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World*
11 *Health Organization* - FAO/WHO (2001) - probióticos são micro-organismos vivos
12 que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde
13 do hospedeiro, através de vários fatores como modulação da microbiota intestinal,
14 efeitos antagônicos e competição resultando em um aumento na resistência contra
15 micro-organismos patogênicos.

16 Entre os micro-organismos que integram o grupo dos probióticos, segundo a
17 legislação brasileira encontram-se bactérias pertencentes aos gêneros
18 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, reunidas em uma categoria que têm
19 como principal característica a produção de ácido láctico (BRASIL, 2002).

20 As bactérias ácido lácticas (BAL) estão reunidas nesse grupo por
21 apresentarem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes.
22 Ao serem aplicadas na preparação de alimentos esses micro-organismos
23 proporcionam a redução do pH através do consumo de carboidratos e produção de
24 ácidos o que conseqüentemente, aumenta o tempo de conservação desse alimento,
25 pois inibe a proliferação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos.
26 (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007).

27 Presentes em uma grande variedade de alimentos, como leites e seus
28 derivados, produtos cárneos e vegetais, as BAL sobrevivem e multiplicam-se nos
29 mesmos, devido aos nutrientes que permitem manter o metabolismo dessas
30 bactérias em funcionamento. Entre os lácteos, o colostro bovino, considerado a
31 primeira secreção láctea, é expelido durante os primeiros sete dias pós-parto e tem

32 como função a alimentação do recém-nascido, pois fornece além da nutrição
33 adequada, proteção imunológica (GODDEN, 2009).

34 Em virtude do excesso produzido e visando a conservação por períodos mais
35 longos, produtores rurais da região Sul, desenvolveram a silagem de colostro
36 bovino. Produzida a partir da fermentação do colostro pela microbiota natural do
37 alimento, durante o período de 21 dias, a silagem permite que o mesmo tenha seu
38 armazenamento prolongado por até 24 meses, mantendo as características físicas e
39 químicas encontradas no colostro *in natura*. Em estudo realizado por Saalfeld
40 (2013), foi identificada a presença do gênero *Lactobacillus* spp. na silagem de
41 colostro bovino, porém não há pesquisas relatando o potencial probiótico desses
42 isolados para uma possível aplicação em alimentos.

43 Um grande problema enfrentado pela indústria em relação à aplicação de
44 bactérias probióticas em alimentos é manter sua viabilidade, nas devidas
45 concentrações (superior a 10^6 UFC/g ou mL), até o consumo. Em virtude deste
46 obstáculo, estudos vêm sendo desenvolvidos, para se transpor essa barreira, sendo
47 uma alternativa a imobilização celular. Essa técnica possibilita o uso em processos
48 fermentativos contínuos, o aumento da estabilidade e o reaproveitamento do
49 material biológico, pois o confinamento além da proteção conferida às células eleva
50 sua atividade fermentativa. Existem diversos métodos para imobilização como: auto-
51 agregação, ligação à superfície, aprisionamento em matriz porosa e contenção por
52 barreira. Assim como os métodos, variados são os tipos de suportes utilizados para
53 esse processo, sendo os materiais mais estudados alginatos e carragena, bem
54 como, grãos ou pedaços de frutas, todos esses fatores dependentes do organismo
55 que se pretende imobilizar.

56 A soja é a cultura oleaginosa mais produzida no mundo, composta
57 majoritariamente por proteínas e lipídios, contendo em torno de 34% de açúcares
58 totais (BRASIL, 2016). Além dos nutrientes básicos, os grãos armazenam
59 compostos bioativos e antioxidantes que quando liberados desempenham
60 benefícios à saúde (JUN, KIM, SUNG, 2002; LEE et al., 2005; TRIPATHI e MISRA,
61 2005; KUMAR, et al., 2009).

62 Nesse contexto, a utilização de grãos como suporte sólido para células com
63 potencial probiótico torna-se uma alternativa e, dessa forma, no presente estudo
64 objetivou-se isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas com potencial probiótico, a

65 partir de silagem de colostro e, imobilizá-la utilizando como suporte grãos de soja, a
66 fim de manter sua viabilidade.
67

68 **2. OBJETIVOS**

69

70 **2.1 OBJETIVO GERAL**

71 Isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas, com potencial probiótico,
72 proveniente de silagem de colostro bovino e imobilizá-las em grãos de soja, a fim de
73 manter sua viabilidade durante o período de armazenamento.

74

75 **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 76 - Isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas a partir de silagem de colostro bovino;
- 77 - Avaliar parâmetros de segurança microbiológica dos isolados (atividade das
78 enzimas hemolisina, DNase e gelatinase, susceptibilidade a antimicrobianos de uso
79 clínico e perfil plasmidial);
- 80 - Avaliar o potencial probiótico dos isolados (simulação ao trânsito gastrointestinal,
81 capacidade de auto-agregação, co-agregação, hidrofobicidade, atividade da enzima
82 β -galactosidase e atividade antagonista contra patógenos);
- 83 - Avaliar a produção de exopolissacarídeo;
- 84 - Identificar molecularmente os isolados;
- 85 - Imobilizar o isolado em grãos de soja através de processo fermentativo;
- 86 - Determinar a viabilidade após 30 dias sob armazenamento em refrigeração e após
87 a liofilização;
- 88 - Visualizar as células imobilizadas na superfície dos grãos de soja, através da
89 técnica de microscopia eletrônica de varredura.

90

91

92 3 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

93

94 3.1 Micro-organismos probióticos e Bactérias Ácido Lácticas (BAL)

95 Derivado do grego a palavra probiótico significa “para a vida” e foi utilizada
96 inicialmente por Lilley e Stillwell (1965), para descrever substâncias secretadas por
97 micro-organismos que estimulam o crescimento de outros. Em 1974, Parker definiu
98 probiótico como sendo “organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio
99 da microbiota intestinal”. Fuller em 1989, redefiniu o termo para “suplemento
100 microbiano vivo que afeta de forma benéfica o hospedeiro melhorando seu equilíbrio
101 intestinal”. Hoje a palavra é designada para definir micro-organismos vivos que
102 quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do
103 hospedeiro (FAO/ WHO, 2001).

104 Enquadrados e registrados na categoria de alimentos com alegações de
105 propriedades funcionais ou de saúde, os alimentos que possuem esse micro-
106 organismos, caracterizam-se por atuar no crescimento, desenvolvimento,
107 manutenção e/ outras funções normais no organismo humano” (BRASIL, 1999)

108 O modo de ação pelo qual o micro-organismo probiótico favorece a saúde do
109 homem não está completamente elucidado pela ciência, embora tenham sido
110 sugeridos vários processos que podem atuar independentemente ou associados.
111 Um deles seria a exclusão, em que o probiótico competiria com patógenos por sítios
112 de fixação e nutrientes impedindo sua ação transitória, porém implicaria na
113 necessidade de administração contínua, em elevadas doses, para manifestar seus
114 efeitos (HAVENAAR; IN’T VELD, 1992; OUWEHAND et al., 1999; CROSS, 2002). A
115 síntese de substâncias como bacteriocinas (VILLANI et al., 1995; RODRIGUEZ,
116 1996; NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999), ácidos orgânicos voláteis (AUDISIO;
117 OLIVER; APELLA, 2000; JIN; MARQUARDT; BAIDOO, 2000; OGAWA et al., 2001),
118 peróxido de hidrogênio (HAVENAAR et al., 1992; NAIDU et al., 1999), ou ainda sua
119 ação sobre o metabolismo celular reduzindo a concentração de amônia no
120 organismo (KOZASA, 1986) e liberando enzimas como a lactase (DE VRESE et al.,
121 2001), qualificariam outros modos de ação. Estudos demonstram que a
122 administração de certas cepas bacterianas probióticas influenciam na indução da
123 resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos (KATO et
124 al., 1988; RAFTER, 2003; LOURENÇO et al., 2013), assim como supressão da
125 formação de tumores de cólon (KATO; YOKOKURA; MUTAI, 1994; COPPOLA;

126 TURNES, 2004; LEBLANC; PERDIGÓN, 2005) e inibição de metástase pulmonares
127 (MATSUZAKI; YOKOKURA, 1987; MATSUZAKI; SHIMIZU; YOKOKURA, 1990;
128 COPPOLA; TURNES, 2004).

129 Para classificar o organismo como probiótico, o mesmo precisa atender
130 certos critérios utilizados e aceitos como: não ser patogênico, ser resistente ao
131 processamento do alimento, ser estável e permanecer viável após a exposição do
132 alimento ao trânsito gástrico e intestinal, aderir-se as células epiteliais e ser capaz
133 de influenciar a atividade metabólica local (SZAJEWSKA et al., 2006). Segundo
134 ANVISA (2008) a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada
135 na faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação
136 diária do produto pronto para o consumo (100 g ou 100 mL), ressaltando-se que
137 valores menores podem ser aceitos, desde que a seja comprovada sua eficácia.

138 Reconhecidas como bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus*,
139 *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Lactobacillus*
140 *casei* subsp. *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium*
141 *bifidum*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*), *Bifidobacterium longum* e
142 *Enterococcus faecium*, integram ainda um grupo caracterizado pela fermentação de
143 açúcares com produção de ácido lático (BRASIL, 2002).

144 As bactérias ácido lácticas (BAL) constituem um grupo de bactérias Gram-
145 positiva unidas por suas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas.
146 São micro-organismos não esporulados, possuem morfologia de cocos ou bacilos,
147 anaeróbios facultativos ou microaerófilos, catalase e motilidade negativa, mesófilos,
148 fastidiosos, possuem baixo conteúdo de G+C e produzem ácido lático como produto
149 majoritário da fermentação de carboidratos. (SALMINEN; VON WRIGHT;
150 OUWEHAND, 2004; FUGELSANG; EDWARDS, 2007).

151 A classificação de BAL em diferentes gêneros é baseada na morfologia das
152 bactérias, modo como fermenta a glicose, desenvolvimento em diferentes
153 temperaturas, configuração do ácido lático produzido (D- Dextrógiro ou L- Levógiro),
154 habilidade de multiplicação em altas concentrações salinas e tolerância ácida ou
155 alcalina. O grupo é constituído de 20 gêneros segundo classificação taxonômica
156 (MOHANIA et al., 2008), porém do ponto de vista tecnológico apenas 11 gêneros
157 são considerados principais, sendo eles: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*,
158 *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*,

159 *Streptococcus*, *Paralactobacillus*, *Trichococcus* e *Weissella* (SALMINEN; VON
160 WRIGHT; OUWEHAND, 2004).

161 Associadas a habitats ricos em nutrientes, as BAL, estão presentes em
162 diversos produtos alimentícios como leites e derivados, carnes, vegetais, bebidas e
163 até mesmo ao corpo humano (SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004)
164 (INÊS et al., 2008).

165

166 3.3 Silagem de colostro bovino

167 O colostro bovino é definido como a mistura de secreções lácteas e
168 constituintes do soro sanguíneo como imunoglobulinas e outras proteínas séricas,
169 que se acumulam na glândula mamária durante o pré-parto, podendo ser coletado
170 imediatamente ou até sete dias após o parto, no período de transição do colostro
171 para o leite (FOLEY; OTTERBY, 1978).

172 Essencial na amamentação do recém-nascido, essa secreção fornece ao
173 animal nutrientes e anticorpos necessários para seu desenvolvimento. A
174 composição do colostro é influenciada por uma série de fatores como raça, número
175 de parição, ração pré-parto, duração do período seco e tempo pós-parto (KEHOE;
176 JAYARAO; HEINRICH, 2007). É notado que com o passar dos dias,
177 principalmente nos primeiros cinco, após o parto, ocorre uma redução na
178 concentração de lipídios, proteínas, imunoglobulinas, minerais e vitaminas até a
179 completa transição do colostro para o leite (FOLEY; OTTERBY, 1978).

180

181 **Tabela 1.** Composição centesimal do colostro até completa transição para leite

Composição	Colostro (dias)					SLC	Leite
	1	2	3	4	5		
Sólidos totais (%)	23,9	17,9	14,1	13,9	13,6	SI	12,9
Proteínas (%)	14,0	8,4	5,1	4,2	4,1	14,6	3,1
Gorduras (%)	6,7	5,4	3,9	4,4	4,3	5,9	4,0
Lactose (%)	2,7	3,9	4,4	4,6	4,7	0,8	5,0
Cálcio (%)	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,15-0,3	0,1
Imunoglobulinas (%)	6,0	4,2	2,4	ND	ND	0,33	0,1
Vitamina A (µg/ 100 mL)	295,0	190,0	113,0	76,0	74,0	SI	34,0

182 SLC: silagem de colostro bovino; ND: não detectado; SI: sem informações

183 Fonte: Adaptado de FOLEY; OTTERBY, 1978; PEREIRA et al., 2016

184

185 Um grande problema enfrentado por produtores rurais seria a alta
186 concentração de partos, o que acarreta em um acúmulo de colostro muito grande,

187 em média de 39 a 52 kg durante os primeiros quatro dias pós-parto, tornando
188 impossível sua utilização imediata (LANUZA et al., 1980; FOLEY; OTTERBY, 1978).
189 Devido a esse obstáculo, há algum tempo, são estudadas formas de conservação,
190 para utilização prolongada desse alimento. O congelamento seria uma
191 possibilidade, porém demandaria da necessidade de equipamentos para seu
192 armazenamento (KLOBASA; GOEL; WERHAHN, 1998; RAMÍREZ-SANTANA,
193 2012), enquanto a acidificação com e sem adição de conservantes manteria essa
194 viabilidade, sem a utilização de equipamentos, porém apenas por 28 dias
195 (GONZALES, 1978; CASTRO et al., 2004).

196 Em pesquisa realizada por Saalfeld no ano 2008, foi desenvolvido um
197 subproduto a partir do colostro que permite seu armazenamento prolongado e,
198 aumento da qualidade através da fermentação anaeróbica pela microbiota natural
199 da secreção. A silagem de colostro, assim denominada, possibilitou o
200 armazenamento por períodos superiores há 24 meses, não necessitando de
201 refrigeração, congelamento ou adição de aditivos, o que contribui para seu baixo
202 custo de produção. A alimentação dos animais recém-nascidos com a silagem de
203 colostro, em comparação a alimentação com leite, propiciou um ganho de peso
204 maior, tanto em machos como fêmeas. Quando estudados, os níveis de
205 imunoglobulinas não diferiram significativamente entre o colostro *in natura* e a
206 silagem. A autora, ainda verificou que após 21 dias de fermentação houve
207 isolamento de bactérias ácido lácticas que através da produção de compostos como
208 ácidos inibiram o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos.

209 Na alimentação humana, o colostro bovino, *in natura* ou liofilizado, vêm sendo
210 utilizado em diversos países como suplemento nutricional devido sua constituição e
211 presença de componentes bioativos (KALAFAT, 2011; GODWIN, 2011).

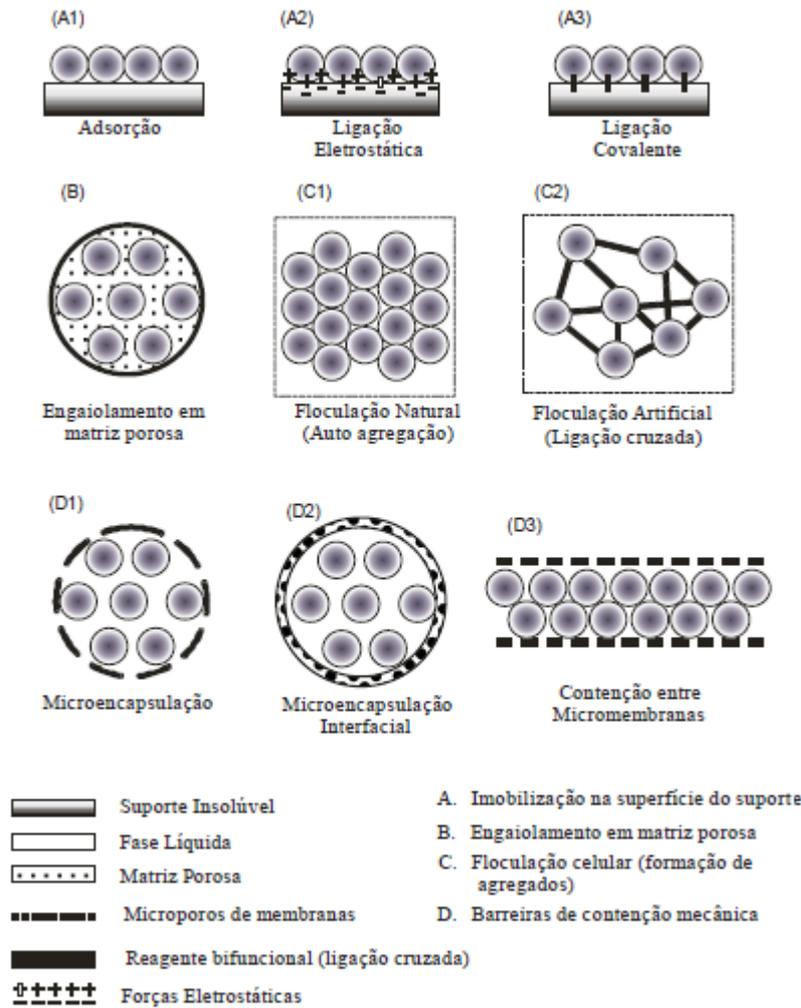
212 Em agosto de 2016, foi defendido em reunião técnica promovida pela
213 Comissão de Agricultura, Pecuária, Abastecimento e Desenvolvimento Rural da
214 Câmara dos Deputados, o aproveitamento do colostro bovino na alimentação
215 humana, acreditando que a modificação poderá ser feita pelo Ministério da
216 Agricultura, em breve, pois a produção no Brasil alcança a marca de 1,9 bilhões de
217 litros, dos quais apenas metade é direcionada para a alimentação dos recém-
218 nascidos a outra metade é descartada (SANTOS; OLIVEIRA, 2016)

219
220

221 **3.4 Imobilização celular**

222 Segundo Tampion e Tampion (1987) o movimento não independente de
223 células ou enzimas na parte aquosa de um sistema, estando localizadas dentro ou
224 na superfície do agente imobilizador pode ser definido como imobilização, desde
225 que não interfira negativamente em sua atividade catalítica. Esse processo permite
226 um aumento de estabilidade, pois as células tornam-se mais resistentes a condições
227 adversas, uma vez que a matriz geralmente protege a mesma, e reaproveitamento
228 do material biológico, devido às elevadas densidades celulares obtidas
229 normalmente.

230 A classificação das técnicas de imobilização celular pode ser dividida em
231 quatro grupos, sendo esses: a imobilização na superfície de suportes sintéticos ou
232 naturais - sólidos, o aprisionamento em matriz porosa, a floculação, podendo ser
233 esta natural através da auto-agregação ou artificial através da adição de um agente
234 ligante e por fim a encapsulação, sendo representadas na Figura 1 (PILKINGTON;
235 MARGARITS; MENSOUR, 1998).



236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251

Figura 1. Métodos de imobilização celular: a) imobilização em superfície; b) aprisionamento em matriz porosa; c) floculação natural (auto-agregação) e floculação artificial; d) encapsulação. Fonte adaptada: PILKINGTON; MARGARITS; MENSOUR (1998)

3.4.1 Imobilização de células microbianas por adsorção em suportes sólidos

As primeiras pesquisas acerca do processo de imobilização de células microbianas surgiram a partir das observações da habilidade de alguns microorganismos se fixarem naturalmente em superfícies de diferentes ambientes. A formação de biofilmes em superfícies é uma estratégia da maioria das bactérias, utilizada para sobrevivência e pode ocorrer naturalmente (JUNTER; JOUENNE, 2004).

Os biofilmes residem em uma matriz feita essencialmente de polissacarídeos contendo também DNA e proteínas. Caracterizado como um polímero complexo, esse abriga em si, uma quantidade de água que corresponde a várias vezes o seu peso seco (TORTORA, 2012).

252 Sua formação inicia-se quando uma bactéria livre (planctônica) se fixa a uma
253 superfície, parâmetro esse influenciado pela presença de flagelos, fímbrias, pili,
254 adesinas, lipopolissacarídeos e cápsulas (MITTELMAN, 1998). Embora o processo
255 de fixação inicial necessite de uma maior elucidação, alguns fatores que influenciam
256 nesse processo já são descritos como pH, concentração e biodisponibilidade de
257 nutrientes, autoindutores de *quorum sensig* e temperatura (OULAHAL et al., 2008).
258 Tal ligação caracterizada como reversível ocorre através da interação inicial fraca do
259 micro-organismo com o substrato, que envolve forças de atração de Van der Waals,
260 forças eletroestáticas e interações hidrofóbicas (WATNICK; KOLTER, 2000). Após,
261 acontece a adesão irreversível resultante do ancoramento de apêndice (pili,
262 flagelos, adesinas) e/ou produção de substâncias poliméricas extracelulares,
263 fazendo com que as ligações entre células e superfície se fortaleçam, devido as
264 interações dipolo-dipolo, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações
265 covalentes e iônicas (CHRISTENSEN; CHARACKLIS, 1990).

266 A multiplicação dos micro-organismos presentes na estrutura do biofilme
267 resulta na formação de microcolônias envoltas em uma matriz polimérica
268 extracelular (EPS) (MALONE; CALDWELL, 1983). A maturação do processo ocorre
269 de três a seis dias após a adesão inicial e pode se estender em até dez dias
270 (HEYDORN et al., 2000), devido ao aumento da densidade populacional e
271 pronunciada produção de EPS (CHENG et al, 2007). Após atingir certa massa
272 denominada de crítica, os micro-organismos viáveis aderidos à superfície se
273 desprendem esse fenômeno é denominado como biotransferência (VERRAN, 2002).

274 O método da adsorção é utilizado por sua simplicidade, baixo custo, fácil
275 manipulação e grande diversidade de suportes. No decorrer do processo ocorre um
276 potencial equilíbrio entre células adsorvidas e livres, dependente do crescimento
277 microbiano e da densidade de células ligadas a matriz. Uma das grandes vantagens
278 da imobilização celular é que essa permite a produção contínua de enzimas por um
279 longo período de tempo, diferentemente da utilização de células livres que possuem
280 um pico de atividade enzimática (DOMÍNGUEZ; COUTO; SANROMÁN, 2001).

281

282 **3.4.2 Encapsulação e aprisionamento (*entrapetman*) de células microbianas** 283 **em matrizes**

284 O método de aprisionamento é baseado na inserção de células, de maneira
285 artificial, em uma malha rígida, ou semirrígida, que impede a difusão destas para o

286 meio, possibilitando a transferência de nutrientes, metabólitos, gases, durante o
287 processo fermentativo (CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-GALLOT, 1994;
288 KRISHNAN et al., 2001).

289 O mecanismo utilizado no aprisionamento se dá através da mistura de células
290 microbianas com compostos poliméricos que apresentem cargas negativas. O
291 conjunto é aplicado na forma de gotas sobre uma solução contendo íons Ca^{2+} , que
292 promove a formação de ligações iônicas produzindo um gel consistente e insolúvel.
293 Já no processo de encapsulação, ocorre o inverso, as células microbianas são
294 adicionadas em uma solução de cloreto de cálcio, e a mistura é aplicada na forma
295 de gotas na solução polimérica (WANG et al., 2005). A diferença entre esses
296 métodos é que na encapsulação as células ficam envoltas por uma membrana e no
297 aprisionamento há uma malha entre as células (CHAMPAGNE; LACROIX; SODINI-
298 GALLOT, 1994; KRISHNAN et al., 2001).

299 A multiplicação celular tanto da imobilização por aprisionamento quanto por
300 encapsulação é dependente de fatores como acúmulo de biomassa no interior da
301 matriz e porosidade do material em que a célula está inserida (PARASCANDOLA;
302 BRANDUARDI; ALTERIIS, 2006). É importante ressaltar a limitação da transferência
303 de massa imposta pelo processo, quando em géis (OGBONNA; MASHIMA;
304 TANAKA, 2000). Um agravante em relação ao processo é a distribuição de oxigênio,
305 pois uma aeração não uniforme pode ocasionar migração das células da superfície
306 do gel para o meio externo com consequente rompimento da matriz (SERP et al.,
307 2000). O aprisionamento em géis tem sido utilizado, ao longo de anos, em
308 processos fermentativos envolvendo bactérias, para produção de ácido láctico (YOO
309 et al., 1996) e fungos para produção de carotenoides (GARBAYO et al., 2003).

310

311 **3.4.3 Imobilização natural de células microbianas (auto-imobilização)**

312 A auto-imobilização é considerada a formação de agregados celulares,
313 influenciada diretamente por variações físico-químicas que afetam o metabolismo
314 dos micro-organismos e a produção de metabólitos (ZINDARSIC; PAVKO, 2001;
315 FENG et al., 2003).

316 Em certos casos, o estado morfológico dos agregados celulares é
317 determinante na produção do metabólito de interesse e, pode afetar diretamente a
318 reologia do meio de cultivo (NIELSEN et al., 1995).

319 A formação de *pellet* dos agregados é desejada muitas vezes no processo,
320 para facilitar a separação sólido/líquido, podendo ocorrer naturalmente ao ser
321 induzida por parâmetros como concentração celular, temperatura e disponibilidade
322 de nitrogênio (NIELSEN et al., 1995; FUJITA et al., 2000).

323

324 **3.4.4 Floculação e contenção de células microbianas em membranas**

325 A imobilização através da floculação consiste na formação de agregados
326 celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural
327 ou artificial. É considerada uma técnica promissora quando utilizada em larga escala
328 nos reatores de leito fixo e fluidizado ou tanques com agitação, que possui ainda a
329 facilidade da remoção de células. (FREEMAN; LILLY, 1998).

330 O método de imobilização entre membranas é baseado no aprisionamento do
331 micro-organismo entre duas membranas permeáveis, podendo ocorrer essa em
332 microcápsulas, contenção em membranas filtrantes ou ainda interação das mesmas
333 na superfície de um dos líquidos não-miscíveis, porém essa tecnologia é mais
334 empregada em fermentações que requerem a reciclagem de células, como as
335 fermentações contínuas (KARGUPTA; DATTA; SANYAL, 1998). A desvantagem
336 imposta por esse método seria a limitação da transferência de massa, pois a
337 membrana dificulta a passagem de fluídos. (LEBEAU; JOUENNE; JUNTER, 1998).

338 Inúmeras pesquisas em relação ao suporte para micro-organismos como
339 bactérias ácido lácticas, evidenciando as que possuem potencial probiótico, vem
340 sendo realizadas ao longo dos anos com intuito de manter a viabilidade celular
341 quando submetidas a processos industriais, o emprego de materiais como pedaços
342 de frutas (KOURKOUTAS et al., 2001), bagaço de cana de açúcar (DOMÍNGUEZ;
343 COUTO; SANROMÁN, 2001), *whey protein* (SIDIRA et al., 2017), grãos (ALMEIDA
344 et al, 2003; BOSNEA et al., 2009) entre outros, tem-se mostrado boas alternativas.

345 A soja (*Glycine max* (L) Merrill), grão pertencente à família Fabaceae, é
346 qualificada como planta herbácea possuindo entre 60 e 130 cm de altura, folhas
347 ásperas, flores violáceas e frutos em vagem contendo de dois a cinco grãos.

348 No que se refere à sua produção no mundo nos anos de 2015 e 2016,
349 segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (BRASIL, 2016), o Brasil
350 ocupa a segunda posição de maior produtor mundial do grão, atrás somente dos
351 Estados Unidos, sendo o estado do Rio Grande do Sul o terceiro maior, dentro do
352 país, produtor responsável por gerar 16,2 milhões de tonelada.

353 Devido suas características, a soja pode ser utilizada tanto na área
354 agroindustrial como nas áreas químicas e petroquímicas. Extremamente versátil, por
355 suas características, o grão de soja é utilizado na indústria de alimentos para dar
356 origem a produtos e subprodutos (ZIEGLER, 2014).

357 **Tabela 2.** Composição físico-química média dos grãos de soja
358

Composição físico-química	
Proteínas	40%
Carboidratos	34%
Lipídeos	20%
Minerais	5%

359 (BRASIL, 2016)

360

361 A soja possui ainda uma diversidade de compostos bioativos e antioxidantes,
362 como isoflavonas, tocoferóis, compostos fenólicos simples e ligados, peptídeos de
363 soja, lecitinas que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais
364 mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (JUN,
365 KIM, SUNG, 2002; LEE et al., 2005; TRIPATHI e MISRA, 2005; KUMAR, et al.,
366 2009).

367 Com a expansão do mercado de produtos naturais a soja vem ganhando
368 espaço, principalmente entre consumidores veganos, vegetarianos e portadores da
369 doença celíaca. A ausência de glúten e o alto teor de proteínas (contendo
370 aminoácidos essenciais e não essenciais) torna esse grão uma ótima alternativa
371 para suprir as necessidades desse nutriente (SCHERER; HERZOG, 2016).
372 Encontram-se no mercado brasileiro produtos derivados da soja ou com adição de
373 soja na formulação, como extrato de soja (original ou com suco de frutas), alimentos
374 com soja sabor iogurte (cremoso ou líquido), sobremesas, achocolatados e
375 embutidos cárneos (hambúrguer, linguiças).

376 Devido suas características físico-químicas, o grão de soja, representa uma
377 alternativa de suporte para imobilização de micro-organismos, visto que nos últimos
378 anos materiais alternativos vêm sendo empregados como suporte a fim de reduzir
379 custos e agregar valor ao alimento que será aplicado. Ressaltando que não há
380 pesquisas sobre o uso da soja como suporte sólido para imobilização de bactérias
381 potencialmente probióticas. O uso de pedaços de maçã para imobilizar
382 *Saccharomyces cerevisiae*, em processos de vinificação, conferindo aroma e sabor
383 dos vinhos (KOURKOUTAS et al., 2001), o uso de grãos de cevada como suporte

384 na produção de pectinases por *Kluyveromyces marxianus* (ALMEIDA et al., 2003), o
385 uso de grãos de trigo como suporte para *Lactobacillus casei* e sua aplicação em
386 embutidos fermentados (SIDIRA et. al., 2014), são algumas alternativas.

387

388

389

390

391 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

392

393 ALMEIDA, C.; BRANYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous
394 production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. **Journal of**
395 **Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 513-518, 2003.

396

397

398 AUDISIO, M. C.; OLIVER, G.; APELLA, M. C. Protective effect of *Enterococcus*
399 *faecium* J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with *Salmonella pullorum*.
400 **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 10, p. 1333-1337, 2000.

401

402

403 BOSNEA, L.; KOURKOUTAS, Y.; ALBANTAKI, N.; TZIA, C.; KOUTINAS, A. A.;
404 KANELLAKI, M. Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat
405 grains. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 1696-1702, 2009.

406

407

408 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril
409 de 1999. Diretrizes Básicas Para Análise E Comprovação De Propriedades
410 Funcionais E Ou De Saúde Alegadas Em Rotulagem De Alimentos. **Diário Oficial**
411 **da União**, Poder Executivo, de 30 de abril de 1999.

412

413

414 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 2, de 7 de janeiro
415 de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos
416 Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da**
417 **União**, Poder Executivo, de 9 de janeiro de 2002.

418

419

420 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Alimentos com
421 Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/
422 Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **Diário Oficial da União**; Poder
423 Executivo, julho de 2008.

424

425

426 BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. (2016) Soja
427 em números (safra 2015/ 2016). Disponível em: <
428 <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> Acesso em: 12 dez
429 2016.

430

431

432 CASTRO, A. L. M.; CAMPOS, W. E.; MANCIO A. B.; PEREIRA, J. C.; CECON, P. R.
433 Desempenho e rendimento de carcaça de bezerros alimentados com colostro
434 fermentado, associado ao óleo de soja e zeranol. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
435 **Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p.193-201, 2004.

436

437

438 CHAMPAGNE, C. P.; LACROIX, C.; SODINI -GALLOT, I. Immobilized cell
439 technologies for the dairy industry - Critical Reviews. **Biotechnology**, v. 14, n. 2, p.
440 109-134, 1994.
441
442
443 CHENG G.; ZHANG Z.; CHEN S.; BRYERS J. D.; JIANG S. Inhibition of bacterial
444 adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, n. 29,
445 p. 4192-4199, 2007.
446
447
448 CHRISTENSEN B.E.; CHARACKLIS W.G. Physical and chemical properties of
449 biofilms. In: Characklis WG, Marshall KC. Biofilms. New York: John Wiley and Sons,
450 1990. p. 93-130.
451
452
453 COPPOLA, M. M.; TURNER, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.
454 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.
455
456
457 CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic
458 lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS**
459 **Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.
460
461
462 DALL´AGNOL, A.; ROESSING, A. C.; LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H.;
463 OLIVEIRA, A.B. **O complexo agroindustrial da soja brasileira**. (Circular Técnica).
464 Londrina, 2007. 12 p.
465
466
467 DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.;
468 SCHREZENMEIR, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American**
469 **Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p.421S-429S, 2001.
470
471
472 DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. Amelioration of ligninolytic
473 enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors.
474 **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 6, p. 451-455, 2001.
475
476
477 FENG, K-C.; ROU, T-M.; LIU, B-L.; TZENG, Y-M.; CHANG, Y-N. Effect of fungal
478 pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*.
479 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 22-25, 2003.
480
481
482 FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and
483 feeding value of surplus colostrums: a revive. **Journal of Dairy Science**, v. 61,
484 p.1033-1060, 1978.
485
486

487 Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization
488 – FAO/ WHO. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food
489 including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001, p. 34. Disponível
490 em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf> Acesso em: 12 dez 2016.
491
492
493 FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and
494 operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial
495 Technology**, v. 23, n. 5, p. 335-345, 1998.
496
497
498 FUGELSANG, Kenneth; EDWARDS, Charles G. **Wine microbiology: practical
499 applications and procedures**. 2.ed. Nova Iorque: Springer, 2007, 394p.
500
501
502 FUJITA, M.; ERA, A.; IKE, M.; SODA, S.; MIYATA, N.; HIRAO, T. Decolorization of
503 heat-treatment liquor of waste sludge by a bioreactor using polyurethane foam-
504 immobilized white rot fungus equipped with an ultramembrane filtration unit. **Journal
505 of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 387-394, 2000.
506
507
508 FULLER, R. Probiotics in man and animals – A Review. **Journal of Applied
509 Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.
510
511
512 GARBAYO, I.; VILCHEZ, C.; NAVA-SAUCEDO, J. E.; BARBOTIN, J. N. Nitrogen,
513 carbon and light-mediated regulation studies of carotenoid biosynthesis in
514 immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.
515 33, n. 5, p. 629-634, 2003.
516
517
518 GODDEN, S. Microbial risks associated with feeding colostrum to calves. **Annu Mtg
519 Southwest Nutrition and Management Conference**, p.26-27, 2009.
520
521
522 GODWIN C. How to Make Beestings Pudding (2011). Disponível em
523 <http://www.ehow.com/how_6167575_make-beestings-pudding.html> Acesso em 12
524 dez 2016.
525
526
527 GONZALEZ, M. I; GARCIA, C.; LÓPEZ, A. Disponibilidad de excedentes colostrales
528 600 provenientes de vacas *Holstein friesian*. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.
529 10, 601 n. 1, p. 69-70, 1978.
530
531
532 HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD,
533 B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. Amsterdam: Elsevier Applied
534 Science, 1992. p.151-170.
535
536

537 HEYDORN A.; NIELSEN A.T.; HENTZER M.; STERNBERG C.; GIVSKOV M.;
538 ERSBØLL B. K.; MOLIN, S. Quantification of biofilm structures by the novel
539 computer program COMSTAT. **Microbiology**, v. 146, n.10, p. 2395-2407, 2000.
540
541
542 INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; MENDES-FAIA, A. Revisão: As bactérias
543 do ácido láctico do vinho – Parte I. **Ciência Técnica Vitivinícola**, v.23, p.81-96,
544 2008.
545
546
547 JIN, L. Z.; MARQUARDT, R. R.; BAIDOO, S. K. Inhibition of enterotoxigenic
548 *Escherichia coli* K88, K99 and 987P by the *Lactobacillus* isolates from porcine
549 intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 5, p. 619-624,
550 2000.
551
552
553 JUN, H. S.; KIM, S. E.; SUNG, M. K. Protective effect of soybean saponins and
554 major antioxidants against aflatoxins B1-induced mutagenicity and DNA adduct
555 formulation. **Journal of Medicinal Foods**. v. 5, n. 4, p. 235–244, 2002.
556
557
558 JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process
559 to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, v.
560 22, n. 8, p. 633-658, 2004.
561
562
563 KALAFAT Y. Iranian Turkish Folk Cuisine (2011). Disponível em <[http://www.turkish-](http://www.turkish-cuisine.org/english/pages.php?ParentID=3&FirstLevel=28&)
564 [cuisine.org/english/pages.php?ParentID=3&FirstLevel=28&](http://www.turkish-cuisine.org/english/pages.php?ParentID=3&FirstLevel=28&)> Acesso em 12 dez
565 2016.
566
567
568 KARGUPTA, K.; DATTA, S.; SANYAL, S. K. Analysis of the performance of a
569 continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation.
570 **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, n. 1, p. 31-37, 1998.
571
572
573 KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus*
574 *casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. **International**
575 **Journal of Immunopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 29-36, 1994.
576
577
578 KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing
579 macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus*
580 *casei* in mice. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 26, n. 3, p. 215-221, 1988.
581
582
583 KEHOE S. I.; JAYARAO B. M.; HEINRICHS A. J. A Survey of Bovine Colostrum
584 Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms.
585 **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 9, p. 4108–4116, 2007.
586

587
588 KLOBASA, F.; GOEL, M. C.; WERHAHN, E. Comparison of freezing and lyophilizing
589 for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. **Journal of**
590 **Animal Science**, v. 76, p. 923-926, 1998.
591
592
593 KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Wine
594 production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures.
595 **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n. 3, p. 1417-1425, 2001.
596
597
598 KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyo*) as growth promotor for animal
599 feeding. **Microbiology Aliments Nutrition**, n. 4, p. 121-135, 1986.
600
601
602 KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G.
603 Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim 2084*
604 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. **Food**
605 **Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 193-202, 2001.
606
607
608 KUMAR, V.; RANI, A.; DIXIT, A.; BHATNAGAR, D.; CHAUHAN, G. S. Relative
609 changes in tocopherols, isoflavones and antioxidative properties of soybean during
610 different reproductive stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57,
611 p. 2705–2710, 2009.
612
613
614 LANUZA, F.; BUTENDIECK, N.; GONZÁLES, F.; STEHR, G.; GARCIA, F. Y
615 HELLBERG, I. Variaciones en la composición química y microbiana del calostro
616 acidificado a distintas temperaturas. In: REUNIÓN ANUAL DE LA SOCIEDAD
617 CHILENA DE PRODUCCIÓN ANIMAL, IV, 1980, Valparaíso, Chile. **Anais IV**
618 **Reunión anual de la Sociedad Chilena de Producción animal**, Valparaíso, Chile:
619 Sociedad Chilena de Producción animal, 1980. p.45.
620
621
622 LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Continuous alcoholic fermentation of
623 glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida*
624 *shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 309-313, 1998.
625
626
627 LEBLANC, A.; PERDIGON, G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase
628 activity by yoghurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, v. 29, n. 1, p. 15-24,
629 2005.
630
631
632 LEE, C. H.; YANG, L.; XU, J. Z. X.; YEUNG, S. Y. V.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Y.
633 Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides. **Food**
634 **Chemistry**. v. 90, n. 4, p. 735–741, 2005.
635
636

637 LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by
638 Microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747-748, 1965.
639
640
641 LOURENÇO, M. C.; KURITZA, L. N.; WESTPHAL, P.; MIGLINO, L. B.; PICKLER, L.
642 KRAIESKI, A. L.; SANTIN, E. Uso de probiótico sobre a ativação de células T e
643 controle de *Salmonella* Minnesota em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária**
644 **Brasileira**, v. 33, n. 1, p. 11-14, 2013.
645
646
647 MALONE J. A.; CALDWELL D. E. Evaluation of surface colonization kinetics in
648 continuous culture. **Microbial Ecology**, v. 9, n. 4, p. 299-305, 1983.
649
650
651 MATSUZAKI, T.; SHIMIZU, Y.; YOKOKURA, T. Augmentation of antimetastatic
652 effect on Lewis lung carcinoma (3LL) in C57BL/6 mice by priming with *Lactobacillus*
653 *casei*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 179, n. 3, p. 161-168, 1990.
654
655
656 MATSUZAKI, T.; YOKOKURA, T. Inhibition of tumor metastasis of Lewis lung
657 carcinoma in C57BL/6 mice by intrapleural administration of *Lactobacillus*
658 *casei*. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 25, n. 2, p. 100-104, 1987.
659
660
661 MITTELMAN M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in
662 fluid processing operations. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 10, p. 2760-2764,
663 1998.
664
665
666 MOHANIA, D.; NAGPAL, R.; KUMAR, M.; BHARDWAJ, A.; YADAV, M.; JAIN, S.;
667 MAROTTA, F.; SINGH, V.; PARKASH, O.; YADAV, H. Molecular approaches for
668 identification and characterization of lactic acid bacteria. **Journal of Digestive**
669 **Diseases**, v. 9, n. 4, p. 190-198, 2008.
670
671
672 NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid
673 bacteria (LAB) - Critical Reviews. **Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 1, p. 13-
674 126, 1999.
675
676
677 NIELSEN, J.; JOHANSEN, C. L.; JACOBSEN, M.; KRABBEN, P.; VILLADSEN, J.
678 Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium*
679 *chrysogenum* and its relation to penicillin production. **Biotechnology Progress**, v.
680 11, n. 1, p. 93-98, 1995.
681
682
683 OGAWA, M.; SCHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R. HAMABATA, T.;
684 YAMASAKI, S. TAKEDA, Y.. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-
685 producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to

686 production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1-2,
687 p.135-140, 2001.

688

689

690 OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production
691 from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource**
692 **Technology**, v. 76, n. 1, p. 1-8, 2000.

693

694

695 OULAHAL N.; BRICE W.; MARTIAL A.; DEGRAEVE P. Quantitative analysis of
696 survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces:
697 polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food**
698 **Control**, v. 19, n. 2, p. 178-185, 2008.

699

700

701 OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics:
702 mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, n.1, p.43-52,
703 1999.

704

705

706 PARASCANDOLA, P.; BRANDUARDI, P.; ALTERIIS, E. D. PVA-gel (Lentikats®) as
707 an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein
708 production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 184-189, 2006.

709

710

711 PARKER, R. B. Probiotics: the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition**
712 **and Health**, v. 29, p. 4-8, 1974.

713

714

715 PEREIRA, C. C.; VITOLA, H. R. S.; SOUZA, A. O.; MEDINA, A. L.; GULARTE, M.
716 A.; RIBEIRO, A. S. Decomposition method in semi-closed system with cold finger for
717 evaluation of Ca, K, Na, Mg, Zn and Fe in colostrum silage by F AAS and F AES.
718 **Microchemical Journal**, v. 129, p. 293-296, 2016.

719

720

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

724

725

726 RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice & Research Clinical**
727 **Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

728

729

730 RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; AUDÍ. C.; CASTELL, M.;
731 MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; CASTELLOTE. C.; FRANCH, A.
732 Effects of cooling and freezing storage on the stability of bioactive factors in human
733 colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2319-25, 2012.

734

735

736 RIVAS, M. B. **Soja: Qualidade de Vida e Saúde com Prazer e Sabor**. Porto
737 Alegre: AGE LTDA, 2006. 172p.
738
739
740 RODRIGUES, A. C.; NARDI, R. M.; BAMBIRRA, E. A.; VIEIRA, E. C. NICOLI, J. R.
741 Effect of *Saccharomyces boulardii* against experimental oral infection with
742 *Salmonella* Typhimurium and *Shigella flexneri* in conventional and gnotobiotic mice.
743 **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 3, p. 251-256, 1996.
744
745
746 SAALFELD, M. H.; PEREIRA, D. I.B.; SILVEIRA, K. R. K.; SCHRAMM, R.;
747 VALENTE, J. S. S.; BORACHARDT, J. L.; GULARTE, M. A; LEITE, F. P. L.
748 Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**,
749 v. 43, n. 9, p.1636-1641, 2013.
750
751
752 SALMINEN, Seppo; VON WRIGHT, Atte; OUWEHAND, Arthur. **Lactic acid**
753 **bacteria: microbiological and functional aspects**. 3.ed. Nova Iorque: Marcel
754 Dekker, 2004. 633p.
755
756
757 SANTOS, V.; OLIVEIRA, M. Deputado e veterinária defendem uso do colostro
758 bovino na alimentação humana. Disponível em: <
759 [http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/SAUDE/515188-DEPUTADO-E-](http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/SAUDE/515188-DEPUTADO-E-VETERINARIA-DEFENDEM-USO-DO-COLOSTRO-BOVINO-NA-ALIMENTACAO-HUMANA.html)
760 [VETERINARIA-DEFENDEM-USO-DO-COLOSTRO-BOVINO-NA-ALIMENTACAO-](http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/SAUDE/515188-DEPUTADO-E-VETERINARIA-DEFENDEM-USO-DO-COLOSTRO-BOVINO-NA-ALIMENTACAO-HUMANA.html)
761 [HUMANA.html](http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/SAUDE/515188-DEPUTADO-E-VETERINARIA-DEFENDEM-USO-DO-COLOSTRO-BOVINO-NA-ALIMENTACAO-HUMANA.html)> Acesso em: 12 dez 2016.
762
763
764 SCHERER, A.; HERZOG, A. L. Brasil é o quarto maior mercado para produtos
765 saudáveis. Revista Exame. Disponível em: < [http://exame.abril.com.br/revista-](http://exame.abril.com.br/revista-exame/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-para-produtos-saudaveis/)
766 [exame/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-para-produtos-saudaveis/](http://exame.abril.com.br/revista-exame/brasil-e-o-quarto-maior-mercado-para-produtos-saudaveis/)> Acesso em: 12
767 dez 2016.
768
769
770 SERP, D.; CANTANA, E.; HEINZEN, C.; VONSTOCKAR, U.; MARISON, I. W.
771 Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse
772 alginate beads for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 70, n.
773 1, p. 41-53, 2000.
774
775
776 SIDIRA, M.; KARAPETSAS, A.; GALANIS, A.; KANELAKI, M. KOURKOUTAS, Y.
777 Effective survival of immobilized *Lactobacillus casei* during ripening and heat
778 treatment of probiotic dry-fermented sausages and investigation of the microbial
779 dynamics. *Meat Science*, v. 96, n. 2, p. 948-955, 2014.
780
781
782 SIDIRA, M.; SANTARMAKI, V.; KIOURTZIDIS, M.; ARGYRI, A. A.;
783 PAPAPOPOULOU, O. S.; CHORIANOPOULOS, N.; TASSOU, C.; KALOUTSA, S.;
784 GALANIS, A.; KOURKOUTAS, Y. Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum*

785 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production. **LWT- Food**
786 **Science and Technology**, v. 75, p. 137-146, 2017.
787
788
789 SOUZA, G.; VALLE, J. L. E; MORENO, I. Efeitos dos compostos da soja e seus
790 derivados na alimentação humana. **Boletim da sociedade Brasileira de Ciências**
791 **e Tecnologia de Alimentos**. Campinas. v. 34, n. 2, p. 61-69, 2000.
792
793
794 SZAJEWSKA, H.; SETTY, M.; MRUKOWICZ, J.; GUANDALINI, S. Probiotics in
795 gastrointestinal diseases in children: hard and not-so0hard evidence of efficacy.
796 **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 454-475,
797 2006.
798
799
800 TAMPION, J.; TAMPION, M. D. **Immobilized Cells: Principles and Applications**.
801 5.ed. Cambridge University Press, 1987. 264p.
802
803 TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10.
804 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934p.
805
806
807 TRIPATHI, A. K.; MISRA, A. K. Soybean: A consummate functional food. **Journal of**
808 **Food Science and Technology**. v. 2, p. 42-46, 2005.
809
810
811 VERRAN J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? **Food and**
812 **Bioproducts Processing**, v. 80, n. 4, p. 292-298, 2002.
813
814
815 VILLANI, F.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; SALZANO, G. MOSCHETTI, G.;
816 COPPOLA, S. Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by
817 *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, n.
818 2, p. 179-190, 1995.
819
820
821 WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to
822 improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations.
823 **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.
824
825
826 WATNICK P.; KOLTER R. Minireview: biofilm, city of microbes. **Journal of**
827 **Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.
828
829
830 YOO, I-K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of
831 *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production.
832 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 5, p. 428-433, 1996.
833
834

835 ZIEGLER, V. **Efeitos da umidade e da temperatura de armazenamento sobre**
836 **parâmetros de avaliação da qualidade dos grãos, do óleo e de compostos**
837 **bioativos de soja**. 2014.110f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
838 Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade
839 Federal de Pelotas, Pelotas.

840

841

842 ZINDARSIC, P.; PAVKO, A. The morphology of filamentous fungi in submerged
843 cultivations as a bioprocess parameter. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, n.
844 3, p. 237-252, 2001.

845

4 CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO – Potencial probiótico de *Lactobacillus casei* SCL3 e imobilização em grãos de soja

Helena Reissig Soares Vitola¹, Guilherme da Silva Dannenberg¹, Juliana de Lima Marques², Graciela Völz Lopes¹, Wladimir Padilha da Silva¹, Ângela Maria Fiorentini¹

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil;

¹ Autor correspondente

Ângela Maria Fiorentini
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Telefone: 55 (53) 991387367
e-mail: angefiore@gmail.com

(Artigo submetido para o periódico LWT- Food Science and Technology).

Resumo

Objetivou-se no presente estudo isolar, caracterizar bactérias ácido lácticas com potencial probiótico e imobilizar em grãos de soja, a fim de manter sua viabilidade durante o armazenamento. Foram realizados testes para isolamento e identificação dos isolados a partir de silagem de colostro bovino, avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica (atividade das enzimas, hemolisina, DNase e gelatinase, susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico e perfil plasmidial), avaliação do potencial probiótico (simulação da tolerância ao trânsito gastrointestinal, capacidade de auto-agregação co-agregação, hidrofobicidade, atividade da enzima β -galactosidase e atividade antagonista), avaliação da produção de exopolissacarídeos, identificação molecular, imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja e microscopia eletrônica de varredura do biocatalizador. Dos isolados caracterizados como bactérias ácido lácticas, três, apresentavam-se seguros microbiologicamente e um isolado (SCL3) apresentou-se potencialmente probiótico. A bactéria selecionada para imobilização, *Lactobacillus casei* SCL3, produtora de exopolissacarídeo, passou por processo fermentativo que permitiu a adsorção de células na superfície dos grãos de soja. A imobilização possibilitou a viabilidade das células de *L. casei* SCL3 em concentração de $6,23 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e $6,71 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ até o final do 30^o dia de armazenamento após secagem (liofilização) e em refrigeração, respectivamente. Através microscopia eletrônica de varredura foi possível visualizar as células aderidas à superfície dos grãos de soja.

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus casei*; biocatalizador; probiótico, viabilidade celular.

31 1. Introdução

32 Desde os primórdios do século 21, a sociedade vem testemunhando um
33 constante aumento na expectativa de vida, resultado de uma maior atenção com
34 qualidade da mesma, por parte da população (Szakály, Szente, Kövér, Polereczki, &
35 Szigeti, 2012). Os consumidores estão cada vez mais preocupados com seus
36 hábitos alimentares, o que explica o aumento na procura por alimentos que
37 influenciam de forma benéfica sua saúde, como os que alegam propriedades
38 funcionais (Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008). A Ciência Funcional dos
39 Alimentos na Europa (FUFOSE) define alimentos funcionais como aqueles que
40 demonstram satisfatoriamente afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no
41 organismo, para além de seus efeitos nutricionais adequados, melhorar o estado de
42 saúde e bem-estar e/ ou reduzir do risco de doença (Europe, 1998).

43 Dentre as categorias de alimentos com propriedades funcionais têm-se os
44 probióticos - micro-organismos viáveis que oferecem benefícios à saúde do
45 hospedeiro, quando ingeridos em concentrações adequadas. Diversas bactérias e
46 leveduras estudadas por possuírem potencial probiótico. As bactérias ácido lácticas
47 (BAL), normalmente, associadas a produtos fermentados, são caracterizadas como
48 Gram-positiva, catalase negativa, não formadoras de esporos e fermentadoras de
49 açúcares com produção de ácido lático e/ou outros metabólitos, destacam-se
50 também pelas características probióticas que algumas linhagens possuem (Ozyurt &
51 Ötles, 2014; Zago et al., 2011).

52 Para serem consideradas potencialmente probióticas, as BAL devem atender
53 uma série de requisitos como permanecerem viáveis após a passagem pelo trato
54 gastrointestinal ($10^6 - 10^7$ UFC.mL⁻¹) (WHO/FAO, 2001), possuírem capacidade de
55 auto-agregação, co-agregação, apresentarem atividade antagonista contra
56 patógenos, dentre outros (Sidira, Kandyliis, Kanellaki, & Kourkoutas, 2015).

57 A variável que desperta maior preocupação em relação à inserção de
58 probióticos em alimentos, é a perda da viabilidade celular após o processamento e o
59 armazenamento do mesmo. Para suprir essa deficiência, técnicas como a
60 imobilização celular são utilizadas para manter a atividade e funcionalidade do
61 micro-organismo (Sidira et al., 2015).

62 A imobilização celular consiste no aprisionamento das células em uma matriz
63 que protege os micro-organismos de fatores exógenos adversos. Existem diversos
64 tipos de imobilização celular como encapsulação, contenção em barreira, auto-

65 agregação ou através de adsorção em diferentes materiais. Nos últimos anos as
66 pesquisas têm como foco principal os suportes utilizados para as imobilizações, pois
67 a maneira como ocorre a interação como o material biológico é de suma importância
68 para o êxito do processo (Mitropoulou, Nedovic, Goyal, & Kourkoutas, 2013). O uso
69 de grãos e frutas como suporte, representa uma alternativa para imobilização de
70 bactérias probióticas devido suas características físico-químicas, pois a presença de
71 proteínas, carboidratos, lipídios e fibras auxiliam no desenvolvimento e preservação
72 dos micro-organismos (Bosnea et al., 2009, 2015; Kourkoutas et al., 2006).

73 Reconhecida por sua composição proteica de alto valor biológico, a soja, faz
74 parte de mais de 60% dos produtos pertencentes a indústria alimentícia por
75 possuírem algum de seus constituintes (Agnol & Roessing, 2007; Liu et al., 2008).
76 Fazem parte de sua composição físico-química proteínas, predominantemente
77 globulinas (Hou & Chang, 2004), lipídeos, em que se destaca dentre os demais
78 óleos pelo percentual de ácido graxos poli-insaturados (Fonseca & Gutierrez, 1974),
79 carboidratos, com maior percentual de sacarose (Greiner, 1990) e ainda compostos
80 bioativos e antioxidantes (Kumar, Rani, Dixit, Pratap, & Bhatnagar, 2010). Devido a
81 sua composição, e fácil obtenção, por ser o grão mais produzido no Brasil e no
82 mundo, a soja torna-se uma alternativa promissora para utilização como suporte na
83 imobilização de bactérias com potencial probiótico, visto que não há estudos, na
84 literatura, relatando esse grão como suporte.

85 Portanto, objetivou-se no presente estudo isolar, caracterizar e avaliar o
86 potencial probiótico de *Lactobacillus casei* SCL3, isolada de silagem de colostro
87 bovino bem como, imobilizar as células utilizando como suporte grãos de soja.

88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98

99 **2. Material e Métodos**

100

101 **2.1 Isolamento e caracterização de bactérias ácido lácticas**

102 Procedeu-se com o isolamento a partir de amostras de silagem de colostro
103 procedentes do Centro de Treinamento de Agricultores de Canguçu -RS (CETAC).
104 A fermentação da silagem ocorreu durante 21 dias e seu pH encontrava-se no valor
105 de 4,0.

106 Na sequência, realizaram-se diluições seriadas até a recíproca 10^{-10} com
107 posterior plaqueamento em ágar seletivo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)
108 (Merck, USA). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose pelo período de
109 48 horas a temperatura de 37 °C.

110 Foram selecionadas, aleatoriamente, 30 colônias, submetendo as mesmas
111 aos testes de coloração de Gram, presença ou ausência da enzima catalase, testes
112 tecnológicos (tolerância a pH 3,0 e 4,5, temperatura de 8 °C e 45°C, concentração
113 salina de 3% e 9% e perfil fermentativo), resistência a sais biliares (0,3% e 1%) e
114 fermentação de carboidratos (frutose, galactose, glicose, lactose, maltose e
115 manose) (Holt, 1994; Lima et al., 2009).

116

117 **2.2 Avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica**

118

119 **2.2.1 Atividade da enzima DNase**

120 A produção da enzima DNase foi determinada a partir da inoculação dos
121 isolados, previamente ativados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C para o ágar
122 DNase (Acumedia, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e para
123 leitura dos resultados utilizou-se solução de ácido clorídrico na concentração de 1
124 N. O aparecimento de zonas transparentes ao entorno dos isolados denotaria
125 resultado positivo para produção da enzima. Como controles positivo e negativo
126 foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Latobacillus sakei* subesp.
127 *sakei* ATCC 15521(Kateete et al., 2010).

128

129 **2.2.2 Atividade hemolítica**

130 A presença de hemolisinas foi determinada a partir do cultivo das bactérias
131 ácido lácticas em caldo MRS por 24 horas a 37 °C. Após a ativação em caldo, os
132 isolados foram transferidos para ágar Trypticase Soy (TSA) (Himedia, Índia)

133 suplementado, previamente, com 7% de sangue equino desfibrinado. Como
134 controle positivo utilizou-se *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Após a incubação
135 de 24 horas a 37 °C a reação hemolítica foi avaliada observando tanto a lise
136 parcial dos glóbulos vermelhos (α -hemólise), através do aparecimento de zonas
137 verdes ao entorno dos isolados bem como a lise total (β -hemólise), através do
138 aparecimento de zonas transparentes (Eaton & Gasson, 2001).

139

140 **2.2.3 Atividade da enzima gelatinase**

141 A atividade da enzima proteolítica foi determinada em meio de cultura
142 preparado com 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Os
143 isolados ativados em caldo MRS por 24 horas a 37 °C foram transferidos para o
144 meio contendo gelatina. Os tubos foram incubados a 30 °C por sete dias, ao final do
145 sétimo dia os mesmos foram mantidos sob refrigeração (8°C) por 30 minutos e, o
146 resultado observado a partir do estado físico do meio de cultivo. A transformação do
147 estado sólido para líquido do meio significaria um resultado positivo para atividade
148 da enzima. Como controles positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC
149 25923 e *Escherichia coli* ATCC 8739, respectivamente (Pereira et al., 2009).

150

151 **2.2.4 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico**

152 Procedeu-se o teste de susceptibilidade de acordo com Luiz et al. (2015). A
153 ativação dos isolados foi realizada em caldo MRS por 24 horas a 37 °C, com
154 posterior padronização da turbidez em solução salina 0,85% para a escala 0,5 de
155 McFarland, que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de
156 colônia por mililitros (UFC.mL⁻¹). Com auxílio de swab estéril os isolados foram
157 inoculados em placas de ágar Müller Hinton (MH) (Kasvi, Brasil) e, então, sobre as
158 mesmas foram aplicados os discos contendo antimicrobianos. Os antimicrobianos
159 selecionados para os testes, pertencentes a diferentes classes, foram:
160 ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg),
161 penicilina G (10 g), tetraciclina (30 g), vancomicina (30 µg) (Fraqueza, 2015) optou-
162 se por selecionar, também, a sulfanilamida (300 µg) por ser um antimicrobiano
163 frequentemente utilizado na medicina veterinária. As placas foram incubadas a 37
164 °C por 24 horas e os resultados dos halos de inibição lidos em milímetros (mm).
165 Utilizou-se como referência a tabela do CLSI de micro-organismos Gram-positivo

166 para avaliar os isolados resistente (R), intermediário (I) ou susceptível (S) (CLSI,
167 2015).

168

169 **2.2.5 Perfil plasmidial**

170 A extração para verificar presença ou ausência de plasmídeo foi realizada de
171 acordo com protocolo descrito no NucleoSpin © Tissue Kits (Macherey-Nagel,
172 Alemanha) e a leitura do resultado realizada através de eletroforese em gel de
173 agarose, sendo as condições utilizadas na corrida de 5µL de plasmídeo, 3µL de
174 GelRed™, 3µL de tampão de carga, 500 mA, 150W, 150 V com duração de 45
175 minutos.

176

177 **2.3 Avaliação do potencial probiótico**

178

179 **2.3.1 Simulação da tolerância ao trato gastrointestinal (TGI)**

180 A avaliação da tolerância foi realizada através do cultivo dos isolados em
181 caldo MRS incubado a 37°C por 24 horas. Após a ativação, o caldo foi centrifugado
182 a 6.800 g, por 10 minutos, a 4 °C e o *pellet* lavado duas vezes com solução salina
183 0,5% e ressuspensa em 1 mL da mesma. Misturou-se uma alíquota de 0,2 mL da
184 suspensão celular, 0,3mL de solução salina e 1,0mL de suco gástrico ou intestinal
185 artificial e incubou-se a 37 °C. A viabilidade celular foi verificada através da
186 inoculação de 20 µL das soluções gástricas contendo os isolados em placas de ágar
187 MRS nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos e intestinais apenas no
188 tempo de 240 minutos. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas em
189 anaerobiose.

190 O suco gástrico sintético foi constituído de solução salina (0,85%) e pepsina
191 (3 mg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich®) a pH 2,5 enquanto o suco intestinal sintético foi
192 composto por solução salina (0,85%) e pancreatina (1 mg.mL⁻¹) (Sigma-Aldrich®) a
193 pH 8,0, adicionados ou não de 0,5% de bile bovina (Sigma-Aldrich®).

194 A fim de verificar a possível influência do alimento sobre os isolados na
195 passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), substituiu-se a solução salina por 0,3mL
196 de leite desnatado esterilizado em ultra alta temperatura (UHT) (Elegê, Brasil)
197 (Huang & Adams, 2004).

198

199

2.3.2 Capacidade de Auto-agregação, Co-agregação e Hidrofobicidade

A fim de avaliar as capacidades de auto-agregação, suspensões celulares dos isolados ativados em caldo MRS a 37 °C por 24h foram preparadas com auxílio de tampão fosfato salino (PBS), com absorbância foi ajustada para $0,25 \pm 0,02$ (10^7 - 10^8 UFC.mL⁻¹) a 600nm. O teste de auto-agregação foi determinado a 20 e 37°C nos tempos de 2, 20 e 24 horas, onde mediu-se a absorbância a 600nm e os resultados foram expressos em percentual, conforme a equação $[1 - (A_{600nm}$ da suspensão final/ A_{600nm} da suspensão inicial) x 100].

Para determinar a capacidade de co-agregação dos isolados ao patógeno *E. coli* ATCC 8739, volumes iguais das suspensões celulares bacterianas foram misturados e incubados a 37 °C. A absorbância foi lida nos tempos de 2, 4 e 24 horas e os resultados expressos em percentual, conforme a equação $[(A_{pat} + A_{isol})/2 - (A_{mix}) / (A_{pat} + A_{isol})/2] \times 100$, onde A_{pat} e A_{isol} representam a absorbância das suspensões bacterianas dos isolados e do patógenos, enquanto A_{mix} representa a absorbância das suspensões celulares misturadas (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2008).

Para avaliar a adesão bacteriana ao xileno (hidrocarboneto) (Synth, Brasil) 3 mL da suspensão celular dos isolados foi agitada em vórtex por 60 segundos com 400µL de xileno, incubando-se por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, a fase aquosa foi removida e a absorbância medida a 600 nm. O resultado foi lido em percentual de adesão, conforme a equação $[(A_0 - A) / A] \times 100$, onde A_0 e A são as absorbâncias antes e depois da extração com xileno, respectivamente (Vinderola & Reinheimer, 2003).

2.3.3 Atividade da enzima β-galactosidase

A avaliação da atividade da enzima β-galactosidase foi determinada, a partir do cultivo dos isolados em caldo MRS suplementado com 1% de lactose (Synth, Brasil) incubados a 37 °C por 24 horas. Uma suspensão preparada com auxílio de PBS a uma absorbância de $1,0 \pm 0,02$ a 560 nm foi permeabilizada com 50 µL de solução tolueno: cetona (1:9 v/v) (Synth, Brasil), através de agitação por 7 minutos. Após, 100 µL da suspensão permeabilizada foi misturada em 900 µL de PBS e 200 µL de ortho-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside – ONPG, na concentração de 4 mg.mL⁻¹ (Sigma-Aldrich®). Manteve-se a mistura em banho-maria a 37 °C por 15

233 minutos, paralisando a reação através da adição de Na₂CO₃ na concentração de 1
234 mol. L⁻¹ (Vetec, Índia). A absorvância foi lida a 420 nm e 560 nm, sendo os
235 resultados expressos em unidades Miller, conforme a equação $1000 \times [(A_{420} - 1,75 \times$
236 $A_{256}) / (15 \text{ min} \times 1 \text{ mL} \times A_{1560})]$, onde A₁ representa a absorvância antes da reação
237 e A₂ após a reação (Vinderola & Reinheimer, 2003).

238

239 **2.3.4 Atividade antagonista contra patógenos**

240 Com intuito de verificar atividade antimicrobiana dos isolados contra
241 patógenos os mesmos foram cultivados em caldo MRS e incubados a 37 °C por 24
242 horas. Uma alíquota de 2 µL do cultivo foi inoculada em placas de MRS incubadas
243 em anaerobiose a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação as placas foram
244 recobertas com sobrecamada de ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Índia)
245 semi-sólido contendo 10⁵ UFC.mL⁻¹ de patógeno, incubou-se o conjunto a 37 °C por
246 24 horas. Os resultados foram visualizados através de zonas translúcidas ao
247 entorno do crescimento dos isolados de BAL, expressos em mm. As bactérias
248 patogênicas utilizadas na metodologia foram: Gram-positiva *L. monocytogenes*
249 ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 25923; Gram-negativa *E. coli* ATCC 8739 e
250 *Salmonella* Tiphymurium ATCC 14028 (Fleming, Etchells, & Costilow, 1975).

251

252 **2.4 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)**

253 A capacidade dos isolados em formar exopolissacarídeos, característica de
254 cepas formadoras de biofilme, foi verificada através do meio CRA (Congo Red Agar)
255 preparado com caldo BHI 37 g/L, sacarose 50 g/L, ágar (Oxoid, UK) 10 g/L e
256 indicador vermelho congo (Oxoid, UK) 8 g/L. Os isolados foram inoculados nas
257 placas de CRA e essas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Como controles
258 positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC
259 12228, respectivamente.

260 Para a leitura dos resultados, foram consideradas produtoras de EPS, as
261 colônias negras com uma consistência seca e cristalina (Freeman, Falkiner, &
262 Keane, 1989).

263

264 **2.5 Identificação molecular**

265 Para identificação de gênero e espécie, os isolados foram submetidos à
266 extração do DNA genômico de acordo com Green & Sambrook (2012). O

267 sequenciamento do material genético foi realizado na Unidade de Análises
268 Moleculares e de Proteínas (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil). Para o
269 estudo do fragmento sequenciado, foi utilizado o programa ContigExpress
270 (VectorNTI, Invitrogen) e, após a ferramenta BLAST do *National Center for*
271 *Biotechnology Information* (NCBI) para a comparação dos resultados com as demais
272 sequências depositadas no banco de dados.

273

274 **2.6 Imobilização celular**

275 Para a imobilização das células do isolado selecionado, através das
276 metodologias anteriores, realizou-se o cultivo em caldo MRS por 24 horas a 37 °C
277 sob agitação, essa operação foi repetida durante quatro dias. Após a ativação o
278 caldo foi centrifugado sob as condições de 4165 g, por 10 minutos a 20 °C, e o
279 *pellet* lavado com tampão fosfato-salino PBS.

280 Os grãos de soja (Sabor do grão, Brasil), utilizados como suporte, foram
281 deixados imersos em água destilada por seis horas, com posterior retirada das
282 cascas. A soja foi esterilizada a 121 °C por 15 minutos, em autoclave. O processo
283 de imobilização ocorreu através da mistura de 250 g de grãos de soja, 1 g de
284 células (peso molhado) e 500 mL de caldo MRS, deixando-se a mistura fermentar
285 por 48 horas a 37 °C, sem agitação. Após, realizou-se a contagem de células
286 viáveis em placas contendo ágar MRS, incubadas à 37°C, por 48 horas em
287 condições de anaerobiose, e na sequência separou-se o caldo do biocatalizador
288 (grãos de soja e células bacterianas). O mesmo foi lavado com PBS para completa
289 remoção das células não aderidas e então separado em duas porções para
290 armazenamento sob refrigeração (8 °C) e secagem por liofilização (Liotop, modelo
291 L101). A determinação da viabilidade celular foi realizada através das contagens do
292 biocatalizador armazenado em refrigeração nos períodos de 0, 10, 20 e 30 dias
293 após imobilização e do biocatalizador liofilizado no período de 0 e 30 dias após
294 imobilização (Bosnea et al., 2009).

295

296 **2.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

297 A visualização através de microscópio eletrônica de varredura foi realizada no
298 biocatalizador liofilizado, que passou por um processo de fixação em *stub* seguido
299 pela metalização com ouro. A leitura foi realizada em MEV (microscópio eletrônico

300 de varredura) JSM 6060, aparelho localizado no Centro de Microscopia e
301 Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

302

303 **2.8 Análise estatística**

304 Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo
305 teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *software* STATISTICA versão 6.1 (StatSoft,
306 França).

307

308 **3. Resultados e Discussão**

309

310 **3.1 Caracterização dos isolados de BAL**

311 Dos 30 isolados selecionados para identificação e caracterização, todos
312 apresentaram-se com morfologia de bacilos, Gram-positiva e catalase negativa. A
313 partir desses resultados os isolados SCL (silagem de colostros) numerados de 1 a
314 30 passaram pela avaliação de potencial tecnológico e fermentação de carboidratos.

315 Em relação ao potencial tecnológico apenas 16 isolados toleraram as
316 condições de pH 3,0, pH 4,5, temperatura de 8 °C, temperatura de 45 °C e
317 concentrações de 3% e 9% de sal. Para avaliação do perfil fermentativo dos
318 isolados, foi observado se haveria ou não produção de gás. Todos os 30 isolados
319 não sintetizaram gás, esta característica indica que os mesmos possuem um perfil
320 homofermentativo, ou seja, produzem apenas ácido lático a partir da fermentação
321 de carboidratos. A presença de bile, em sua menor concentração (0,3%), influenciou
322 sobre a seleção dos isolados para os próximos testes, pois apenas seis isolados
323 sobreviveram.

324 Pinto, Franz, Schillinger, & Holzapfel (2006) avaliaram o perfil fermentativo e
325 o crescimento de *Lactobacillus* a 15 e 45°C. Os autores observaram que nenhum
326 isolado produziu gás e que houve crescimento apenas a 15°C.

327 Segundo Salminen, Wright, Lahtinen, & Ouwehand (2011) apenas os gênero
328 *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Enterococcus* são capazes de crescer em pH 4,4,
329 concentração salina de 6,5% e temperatura de 45 °C.

330 Quanto a fermentação de carboidratos, dos seis isolados selecionados, 100%
331 fermentaram os açúcares frutose, glicose e manose, 33,3% fermentaram a
332 galactose e 66,6% fermentaram a lactose e a maltose. Sabe-se que certas bactérias
333 ácido lácticas são capazes de fermentar monossacarídeos, como *Lactobacillus*,

334 *Oneococcus*, *Weisselas*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e dissacarídeos como
335 *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (Salminen et al., 2011).

336 Esses testes possibilitaram a seleção de seis isolados para as demais
337 avaliações propostas, quanto à segurança microbiológica e potencial probiótico.

338

339 **3.2 Avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica**

340

341 **3.2.1 Atividade das enzimas hemolisina, DNase e gelatinase**

342 Dos seis isolados testados, todos apresentaram resultados negativos para a
343 presença das hemolisinas, capazes de lisar eritrócitos do sangue humano, para
344 presença das enzimas DNase, que degradam os ácidos nucleicos, e gelatinase, que
345 hidrolisam gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos.

346 Assim como no presente estudo, Angmo, Kumari, Savitri, & Bhalla (2016)
347 testaram a atividade hemolítica de 25 BAL isoladas de alimentos fermentados e
348 bebida de Ladakh, verificaram que todas apresentaram resultados negativos para a
349 presença das exotoxinas hemolíticas.

350 Luiz et al. (2015) caracterizaram BAL isoladas de leite de cabra, e puderam
351 observar que os isolados não apresentaram atividade da enzima DNase. No que diz
352 respeito à atividade da enzima gelatinase, Franco (2016) avaliou oito isolados de
353 BAL que não apresentaram atividade enzimática. Resultados esses que vão ao
354 encontro dos obtidos na pesquisa realizada. Apesar de constatar-se que muitas BAL
355 isoladas da microbiota de diferentes alimentos não apresentam as enzimas
356 testadas, sempre é recomendável que isolados que serão aplicados futuramente em
357 alimentos sejam submetidos aos mesmos, uma vez que a síntese dessas enzimas é
358 um indicativo de patogenicidade

359

360 **3.2.2 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico**

361 Na Tabela 3 podem ser observados os resultados de susceptibilidade aos
362 antimicrobianos testados nos isolados de silagem de colostro bovino.

363 Nota-se que os seis isolados apresentaram-se sensíveis à penicilina,
364 tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, gentamicina e cloranfenicol, característica
365 essa vantajosa, pois uma vez que o isolado não apresenta resistência, a
366 transmissão dessa para micro-organismos patógenos não ocorrerá (CLSI, 2015).

367

368 **Tabela 3.** Análise da susceptibilidade dos isolados de silagem de colostro bovino a antimicrobianos
369 de uso clínico

Isolados	PEN	VAN	TET	ERI	CIP	SUL	GEN	CLO
SCL2	S	R	S	S	S	R	S	S
SCL3	S	R	S	S	S	R	S	S
SCL4	S	R	S	S	S	R	S	S
SCL6	S	R	S	S	S	R	S	S
SCL7	S	R	S	S	S	R	S	S
SCL16	S	R	S	S	S	R	S	S

370 PEN: penicilina; VAN: vancomicina; TET: tetraciclina; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacina; SUL:
371 sulfanilamida; GEN: gentamicina; CLO: cloranfenicol; S: sensível; R: resistente.
372

373 A resistência apresentada pelos isolados à vancomicina é considerada um
374 resultado esperado já que certas espécies de BAL possuem resistência intrínseca
375 ao antibiótico, não sendo, portanto um dado preocupante, pois uma vez codificada
376 cromossomicamente a transmissão dos genes de resistência a outros micro-
377 organismos é dificultada (Swenson J Thornsberry C, 1990). Tal resistência foi
378 encontrado também por Aymerich et al. (2006), que avaliaram a susceptibilidade de
379 BAL isoladas de embutidos fermentados e Abushelaibi, AlMahdin, El-Tarabily, Shah,
380 & Ayyash (2017), que caracterizaram BAL isoladas de leite de camela.

381 Já a resistência apresentada por todos os isolados à sulfanilamida
382 (pertencente ao grupo das sulfonamidas), citado por Sarmah, Meyer, & Boxall,
383 (2006) como um dos antibióticos eleitos na medicina veterinária para tratar ou
384 prevenir doenças, supõem-se que esta resistência pode ter relação com o uso do
385 antibiótico em bovinos responsáveis pela produção do colostro.
386

387 **3.2.3 Perfil plasmidial**

388 A partir das resistências apresentadas pelos isolados de BAL à vancomicina
389 e a sulfanilamida, realizou-se a extração a fim de verificar a presença ou ausência
390 de plasmídeos. O resultado da eletroforese na Figura 2 mostra a presença de
391 plasmídeos nos isolados SCL2, SCL6 e SCL7.
392

393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409

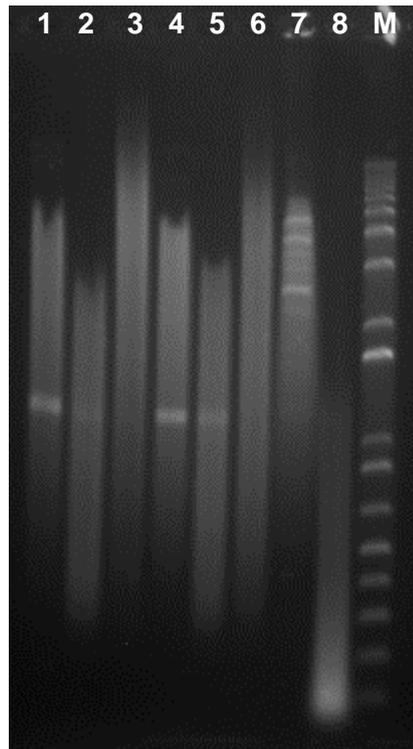


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Colunas: 1: isolado SCL2; 2: isolado SCL3; 3: isolado SCL4 4: isolado SCL6; 5: isolado SCL7; 6: isolado SCL16; 7: *E. coli* V517; 8: *E. coli* R55 e M: marcador de tamanho molecular (*Ladder* 1kb).

410
411
412
413
414
415
416
417
418
419

A possibilidade dos genes de resistência estar presentes nesse elemento genético móvel torna sua existência preocupante, uma vez que, a transferência de plasmídeos ocorre entre diferentes gêneros bacterianos, podendo esta resistência ser transmitida para micro-organismos patogênicos, o que implicaria em complicações nos quadros clínicos (Vogel, Lohmann, Weller, Hugas, & Hammes, 1991). Aymerich et al. (2006) avaliaram o perfil plasmidial de 88 isolados de BAL provenientes de embutidos cárneos fermentados e puderam observar a presença de plasmídeos em 74 isolados, assim como no presente estudo.

Portanto, os isolados SCL2, SCL6 e SCL7, foram considerados inadequados para prosseguirem com os demais testes.

420
421
422
423

3.3. Avaliação do potencial probiótico

424
425
426

3.3.1 Simulação da tolerância ao trato gastrointestinal (TGI)

A passagem pelo trato gastrointestinal simula as condições encontradas pela bactéria ao longo do seu trajeto até chegar a seu sítio de ação. Observam-se na

427 Tabela 4 as concentrações celulares antes e após a passagem pelo trato gástrico,
 428 na presença e ausência de alimento.

429

430 **Tabela 4.** Contagem de células viáveis (log UFC.mL⁻¹) dos isolados de silagem de colostro bovino
 431 quando submetidos a passagem pelo trato gástrico simulado com e sem a presença de alimento

Tempo (min)	Sem alimento			Com alimento		
	SLC3	SCL4	SCL16	SLC3	SCL4	SCL16
0	8,01 ± 0,01 ^{aA}	6,82 ± 0,13 ^{bA}	8,05 ± 0,01 ^{aA}	8,00 ± 0,04 ^{aA}	7,03 ± 0,01 ^{bA}	7,96 ± 0,08 ^{aA}
15	7,09 ± 0,09 ^{aA}	5,03 ± 0,00 ^{bA}	7,76 ± 0,01 ^{cA}	8,13 ± 0,04 ^{aB}	6,97 ± 0,04 ^{bB}	7,96 ± 0,01 ^{aB}
30	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	8,05 ± 0,04 ^{aB}	7,06 ± 0,04 ^{bB}	8,00 ± 0,10 ^{aB}
60	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	7,96 ± 0,01 ^{aB}	7,07 ± 0,01 ^{bB}	8,34 ± 0,01 ^{cB}
120	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	6,91 ± 0,01 ^{aB}	7,65 ± 0,05 ^{bB}	7,97 ± 0,13 ^{bB}
180	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	7,07 ± 0,07 ^{aB}	6,22 ± 0,19 ^{aB}	6,35 ± 0,34 ^{aB}
240	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,00 ± 0,00 ^{aA}	5,78 ± 0,07 ^{aB}	4,27 ± 0,27 ^{bB}	4,90 ± 0,06 ^{abB}

432 Resultados expressos como media (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma
 433 linha representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os isolados em
 434 um mesmo tempo e condição (Sem alimento ou Com alimento); Letras maiúsculas diferentes na
 435 mesma coluna representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os
 436 isolados em condições diferentes (Sem alimento x Com alimento) em um mesmo tempo.

437 Nota-se que após o período de 15 minutos, sem alimento, nenhum isolado
 438 possuía mais células viáveis. A presença de alimentos na passagem pelo trato
 439 gástrico contribui para a proteção da bactéria, pois mantém sua viabilidade celular
 440 uma vez que age tamponando o ambiente, ou seja, aumentando o pH. No entanto,
 441 segundo Huang & Adams (2004), a baixa tolerância ao suco gástrico simulado,
 442 pelas bactérias ácido lácticas não deve ser suficiente para excluí-las de aplicações
 443 probióticas.

444 Angmo et al. (2016) avaliou o efeito causado pela queda de pH sobre
 445 isolados de bactérias ácido lácticas, onde notou uma queda na concentração dos
 446 micro-organismos que em pH 2,0 mantiveram sua viabilidade na faixa de 3,04 log
 447 UFC.mL⁻¹ a 6,69 log UFC.mL⁻¹ durante 3 horas de incubação, resultado similar ao
 448 estudado, uma vez que, com o passar do tempo a baixo pH os isolados reduziram
 449 sua multiplicação. Destaque ao isolado SCL3 que manteve sua concentração
 450 superior, quando comparado aos demais isolados, na presença de alimento, ao final
 451 do tempo de 240 minutos.

452 Na Tabela 5 podem ser observadas as concentrações celulares antes e após
 453 a passagem pelo trato intestinal com e sem a presença de bile e alimento.

454

455

456 **Tabela 5.** Contagem de células viáveis (log UFC.mL⁻¹) dos isolados de silagem de colostro bovino
 457 quando submetidos a passagem pelo trato intestinal simulado com e sem a presença de alimento

Tratamento	Tempo (minutos)	Isolado		
		SLC3	SLC4	SLC16
TI	0	8,08 ± 0,06 ^{aA}	7,04 ± 0,04 ^{bA}	8,03 ± 0,06 ^{aA}
	240	7,77 ± 0,08 ^{aA}	6,94 ± 0,03 ^{bA}	8,18 ± 0,01 ^{cA}
TIB	0	7,69 ± 0,09 ^{aA}	6,66 ± 0,01 ^{bA}	7,34 ± 0,04 ^{cB}
	240	7,39 ± 0,09 ^{aA}	6,97 ± 0,07 ^{abA}	6,76 ± 0,11 ^{bB}
TIA	0	7,90 ± 0,03 ^{aA}	6,81 ± 0,16 ^{bA}	8,01 ± 0,01 ^{aA}
	240	7,82 ± 0,08 ^{aA}	5,97 ± 0,05 ^{bB}	7,30 ± 0,30 ^{bAB}
TIBA	0	8,05 ± 0,01 ^{aA}	7,69 ± 0,15 ^{aB}	8,15 ± 0,11 ^{aA}
	240	7,92 ± 0,15 ^{aA}	6,97 ± 0,00 ^{bA}	8,17 ± 0,03 ^{bAB}

458 TI: trato intestinal; TIB: trato intestinal com bile; TIA: trato intestinal com alimento; TIBA: trato intestinal
 459 com bile e alimento;

460 Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma
 461 linha representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os diferentes
 462 isolados em um mesmo tempo e tratamento; Letras maiúsculas diferentes na coluna representam
 463 diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando tratamentos para um mesmo tempo e
 464 isolado

465

466

467 Observa-se que os isolados SCL3 e SCL16 permaneceram em
 468 concentrações superiores a 6,5 log UFC.mL⁻¹, em todos tempos e tratamentos,
 469 destacando que o isolado SCL3 foi o único que não apresentou diferença
 470 significativa entre os tempos e condições, mantendo-se viável em concentrações
 471 superiores a 7,3 log UFC.mL⁻¹.

472 De acordo com Sidira et al. (2013) para conferir efeito probiótico a bactéria
 473 deve-se manter em concentrações iguais ou maiores a (FAO) 6 log UFC.mL⁻¹, então
 474 na presença de bile e alimento, todos isolados poderiam conferir esse efeito, já que
 475 se mantiveram viáveis em concentrações superiores ao estipulado.

476

477 **3.3.2 Capacidade de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade**

478 A auto-agregação é conceituada como sendo a adesão das linhagens
 479 probióticas entre si e nas células epiteliais. A Tabela 6 apresenta os percentuais de
 480 auto-agregação pelos isolados SCL3, SCL4 e SCL16, em função do tempo e
 481 temperatura.

482

483

484

485

486

487 **Tabela 6.** Percentual de auto-agregação dos isolados de silagem de colostro bovino em função do
 488 tempo e temperatura

Isolados	Tempo (h)	Auto-agregação (%)	
		Temperatura 20 °C	37 °C
SLC3	2	59,93 ± 0,40 ^{aA}	30,30 ± 0,42 ^{bA}
	20	96,07 ± 0,09 ^{aA}	96,67 ± 1,13 ^{aA}
SLC4	2	71,73 ± 0,92 ^{aB}	73,16 ± 2,07 ^{aB}
	20	95,98 ± 0,07 ^{aA}	99,68 ± 0,26 ^{bB}
SLC16	2	15,95 ± 1,05 ^{aC}	15,85 ± 1,75 ^{aC}
	20	87,43 ± 0,16 ^{aB}	97,99 ± 0,09 ^{bAB}

489 Resultados expressos como media (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma
 490 linha representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando as temperaturas
 491 para cada isolado em cada tempo; Letras maiúsculas diferentes na coluna representam diferença
 492 significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os isolados entre si em um mesmo tempo e
 493 temperatura.
 494

495 Após 20 horas, observa-se diferença estatística entre as temperaturas de 20 e
 496 37 °C, para os isolados SCL4 e SCL16. O isolado SCL3 manteve sua capacidade de
 497 auto-agregação maior que 95% nas duas temperaturas testadas. Após 20 horas os
 498 três isolados, em diferentes temperaturas mantiveram um percentual maior que 85%,
 499 demonstrando assim a alta capacidade dos isolados em se auto-agregarem.

500 Em estudo realizado por Franco (2016) o maior percentual obtido pelas BAL a
 501 37 °C foi igual a 67%, após 24 horas, resultado menor do que obtido neste estudo,
 502 onde os três isolados permaneceram com uma auto-agregação maior que 90%, após
 503 20 horas.

504 Quanto a capacidade de co-agregação, esta é a habilidade das células, de
 505 diferentes linhagens, se aderirem umas as outras. Essa característica é de suma
 506 importância para definir micro-organismos probióticos, pois leva a formação de uma
 507 barreira frente à colonização intestinal por patógenos (Reid, McGroarty, Angotti, &
 508 Cook, 1988).

509 Na Tabela 7 estão demonstrados os percentuais de co-agregação entre os
 510 isolados de silagem de colostro bovino e o patógeno *E. coli* ATCC 8739.

511
 512
 513
 514
 515
 516

517 **Tabela 7.** Percentual de co-agregação dos isolados de silagem de colostro bovino a *E. coli* ATCC 8739,
 518 em função do tempo

Isolados	Co-agregação (%)	
	Tempo	
	2 h	20 h
SLC3	23,46 ± 1,36 ^{aA}	57,10 ± 0,60 ^{aC}
SLC4	15,38 ± 0,60 ^{bA}	60,85 ± 0,26 ^{bC}
SLC16	14,61 ± 1,62 ^{bA}	47,37 ± 0,40 ^{cB}

519 Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma
 520 coluna representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os diferentes
 521 isolados em um mesmo tempo; Letras maiúsculas diferentes na linha representam diferença significativa
 522 pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os diferentes tempos para cada isolado individualmente.
 523

524 A partir dos resultados é possível compreender que há diferença significativa
 525 entre os isolados, após 20 horas de incubação. O isolado SCL4 demonstrou maior
 526 capacidade de co-agregação, seguido pelos isolados SCL3 e SCL16.

527 García-Cayuela et al. (2014) avaliou a capacidade de co-agregação entre
 528 isolados de *L. plantarum* e *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. O autor observou
 529 que dos 14 isolados, mais da metade mantiveram-se com um percentual de co-
 530 agregação menor que 40% para todos os patógenos, após 24 horas. Resultado esse,
 531 que diverge do presente estudo, uma vez que todos isolados de silagem de colostro
 532 bovino apresentaram seu percentual de agregação a *E. coli* maior que 40%.

533 Evidencia-se que tanto a capacidade de auto-agregação, quanto a capacidade
 534 de co-agregação são dependentes dos isolados e patógenos testados, tempo de
 535 incubação e temperatura.

536 A hidrofobicidade de um isolado compreende a capacidade de adesão a um
 537 hidrocarboneto, e estima a forma como a bactéria se ligaria às células epiteliais do
 538 hospedeiro (Todorov, Furtado, Saad, Tome, & Franco, 2011). Observam-se através da
 539 Tabela 8 os resultados, após a extração com xileno (hidrocarboneto).

540

541 **Tabela 8.** Percentual de hidrofobicidade dos isolados de silagem de colostro bovino após a extração
 542 com xileno

Isolado	Hidrofobicidade (%)
SLC3	14,52 ± 0,49 ^a
SLC4	15,03 ± 0,88 ^a
SLC16	12,81 ± 0,83 ^a

543 Resultados expressos como média (n = 3) ± desvio padrão; Letras minúsculas diferentes na mesma
 544 coluna representam diferença significativa pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05), comparando os diferentes
 545 isolados.
 546
 547

548 Os resultados mostram que com relação ao percentual de hidrofobicidade os
549 isolados SCL3, SCL4 e SCL16 não apresentaram uma alta capacidade de adesão ao
550 hidrocarboneto, ressaltando que eles não diferem estatisticamente entre si.

551 Abushelaibi et al. (2017) avaliou a hidrofobicidade de bactérias ácido lácticas
552 isoladas de leite de camela, onde notou que os 9 isolados variaram com percentuais
553 entre 2,2% e 57,8%.

554 Todorov et al. (2011) demonstraram em seu estudo isolados com alta
555 capacidade de hidrofobicidade, que não aderiram em altas concentrações as células
556 HT-29, portanto a capacidade de adesão ao hidrocarboneto pode auxiliar na adesão,
557 porém não é uma exigência para que ela ocorra.

558

559 **3.3.3 Atividade da enzima β -galactosidase**

560 A β -galactosidase se apresenta na forma de um tetrâmero com quatro
561 polipeptídios idênticos e é responsável pela clivagem do dissacarídeo lactose em
562 glicose e galactose (Fowler & Zabin, 1977). Os três isolados de BAL provenientes
563 da silagem de colostro bovino não apresentaram atividade da enzima, porém
564 estudos sugerem a baixa produção desta por *L. casei* probióticos (Vinderola &
565 Reinheimer, 2003).

566 Pinto et al. (2006) e Franco (2016) não observaram em seus estudos com
567 bactérias do gênero *Lactobacillus* a atividade enzimática, assim como no presente
568 estudo. Esse fato pode estar relacionado à concentração celular, pois uma baixa
569 concentração acarreta em uma redução na produção da enzima (Tille, 2013). Outro
570 fator que poderia ter influenciado a atividade da enzima, seriam as condições de
571 cultivo (tempo e temperatura) propostos na metodologia utilizada, que poderiam não
572 ser as mais adequadas para a expressão da atividade enzimática dos isolados
573 testados.

574

575 **3.3.4 Atividade antagonista contra patógenos**

576 Observa-se na Tabela 9 as zonas de inibição formadas pelos isolados SCL3,
577 SCL4 e SCL16 contra os patógenos testados.

578

579

580

581 **Tabela 9.** Espectro de inibição da atividade antimicrobiana produzida pelos isolados de silagem de
582 colostro bovino

Micro-organismo	Origem	Zona de inibição (mm)		
		SCL3	SCL4	SCL16
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	22	21	19,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	26	35	27
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 14028	17,5	28,5	23,5
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	29	20,5	19

592 ATCC: American Type Culture Collection

593

594 Os três isolados demonstraram atividade antagonista, já que desenvolveram
595 zonas de inibição tanto contra os micro-organismos Gram-positiva (*S. aureus* e *L.*
596 *monocytogenes*) quanto contra os Gram-negativa testados (*S. Typhimurim* e *E. coli*).
597 O poder inibitório dessas bactérias está ligado principalmente a produção de ácido
598 através do consumo de carboidratos, porém certas linhagens são capazes de
599 produzir peptídeos antimicrobianos, conhecidos como bacteriocinas, que possuem
600 efeito contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes (de Souza Barbosa et
601 al., 2015; Leroy, Verluyten, & De Vuyst, 2006)

602 Andrade et al. (2014) avaliaram a atividade antagonista de *Lactobacillus spp.*,
603 isolados de queijos minas artesanais, contra patógenos , onde obteve resultados
604 positivos contra *E. coli* ATCC 25922 , (24-41mm) *S. aureus* ATCC 29213 (29-48mm)
605 e *L. monocytogenes* ATCC 15313 (19-50mm), porém contra *S. Typhimurium* ATCC
606 14028 apenas um isolado desenvolveu zona de inibição inferior a 6 mm,
607 diferentemente do presente estudo que obteve halos superiores a 17 mm, inclusive
608 para *S. Typhimurium*.

609

610 **3.4 Avaliação da produção de exopolissacarideo (EPS)**

611 A produção de exopolissacarídeos é uma característica atribuída a isolados
612 potencialmente formadores de biofilmes, sendo este um aspecto relevante, pois
613 pode influenciar diretamente sob o processo de adesão das células ao suporte
614 durante a imobilização, além de proteger os micro-organismos de fatores exógenos.
615 Todos, os três isolados, apresentaram resultados positivos para formação do
616 polímero bem como ao encontrado por García-ruiz et al., (2014) que avaliaram o
617 potencial probiótico de isolados de BAL e aos resultados obtidos por Angmo et al.
618 (2016) que das 25 BAL isoladas de alimentos fermentados e bebidas do Ladakh,
619 oito apresentaram produção de EPS.

620

621 **3.5 Identificação molecular**

622 A análise do sequenciamento molecular apontou os isolados SCL3 (98% de
623 identificação), SCL4 (99% de identificação) e SCL16 (98 % de identificação) como
624 sendo pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e espécie *casei*.

625 Em estudo relatado por Saalfeld (2013), as BAL isoladas a partir de silagem
626 de colostro bovino foram 75% identificadas como *Lactobacillus*, incluindo as
627 espécies *casei*, *brevis*, *rennanqily* e *crustorum* e 25 % relativas ao gênero
628 *Enterococcus*, incluindo as espécies *durans*, *faecium*, *faecalis*, *mundyii*.

629

630 **3.6 Imobilização celular**

631 Para a imobilização foi inoculado $11 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ de *L. casei* SCL3,
632 concentração referente a 1 g de células (peso úmido). A escolha do isolado SCL3,
633 dentre os demais, ocorreu devido a sua maior resistência à presença de bile, fator
634 determinante para caracterização do micro-organismo como probiótico. Após 48
635 horas de fermentação, no conjunto grãos e caldo, a concentração de células estava
636 em $9,36 \log \text{ UFC.g}^{-1}$. A lavagem dos grãos de soja com tampão PBS permitiu a
637 eliminação das células não aderidas, ou fracamente aderidas, permanecendo para
638 posterior contagem somente as células imobilizadas (biocatalizador), que
639 mantiveram a concentração de $6,66 \log \text{ UFC.g}^{-1}$.

640 Quando submetido à refrigeração pelos períodos de 10, 20 e 30 dias, o
641 biocatalizador apresentou concentração celular equivalente a $6,81 \log \text{ UFC. g}^{-1}$, $6,65$
642 $\log \text{ UFC.g}^{-1}$ e $6,71 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, respectivamente. Enquanto que a avaliação do
643 biocatalizador liofilizado no tempo de 30 dias foi equivalente a $6,23 \log \text{ UFC.g}^{-1}$

644 Sidira, Karapetsas, Galanis, Kanellaki, & Kourkoutas (2014) avaliaram a
645 sobrevivência de *L. casei* imobilizada durante maturação do embutido cárneo
646 probiótico e observou que até 70 dias a concentração dos *Lactobacillus* se manteve
647 entre $6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e $10 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, valor este dependente da quantidade de
648 células imobilizadas inseridas no embutido.

649 Os resultados apresentados comprovam que foi possível a imobilização
650 celular, através da adesão das células viáveis de *L. casei* SCL3 aos grãos de soja
651 utilizados como suporte e armazenamento em refrigeração.

652

653 **3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

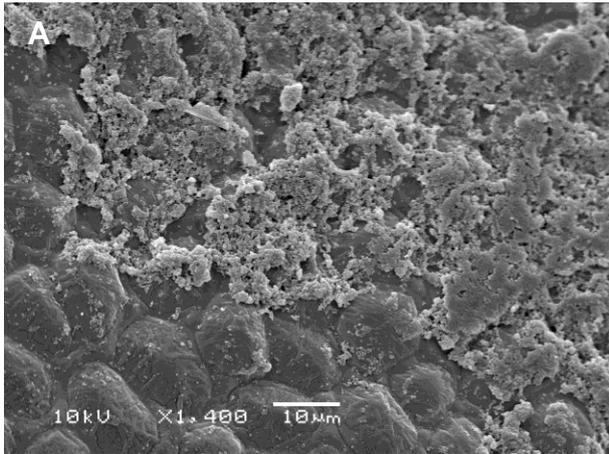
654 Com a finalidade de observar a imobilização das células de *L.casei* SCL3,
655 através da adsorção sobre os grãos de soja utilizou-se a microscopia eletrônica de
656 varredura (MEV), que baseia seu princípio na emissão de um feixe de elétrons para
657 exploração da superfície da amostra.

658 Pode ser observado através da Figura 4 o modo como as células aderem aos
659 grãos de soja e entre si, ocasionando a formação de agregados que se apresentam
660 na forma de uma espécie de “tapete celular”.

661 Resultado esse, semelhante ao encontrado por Bosnea et al. (2009) que
662 avaliaram a funcionalidade da liofilização de células de *L. casei* imobilizadas em
663 grãos de trigo.

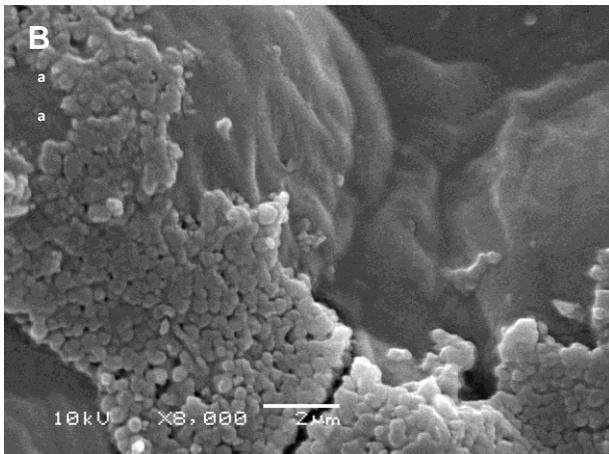
664

665



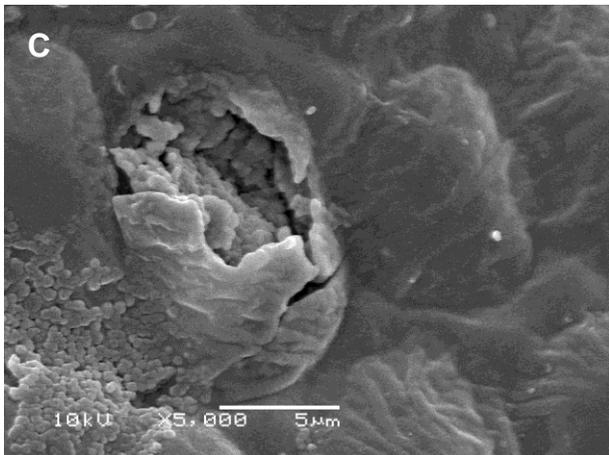
666

667



668

669



670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

Figura 4. Fotografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) após liofilização do biocatalizador (a) *L. casei* immobilizadas na superfície do grão de soja (x 1.400); (b) *L. casei* immobilizadas na superfície do grão de soja (x 8.000) (c) Fissura na superfície do grão de soja com adesão de *L. casei* (x 5.000)

680 4. Conclusão

681 O isolado identificado como *Lactobacillus casei* SCL3, proveniente de silagem
682 de colostro bovino, possui potencial probiótico e quando imobilizado em grãos de
683 soja, manteve sua viabilidade sob armazenamento em refrigeração e após
684 liofilização, característica vantajosa visando futura aplicação em alimentos.

685

686 5. Referências Bibliográficas

687 Abushelaibi, A., AlMahdin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. (2017).
688 Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk.
689 *LWT - Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>

690 Agnol, A. D., & Roessing, A. C. (2007). o complexo agroindustrial da soja brasileira
691 Autores. *Circular Técnica*, 12.

692 Andrade, C. R. G., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Acurcio, L. B., Sant'Anna, F.
693 M., Castro, R. D., & Oliveira, D. L. S. (2014). Propriedades probióticas in vitro de
694 *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG.
695 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 66(5), 1592–1600.
696 <https://doi.org/10.1590/1678-6781>

697 Angmo, K., Kumari, A., Savitri, & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of
698 lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT -*
699 *Food Science and Technology*, 66, 428–435.
700 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>

701 Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., & Hugas, M.
702 (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from
703 slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 40–49.
704 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02772.x>

705 Bosnea, L. A., Kourkoutas, Y., Albantaki, N., Tzia, C., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M.
706 (2009). LWT - Food Science and Technology Functionality of freeze-dried *L. casei*
707 cells immobilized on wheat grains. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10),
708 1696–1702. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.011>

709 Bosnea, L. A., Kourkoutas, Y., Albantaki, N., Tzia, C., Koutinas, A. A., Kanellaki, M.,
710 ... Kourkoutas, Y. (2015). Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile
711 compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages Running title : Volatiles
712 in heat treated sausages with immobilized *L. casei*. *LWT - Food Science and*
713 *Technology*, 42(10), 1696–1702. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.05.011>

714 CLSI. (2015). *M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial*. (C. and L. S.
715 Institute, Ed.) (M100-S25 ed.). Wayne.

716 Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation
717 properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and*

718 *Technology*, 226(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>

719 de Souza Barbosa, M., Todorov, S. D., Ivanova, I., Chobert, J. M., Haertle, T., & de
720 Melo Franco, B. D. G. (2015). Improving safety of salami by application of
721 bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food*
722 *Microbiology*, 46, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.004>

723 Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular Screening of Enterococcus Virulence
724 Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical
725 Isolates Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential
726 for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and*
727 *Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635.
728 <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628>

729 Europe, I. (1998). Addition of Nutrients to Food: Nutritional and Safety
730 Considerations. Retrieved from [http://ilsa.org/mexico/wp-](http://ilsa.org/mexico/wp-content/uploads/sites/29/2016/09/The-Safety-Assessment-of-Novel-Foods-and-Concepts-to-Determine-their-Safety-in-Use.pdf)
731 [content/uploads/sites/29/2016/09/The-Safety-Assessment-of-Novel-Foods-and-](http://ilsa.org/mexico/wp-content/uploads/sites/29/2016/09/The-Safety-Assessment-of-Novel-Foods-and-Concepts-to-Determine-their-Safety-in-Use.pdf)
732 [Concepts-to-Determine-their-Safety-in-Use.pdf](http://ilsa.org/mexico/wp-content/uploads/sites/29/2016/09/The-Safety-Assessment-of-Novel-Foods-and-Concepts-to-Determine-their-Safety-in-Use.pdf)

733 Fleming, H. P., Etchells, J. L., & Costilow, R. N. (1975). Microbial inhibition by an
734 isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, 30(6), 1040–
735 1042.

736 Fonseca, H., & Gutierrez, L. E. (1974). Composição em ácidos graxos de óleos
737 vegetais e gorduras animais. *Anais Da Escola Superior de Agricultura Luiz de*
738 *Queiroz*, 31(1962), 485–490. <https://doi.org/10.1590/S0071-12761974000100038>

739 Fowler, a V., & Zabin, I. (1977). The amino acid sequence of beta-galactosidase of
740 *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*
741 *States of America*, 74(4), 1507–1510.

742 Franco, B. (2016). Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for
743 the Control of *Listeria monocytogenes* , *Salmonella Typhimurium* , and *Escherichia*
744 *coli* O157 : H7 Biofilms Formation Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (
745 LAB) Biofilms for th, (June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00863>

746 Fraqueza, M. J. (2015). International Journal of Food Microbiology Antibiotic
747 resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International*
748 *Journal of Food Microbiology*, 212, 76–88.
749 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>

750 Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting
751 slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*,
752 42(8), 872–4. <https://doi.org/10.1136/JCP.42.8.872>

753 García-Cayuela, T., Korany, A. M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena,
754 T., Peláez, C., & Martínez-Cuesta, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy
755 *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research*
756 *International*, 57, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>

757 García-ruiz, A., Llano, D. G. De, Esteban-fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B.,
758 & Moreno-arribas, M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid
759 bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*.

760 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.06.015>

761 Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (4th ed.).
762 Cold Spring Harbor Laboratory Press.

763 Greiner, C. (1990). *Economic implication of modified soybean trait. Iowa Agriculture*
764 *and Home Economics Experiment Station. Iowa.*

765 Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. LWW; Ninth
766 edition.

767 Hou, H. J., & Chang, K. C. (2004). Structural characteristics of purified beta-
768 conglycinin from soybeans stored under four conditions. *Journal of Agricultural and*
769 *Food Chemistry*, 52(26), 7931–7937. <https://doi.org/10.1021/jf049430p>

770 Huang, Y., & Adams, M. C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal
771 tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food*
772 *Microbiology*, 91(3), 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>

773 Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A.,
774 ... Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and
775 Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical*
776 *Microbiology and Antimicrobials*, 9, 23. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-9-23>

777 Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., & Kanellaki, M.
778 (2006). Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on
779 fruit pieces. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1439–1451.
780 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72212-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72212-3)

781 Kumar, V., Rani, A., Dixit, A. K., Pratap, D., & Bhatnagar, D. (2010). A comparative
782 assessment of total phenolic content, ferric reducing-anti-oxidative power, free
783 radical-scavenging activity, vitamin C and isoflavones content in soybean with
784 varying seed coat colour. *Food Research International*, 43(1), 323–328.
785 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.019>

786 Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for
787 improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3),
788 270–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027>

789 Lima, K. G. de C., Kruger, M. F., Behrens, J., Destro, M. T., Landgraf, M., &
790 Gombossy de Melo Franco, B. D. (2009). Evaluation of culture media for
791 enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium*
792 *animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and
793 *Streptococcus thermophilus*. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 491–495.
794 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.011>

795 Liu, C., Wang, X., Ma, H., Zhang, Z., Gao, W., & Xiao, L. (2008). Functional
796 properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions. *Food*
797 *Chemistry*, 111(1), 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.040>

798 Luiz, W., Almeida, G. De, Ferrari, S., Souza, J. V. De, Daiane, C., Matiuzzi, M., &
799 Dias, F. S. (2015). Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated
800 from goat milk, 53, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.013>

801 Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization
802 technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013.
803 <https://doi.org/10.1155/2013/716861>

804 Nations Food and Agriculture Organization, U.-S. (2001). Evaluation of health and
805 nutritional properties of probiotic in food including powder milk with live lactic acid
806 bacteria. Retrieved from ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf

807 Ozyurt, V. H., & Ötles, S. (2014). Properties of probiotics and encapsulated probiotics
808 in food. *ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(4), 413–424.

809 Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., & Teixeira, P. (2009).
810 Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic
811 susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food*
812 *Microbiology*, 26(3), 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.008>

813 Pinto, M. G. V., Franz, C. M. A. P., Schillinger, U., & Holzapfel, W. H. (2006).
814 *Lactobacillus* spp . with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional
815 fermented products, 109, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>

816 Reid, G., McGroarty, J. a, Angotti, R., & Cook, R. L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor
817 production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens.
818 *Canadian Journal of Microbiology*, 34(3), 344–51. <https://doi.org/10.1139/m88-063>

819 Saalfeld, M. H. (2013). *Silagem de colostro bovino: propriedades e potencialidades*
820 *de usos*. Universidade Federal de Pelotas.

821 Salminen, S., Wright, A. von, Lahtinen, S., & Ouwehand, A. (2011). *Lactic Acid*
822 *Bacteria Microbiological Functional* (4th ed.). CRC Press.

823 Sarmah, A. K., Meyer, M. T., & Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the
824 use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics
825 (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725–759.
826 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.026>

827 Sidira, M., Kandyliis, P., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2015). Effect of immobilized
828 *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented
829 sausages Running title : Volatiles in heat treated sausages with immobilized L . casei.
830 *FOOD CHEMISTRY*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.068>

831 Sidira, M., Karapetsas, A., Galanis, A., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2014).
832 Effective survival of immobilized *Lactobacillus casei* during ripening and heat
833 treatment of probiotic dry-fermented sausages and investigation of the microbial
834 dynamics. *MESC*, 96(2), 948–955. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.013>

835 Sidira, M., Saxami, G., Dimitrellou, D., Santarmaki, V., Galanis, A., & Kourkoutas, Y.
836 (2013). Monitoring survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in probiotic yogurts
837 using an efficient molecular tool. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3369–3377.
838 <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6343>

839 Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product
840 development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51(3), 456–
841 467. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>

842 Swenson J Thornsberry C, F. R. (1990). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-
843 resistant *Leuconostoc*, *Pedococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob Agents*
844 *Chemother*, 34(4), 543–549. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.4.543>. Updated

845 Szakály, Z., Szente, V., Kövér, G., Polereczki, Z., & Szigeti, O. (2012). The influence
846 of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. *Appetite*, 58(1),
847 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2011.11.003>

848 Tille, P. (2013). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. © Mosby.

849 Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., Tome, E., & Franco, B. D. G. M.
850 (2011). Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria
851 isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 971–986.
852 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x>

853 Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic
854 bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological
855 barrier resistance. *Food Research International*, 36(9–10), 895–904.
856 [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)

857 Vogel, R. F., Lohmann, M., Weller, A. N., Hugas, M., & Hammes, W. P. (1991).
858 Structural similarity and distribution of small cryptic plasmids of *Lactobacillus*
859 *curvatus* and *L. sake*. *FEMS Microbiology Letters*, 84(2), 183–190. Retrieved from
860 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037810979190125T>

861 Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., ...
862 Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum*
863 strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040.
864 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>

865

866

867 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

868 Dos 30 isolados, provenientes de silagem de colostro bovino caracterizados
869 como bactérias ácido lácticas, seis foram selecionados nos testes tecnológicos,
870 resistência a diferentes concentrações de bile e fermentação de açúcares. Dos seis
871 isolados selecionados para a avaliação dos parâmetros de segurança
872 microbiológica nenhum apresentou atividade das enzimas hemolisina, DNase e
873 gelatinase. Três isolados foram resistentes a dois antimicrobianos testados e
874 continham plasmídeos, devido às características apresentadas, estes isolados
875 (SCL2, SCL6 e SCL7) não foram escolhidos para os testes de potencial probiótico.

876 Na avaliação do potencial probiótico os três isolados apresentaram atividade
877 antagonista contra patógenos Gram-positiva e Gram-negativa, capacidade de auto-
878 agregação e co-agregação, mantiveram-se em concentrações superiores a 6 log
879 UFC.mL⁻¹ na passagem pelo trato intestinal com bile e alimento, ressaltando que o
880 isolado SCL3 no trato gástrico manteve-se em concentração de 5,7 log UFC.mL⁻¹
881 porém não apresentaram atividade da enzima β galactosidase e tiveram baixo
882 percentual hidrofobicidade.

883 O isolado identificado como *Lactobacillus casei* SCL3, produtor de
884 exopolissacarídeo, foi imobilizado na superfície dos grãos de soja, através de
885 processo fermentativo, onde formou agregados celulares, similar a organização de
886 biofilme e mantiveram-se em 6,71 log UFC.mL⁻¹ até o 30º dia de armazenamento
887 em refrigeração e 6,23 log UFC.mL⁻¹ no 30º dia após liofilização.

888 Destaca-se essa uma pesquisa de carácter inovador, pois não há trabalhos
889 na literatura que relatem o uso de soja como suporte sólido para bactérias ácido
890 lácticas potencialmente probióticas.

891 A partir dos resultados têm-se como perspectivas futuras ensaios de
892 toxicidade celular bem como a aplicação do biocatalizador em sistema alimentar.

893