

EFEITO DE POLISSACARÍDEO BACTERIANO COMO SEPARADOR SÓLIDO-LÍQUIDO EM CULTIVOS DE *Bacillus toyonensis* e *Saccharomyces boulardii*

LUCAS REICHERT MAUBRIGADES¹; FRANCISCO DENIS SOUZA SANTOS²;
HELEN CABALDI FRANZ²; VITÓRIA SEQUEIRA GONÇALVES²; RODRIGO
CASQUERO CUNHA²; FÁBIO PEREIRA LEIVAS LEITE³

^{1,2}Universidade Federal de Pelotas – lucasmaub@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – fabio@leivasleite.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos bacterianos ou exopolissacarídeos são produzidos por uma grande variedade de microrganismos e possuem propriedades físicas, químicas e estruturais particulares. São aditivos amplamente utilizados na indústria farmacêutica, petroquímica e principalmente alimentícia como estabilizantes, espessantes e emulsificantes (DE SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004).

Em bioprocessos, em culturas de microrganismos em meio líquido, se faz necessário a separação da massa celular do meio para recuperação do produto final desejado. Para isso, um dos métodos usados consiste na centrifugação, fazendo o uso de uma força centrífuga que promove a separação dos sólidos suspensos e dos sólidos não dissolvidos em um determinado meio, através da diferença de densidade (WOON e LENG, 2007).

As centrífugas, apesar de serem vastamente utilizadas em escala laboratorial e industrial, requerem manipulação adequada, manutenções periódicas e apresentam custos significativos no processo de produção. Sendo assim, torna-se necessário a procura e avaliação de métodos alternativos ao uso destes equipamentos. Neste contexto, é possível destacarmos os polímeros por possuírem propriedades que favorecem a precipitação de proteínas, através de suas fortes interações com a água (REGULY, 2000).

Os polissacarídeos bacterianos podem apresentar importante papel como agentes separadores de sólido-líquido e, desta forma, serem utilizados como alternativa ao processo de centrifugação. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito de um polissacarídeo como agente separador de sólido-líquido em cultivos dos microrganismos probióticos *Bacillus toyonensis* e *Saccharomyces boulardii*.

2. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os microrganismos utilizados *Bacillus toyonensis* e *Saccharomyces boulardii* foram cultivados em meio líquido Brain Heart Infusion (caldo BHI, acumedia®) e Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD, 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de dextrose), respectivamente, sendo que inicialmente foi preparado 1 litro de cada meio em frascos Erlenmeyer para o cultivo em menor escala. O *B. toyonensis* foi incubado à temperatura de 37 °C durante 24 horas e o *S. boulardii* à temperatura de 28 °C durante 72 horas, ambos em agitador orbital (CERTOMAT® BS-T) a 200 rpm. Após, foram preparados 6 litros de cada meio para cultivar os microrganismos em biorreator à temperatura de 37 °C durante 72 horas e, desta forma, obter uma produção em maior escala.

Posterior ao período de cultivo realizou-se a técnica de diluição seriada em placas de Petri contendo o meio ágar BHI e YPD, seguida pelo método de semeadura por espalhamento com alça de Drigalsky com o objetivo de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante 24 horas para *B. toyonensis* e 72 horas para *S. boulardii*. Os resultados serão expressos em UFC/L. Em seguida, foram adicionados 0,01% de goma xantana (DELAWARE®) em cada recipiente de cultivo. Os cultivos foram mantidos durante 24 horas à temperatura ambiente. O sobrenadante do cultivo foi descartado e utilizou-se a contagem bacteriana em UFC para quantificar as células no pellet.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cultivos de *B. toyonensis* e *S. boulardii* obtiveram o crescimento esperado. Foi possível observar que decorridas 24 horas da adição do polissacarídeo nos cultivos, a massa celular já se apresentava totalmente separada, proporcionando o descarte do sobrenadante e a sua coleta. Vale destacar que a separação da massa celular da parte líquida foi observada no cultivo de 1 litro e em biorreator (6L). A tabela 1 mostra a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/L) antes e após 24 horas da adição do polissacarídeo bacteriano.

Tabela 1. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/L) de *S. boulardii* e *B. toyonensis* antes e 24 horas após a adição do polissacarídeo.

Meio/Volume	Microrganismo	UFC/L antes da adição da goma xantana	UFC/L Após a adição da goma xantana
BHI/ 1L	<i>B. toyonensis</i>	7×10^{11} UFC/L	7×10^{12} UFC/L
YPD/ 1L	<i>S. boulardii</i>	$1,5 \times 10^{11}$ UFC/L	$1,5 \times 10^{12}$ UFC/L
BHI/ 6L	<i>B. toyonensis</i>	8×10^{11} UFC/L	8×10^{12} UFC/L
YPD/ 6L	<i>S. boulardii</i>	3×10^{11} UFC/L	3×10^{12} UFC/L

No crescimento microbiano, vários compostos e metabólitos tóxicos são produzidos durante a fase exponencial (DE CARVALHO, 2010). Neste estudo, a adição deste polissacarídeo possibilitou uma melhor separação das células e obteve-se uma massa celular mais concentrada. Tendo em vista que não houve decréscimo no número de UFC/L da contagem final de células, existe a possibilidade de que os metabólitos tóxicos e proteases produzidos durante o crescimento tenham se tornado solúveis, sendo descartados juntamente ao sobrenadante do cultivo. Além disso, o uso de polissacarídeos como agente de separação de sólido-líquido reduz o número de etapas durante o processo, resultando em menor manipulação do cultivo quando comparado ao método de centrifugação.

B. toyonensis e *S. boulardii* são utilizados como probióticos na alimentação humana e animal há várias décadas (DURAND & DURAND, 2010; JAWHARA & POULAIN, 2007; WILLIAMS et al., 2009). Estes microrganismos são cultivados e a massa celular resultante é separada através do processo de centrifugação para ser adicionada nas formulações. A goma xantana é amplamente utilizada na indústria alimentícia (NITSCHKE, 2001). Neste contexto, vale ressaltar que não há implicações de segurança em adicioná-la nos cultivos dos probióticos. Sendo assim, a atuação desse polissacarídeo como separador sólido-líquido pode ser uma alternativa eficaz no processo de produção destes microrganismos.

4. CONCLUSÕES

A utilização do polissacarídeo bacteriano no presente trabalho apresentou um papel efetivo na separação do meio líquido da massa celular do cultivo, assim como não influenciou na viabilidade celular. O uso desse polissacarídeo pode ser considerado como um agente separador de sólido-líquido em cultivos dos microrganismos probióticos *B. toyonensis* e *S. boulardii*, constituindo-se numa alternativa ao uso do processo de centrifugação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WOON, W.; LEUNG, F. **Centrifugal separations in biotechnology**. Hardbound: Academic Press. 2007.

REGULY, J.C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: UFPel. 2000.

REGULY, J.C. Engenharia das Fermentações. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. Pelotas: UFPel, 2000. 6, p. 137-195.

SOUZA, A. S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. **Ciência e Engenharia**. 1999. v. 8, n. 2, p. 115-123.

SOUZA, D. M. DE; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

DURAND, F. C.; DURAND, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, V.1, n.1, p. 3-9, 2010.

JAWHARA, S., POULAIN D. *Saccharomyces boulardii* decreases inflammation and intestinal colonization by *Candida albicans* in a mouse model of chemically-induced colitis. **Medical Mycology**. 45: 691–700, 2007.

Williams, L.D., Burdock, G.A., Jiménez, G. and Castillo, M., 2009. Literature review on the safety of Toyocerin®, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 55: 236-246.

CARVALHO, I. T. DE. **Microbiologia Básica**. Recife: EdUFRPE. 2010.