

INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NO CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* UFV H2B20

INFLUENCE OF THE NITROGEN SOURCE ON THE GROWTH OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* UFV H2B20

*Hamilton Mendes de Figueiredo **

*Frederico José Vieira Passos ***

RESUMO — *Com o objetivo de caracterizar um sistema de produção de células viáveis de *L. acidophilus* UFV H2b20, para adição em probióticos, estudos da cinética de crescimento do microrganismo foram conduzidos. Na produção de massa celular viável foi utilizado o soro de queijo ultrafiltrado (SQUF) como meio basal. A produção máxima de células de $3,1 \times 10^9$ UFC/ml foi alcançada quando o SQUF foi suplementado com proteose peptona nº 3, à temperatura de crescimento de 37°C. Essa produção celular em proteose peptona nº 3 foi estatisticamente superior às demais fontes de nitrogênio utilizadas (Triptona, peptona, nitrogênio básico para levedura e aminoácido de caseína), com exceção do caldo Man, Rogosa & Sharpe (MRS) que também apresentou bom crescimento celular.*

PALAVRAS-CHAVE: *Lactobacillus acidophilus; Soro de queijo; Probiótico.*

ABSTRACT — *With the objective of characterizing a system of production of viable cells of *L. acidophilus* UFV H2b20, for addition in probiotics, studies of the growth kinetics of the microorganism were conducted. For the production of viable cell mass, ultrafiltered cheese whey (UCW) was used as a medium. The maximum cell production of 3.1×10^9 UFC/ml was reached when UCW was supplemented with proteose peptone nº. 3 at a growth temperature of 37°C. This cellular production in proteose peptone nº 3 was statistically better than other sources of nitrogen (Triptone, Peptone, Bacto Yeast Nitrogen Base and Bacto Casamino Acids), except for MRS which also presented good cellular growth.*

* Prof. Adjunto, DTEC (UEFS), Engenheiro Agrônomo, DS,
E-mail: hamiltonmendes1@hotmail.com

** Prof. Adjunto, UFV. Engenheiro de Alimentos, PhD.
Universidade Estadual de Feira de Santana – Dep. de
Tecnologia. Tel./Fax (75) 224-8056 - BR 116 – KM 03, Campus -
Feira de Santana/BA – CEP 44031-460.

KEYWORDS: *Lactobacillus acidophilus*; *Cheese whey*; *Probiotics*

1 INTRODUÇÃO

A idéia de Metchinikoff, de que os lactobacilos poderiam prevenir os efeitos tóxicos causados por outras bactérias intestinais, fez com que houvesse um grande interesse popular em relação ao consumo do iogurte e outros produtos lácteos fermentados (SHAHANI & AYEBO, 1980). Do início do século até hoje, muitos probióticos surgiram, porém a maioria apresentando problemas de palatabilidade, baixo número de células viáveis e vida de prateleira curta, entre outros.

Para a produção de um bom probiótico, é necessário, primeiro, que se tenha uma fonte de células vivas capaz de fornecer quantidade suficiente de células para se obter um bom número de lactobacilos no produto, sem que o preço final seja muito elevado. O efeito benéfico do *Lactobacillus acidophilus* requer um contínuo suprimento desses microrganismos no trato intestinal, para que possam estabilizar a microflora do intestino (KLAENHAMMER, 1982). É necessária a ingestão diária de cerca 10^8 UFC, para que haja um aumento do número de lactobacilos facultativos no intestino (GILLILAND *et al.*, 1978; GILLILAND *et al.*, 1985).

A estirpe de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 foi isolada e caracterizada no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, por SANTOS (1984), após o que seu comportamento foi estudado sob condições do trato digestivo *in vitro*, sendo considerado resistente a essas condições (AGOSTINHO, 1988). Dessa maneira, surgiu a idéia de utilizar essa estirpe na composição de um probiótico.

De acordo com o KANDLER & WEISS (1986), os lactobacilos têm alta exigência nutricional, geralmente crescendo bem entre 30 e 40°C, são catalase negativa e não possuem sistema de citocromos. Daí a necessidade de desenvolver um meio, de baixo custo, que permita o crescimento desse microrganismo. Uma vez obtido um sistema eficiente de produção de células, uma série de produtos poderá ser desenvolvida, sem que o custo venha representar um acréscimo substancial no preço final do produto.

Este trabalho teve como objetivos avaliar o crescimento do *L. acidophilus* H2b20 em soro de queijo “minas-padrão”, ultrafiltrado e suplementado com fonte de nitrogênio e caracterizar a cinética de crescimento das células.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Processos Fermentativos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

2.1 Microrganismo e Meio de Cultura

Foi utilizado o *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20, isolado e caracterizado por Santos (1984).

As células foram cultivadas em 1 litro de caldo MRS (DE MAN *et al.*, 1960) e centrifugadas a 9.800 g, em centrífuga J2-MC. Em seguida, as células foram ressuspensas em 100 mL de caldo MRS, contendo 10% de glicerol, distribuídas em tubos “ependorf” e armazenadas sob congelamento (-10°C). No momento da utilização como inóculo, a cultura foi ativada duas vezes em caldo MRS com incubação a 37°C, sem agitação, por 14-16 horas, em estufa bacteriológica. Os meios de cultura utilizados foram o caldo MRS e o soro de queijo “minas-padrão”, produzido na Usina Piloto de Laticínios (Funarbe/UFV). O soro foi submetido a diferentes tratamentos e suplementações.

2.2 Condições de Cultivo

Nos estudos de suplementação do soro com diferentes fontes de nitrogênio, os experimentos foram realizados em fermentadores, em batelada. Os fermentadores são frascos jaquetados com um volume total de trabalho de 150 mL, no qual foram colocados 125 mL de meio. O meio foi agitado mediante o uso de um agitador magnético. O nitrogênio foi injetado para estabelecer a anaerobiose no espaço vazio dos fermentadores. A injeção do nitrogênio foi realizada através de um filtro esterilizado (Millex-FG50 0,22mm).

Durante o processo, amostras de 3 mL foram retiradas, assepticamente, em intervalos de uma hora, com uma seringa descartável. As densidades óticas das amostras foram lidas em espectrofotômetro a 630 nm. Amostras com valores de densidade ótica superiores a 0,4 foram diluídas para valores entre 0,1 e 0,4.

2.3 Utilização do Soro de Queijo como Meio de Cultura

Para avaliar o crescimento de *L. acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo, foram testados os seguintes tratamentos:

Tratamento 1: soro de queijo sem suplementação;

Tratamento 2: soro ultrafiltrado em sistema de ultrafiltração Reginox, com membrana tipo espiral Desalination System Inc., de corte de 10.000 daltons, com poros de 0,03mm;

Tratamento 3: soro centrifugado em centrífuga a 12.100 g, por 10 minutos, a 10°C;

Tratamento 4: soro ultrafiltrado e suplementado com 1% de proteose peptona n. 3;

Tratamento 5: soro suplementado com 1% de proteose peptona n. 3.

Os meios foram esterilizados a 121°C, por 15 minutos, em autoclave. Cada meio foi preparado em duplicata, e depois foi feita uma repetição do experimento.

O inóculo, antes de ser repicado para esses meios na proporção de 1% v/v, foi ativado em caldo MRS (10 ml) por 14-16 horas, a 37°C. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 37°C, por 20 horas, e após esse tempo foram realizados plaqueamentos para contagem do número de células viáveis.

O plaqueamento das amostras foi realizado “pour plate” em duplicata no caldo MRS, adicionado de 1,5 e 0,75% de Bacto-ágar. No plaqueamento utilizou-se um plaqueador automático, no modo exponencial de 100 mL. A incubação foi a 37°C, e a contagem das colônias feita após 48 horas.

2.4 Suplementação do soro com diferentes fontes de nitrogênio

O experimento foi realizado em três repetições. Os fermentadores continham um volume de 125 ml de meio. Além do soro suplementado

com diferentes fontes de nitrogênio, foi utilizado o caldo MRS como referência, e os fermentadores foram inoculados de maneira a obter uma densidade óptica inicial correspondente a D.O.₆₃₀ de 0,005.

O soro de queijo foi previamente hidrolisado com Papaína USP, utilizando-se 1U.I. de enzima para cada 1mL de soro. A hidrólise foi realizada a 28°C, por uma hora. Em seguida, o soro foi ultrafiltrado, embalado em sacos plásticos apropriados e mantido sob congelamento, à temperatura de -10°C. No momento da utilização, o soro foi descongelado, aquecido até a ebulição e resfriado para 25°C. O precipitado foi descartado, e o líquido resultante foi utilizado como meio de cultivo. A ele foram adicionados 0,2% de citrato de amônio e 0,5% de acetato de sódio anidro, com o objetivo de dar maior estabilidade às proteínas por ocasião da esterilização. Em seguida, o soro foi dividido em volumes de 125 ml e adicionado de 1% de uma das fontes de nitrogênio, visando obter o soro suplementado. As fontes de nitrogênio testadas foram triptona, peptona, nitrogênio básico para levedura, aminoácido de caseína e proteose peptona nº3.

Quando necessário, o crescimento celular foi acompanhado por meio de plaqueamento, e a contagem das colônias ocorreu após 48 horas de incubação a 37°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para os diversos experimentos realizados são apresentados a seguir.

3.1 Utilização do soro como meio de cultura

O Quadro 1 apresenta a população de células de *L. acidophilus* UFV H2b20 obtidas com 20 horas de incubação a 37°C, em vários meios de cultura. Pôde-se observar que o menor número de células viáveis foi obtido quando o soro foi ultrafiltrado e não recebeu suplementação de uma fonte de nitrogênio para repor aquele retirado por ocasião da ultrafiltração. A redução no teor de nitrogênio fez com que uma população de 3×10^6 UFC/mL fosse atingida, mas, quando o soro não sofreu tratamento (ultrafiltração ou centrifugação) nem adição de fonte de nitrogênio, essa população alcançou 10^9 UFC/mL.

Esses resultados indicam uma maior disponibilidade de nitrogênio assimilável pelo lactobacilo no soro que não sofreu nenhum tratamento, a não ser a esterilização.

Também, pôde-se verificar que a ultrafiltração e a posterior suplementação do soro com proteose peptona n. 3 permitiram uma boa multiplicação do lactobacilo, que chegou a $1,3 \times 10^9$ UFC/mL. Esse resultado está de acordo com o obtido por Passos (1997) que, trabalhando com soro de Mozzarella, obteve uma produção de 10^9 UFC/mL após a hidrólise, a ultrafiltração e a posterior suplementação com proteose peptona n.º 3 (1%), citrato de amônio (0,2%) e acetato de sódio anidro (0,5%). Esse soro é mais fácil de ser trabalhado, do ponto de vista operacional, já que facilita a posterior separação das células do soro, por conter menos impurezas. Essa população é equiparada àquela obtida quando se utiliza soro mais proteose peptona n.º 3 ($1,5 \times 10^9$ UFC/mL). Ao utilizar o soro centrifugado, obteve-se uma população de $3,8 \times 10^8$ UFC/mL, em 20 horas de incubação, o que ainda é uma população relativamente baixa, se comparada à população de 10^9 UFC/mL alcançada com soro.

Quadro 1 - População de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 obtida com 20 horas de incubação a 37°C, em função do tipo de meio de fermentação utilizado (média de duas repetições em duplicata)

Meio	UFC/mL
Soro	$1,0 \times 10^9$
Soro centrifugado	$3,8 \times 10^8$
Soro ultrafiltrado	$3,0 \times 10^6$
Soro + peptona n.º 3	$1,5 \times 10^9$
Soro ultrafiltrado+ peptona n.º 3	$1,3 \times 10^9$

Esse soro apresenta uma pequena quantidade de proteínas (b-lactoglobulinas e a-lactoalbumina) e glicomacropéptidos

liberados pela renina durante a coagulação do queijo, os quais estão misturados à gordura (GREEN, 1977; LUND *et al.*, 1992). É possível que uma parte desses compostos nitrogenados tenha sido arrastada junto com a gordura durante a centrifugação, vindo a reduzir o teor de nitrogênio do soro. Isso pode ser a causa da diminuição no número de células vivas do soro centrifugado ($3,8 \times 10^8$ UFC/mL), quando comparado ao soro sem nenhum tratamento.

Com o soro sem tratamento, é possível obter uma maior produção de células. Porém, no final da fermentação, há dificuldades para se separar as células viáveis do meio de fermentação, em função da formação de uma massa composta por células, gordura e proteína, o que dificulta a utilização de qualquer sistema para separar essas células. A ultrafiltração deixa o soro pobre em nitrogênio, fazendo com que haja uma baixa produção de biomassa. Na utilização desse soro para produzir células, é necessária a sua suplementação com uma fonte de nitrogênio assimilável pelo lactobacilo que seja capaz de permitir uma boa produção de células viáveis nesse meio. Segundo Krischke *et al.* (1991), o soro permeado contém proteínas de menor tamanho, além de peptídios e sais inorgânicos, como, fosfatos de cálcio, os quais se precipitam após a esterilização e o ajuste de pH. Daí a necessidade de suplementação do soro com uma fonte de nitrogênio assimilável (ROY *et al.*, 1986; ROY *et al.*, 1987 ; LUND *et al.*, 1992). Uma outra maneira de obter um meio para produção de *L. acidophilus* seria a adição, ao soro, de 0,5% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de Na_2HPO_4 e 0,3% de hexametáfosfato de sódio (KAUL & MATHÚR, 1992).

3.2 Efeito da fonte de nitrogênio no crescimento do *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20

A Figura 1 mostra o crescimento característico do *L. acidophilus* UFV H2b20 quando diferentes fontes de nitrogênio foram adicionadas, alternativamente, ao soro de queijo, da maneira como descrito no item 2.4. Pela figura observa-se que, das cinco fontes de nitrogênio testadas, a que mais favoreceu o crescimento da

célula foi a proteose peptona n. 3, com uma produção média de massa celular, representada em densidade ótica, de 2,336 (Quadro 2), quando se utilizou temperatura de 37°C. Essa produção foi estatisticamente superior à produção das demais fontes de nitrogênio testadas (com exceção do MRS), pelo teste de Tukey, em nível de 1%.

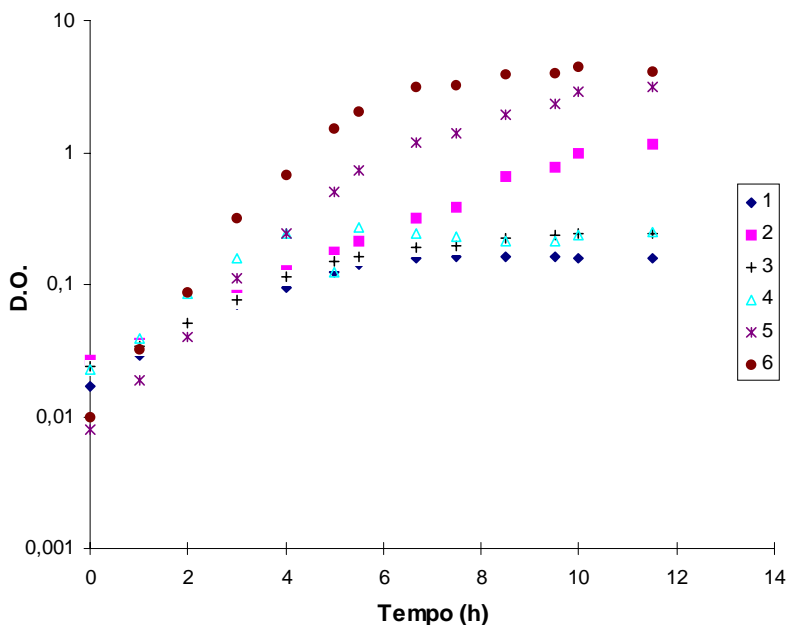


Figura 1 - Crescimento característico de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20, medido em densidade ótica (D.O.₆₃₀), em meio MRS ou soro suplementado com diferentes fontes de nitrogênio: 1 - nitrogênio básico para levedura; 2 - peptona, 3 - aminoácido de caseína, 4 - triptona, 5 - peptona n. 3 e 6 - MRS, à temperatura de 37°C.

As outras fontes de nitrogênio não apresentaram diferença estatisticamente significativa, apesar de se verificar pela Figura 1 que a peptona apresentou produção intermediária entre a proteose peptona n. 3 e as demais (aminoácido de caseína,

triptona e nitrogênio básico para levedura). O Quadro 2 mostra a produção média de massa celular, representada em densidade ótica, para todos os meios testados com 10 horas de cultivo. Foram observadas produção de $DO_{630} = 3,965$ e velocidade específica máxima de 0,921 para o MRS, enquanto a peptona n. 3, que foi a que mais se aproximou, ficou com $DO_{630} = 2,336$ e $m_{max} = 0,799$.

Quadro 2 - Densidade ótica ($D.O._{630}$) média, velocidade específica de crescimento (?) e desvio-padrão (s), com 10 horas de cultivo a 37°C, para as três fermentações realizadas em meio MRS ou soro de queijo suplementado, alternativamente, com cinco fontes de nitrogênio, utilizando-se o *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20

	D.O.	s (DO)	μ	s (μ)
N.B.L	0,080	0,054	0,307	0,119
PEPTONA	0,528	0,323	0,412	0,083
A.A.C.	0,148	0,063	0,390	0,080
TRIPTONA	0,160	0,058	0,653	0,109
PEPTONA. n ^o 3	2,336	0,428	0,799	0,061
M.R.S.	3,965	0,353	0,921	0,081

N.B.L. \Rightarrow Nitrogênio básico para levedura.

A.A.C \Rightarrow Aminoácido de caseína.

Observa-se que, de todos os meios testados, o que apresentou os melhores resultados foi o MRS, com uma produção de células, medida em densidade ótica, de 3,965. Esse valor é estatisticamente superior aos apresentados pelos demais meios testados. Apesar da superioridade do MRS, pode-se dizer que o soro suplementado com proteose peptona n. 3 apresentou bons resultados, já que a densidade ótica foi de 2,336 contra 3,965 do MRS. A velocidade específica de crescimento para o soro suplementado com proteose peptona n.3 foi de

0,7991h⁻¹, enquanto, em estudo realizado por Passos (1997), essa velocidade de crescimento ficou em $m=0,452h^{-1}$. Para o MRS, essa velocidade foi de $m=0,9206 h^{-1}$, sendo esse valor bastante próximo dos resultados encontrados por Gomes (1996), que foi de $m=1,07h^{-1}$. Com relação às demais fontes de nitrogênio, pode-se dizer que elas não foram apropriadas, já que a produção de massa celular ficou bem abaixo da atingida pelo MRS e pela proteose peptona n. 3.

Segundo o Manual da Difco, a proteose peptona n. 3 é nutricionalmente superior às demais peptonas, sendo utilizada para meio de cultivo de microrganismos exigentes. Dos 19 aminoácidos citados por Guirard (1974) como necessários aos lactobacilos, todos estão incluídos na proteose peptona n. 3. Isso permite que ela seja considerada boa fornecedora de nitrogênio na forma de aminoácidos para o *L. acidophilus*. Essa facilidade em obter nitrogênio em quantidade suficiente permite que o microrganismo se multiplique a uma velocidade específica de crescimento de 0,7991h⁻¹, bem próximo à velocidade alcançada com o MRS. Vale observar que a fonte de nitrogênio do MRS é 1% de proteose peptona n^o 3.

Ainda pelo Quadro 2, pode-se observar que três das fontes de nitrogênio testadas (nitrogênio básico para levedura, triptona e aminoácido de caseína) resultaram em densidades óticas médias muito baixas, com 10 horas, devendo-se ressaltar que a peptona levou a uma produção um pouco superior a essas fontes, porém, sem diferença estatisticamente significativa. A suplementação do soro com proteose peptona n^o 3 demonstrou que esta foi a melhor fonte de nitrogênio para o *L. acidophilus* UFV H2b20.

Quando o soro foi suplementado com nitrogênio básico para levedura, obteve-se a menor velocidade específica de crescimento ($m = 0,307 h^{-1}$), pois a célula apresentou crescimento por, no máximo, 7 horas, e depois entrou imediatamente em declínio. Para a triptona, a velocidade foi de 0,653 h⁻¹, ocorrendo um breve período de crescimento (cerca de 6 horas), porém, este foi logo encerrado, provavelmente em consequência do esgotamento da fonte de nitrogênio e, a partir daí, começou a fase de declínio. Quando se suplementou o soro com peptona,

ocorreu um aumento lento da massa microbiana ($m = 0,4121h^{-1}$), todavia, durante um tempo maior (até 11 horas), o que acabou resultando em uma maior produção de massa celular. A suplementação com aminoácido de caseína também apresentou baixos valores na velocidade específica de crescimento ($m = 0,3897h^{-1}$), e o crescimento de massa de células se encerrou após um período de 10 a 11 horas.

Verificou-se, ainda, pelo Guia de Referência da Difco, que a bacto-peptona possui uma quantidade bem menor de aminoácidos cistina, histidina, treonina e tirosina que a proteose peptona n.3. Isso pode significar que um ou alguns desses aminoácidos estejam limitando o crescimento da bactéria, já que são considerados essenciais para o *L. acidophilus*, segundo Guirard (1974). Porém, para avaliar tal fato, seria necessário um estudo que envolvesse esses aminoácidos em combinação com bacto-peptona, para poder afirmar se realmente eles tiveram alguma relação com o baixo rendimento do *L. acidophilus* UFV H2b20, quando cultivado em soro de queijo com esse tipo de peptona.

Com relação ao desempenho da bactéria em soro adicionado de triptona, observou-se, pelo Quadro 2, que uma velocidade específica de crescimento de $0,653 h^{-1}$ foi atingida, ressaltando-se que a massa celular aumentou até aproximadamente 6 horas de crescimento e, em seguida, começou a decrescer lentamente. A massa celular com 10 horas de fermentação foi de D.O. = 0,160. No Guia de Referência da Difco, observa-se que a triptona possui, em sua composição, menores teores de aminoácidos alanina, arginina, cistina e glicina que com a proteose peptona nº 3. Isso quer dizer que existe a possibilidade que a ausência de um ou mais desses aminoácidos seja limitante para o crescimento da bactéria.

A adição de aminoácido de caseína ao soro de queijo não favoreceu o desenvolvimento da bactéria, como foi observado pela baixa velocidade específica de crescimento ($m = 0,390h^{-1}$) e pela pequena formação de massa celular dada por uma D.O.=0,148. Essa fonte de nitrogênio é obtida pela hidrólise ácida da caseína, até que todo nitrogênio da caseína seja convertido para aminoácido ou outro composto de relativa simplicidade. Trata-se de um nutriente que apresenta baixo

conteúdo de cistina, glicina, triptofano e tirosina, os quais são necessários ao desenvolvimento da bactéria, havendo necessidade de se realizar testes para confirmar se foram realmente eles que causaram essa limitação de crescimento.

A suplementação do soro com nitrogênio básico para levedura permite uma velocidade de crescimento da bactéria equivalente a $m=0,307 \text{ h}^{-1}$, o que constata a influência da suplementação com essa fonte de nitrogênio.

4 RESUMO E CONCLUSÕES

A produção de células de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 foi avaliada sob vários aspectos, com relação à fermentação realizada em soro de queijo. Observou-se que, das cinco fontes de nitrogênio adicionadas ao soro, a proteose peptona nº 3 foi a que apresentou melhores resultados, atingindo uma densidade ótica de 2,336. Essa produção de massa celular é estatisticamente superior à produção atingida com as demais fontes de nitrogênio testadas (triptona, peptona, nitrogênio básico para levedura e aminoácido de caseína), exceto para o MRS, pelo teste Tukey, em nível de 1%.

Observou-se, portanto, que há necessidade de suplementação do soro ultrafiltrado com uma fonte de nitrogênio para que o *L. acidophilus* UFV H2b20 apresente um bom crescimento, atingindo populações da ordem de 10^9 UFC/ml. Dentre as fontes de nitrogênio testadas para suplementar o soro, a única que apresentou bons resultados foi a proteose peptona n. 3, que foi capaz de fornecer nitrogênio na forma assimilável para o lactobacilo, fazendo com que esse crescesse no soro ultrafiltrado e atingisse populações de 10^9 UFC/mL. Dessa maneira, concluiu-se que, para se obter a máxima produção de células vivas em soro ultrafiltrado, é necessário fazer a suplementação com proteose peptona n. 3.

AGRADECIMENTOS

À FINEP e ao CNPq pelo apoio ao projeto.

5 REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, S. M. **Comportamento do *L. acidophilus* H₂b₂₀ sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DIFCO LABORATORIES. **Difco manual.** Detroit, Edition 11th, Difco Laboratories, 862p. 1998.

GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L.; NAUYOK JUNIOR, G. F. et al. Influence of consuming nonfermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora of healthy males. **Journal Dairy Science**, v. 61, p. 1-10. 1978.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.49, n. 2, p. 377-381,1985.

GOMES, C.P. **Sistema de produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** Viçosa, MG, UFV, 1996. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

GREEN, M. L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. **Journal Dairy Research**, v.44, p. 159-188, 1977.

GUIRARD, B. The amino acid requirements of microorganisms for growth. In: LASKIN, A. J., Leschevalier, H. A. **Handbook of microbiology.** Cleveland: CRC, 1974. v. 4, p.1-19.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: BERGEY, D. H. **Bergey's manual of sistematic bacteriology.** Baltimore: Willians e Wilkins, 1986. v.2, p. 1208-1223.

KAUL, J. & MATHUR, B.N. Development and assessment of unfermented ice-cream containing *Lactobacillus acidophilus*. **Indiana Journal of Dairy Science**, v. 35, p. 267 - 274, 1992.

KLAENHAMMER, T. R. Microbiological considerations in selection and preparation of lactobacillus strains for use as dietary adjuncts. **Journal Dairy Science**, v. 65, p. 1339-1349. 1982.

Sitientibus, Feira de Santana, n.28, p.37-50, jan./jun. 2003

KRISCHKE, W.; SCHODER, M.; TROSCHE, W. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 573-578, 1991.

LUND, B.; NORDDAHL, B.; AHRING, B. Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 851 - 856, 1992.

PASSOS, L.M.L. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo ultrafiltrado e suplementado**. Viçosa, MG: UFV, 1997. 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

ROY, D.; GOULET, J.; LEDUY, A. Batch fermentation of whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.24, p. 206 - 213, 1986.

ROY, D.; GOULET, J.; LEDUY, A. Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. **J. Dairy Sci.**, v.70, p. 506, 1987.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros visando a sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, MG: UFV, 1984. 69p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SHAHANI, K. M. & AYEBO, A. D. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, p. 2448-2457. 1980.