

MEIOS ALTERNATIVOS CONSTITUÍDOS POR SUBPRODUTO DO CULTIVO DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES PARA O CRESCIMENTO DE *Lactobacillus acidophilus* E PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

Elaine Cristina Silva¹

Raquel Pedrosa Bezerra²

Ana Lúcia Figueiredo Porto³

Maria Taciana Holanda Cavalcanti⁴

RESUMO: Bactérias ácido-láticas como *Lactobacillus acidophilus* possuem grande potencial de mercado devido aos seus efeitos probióticos e no processamento de produtos lácteos. Essas bactérias também sintetizam enzimas de interesse industrial, como a β -galactosidase (lactase). No entanto, a produção em larga escala desse produto é onerosa devido à formulação do meio de cultivo, levando a busca por alternativas para substituição total ou parcial. O líquido metabólico (LM) de microrganismos fotossintetizantes pode ser uma opção devido à quantidade de vitaminas, açúcares e proteínas liberadas no meio. A reutilização do LM é interessante para a produção comercial de *L. acidophilus* por reduzir os custos e prevenir a contaminação ambiental. O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de *L. acidophilus* e a produção de β -galactosidase em meios de cultura contendo LM de microrganismos fotossintetizantes. *L. acidophilus* foi cultivada em meio convencional contendo diferentes concentrações de líquido metabólico de quatro microrganismos fotossintetizantes (*Artrhospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus* sp.) durante 72 horas, a 37 °C. A cada 24h, foram avaliados o crescimento celular e a produção da enzima β -galactosidase. No geral, os maiores crescimentos observados foram nos meios contendo 25% e 50% de

¹ Doutoranda no Programa *Strictu sensu* em Biociência Animal (PPGBA) Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife (PE), Brasil.

² Doutora em Engenharia química e de processos pela Università Degli Studi di Genova e em Ciências pela Universidade de São Paulo - USP. Docente no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife (PE), Brasil.

³ Doutora em Engenharia Química pela Universidade de Campinas. Docente Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife (PE), Brasil

⁴ Doutora em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica Faculdade de Farmácia - USP e Pós-doutora em Engenharia Biológica pela Universidade do Minho, Braga, Portugal. Docente no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal na Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Recife (PE), Brasil.

E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br

líquido metabólico após 24h de cultivo. A melhor condição observada foi com 50% do líquido metabólico de *C. vulgaris*, obtendo-se mais de 60% e 90% do crescimento celular e da produção de β -galactosidase, respectivamente, quando comparado ao meio convencional, mostrando ser um resíduo líquido alternativo na substituição parcial do meio pelo crescimento de *L. acidophilus* e produção de β -galactosidase.

PALAVRAS-CHAVE: Enzima; Líquido metabólico; Probiótico; Resíduo.

ALTERNATIVE MEANS FORMED BY BYPRODUCTS OF PHOTOSYNTHETIZING MICROORGANISM CULTURE FOR THE GROWTH OF *Lactobacillus acidophilus* AND THE PRODUCTION OF β -GALACTOSIDASES

ABSTRACT: Acid-lactic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* are highly important on the market due to their probiotic effects and processing of lactic products. These bacteria synthesize enzymes with industrial interests such as β -galactosidases (lactase). However, large-scale production of the product is expensive due to the formulation of culture medium. Consequently, alternatives for total or partial replace are important. Photosynthetic micro-organisms' metabolic liquid (ML) may be an option due to the amount of vitamins, sugars and proteins released in the medium. ML reuse is interesting for the commercial production of *L. acidophilus* to reduce costs and avoid environmental contamination. Current study evaluates the growth of *L. acidophilus* and the production of β -galactosidases in culture media with ML of photosynthetic micro-organisms. *L. acidophilus* was cultivated in a conventional medium with different concentrations of metabolic liquid of four photosynthetic micro-organisms (*Arthrospira platensis*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus* sp.) during 72 h, at 37°C. Every 24h, cell growth and enzyme β -galactosidases production were evaluated. Highest growth rates were, as a rule, reported in media with 25% and 50% of ML after a 24-h culture. Best condition comprised 50% of ML of *C. vulgaris*, with more than 60% and 90% of cell growth and β -galactosidases production, respectively, when compared to conventional medium. Results show that it may be an alternative liquid residue in the partial replacement of the medium by the growth of *L. acidophilus* and the production of β -galactosidases.

KEY WORDS: Enzyme; Metabolic liquid; Probiotics; Residues.

INTRODUÇÃO

Uma importante parte do mercado de alimentos com propriedades funcionais é representada pelos probióticos, que são microrganismos conhecidos por seus efeitos benéficos à saúde, tais como a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, inibição do surgimento de bactérias patogênicas, redução do colesterol sérico, aumento da função imune e prevenção de alguns tipos de câncer (KECHAGIA *et al.*, 2013). A maioria dos probióticos é representada pelas bactérias, dentre as quais as Bactérias Ácido-Láticas (BAL) são as mais comuns (SIRICHOKCHATCHAWAN *et al.*, 2018). Os gêneros de bactérias mais comumente usados como probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Leuconostoc* e *Bacillus* (AMARA; SHIBL, 2015).

Lactobacillus sp. é o gênero mais abundante das BAL (DA SILVA SABO *et al.*, 2014). Este microrganismo é responsável pelo acúmulo de altas concentrações de ácido lático extracelular levando à inibição e deterioração de microrganismos indesejáveis, além de favorecer no melhoramento das propriedades sensoriais de alimentos (CUI *et al.*, 2016). *Lactobacillus* sp. também tem atraído a atenção por ser fonte potencial na produção de enzimas (KIM; GILLILAND, 1983) como a β -galactosidase, tradicionalmente usada para reduzir o teor de lactose em alimentos através do processo de hidrólise e a reação de transgalactosilação em que a lactose serve como receptor de galactosil, produzindo uma série de di, tri e tetrassacarídeos chamados galactooligosacarídeos (GOS) (TORRES *et al.*, 2010).

A produção extensiva de bioprodutos de origem microbiana tem levado à busca por alternativas que minimizem os custos do processo de cultivo. As BAL, por exemplo, são microrganismos tradicionalmente fastidiosos e têm requisitos complexos de nutrientes (FITZPATRICK; OKEEFFE, 2001), tornando o meio dispendioso para a utilização industrial. Assim, alguns estudos têm mostrado que o reúso do meio de cultura para o crescimento de microrganismos pode ser uma via alternativa para reduzir o uso de água e custos com meios de cultura.

A reutilização do meio de cultura de microrganismos fotossintetizantes (MF) pode ser aplicada no crescimento de microrganismos devido à presença de compostos bioativos extracelulares (proteínas, carboidratos, vitaminas e sais minerais) que são liberados no meio durante o crescimento (FOGG, 1966; 1971). A

reutilização do líquido metabólico das microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Nannochloropsis sp.* tem sido bem-sucedida para o crescimento celular (HADJ-ROMDHANE *et al.*, 2012; LÍVANSKY *et al.*, 1996; RODOLFI *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, os microrganismos fotossintetizantes estão sendo explorados como uma fonte promissora para a produção de muitos produtos adicionados, incluindo nutrição comestível, produtos farmacêuticos e cosméticos, biocombustíveis, alimentos para animais e aquicultura, corantes naturais, etc (HAN *et al.*, 2016; GULDHE *et al.*, 2017). No entanto, apenas a biomassa de MF é processada para produtos atuais, enquanto grandes volumes de meio são inexplorados após a colheita de biomassa. O descarte indevido desse resíduo pode dar origem à poluição ambiental e ao custo de abastecimento de água (LIU *et al.*, 2016). De acordo com Yang (2011) a reciclagem do meio de cultura pode reduzir a demanda de água em 84%. Portanto, a aplicação de métodos de reciclagem motivados pela geração simultânea de produtos de alto valor a partir do meio gasto tem potencial em perspectivas comerciais e ambientais (LIU *et al.*, 2016).

O desenvolvimento de métodos econômicos que possam reduzir o custo do meio de cultura aumentará o potencial de mercado do *Lactobacillus sp.* Sendo assim, este estudo tem por objetivo avaliar o resíduo proveniente do cultivo de microrganismos fotossintetizantes no crescimento de *L. acidophilus* e produção de β -galactosidase com a redução da demanda de meio de cultura comercial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MICRORGANISMO

Lactobacillus acidophilus foi isolada do fermento lácteo comercial Biorich® e estocada em leite desnatado reconstituído (LDR) 10% e 20% de glicerol sob 4 °C de congelamento. As culturas foram reativadas por duas vezes em LDR 10% e incubadas a 37 °C durante 24h entre as reativações.

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O Líquido Metabólico (LM) de quatro microrganismos fotossintetizantes (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp., *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta*) foram cedidos pelo Laboratório de bioativos (Lactecbio) da Universidade Federal Rural de Pernambuco e misturados com meio comercial *Elliker broth* (Lactobacilli broth, HIMEDIA) em diferentes proporções, como descrito no Quadro 1. O *L. acidophilus* foi cultivado em frascos *Erlemeyer* de 125 mL, contendo 50 mL de meio de cultura, com densidade ótica inicial de 0,1 (Micronal, modelo B582), em cultivo estático a 37 °C, durante 72h. A cada 24h, foram determinadas a concentração celular em 660 nm (PARADA *et al.*, 1998) e a atividade da β -galactosidase.

Quadro 1. Meios constituídos por diferentes concentrações de LM em meio comercial

LM (%)	Meio convencional (%)
0	100
25	75
50	50
75	25
100	0

2.3 EXTRAÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

As células foram centrifugadas (8000 rpm, 10min, 4 °C), lavadas em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, ressuspendidas no mesmo tampão e sonicadas durante 6 minutos em banho de gelo (homogeneizador ultrassônico *Sonoplus*, modelo HD 2070, Alemanha). O conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para dosagem enzimática.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE β -GALACTOSIDASE

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com Nagy *et al.* (2001) modificado, onde 8,3 x 10³ mol L⁻¹ do substrato cromogênico o-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo (ONPG - Sigma Co, USA) foi dissolvido em 0,05

mol L⁻¹ tampão fosfato pH 7.0. Foram adicionados 50 µL do substrato e 50 µL da enzima em microplaca de 96 poços e incubados em estufa por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com adição de 200 µL de carbonato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e a absorbância foi determinada a 405 nm (leitor de microplaca *Bio-rad*, modelo *imark*, Japão). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 mmol de ONP por minuto.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas análises foram submetidos a tratamento estatístico para o cálculo da média e desvio padrão dos experimentos em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO DE *Lactobacillus acidophilus*

O crescimento de *L. acidophilus* nos diferentes meios de cultura está representado na Figura 1. O controle positivo com apenas o meio convencional (*Elliker Lactobacilli broth*) exibiu concentração celular máxima com D.O. igual a 3,79 em 24h (Figura 1a). Para efeitos comparativos com os demais meios, pode-se observar que os ensaios contendo LM de *C. vulgaris* apresentaram melhor desempenho frente ao sobrenadante dos demais microrganismos fotossintetizantes, obtendo D.O. igual a 2,47 com 50% de LM durante 48h (Figura 1b). Essa D.O. representa pouco mais de 60% de crescimento em relação ao meio convencional. A presença de proteínas, carboidratos e vitaminas no meio alternativo constituído por 50% de LM de *C. vulgaris* provavelmente favoreceu o crescimento celular. Segundo Richmond (2004), a morte celular de *C. vulgaris* resulta na excreção e acumulação de proteínas, aminoácidos, lipídios e polissacarídeos no sobrenadante, justificando o maior crescimento do *L. acidophilus* utilizando esse meio. No entanto, com o aumento da concentração do LM de *C. vulgaris*, menor foi a concentração do *L.*

acidophilus. Isso mostra que meio de cultura alternativo constituído com LM de *C. vulgaris* acima de 75% não é adequado para o crescimento de *L. acidophilus*.

O cultivo contendo 25% LM de *D. tertiolecta* obteve valor semelhante (D.O. = 2,4) ao obtido com 25% LM de *C. vulgaris*. No entanto, após 24h, a concentração celular reduziu no cultivo com 25% LM de *D. tertiolecta* (Figura 1c). Sugere-se que a alta salinidade no meio cultivo de *D. tertiolecta* inibiu o crescimento da bactéria. Isso pode ser observado na Figura 1c, quanto maior a concentração de LM de *D. tertiolecta*, menor foi o crescimento do *L. acidophilus*. Segundo Mishra *et al.* (2008), o gênero *Dunaliella* cresce em meio com altas concentrações salinas. A presença de sal no meio de crescimento pode afetar a membrana celular da bactéria, que por sua vez reduz o crescimento e atividade metabólica (SUNNY; ROBERTS, 2007).

Menor crescimento celular de *L. acidophilus* também foi observado nos meios contendo LM de *A. platensis* com D.O. máxima de 1,58 em 25% de concentração durante 24h (Figura 1d). O aumento da concentração de LM de *A. platensis* proporcionou diminuição da concentração de *L. acidophilus*. Estes resultados estão de acordo com Parada *et al.* (1998) quando avaliaram o crescimento de *Lactobacillus bulgaricus* em meio suplementado com LM de *Spirulina platensis* (*A. platensis*). A baixa concentração celular está associada ao alto valor de pH do meio de cultura. O valor de pH do meio aumenta com o aumento da concentração de LM (8,7 a 10,0) proporcionando menor concentração de *L. acidophilus*. Taillandier *et al.* (1996) relataram que o pH 6,0 é o mais favorável para o crescimento de *Lactobacillus*. Estresses ácido-alcalinos são considerados condições que afetam o crescimento e a sobrevivência das bactérias ácido-láticas (BUNTHOF *et al.*, 2001). Sendo assim, o alto valor de pH foi uma condição desfavorável no crescimento de *L. acidophilus* quando cultivados em meio constituído LM de *A. platensis*.

O cultivo utilizando meio de cultura contendo LM de *Scenedesmus* sp. apresentou baixa concentração celular, independente da concentração utilizada, e não foi observado crescimento celular no meio de cultura constituído apenas com LM de *Scenedesmus* sp. (Figura 1e). O gênero *Scenedesmus* libera poucas quantidades de substâncias no meio durante o crescimento (PEKTOV *et al.*, 2010), contribuindo para o menor crescimento de *L. acidophilus*. Logo, o meio se torna nutricionalmente pobre para o desenvolvimento da bactéria à medida que a

concentração do LM aumenta. De acordo com Cui *et al.* (2016) o crescimento de *L. acidophilus* é limitado quando o meio de cultura contém pouco nutriente.

Desse modo, a melhor condição para o cultivo de *L. acidophilus* em meio de cultura alternativo foi utilizando LM de *C. vulgaris*, que proporcionou maior aumento da massa celular frente os demais meios, sendo 50% a concentração adequada.

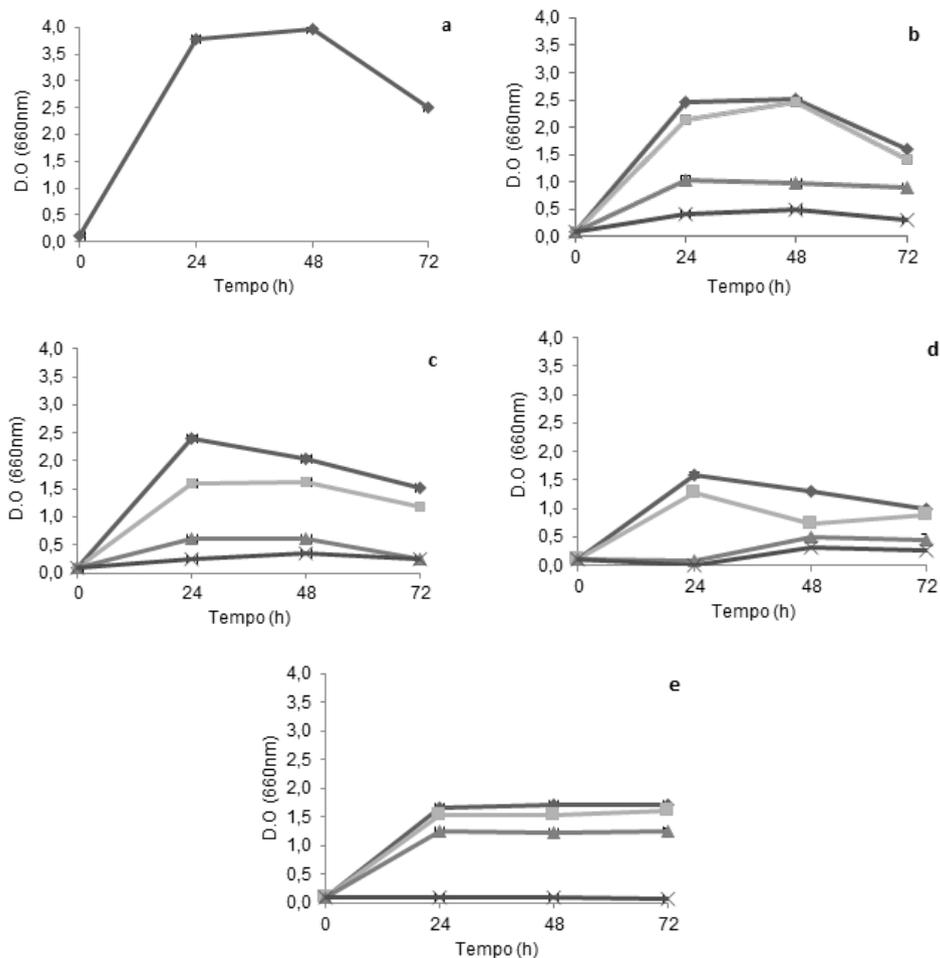


Figura 1. Crescimento de *L. acidophilus* em meio de cultura convencional, pH 6,8 (a) e meios de culturas alternativos constituídos por líquido metabólico de *C. vulgaris*, pH 7-7,5 (b), *D. tertiolecta*, pH 6,5-6,7 (c) *A. platensis*, pH 8,7-10 (d) e *Scenedesmus* sp. pH 7-7,5 (e). Valores de concentração em meio Elliker com (◆) 25%, (■) 50%, (▲) 75% e (×) 100% de LM.

3.2 PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

A produção da β -galactosidase por *L. acidophilus* nos diferentes meios de cultivo está representada na Figura 2. A produção de β -galactosidase foi utilizada como parâmetro para analisar o comportamento fisiológico da *L. acidophilus* frente à substituição do meio de cultura convencional pelos meios de cultura alternativos constituídos pelo LM dos diferentes microrganismos fotossintetizantes. A produção de β -galactosidase foi avaliada com 24h da fermentação da *L. acidophilus*, alcançando pelo controle positivo a atividade enzimática de 30,12 U/ml, obtida no meio convencional presente em todos os gráficos (Figura 2).

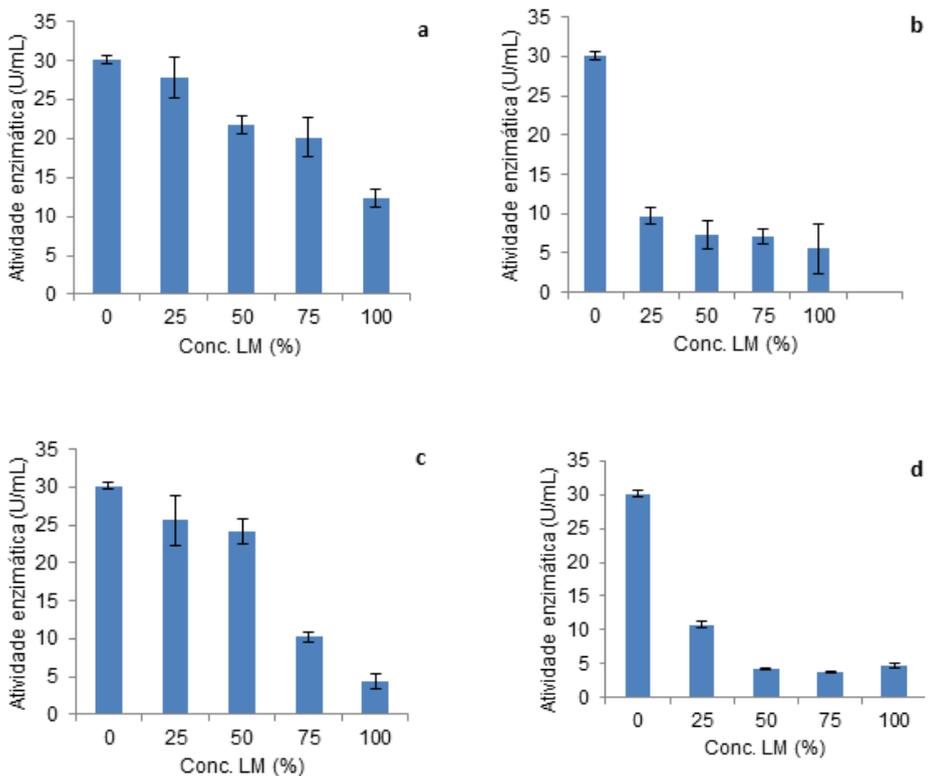


Figura 2. Atividade enzimática de β -galactosidase de *L. acidophilus* cultivada em meios alternativos contendo LM de *C. vulgaris* (a), *D. tertiolecta* (b), *A. platensis* (c) e *Scenedesmus sp.* (d).

Os maiores valores de atividade enzimática obtidos foram em meio de cultura constituído pelo LM da *C. vulgaris*, obtendo resultados próximos ao do meio de cultura convencional quando utilizando a concentração de 25% (27,83 U/mL, Figura 2a). A atividade da β -galactosidase de *L. acidophilus* diminui com o aumento da concentração do LM no meio de cultura, sendo a mínima de 12,37 U/mL em meio constituído por 100% de LM de *C. vulgaris*. No entanto, esse valor foi maior que o obtido por *Kluyveromyces marxianus* cultivado em soro de leite bovino como meio alternativo para a produção de β -galactosidase (10,4 U/mL) (BRAGA *et al.*, 2012).

A maior atividade de β -galactosidase produzida por *L. acidophilus* foi de 9,68 U/mL quando cultivada no meio alternativo constituído por LM de *D. tertiolecta*. Com o aumento da concentração do LM acima de 50%, menores foram as atividades enzimáticas (Figura 2b). Do mesmo modo como o ocorrido com o crescimento celular, a alta salinidade do meio também afetou a produção da enzima. Segundo Malakar *et al.* (2014) altas concentrações salinas inibiram a síntese e a atividade de β -galactosidase produzida por *E. coli*.

Outro fator que influencia na produção da β -galactosidase por *L. acidophilus* é o pH do meio de cultura (GANDHI *et al.*, 2014). Os meios alternativos constituídos por LM de *A. platensis* obtiveram valores de pH entre 8,7 e 10,0. No meio de cultura com 25% de LM de *A. platensis* foi obtido o menor valor de pH e maior atividade enzimática de 14,13 U/mL. O meio de cultura mais alcalino (pH = 10,0; 100% de LM da *A. platensis*) proporcionou a menor atividade da β -galactosidase (4,36 U/mL; Figura 2c). Gupte e Nair (2010) relataram que o melhor pH para produção de β -galactosidase é 5,0. Desse modo, a utilização do LM de *A. platensis* no meio de cultura proporciona um pH do meio alcalino, não sendo adequado para a produção β -galactosidase por *L. acidophilus*.

A produção da β -galactosidase em meio de cultura contendo LM de *Scenedesmus* sp. foi limitada, obtendo o maior valor de 10,75 U/ml com 25% e LM. Esse valor diminui com o aumento da concentração do LM (Figura 2d). Efeito semelhante foi observado na concentração celular do *L. acidophilus*. Poucos metabólitos são liberados no LM de *Scenedesmus* sp., o que contribuiu para a menor concentração celular e produção da β -galactosidase por *L. acidophilus*.

Joo *et al.* (2005) estimam que aproximadamente 30-40% dos custos de produção estão correlacionados com os constituintes do meio de cultura. No

presente estudo, a maior atividade enzimática obtida foi utilizando LM de *C. vulgaris*, sendo, portanto uma fonte alternativa para a produção do meio de cultura para o crescimento celular e produção de β -galactosidase por *L. acidophilus*. Altos valores de pH e salinidade diminuem o crescimento celular e produção de β -galactosidase por *L. acidophilus*, limitando o uso de LM de *A. platensis* e *D. tertiolecta* na constituição de meios de cultura alternativos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi constatado que a existência de agentes inibidores presentes nos meios contendo resíduo de *D. tertiolecta*, *Scenedesmus spp.* e *Arthrospira platensis* influenciou tanto no crescimento da bactéria quanto na produção da enzima, porém o resíduo da *Chlorella vulgaris* se mostrou promissor, principalmente na produção da β -galactosidase, por se tratar de uma enzima digestiva com uma importante aplicabilidade, como a produção de produtos livres de lactose.

O resíduo do cultivo de microrganismos fotossintetizantes ainda é algo pouco explorado, embora existam relatos de que esse material possui substâncias que podem ser reaproveitadas. Em suma, os dados apresentados aqui indicam que esse resíduo pode ter potencial para ser utilizado no cultivo de microrganismos como *L. acidophilus* e seus produtos favorecendo na redução do custo de produção bem como para um ambiente mais seguro, que de outro modo poderia ser um poluente.

5 AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Raquel Pedrosa pelo apoio e fornecimento do resíduo proveniente de estudos realizados pela sua equipe. Ao laboratório LABTECBIO (Laboratório de Bioativos) e o CENAPESQ (Centro de Apoio a Pesquisa) pelo espaço e equipamentos cedidos para o desenvolvimento do trabalho. Ao órgão de fomento FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão de bolsa de Iniciação Científica, à CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AMARA, A. A.; SHIBL, A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 23, p. 107-114, 2015.

BRAGA, A. R. C.; GOMES, P. A.; KALIL, S. J. Formulation of culture medium with agroindustrial waste for β -galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1653-1663, 2012.

BUNTHOF, C. J.; BLOEMEN, K.; BREEUWER, P.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, p. 2326-2335, 2001.

CUI, S.; ZHAO, J.; LIU, X.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, H.; CHEN, W. Maximum-biomass prediction of homofermentative *Lactobacillus*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 122, p. 52-57, 2016.

DA SILVA SABO, S.; VITOLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

FITZPATRICK, J. J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 183-186, 2001.

FOGG, G. E. The extracellular products of algae. **Oceanography and Marine Biology**, v. 4, p. 195-212, 1966.

FOGG, G. E. Extracellular products of algae in freshwater. **Archiv für hydrobiologie**, v. 5, p. 1-25, 1971.

GANDHI, A.; SHAH, N. P. Effects of salt concentration and pH on structural and functional properties of *Lactobacillus acidophilus*: FT-IR spectroscopic analysis. **International journal of food microbiology**, v. 173, p. 41-47, 2014.

GULDHE, A.; KUMARI, S.; RAMANNA, L.; RAMSUNDAR, P.; SINGH, P.; RAWAT, I.; BUX, F. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 299-315, 2017.

GUPTE, A. M.; NAIR, J. S. β -galactosidase production and ethanol fermentation from whey using *Kluyveromyces marxianus*. **NISCAIR-CSIR, India**, v. 69, p. 855-859, 2010.

HAN, F.; PEI, H.; HU, W.; JIANG, L.; CHENG, J.; ZHANG, L. Beneficial changes in biomass and lipid of microalgae *Anabaena variabilis* facing the ultrasonic stress environment. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 16-22, 2016.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTOPOULOU, K.; SKARMOUTSOU, N.; FAKIRI, E. M. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN nutrition**, 2013.

KIM, H. S.; GILLILAND, S. E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of dairy science**, v. 66, p. 959-966, 1983.

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular metabolites from industrial microalgae and their biotechnological potential. **Marine drugs**, v. 14, p. 191, 2016.

LÍVANSKY, K.; DE DIC, K.; BÍNOVÁ, J.; TICHY, V.; NOVOTNY, P.; DOUCHA, J. Influence of the nutrient solution recycling on the productivity of *Scenedesmus obliquus*, utilization of nutrients and water in outdoor cultures. **Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie**, v. 81, p. 105-113, 1996.

MALAKAR, P.; SINGH, V. K.; KARMAKAR, R.; VENKATESH, K. V. Effect on β -galactosidase synthesis and burden on growth of osmotic stress in *Escherichia coli*. **Springer Plus**, v. 3, p. 748, 2014.

MISHRA, A.; MANDOLI, A.; BHAVANATH, J. H. A. Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, p. 1093, 2008.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. **Protein expression and purification**, v. 21, p. 24-29, 2001.

PARADA, J. L.; CAIRE, G. Z.; MULÉ, M. C. Z.; CANO, M. M. S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 225-228, 1998.

PETKOV, G.; KAMBOUROVA, R.; BANKOVA, V. Extracellular substances of total bacterial flora from cultures of the green alga *Scenedesmus*. **Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences**, v. 63, p. 235-240, 2010.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Oxford: Blackwell Science**, 2004.

SIRICHOKCHATCHAWAN, W.; PUPA, P.; PRAECHANSRI, P.; AM-IN, N.; TANASUPAWAT, S.; SONTHEYANON, P.; PRAPASARAKUL, N. Autochthonous lactic acid bacteria isolated from pig faeces in Thailand show probiotic properties and antibacterial activity against enteric pathogenic bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 119, p. 208-215, 2018.

RODOLFI, L.; ZITTELLI, G. C.; BARSANTI, L.; ROSATI, G.; TREDICI, M. R. Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. **Biomolecular Engineering**, v. 20, p. 243-248, 2003.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; ANANTA, E.; KNORR, D. Flow cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. **Nutrition & Food Science**, v. 37, p. 184-200, 2007.

TAILLANDIER, P.; GILIS, F.; PORTUGAL, F. R.; LAFORCE, P.; STREHAIANO, P. Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology letters**, v. 18, p. 775-780, 1996.

TORRES, D. P.; GONÇALVES, M. D. P. F.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438-454, 2010.

YANG, J.; XU, M.; ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; CHEN, Y. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 159-165, 2011.

Recebido em: 27/07/2018

Aceito em: 07/06/2019