

## ESTUDO PRELIMINAR DA VIABILIDADE AO ARMAZENAMENTO DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*-R7 LIVRE E MICROENCAPSULADO POR SPRAY DRYING

MICHELE DUTRA ROSOLEN<sup>1</sup>; FERNANDA WEBER BORDINI<sup>2</sup>; GABRIELA DE QUADROS DA LUZ<sup>3</sup>, PATRÍCIA DIAZ<sup>4</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>5</sup>; SIMONE PIENIZ<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – michele.dutra@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – fernandawbordini@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – ql.gabi@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – bilicadiaz@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – nutrisimone@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, um número crescente de bactérias tem sido investigadas pelo seu potencial probiótico, uma vez que conferem benefícios ao hospedeiro quando administradas em quantidades adequadas. Os efeitos benéficos dos probióticos dependem da especificidade da estirpe ou espécie, da dose e da viabilidade das bactérias ingeridas (HUANG et al., 2017). O conceito de que os micro-organismos vivos associados às fermentações podem fornecer funções benéficas ao trato gastrintestinal (TGI) é consistente com a visão emergente de que os benefícios essenciais para a saúde podem ser atribuídos a uma espécie, em vez de cepas específicas (MARCO et al., 2017).

Nesse contexto, *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) é comumente associado à produtos lácteos, no entanto, esse micro-organismo foi originalmente isolado de plantas em que acredita-se que estava dormente, onde somente foi ativado quando ingerido por ruminantes, multiplicando-se após atingir o trato gastrintestinal. Originário do gênero *Streptococcus* e reclassificado em *Lactococcus* em 1985, *L. lactis* é dividido em três subespécies: *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae*. Fenotipicamente é classificado como Gram-positivo, esférico, homoláxico, não esporulado e anaeróbio facultativo (SONG et al., 2017). *L. lactis* tem sido utilizado na fermentação de alimentos, especialmente em queijos, iogurtes, chucrutes e produtos similares, tornando-o reconhecido por ser um micro-organismo dito como seguro para ser administrado em alimentos (GRAS) (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS, 2011).

Boas propriedades tecnológicas também são importantes para que probióticos sejam utilizados em produtos comerciais, como a capacidade de cultivo em escala industrial, viabilidade e estabilidade ao armazenamento, além disso, não deve conferir sabores ou odores desagradáveis (SARAO; ARORA, 2017). No entanto, ainda há problemas com respeito à baixa viabilidade de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados incluindo acidez titulável, pH, peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento e a concentração de ácido lático e acético (ANAL; SINGH, 2007). Em virtude da baixa estabilidade e fácil decomposição dos probióticos por fatores ambientais e de processamento, a microencapsulação é uma alternativa para a produção de micropartículas com alta eficiência para aplicação na indústria de alimentos (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016).

A microencapsulação é um processo utilizado para o aprisionamento de pequenas partículas líquidas, sólidas ou gasosas em uma ou mais matrizes poliméricas (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016). Diferentes BAL foram encapsuladas em diferentes polímeros e com diferentes objetivos, por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 aumentou significativamente a viabilidade ao armazenamento após 18 meses mantidos congelados em nitrogênio líquido (KAVITAKE et al., 2018); *Lactobacillus acidophilus* foi encapsulado por *spray drying* utilizando diferentes polissacarídeos e garantiu o aumento da proteção térmica e sobrevivência ao TGI (NUNES et al., 2018).

Portanto, o presente estudo tem por objetivo avaliar a viabilidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*-R7 (*L. lactis*-R7) livre e microencapsulado, utilizando como material de parede inulina e soro de queijo, em 30 dias de armazenamento em diferentes temperaturas.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Estirpe bacteriana e condições de cultivo

*L. lactis*-R7 foi isolado de queijo ricota pelo grupo de pesquisa e está depositado no GenBank sob número de acesso KF879126. Para obtenção de uma suspensão bacteriana de alta densidade o crescimento bacteriano foi realizado utilizando como meio de cultivo o soro de queijo em pó reconstituído obtido comercialmente. Para isso, uma colônia de *L. lacis*-R7 foi reativada em soro de queijo e incubada em agitador orbital a 150 rpm, 37 °C por 16 h, em condições anaeróbicas. Logo após, 3% de inóculo foi adicionado em um biorreator de bancada mantido a 37 °C por 16 h a 100 rpm, sob anaerobiose.

### 2.2 Produção de microcápsula de *L. lactis*-R7 por Spray Drying

A solução encapsulante utilizada foi composta de soro de queijo, inulina e aerosil. Para o processo de secagem utilizou-se *spray dryer* (LabMaq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros utilizados foram 100 °C de temperatura de entrada, 68 °C de temperatura de saída, com fluxo de alimentação de 0,25 L h<sup>-1</sup> e fluxo de ar de secagem 3,00 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. O produto final seco foi coletado em frascos estéreis e armazenado em diferentes temperaturas. O processo de encapsulação e subsequentes análises foram realizadas em triplicata. Foram obtidas partículas em tamanho micrométrico.

### 2.3 Viabilidade de *L. lactis*-R7 livre e microencapsulado ao armazenamento em diferentes temperaturas

A contagem de *L. lactis*-R7 livre e microencapsulado foi realizada durante o armazenamento por 30 dias a -20 ± 1 °C (congelamento), 4 ± 1 °C (refrigeração) e 25 ± 5 °C (ambiente). Para o rompimento da microcápsula utilizou-se 0,1 g do pó em 1 mL de solução salina 0,5% (m v<sup>-1</sup>) pH 2,0 contendo 3 mg mL<sup>-1</sup> de pepsina e manteve-se em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C durante 30 minutos. Para a determinação da viabilidade de *L. lactis*-R7 livre, utilizou-se 0,01 g do micro-organismo em 1 mL de água peptonada 0,15% (m v<sup>-1</sup>) estéril e homogeneizada em vórtex. A contagem das células viáveis foi determinada por diluição seriada em água peptonada 0,15% (m v<sup>-1</sup>) e alíquotas dessas diluições foram inoculadas em ágar MRS, incubadas a 37 °C por 48 h em jarras de anaerobiose, sendo a concentração

das células viáveis expressa em log UFC g<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a influência do tempo de armazenamento sobre a viabilidade de *L. lactis*-R7 livre e microencapsulado ao longo de 30 dias. Pode-se observar que ao final de 14 dias houve redução na sobrevivência de *L. lactis*-R7 livre e microencapsulado, em todas temperaturas analisadas. No entanto, a célula livre apresentou redução significativa com contagem inferior a 6 log UFC g<sup>-1</sup>, quantidade mínima necessária de bactérias probióticas para alimentos funcionais (Food and Agriculture Organisation of the United Nations and WHO Working Group, 2002). Quando analisada a microcápsula, apesar da redução inicial, esta manteve-se estável ao longo de 30 dias de armazenamento para todas as temperaturas estudadas.

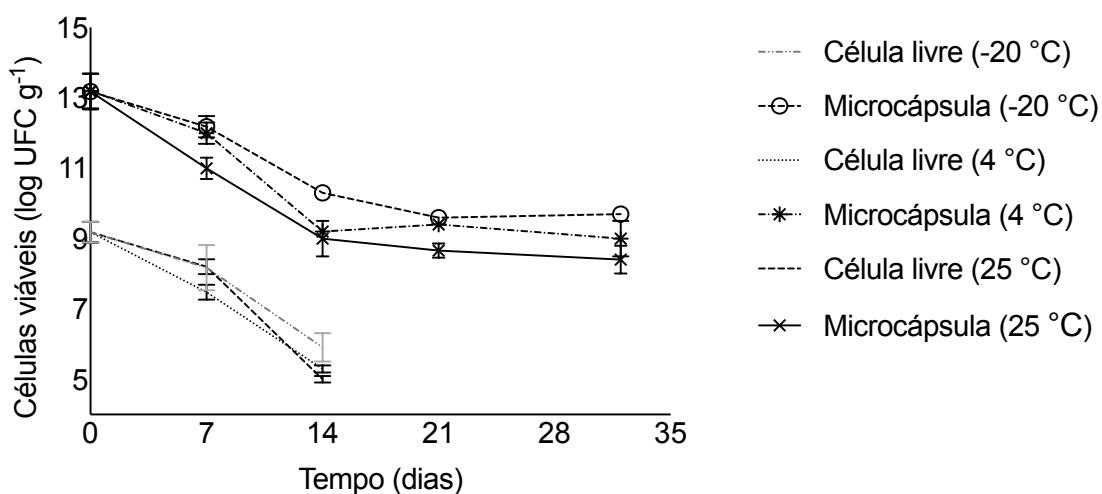


Figura 1. Viabilidade de *L. Lactis*-R7 livre e microencapsulado durante 30 dias de armazenamento nas temperaturas ambiente (25 °C), congelamento (-18 °C) e sob refrigeração (4 °C). Os resultados são mostrados como médias e desvios padrão (n=3).

Resultados semelhante ao presente estudo foi relatado por Pinto et al. (2015) que avaliaram a viabilidade ao armazenamento de microcápsulas de *Bifidobacterium*-BB-12 obtidas por spray drying nas temperaturas de -20 e 4 °C, em que referem contagens em torno de 8,5 log UFC g<sup>-1</sup> ao final de 30 dias. Cabe salientar a necessidade do desenvolvimento de novos produtos contendo probióticos viáveis à temperatura ambiente. Portanto, desenvolver técnicas que proporcionem maior estabilidade das células ao longo do tempo, sem a exigência da cadeia do frio, pode diminuir os custos e ampliar o mercado de alimentos funcionais (ECKERT et al., 2017).

### 4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados preliminares obtidos no presente estudo, conclui-se que a microencapsulação foi eficaz na proteção de *L. lactis*-R7 na manutenção da viabilidade celular ao longo de 30 dias de armazenamento nas diferentes temperaturas analisadas. Por outro lado, a célula livre não apresentou contagem probiótica a partir dos 14 dias de armazenamento em todas temperaturas avaliadas.

Cabe salientar que mais estudos estão sendo realizados a fim de compreender o efeito da microencapsulação na viabilidade celular do micro-organismo.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Probióticos : **Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas**, [s. I.], p. 1–14, 2017.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, [s. I.], v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.
- BIELECKA, M. Probiotics in Food. [s. I.], p. 413–426, 2006. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420009613.ch16>>
- ECKERT, C. et al. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. I.], v. 82, n. November, p. 176–183, 2017.
- HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. I.], v. 63, p. 1–17, 2017.
- KAVITAKE, D. et al. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. **Food Bioscience**, [s. I.], v. 21, n. June 2017, p. 34–44, 2018.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. I.], v. 44, p. 94–102, 2017.
- NUNES, G. L. et al. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of Lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. I.], v. 89, p. 128–133, 2018.
- PAPAGIANNI, M.; AVRAMIDIS, N. Lactococcus lactis as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. I.], v. 49, n. 2, p. 197–202, 2011.
- PEANPARKDEE, M.; IWAMOTO, S.; YAMAUCHI, R. Microencapsulation: a Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. **Reviews in Agricultural Science**, [s. I.], v. 4, n. 0, 2016.
- SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. I.], v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.
- SONG, A. A. L. et al. A review on Lactococcus lactis: From food to factory. **Microbial Cell Factories**, [s. I.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.
- YEUNG, T. W. et al. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: Lactococcus lactis subsp. cremoris LM0230 viability using calcium alginate beads. **Food and Function**, [s. I.], v. 7, n. 4, p. 1797–1804, 2016.