

## ESTUDO PRELIMINAR DA VIABILIDADE DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*-R7 LIVRE E MICROENCAPSULADO APLICADO EM LEITE E SUCO DE MIRTILO

**GABRIELA DE QUADROS DA LUZ<sup>1</sup>; MICHELE DUTRA ROSOLEN<sup>2</sup>; FERNANDA WEBER BORDINI<sup>3</sup>; SIMONE PIENIZ<sup>4</sup>; PATRICIA DIAZ DE OLIVEIRA<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - ql.gabi@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - michele.dutra@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - fernandawbordini@gmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - nutrisimone@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - bilicadiaz@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

*Lactococcus lactis* é uma bactéria ácido láctica, Gram-positiva comumente associada aos processos de fermentação de produtos lácteos, como queijo, iogurte, chucrute e similares. Esse micro-organismo tem a capacidade de produzir ácido para a preservação dos alimentos e conferir sabor a eles. Além de suas propriedades fermentativas, *Lactococcus lactis* apresenta características probióticas, já descritas em outros estudos, que auxiliam no combate a doenças referentes ao intestino, como inflamações e constipação (JASKULSKI, 2018; NURYSHEV et al. 2016).

Devido aos seus efeitos benéficos, a aplicabilidade de probióticos em alimentos tem sido uma alternativa na manutenção e melhoramento da microbiota intestinal. Entretanto, ainda existem diversos problemas relacionados a preservação e resistência das culturas probióticas nesses alimentos. Dentre os fatores que corroboram para a alteração na estabilidade das bactérias, estão o pH, a temperatura de armazenamento e a concentração de ácido láctico e acético (ANAL et al, 2007).

Nesse contexto, a técnica de microencapsulação de probióticos tem sido empregada com o intuito de aumentar a viabilidade celular durante o processamento e utilização em produtos comerciais, além de proporcionar uma liberação controlada das bactérias no trato gastrointestinal (SIMEONI et al, 2014). Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis*-R7) livre e microencapsulado aplicado em leite integral e suco de mirtilo durante o armazenamento sob refrigeração.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Condições de cultivo

O cultivo anaeróbio de *L. lactis*-R7 (GenBank: KF879126) foi realizado em duas etapas utilizando meio de cultivo soro de queijo (Relat - Estação, RS, Brasil) reconstituído em água destilada estéril a 6% (m.v<sup>-1</sup>) e pasteurizado (65 °C, 30 min). O inóculo foi preparado partindo-se de uma colônia reativada em soro de queijo e incubada em agitador orbital (150 rpm, 37 °C, 16 h). A fermentação foi conduzida em biorreator de bancada (cuba de 2 L) contendo 2 L de meio de cultivo e 3% de inóculo (37 °C, 16 h, 100 rpm). Após obter densidade celular de 10<sup>12</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, as células foram centrifugadas (2370 × g, 10 min, 4 °C) e o pellet lavado com PBS 1 x, ressuspensido em 100 mL de PBS, com concentração final de 13 log, mantido sob refrigeração a 4 °C.

## 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. O processo de secagem foi realizado em *spray dryer* (LabMaq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil) a 100 °C (temperatura de entrada), 68 °C (temperatura de saída), 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 de tamanho micrométrico foi coletado em frascos estéreis e armazenado. A microencapsulação e as análises foram realizadas em triplicata.

## 2.3 Preparo das matrizes alimentares

No preparo do suco de mirtilo utilizou-se 170 g de polpa comercial diluído em 330 mL de água destilada estéril adicionado de 1% de sacarose. O preparo do leite deu-se pela reconstituição de leite em pó a 10% m.v<sup>-1</sup>. As matrizes alimentares foram pasteurizadas (65 °C, 30 min), acondicionadas em frascos (100 mL) e armazenadas a 4 °C por 30 dias.

## 2.4 Adição de *L. lactis*-R7 livre e microencapsulado na matriz alimentar

Para adição da bactéria livre, utilizou-se 2 mL de inóculo, que foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm, lavado com tampão PBS 10mM, submetidas a uma nova centrifugação e o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionado ao suco de mirtilo e ao leite em pó reconstituído. O *L. lactis*-R7 microencapsulado foi adicionado na proporção de 1 g para cada 100 mL de matriz conforme preconizado pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (2002).

## 2.6 Análise de viabilidade e pH durante o armazenamento

Aliquotas foram retiradas nos períodos de armazenamento a cada 7 dias nas quais foi medido o pH e a concentração microbiana realizada por diluição seriada e plaqueamento em meio ágar MRS (37 °C, 48 h) sob anaerobiose.

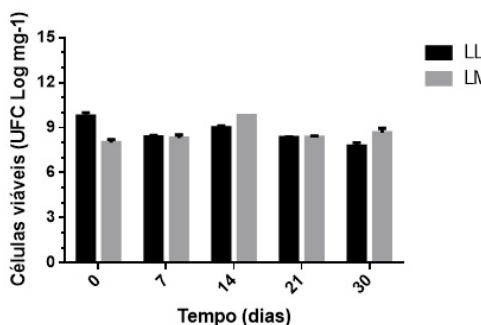
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade de *L. lactis* - R7 livre e microencapsulado em leite apresentou concentração de 7,78 e de 8,67 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, após 30 dias de armazenamento, conforme Figura 1a. Para o suco de mirtilo (Figura 1b) a viabilidade somente foi observada até o dia 7, com concentrações de 6,77 Log UFC.mL<sup>-1</sup> para livre e 8 Log UFC.mL<sup>-1</sup> para microencapsulado. Independentemente da matriz alimentar, o último dia analisado apresentou maior viabilidade nas células microencapsuladas em relação as livres.

A redução de 2 Log UFC.mL<sup>-1</sup> de *L. lactis* - R7 livre e crescimento de 0,67 Log UFC.mL<sup>-1</sup> do probiótico microencapsulado foi observada ao final de 30 dias de armazenamento em leite. Tal comportamento é esperado, conforme relatado por Özer et al. (2009) que aplicaram *Bifidobacterium bifidum* livre e microencapsulado em matriz láctea por 90 dias de armazenamento.

Molina et al. (2013) pesquisaram o comportamento de *Lactobacillus casei* livre e microencapsulado em suco de goiaba, observando redução de 5,01 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e de 1,27 Log UFC.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, em 7 dias. Tal resultado assemelha-se aos obtidos no presente trabalho, cujo *L. lactis*-R7 livre diminuiu 2,83 Log UFC.mL<sup>-1</sup> e o microencapsulado 1 Log UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 1b), no mesmo período.

a)



b)

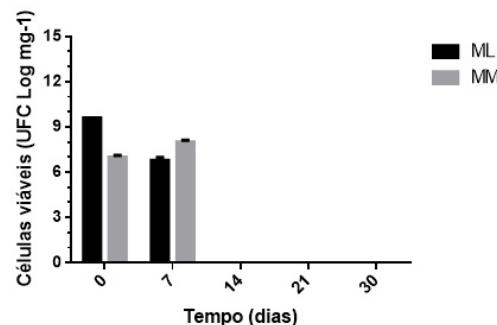
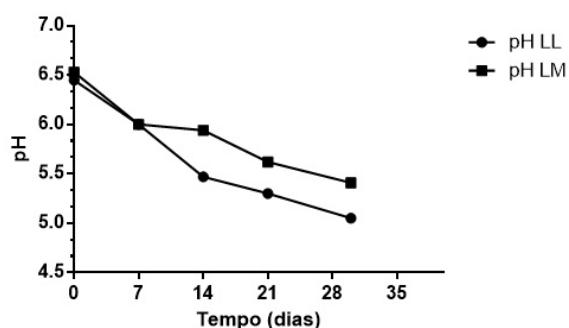


Figura 1. Concentração celular de *Lactococcus lactis* cepa R7 livre e microencapsulado nas matrizes alimentares (leite e suco de mirtilo) por 30 dias. LL – *L. lactis* livre em leite. LM – *L. lactis* microencapsulado em leite; ML – *L. lactis* livre no suco de mirtilo; MM – *L. lactis* microencapsulado no suco de mirtilo;

Comparando o pH inicial e final das matrizes alimentares utilizadas, a láctea apresentou maior declínio de pH em comparação ao suco de mirtilo. Dentro de cada matriz alimentas, o micro-organismo microencapsulado proporcionou menor redução no valor do pH (Figura 2). É possível observar uma leve acidificação da célula livre e microencapsulada na matriz láctea, onde o pH da matriz com *L. lactis* livre passou de 6,45 no dia 0 para 5,05 no final de 30 dias e de 6,53 para 5,41 no mesmo período na matriz com o probiótico microencapsulado (Figura 2a). Enquanto o pH do suco de mirtilo não apresentou alteração tanto com a célula livre quanto microencapsulada (Figura 2b).

a)



b)

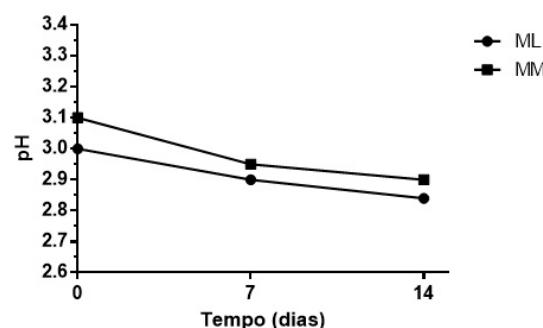


Figura 2. Variação do pH nas matrizes alimentares contendo *Lactococcus lactis* cepa R7 livre e microencapsulado por 30 dias. LL – *L. lactis* livre em leite; LM – *L. lactis* microencapsulado em leite; ML – *L. lactis* livre no suco de mirtilo; MM – *L. lactis* microencapsulado no suco de mirtilo;

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a microencapsulação foi eficiente na proteção de *L. lactis*-R7 quando inserido em uma matriz alimentar láctea, tendo em vista que ao final de 30 dias houve maior concentração de células viáveis quando comparado às células livres. Para a matriz alimentar ácida, após 7 dias ocorreu o rompimento da microcápsula e consequente declínio de viabilidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAL, A. K., & SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, 18(5), 240–251. 2007.

FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a Joint FAO/ WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canada: Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. Honduras.

JASKULSKI, I. B. **In vivo action of Lactococcus lactis subsp. lactis (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium**. 2018. 66p. Dissertation (Master in Food Science and Technology) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

MOLINA, A. V. D. L. C; RATTI, A. R. T. **Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei libre y encapsulado en alginato sódico como probiótico en jugo de guayaba**. 2013. Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieros en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura. Escuela Agrícola Panamericano, Zamorano

NURYSHEV, M.Z; STOYANOVA, L.G; NETRUSOV, A.I. New Probiotic Culture of Lactococcus lactis ssp. lactis: Effective Opportunities and Prospects. **J Microb Biochem Technol** 8: 290-295. 2016.

ÖZER, B., KIRMACI, H. A., ŞENEL, E., ATAMER, M., & HAYALOGLU, A. Improving the 485 viability of Bifidobacterium bifidum BB-12 and Lactobacillus acidophilus LA-5 in white486 brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, 19(1), 22-29. 2009.

SIMEONI, C. P; ETCHEPARE, M. A; MENEZES, C. R; FRIES. L. M; MENEZES, M. F. C; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**. v:18. Ed. Especial Mai, 2014, p 66-75.