

LEITE FERMENTADO POR *Lactobacillus* sp. H7 ADICIONADO DE *Bifidobacterium lactis* BB-12 E AMORA-PRETA: INFLUÊNCIA DA LIOFILIZAÇÃO NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DE VIABILIDADE CELULAR

PAOLA VALENTE RODRIGUES¹; CAROLINE KRAUSE BIERHALS²; HELENA SOARES VITOLA³; CLÁUDIO DOS SANTOS CRUXEN⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – paolarodrigues.sls@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolinebierhals@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – helenarsv@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cbrcruzen@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há uma crescente tendência da população por alimentos funcionais, visto que o consumo destes alimentos, podem fornecer efeitos positivos à saúde do consumidor, pela presença de compostos bioativos e de propriedades probióticas e antioxidantes (DIAS *et al.*, 2017).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, são capazes de proporcionar benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002). Na indústria de alimentos, os probióticos mais utilizados são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (VILLALOBOS *et al.*, 2020). Outrossim, juntamente com probióticos, em produtos lácteos, adicionam-se frutas, por possuírem elevado potencial antioxidante como é o caso da amora-preta, com compostos fenólicos presentes em sua composição (CROGE *et al.*, 2019), e que são ativos na regulação do metabolismo, proliferação celular, entre outros (CORY *et al.*, 2018).

Para a produção destes alimentos funcionais, é importante que a viabilidade de probióticos durante o armazenamento se mantenha. Nesse sentido a aplicação de métodos de conservação, como o processo de liofilização, são essenciais para garantir a sobrevivência destes microrganismos por longos períodos (SANTIVARANGKNA, 2015). No presente trabalho objetivou-se avaliar a influência da liofilização nas características físico-químicas e de viabilidade celular, em leite fermentado por *Lactobacillus* sp. H7 adicionado de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e polpa de amora-preta.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 2 L de leite integral UHT, 10% de sacarose e submetidos a 95 °C/5 min. Após, a mistura foi resfriada para adição de 1% de *Lactobacillus* sp. H7 (8 log UFC.mL⁻¹) isolado de kefir, com incubação em iogurteira, para fermentação do leite (pH ~ 4,5), e para interromper a fermentação, foram armazenados em refrigeração/24h. Na sequência, adicionou-se polpa de amora-preta liofilizada (4%), goma guar (0,5%) e 0,01% da cultura probiótica liofilizada *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (10 log UFC.mL⁻¹), obtendo-se o leite fermentado probiótico com amora-preta.

O leite fermentado foi separado em dois tratamentos, que foram armazenados em refrigeração por 35 dias: LF - leite fermentado no estado de gel, e

LFLR - leite fermentado, liofilizado, reconstituído (com o mesmo volume de água que foi retirada pela liofilização), antes das análises.

A determinação do valor de pH foi realizada utilizando pHmetro, e a acidez total titulável seguindo a metodologia de AOAC (1995). Para a contagem de células viáveis, homogeneizou-se 10 g de amostra em 90 mL de água peptonada (0,1%). Seguida de inoculação de 0,1 mL, a partir de diluições decimais seriadas (até 10^{-10}), em placas de Petri contendo ágar MRS (*Lactobacillus* sp. H7) e ágar MRS suplementado (0,5 g.L⁻¹ de cloreto de lítio; 0,75 g.L⁻¹ de propionato de sódio; 10 mL.L⁻¹ de cisteína 10%) para *B. lactis* Bb-12. As placas foram incubadas por 72h/37 °C, em anaerobiose para *B. lactis* Bb-12 e aerobiose para *Lactobacillus* sp. H7 (DOORES *et al.*, 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH apresentou apenas efeito principal significativo para o tempo ($p=0.008$), indicando que as operações unitárias de liofilização e de reconstituição não influenciaram no pH do leite fermentado. Em relação à acidez, houve interações entre os fatores de tratamentos (formulações x tempo) ($p=0.0435$). Na comparação entre as formulações, foi possível observar que a formulação LF apresentou acidez superior ou igual à formulação LFLR.

Islam *et al.* (2021) avaliaram propriedades tecnológicas de bactérias ácido-láticas, e obtiveram estabilidade no pH (4,54-4,56) do leite fermentado em 21 dias de armazenamento. Este resultado, corrobora com os resultados encontrados no presente estudo para LF e LFLR, que apresentaram pH entre 4,3-4,2, respectivamente. Da mesma forma, o aumento da acidez pode estar relacionado à atividade metabólica das bactérias nos alimentos, durante o armazenamento (BORGONOVÍ; CASAROTTI; PENNA, 2021).

Quanto a viabilidade, H7 e Bb-12 apresentaram interação ($p = 0.0016$) e ($p = 0.0001$), respectivamente, entre os fatores de tratamento (formulação x tempo) (Tabela 1).

Tabela 1. Viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12 em leite fermentado adicionado de amora-preta, durante armazenamento em refrigeração

Tempo (dias)	LF	LFLR
	H7	
0	8,90 ± 0,35 ^a	7,95 ± 0,12 ^b
7	8,02 ± 0,33 ^a	7,99 ± 0,31 ^b
14	7,48 ± 0,21 ^a	7,29 ± 0,09 ^a
28	7,28 ± 0,16 ^a	7,17 ± 0,13 ^a
35	7,28 ± 0,19 ^a	7,21 ± 0,06 ^a
	Bb-12	
0	9,75 ± 0,19 ^a	8,93 ± 0,06 ^b
7	8,48 ± 0,24 ^a	8,03 ± 0,08 ^b
14	7,83 ± 0,12 ^a	7,97 ± 0,23 ^a
28	7,50 ± 0,11 ^a	6,74 ± 0,30 ^b
35	7,46 ± 0,20 ^a	6,74 ± 0,17 ^b

LF = Leite fermentado; LFLR = Leite fermentado liofilizado reconstituído.

Médias \pm desvio padrão com letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste T ($p \leq 0.05$) na comparação entre os diferentes tratamentos

De acordo com Estilarte *et al.* (2021), a liofilização possibilitou a preservação e armazenamento em diferentes condições de todas as cepas avaliadas, corroborando com o presente trabalho, visto que as concentrações dos isolados *Lactobacillus* sp. H7 e *Bifidobacterium lactis* Bb-12, mantiveram-se em contagens altas e com viabilidade superior a 6 log UFC.mL⁻¹ durante os 35 dias de armazenamento para os dois tratamentos.

A influência do tempo na viabilidade de *Lactobacillus* sp. H7 e *B. lactis* Bb-12 pode ser analisada na Figura 1 A e B, respectivamente

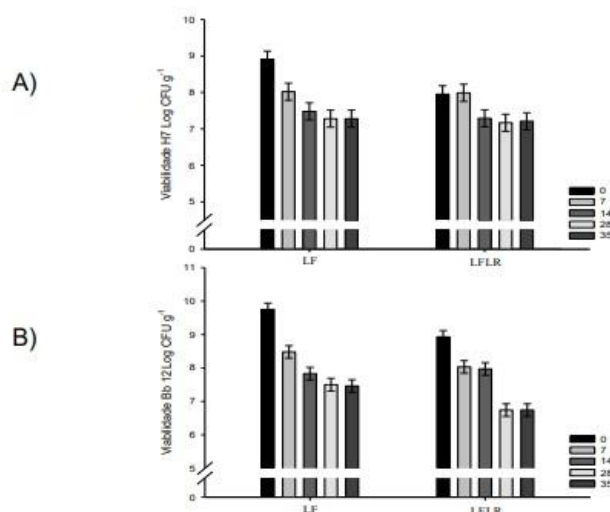


Figura 1- (A) Viabilidade ao longo do tempo de H7 (IC = 0.468) e (B) de Bb12 (IC = 0.375) em leite fermentado (LF) e em leite fermentado liofilizado reconstituído (LFLR).

Barras verticais indicam intervalo de confiança a 95% de probabilidade sendo que a não sobreposição das barras indicam diferença significativa

É possível observar que o tempo afetou a viabilidade das bactérias *Lactobacillus* sp. H7 e *B. lactis* Bb-12, reduzindo em ambas as formulações. Entretanto, esta redução não foi constante, apresentando também uma estabilidade da viabilidade em determinados períodos de tempo.

Estudos realizados por Jouki *et al.* (2021), demonstraram que a concentração de *L. plantarum* do iogurte liofilizado em pó, diminuiu durante o armazenamento, enquanto o iogurte liofilizado em pó contendo microcápsulas adicionadas de sorbitol apresentaram maior viabilidade do microrganismo, durante o armazenamento por 12 semanas. Portanto, a liofilização é um processo alternativo, que oferece alto grau de viabilidade celular, mas que requer mais estudos para o melhoramento da viabilidade e atividade dos microrganismos.

4. CONCLUSÕES

A liofilização demonstrou ser um processo viável para conservação e viabilidade das bactérias avaliadas neste trabalho, visto que, os resultados obtidos foram satisfatórios, apresentando viabilidade superior a 6 log UFC.mL⁻¹ para H7 e Bb-12, durante o período de armazenamento sob refrigeração.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16ª edição, 1995.
- BORGONOV, T.F.; CASAROTTI, S.N.; PENNA, A.L.B. *Lactocaseibacillus casei* SJRP38 and buriti pulp increased bioactive compounds and probiotic potential of fermented milk. **LWT**, v. 143, p. 111-124, 2021.
- CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTE, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Frontiers In Nutrition**, v. 5, n. 87, p. 1-9, 2018.
- CROGE, C.P.; CUQUEL, F.L.; PINTRO, P.T.M.; BIASI, L.A.; BONA, C.M. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Compounds of Blackberries Produced in Different Climates. **Hortscience**, v. 54, n. 12, p.2209-2213, 2019.
- DIAS, D.R.; BOTREL, D.A.; FERNANDES, R.V.B.; BORGES, S.V. Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 31–37, 2017.
- DOORES, F.; SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L.; WILCKE, B.W. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. Ed. APHA American Public Health Association, 2015.
- ESTILARTE, M.L.; TYMCZYSZYN, E.E.; SERRADELL, M.A.; CARASI, P. Freeze-drying of *Enterococcus durans*: Effect on their probiotics and biopreservative properties. **LWT**, v. 137, p. 110496, 2021.
- FAO/WHO. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina 2002
- ISLAM, M.Z.; UDDIN, M.E.; RAHMAN, M.T.; ISLAM, M.A.; HARUN-UR-RASHID, M. Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk:Assessment of probiotic potential and technological properties. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106532, 2021.
- JOUKI, M.; KHAZAEI, N.; REZAEI, F.; TAGHAVIAN-SAEID, R. (2021). Production of synbiotic freeze-dried yoghurt powder using microencapsulation and cryopreservation of *L. plantarum* in alginate-skim milk microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 122, p. 105-133, 2021.
- SANTIVARANGKNA, C. **Advances in Probiotic Technology**. CRC Press: Boca Raton, 2015.
- VILLALOBOS, J.A.M.; ZAMORA, J.M.; BARBOZA, N.; GARBANZO, C.R.; USAGA, J.; SOLANO, M.R.; SCHROEDTER, L.; WIDDRAT, A.O.; GÓMEZ, J.P.L. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 23, 2020.