



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

COMPORTAMENTO DE CULTURAS DE BIFIDOBACTÉRIAS NA PRESENÇA DE HIDROLISADO PROTEICO DE SORO DE LEITE

J. O. Correia¹, F. C. Alonso Buriti¹, L. O. L. Rosa², L. M. Cabral³,
K. M. O. dos Santos³, C. Mellinger Silva³

¹ Universidade Estadual da Paraíba, Departamento de Farmácia, Rua Juvêncio Arruda s/n – CEP: 58429-500 – Campina Grande PB – Brasil, Telefone: (83) 3315-3360 – Fax: (83) 3315-3352 – e-mail: joyceana@live.com, flaviaca0123@gmail.com

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Av. Athos da Silveira Ramos, 149, Bl. A, 7º Andar – CEP: 21941-909 – Rio de Janeiro RJ – Brasil, Telefone: (21) 3938-7260 – e-mail: ozorio@gmail.com

³ Embrapa Agroindústria de Alimentos, Avenida das Américas, 29501, CEP: 23020-470 – Rio de Janeiro RJ – Brasil, Telefone: (21) 3622-9600 – Fax: (21) 3622-9713 – e-mail: caroline.mellinger@embrapa.br, lourdes.cabral@embrapa.br, karina.dos-santos@embrapa.br

RESUMO – O comportamento de *Bifidobacterium bifidum* CCT7603, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 e *Bifidobacterium logum* BLG301 foi avaliado na presença de hidrolisado proteico de soro de leite (HPS) em duas etapas. Inicialmente, foram testadas duas concentrações de caldo MRS (30,25 mg/mL e 60,50 mg/mL) com HPS de 0,001 mg/mL a 1 mg/mL. Posteriormente, foi utilizado o caldo MRS (30,25 mg/mL) com HPS de 0,01 mg/mL a 10 mg/mL. Na primeira etapa, uma tendência de estímulo da multiplicação com o aumento da concentração de HPS foi observado apenas para as culturas CCT7603 (até 0,1 mg HPS/mL) e BLG301 (até 0,01 mg HPS/mL). Na segunda etapa, valores duas vezes mais altos de absorvância na presença de HPS (até 1 mg/mL) foram obtidos para a cultura CCT7603 em comparação ao controle. A concentração de 10 mg HPS/mL foi inibitória. Considerando as duas etapas, apenas CCT7603 foi aparentemente estimulada pelo HPS até 1 mg/mL.

ABSTRACT – The behavior of *Bifidobacterium bifidum* CCT7603, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 and *Bifidobacterium logum* BLG301 in the presence of whey protein hydrolysate (WPH) was evaluated in two steps. Initially, two MRS broth concentrations (30.25 mg/mL and 60.50 mg/mL) were tested with WPH from 0.001 mg/mL to 1 mg/mL. Subsequently, the MRS broth (30.25 mg/mL) was tested with WPH from 0.01 mg/mL to 10 mg/mL. In the first stage, a trend of growth promotion with increasing WPH concentration was only observed for CCT7603 (up to 0.1mg WPH/mL) and BLG301 (WPH to 0.01 mg/mL) cultures. In the second step, two-fold higher absorbance values were obtained for CCT7603 culture in the presence of WPH (up to 1.0 mg/mL) compared to the control. The WPH concentration of 10 mg/mL was inhibitory. Considering the two steps, it seems that the WPH up to 1 mg/mL promoted only the growth of CCT7603 culture.

PALAVRAS-CHAVE: *Bifidobacterium*; culturas probióticas; estímulo da multiplicação; hidrolisado proteico de soro.

KEYWORDS: *Bifidobacterium*; probiotic cultures; growth promotion; whey protein hydrolysate.



1. INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal humano é colonizado por microrganismos logo após o nascimento. Em recém-nascidos, o modo como a microbiota intestinal se desenvolve está ligado diretamente à alimentação: nos que consomem leite materno são verificadas quantidades baixas de bactérias patogênicas que são inibidas por fatores imunológicos do leite. Ao longo da vida do hospedeiro, a microbiota intestinal irá atuar de diversas maneiras, seja influenciando o metabolismo de produtos alimentícios, provendo fatores de crescimento essenciais, protegendo contra infecções por microrganismos patogênicos, ou reforçando os mecanismos de defesa do organismo, entre outras atividades (Santos e Varavallo, 2011).

Tendo sido demonstrada a importância da microbiota intestinal, estratégias têm sido elaboradas para manipular as populações bacterianas do trato digestório visando melhorar a saúde dos indivíduos. Desta forma, o interesse por alimentos probióticos tem aumentado, uma vez que estes ampliam as possibilidades de promover o equilíbrio das bactérias do trato gastrointestinal. Produtos probióticos contêm microrganismos vivos que, se administrados adequadamente, podem resultar em benefícios ao hospedeiro. O principal objetivo desses produtos é elevar a população e a atividade dos microrganismos intestinais trazendo benefício à saúde (Santos e Varavallo, 2011).

As bifidobactérias são bactérias Gram positivas anaeróbicas que estão presentes no trato gastrointestinal humano e são consideradas benéficas à saúde (Oda et al., 2013). Cepas de bifidobactérias são reconhecidas como probióticos (Saad et al., 2011), sendo utilizadas em produtos farmacêuticos e alimentícios, principalmente alimentos infantis, leites fermentados e outros produtos lácteos. As características de multiplicação, bem como a tolerância às condições ácidas, aos sais biliares e a metabólitos tóxicos são importantes para a seleção de cepas probióticas, uma vez que devem ser resistentes aos processos de preparo do alimento, durante o tempo de estocagem e durante a exposição ao ácido estomacal após ingestão. As espécies de bifidobactérias mais utilizadas como probióticos em alimentos lácteos são *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium longum*, por apresentarem melhor desenvolvimento nesses produtos (Mazo et al., 2009).

Portanto, além de possuir boa viabilidade no intestino, esses microrganismos precisam apresentar propriedades tecnológicas específicas que sejam compatíveis com os produtos em que serão incorporados. A escolha adequada da cultura probiótica varia de acordo com a matriz alimentícia, devendo-se evitar uma interação indesejável cepa probiótica-veículo (Saad et al., 2011). As bifidobactérias geralmente inseridas em alimentos lácteos podem perder a viabilidade após exposição ao ácido, ao oxigênio e estocagem refrigerada. Outros fatores podem impedir a multiplicação das mesmas, por exemplo, os aditivos alimentares (adoçantes, compostos aromáticos, agentes flavorizantes, corantes, natamicina) (Mazo et al., 2009).

Peptídeos e aminoácidos podem atuar como fatores de crescimento necessários para manter a viabilidade de bactérias probióticas em alimentos. Complementarmente, peptídeos oriundos da alimentação podem ser utilizados pelos probióticos para multiplicação no intestino (Saad et al., 2011). O hidrolisado proteico de soro de leite apresenta aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular em sua composição e tem sido utilizado para fins nutricionais em doenças ou outras condições clínicas em que é exigido para a absorção intestinal dos aminoácidos (Pacheco et al., 2005). Nesse sentido, o uso do hidrolisado proteico de soro de leite na elaboração de alimentos contendo bifidobactérias pode aumentar a viabilidade desses microrganismos no produto, bem como contribuir para que estes colonizem e se multipliquem no intestino.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o comportamento de culturas de bifidobactérias em meio contendo diferentes concentrações de hidrolisado proteico de soro de leite, visando escolher a cultura mais apropriada para uso em alimento contendo este ingrediente.



2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção do hidrolisado e preparo das culturas de bifidobactérias

O hidrolisado proteico de soro de leite (HPS) utilizado neste estudo foi produzido pela Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ) e enviado para o Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos da Universidade Estadual da Paraíba. O HPS foi armazenado sob congelamento (-18°C) até o uso nos ensaios de multiplicação de bifidobactérias, realizados segundo a metodologia adaptada de Oda et al. (2013).

Para estes ensaios foram utilizadas as culturas *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 (Fundação André Tosello, Campinas, Brasil), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca) e *Bifidobacterium logum* BLG301 (Granotec, Curitiba, Brasil). Previamente aos ensaios, as culturas foram multiplicadas por 24 h em anaerobiose, a 37°C, em caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, EUA), preparado de acordo com as instruções do fabricante e suplementado com L-cisteína (L-cysteine hydrochloride monohydrate, Merck, Darmstadt, Alemanha, 0,05 g/100 g). Para utilização nos ensaios, as culturas de 24 h foram diluídas em caldo MRS para obtenção de valores de absorvância a 630 nm entre 0,500 e 1,000.

2.2. Avaliação do comportamento das culturas de bifidobactérias na presença de hidrolisado proteico de soro

Primeira etapa: Na primeira etapa foram testadas duas concentrações de caldo MRS nos ensaios com hidrolisado. O caldo A foi preparado com MRS de acordo com as instruções do fabricante (30,25 mg/mL) e suplementado com L-cisteína (0,05 g/100 g). O caldo B foi preparado com MRS utilizando o dobro da concentração recomendada pelo fabricante (60,50 mg/mL) e suplementado com L-cisteína (0,1 g/100 g). Para os ensaios desta etapa foram utilizadas quatro diluições de HPS em água destilada (0,0025 mg/mL, 0,025 mg/mL, 0,25 mg/mL e 2,5 mg/mL). A solução mãe (2,5 mg/mL) foi filtrada em membrana de 0,22 µm e as demais foram obtidas por diluição decimal seriada com água destilada estéril. As culturas com absorvância entre 0,5 a 1,0 foram diluídas a 2% para a realização dos ensaios. Uma alíquota de 10 µL de cada cultura foi adicionada de 80 µL de solução de hidrolisado e 110 µL de caldo MRS (A ou B) para incubação em anaerobiose a 37°C por 24 h. Após a incubação, os ensaios foram lidos, em microplaca, em comprimento de onda de 630 nm utilizando leitora de microplaca TP-Reader (Thermo Plate, Shenzhen, China).

Segunda etapa: Na segunda etapa foram testadas quatro diluições de HPS em água destilada (0,025 mg/mL, 0,25 mg/mL, 2,5 mg/mL e 25 mg/mL). Foi utilizada uma única concentração de caldo MRS, a formulação A, preparada de acordo com as instruções do fabricante e suplementada com L-cisteína (0,05 g/100 g). As culturas com absorvância entre 0,5 a 1,000 foram diluídas a 2% para a realização dos ensaios desta etapa, em duplicata. Uma alíquota de 50 µL de cada cultura foi adicionada de 200 µL de solução de hidrolisado e 250 µL de caldo MRS para incubação em anaerobiose a 37°C por 24 h. Após a incubação, os resultados foram lidos em comprimento de onda de 630 nm utilizando TP-Reader (Thermo Plate). Foram obtidas três leituras de cada replicata, sendo utilizada a formulação de caldo A como branco, em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO



Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para os ensaios da primeira etapa. De modo geral, observa-se que houve maior multiplicação dos microrganismos no caldo A (caldo MRS na concentração do fabricante). A maior absorvância foi obtida para a cultura CCT7603 utilizando o caldo A adicionado de HPS na concentração de 0,1 mg/mL. No entanto, uma tendência de estímulo da multiplicação de bifidobactérias no caldo A com o aumento da concentração de hidrolisado proteico foi observado apenas para a cultura CCT7603 (até 0,1 mg de hidrolisado/mL) e BLG301 (até 0,01 mg de hidrolisado/mL). Para a cultura BB12 a maior absorvância foi obtida para o caldo B com o hidrolisado na concentração de 0,1 mg/mL. No entanto, para esta cultura, não houve uma tendência clara de aumento da absorvância com o aumento da concentração de hidrolisado, já que uma queda na absorvância (0,043) foi obtida na concentração de 0,01 mg/mL, cujo resultado é comparável à absorvância obtida para esta cultura, no mesmo caldo (B), na ausência de hidrolisado (0,045).

Tabela 1 – Valores de absorvância a 630 nm obtidos para os caldos A e B com diferentes cepas de bifidobactérias e concentrações de hidrolisado proteico de soro após 24 h de incubação em anaerobiose.

Caldo	Amostras	Hidrolisado proteico de soro (mg/mL)				
		0	0,001	0,01	0,1	1
A	CCT 7603	0,182	0,139	0,171	0,289	0,209
	BB12	0,125	0,111	0,016	-0,011	-0,137
	BLG301	0,054	0,066	0,152	0,121	0,056
B	CCT 7603	0,06	0,157	0,089	0,199	0,133
	BB12	0,045	0,108	0,043	0,159	-0,115
	BLG301	-0,017	0,003	0,004	0,041	-0,028

* CCT7603 = *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 (Fundação André Tosello, Campinas, Brasil); BB12 = *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca); BLG301 = *Bifidobacterium longum* BLG301 (Granotec, Curitiba, Brasil).

Devido à melhor multiplicação no caldo A para duas das culturas testadas (CCT7603 e BLG301), estes resultados serviram de base para a elaboração da segunda etapa (utilizando apenas o caldo A), aumentando a concentração final de hidrolisado (10 mg/mL). Os resultados da segunda etapa estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de absorvância a 630 nm (média ± desvio padrão)* obtidos para o caldo A com diferentes cepas de bifidobactérias e concentrações de hidrolisado proteico após 24 h de incubação em anaerobiose.

Amostras	Hidrolisado proteico de soro (mg/mL)				
	0	0,01	0,1	1,0	10,0
CCT7603	0,120 ± 0,072	0,248 ± 0,020	0,217 ± 0,067	0,208 ± 0,049	0,101 ± 0,101
BB12	0,366 ± 0,060	0,250 ± 0,117	0,281 ± 0,023	0,161 ± 0,014	0,232 ± 0,046
BLG301	0,206 ± 0,044	0,209 ± 0,032	0,168 ± 0,080	0,241 ± 0,022	0,043 ± 0,034

* Obtidos a partir de ensaios realizados em duplicata e três leituras para cada replicata, totalizando 6 leituras para cada ensaio.



** CCT7603 = *Bifidobacterium bifidum* CCT7603 (Fundação André Tosello, Campinas, Brasil); BB12 = *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Dinamarca); BLG301 = *Bifidobacterium logum* BLG301 (Granotec, Curitiba, Brasil).

De modo similar ao observado na primeira etapa para a cultura CCT7603, valores duas vezes mais altos de absorvância na presença de HPS (nas concentrações de 0,01 a 1,0 mg/mL) foram obtidos para a cultura CCT7603 em comparação à absorvância igual à 0,120 do ensaio controle desta cultura sem hidrolisado. Na segunda etapa, o valor mais alto de absorvância para esta cultura (0,248) foi obtido usando o hidrolisado proteico na concentração de 0,01 mg/mL, enquanto que na primeira etapa, considerando o mesmo caldo, a maior absorvância foi obtida para o hidrolisado na concentração 0,1 mg/mL. Por outro lado, a concentração de 10 mg de HPS/mL mostrou efeito inibitório sobre a cultura CCT7603, uma vez que a média do valor de absorvância de 0,101 foi próxima da obtida para o ensaio controle.

Para a cultura BB12 o valor mais alto de absorvância foi registrado na ausência de HPS, o que evidencia uma tendência de efeito inibitório da presença do hidrolisado com a utilização do caldo A, resultado semelhante ao obtido na primeira etapa deste estudo para esta cultura (Tabela 1). Essa tendência de efeito inibitório gerada pela suplementação com HPS pode ser justificada por características da cultura BB12 que, durante o armazenamento e, especialmente quando incorporada a produtos lácteos, apresenta alta estabilidade e viabilidade, independentemente dos demais ingredientes utilizados nas formulações dos produtos alimentícios (Saad et al., 2011).

Considerando a cultura BLG301, apesar da maior absorvância (0,241) ter sido verificada nesta etapa para a concentração de HPS de 1,0 mg/mL, não foi possível obter evidência de que tal concentração estimule a multiplicação desta cepa, uma vez que na primeira etapa, a viabilidade do microrganismo diminuiu na presença da mesma concentração de hidrolisado. A viabilidade da cultura BLG301 utilizando o concentrado proteico no intervalo de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL na segunda etapa foi semelhante à obtida na primeira etapa para o caldo A. No entanto, nesta segunda etapa, a absorvância da cultura BLG301 foi elevada mesmo na ausência de hidrolisado proteico, sendo comparável à obtida para a concentração de 0,01 mg/mL de hidrolisado. Além disso, uma redução acentuada da viabilidade deste microrganismo foi observada com o uso de 10 mg/mL de hidrolisado proteico de soro, sugerindo uma atividade inibitória do hidrolisado nesta concentração, semelhante ao verificado para a cultura CCT7603.

4. CONCLUSÕES

O aumento da absorvância observado para a cultura *B. bifidum* CCT7603 na presença de 0,001 mg/ml e 1 mg/ml de hidrolisado proteico de soro no caldo A, em comparação ao controle, sugere o possível estímulo deste ingrediente sobre esta cepa, diferentemente dos demais microrganismos analisados. É possível que este estímulo tenha relação com o fato da cepa CCT7603 não ser comercialmente produzida como cultura láctica para aplicação em alimentos podendo, desta forma, se beneficiar da suplementação nutricional adicional oferecida pelo HPS, contribuindo para o aumento de sua viabilidade. Por outro lado, a concentração de 10 mg/ml de HPS foi inibitória para as culturas CCT7603 e BLG301, e verificou-se uma tendência de efeito inibitório sobre a cultura BB12 a partir da menor concentração do hidrolisado. Novos estudos com as mesmas e outras culturas de bifidobactérias são necessários para dar suporte aos resultados obtidos e gerar informações adicionais sobre o efeito deste ingrediente na multiplicação destes microrganismos benéficos à saúde humana.

5. AGRADECIMENTOS



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária pelo auxílio financeiro, bem como ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA/UEPB) e à Embrapa Algodão - CNPA pela colaboração nas análises do presente estudo. Os autores também agradecem à empresa BioCamp pela cessão da cultura CCT7603 à pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Mazo, J. Z., Ilha, E. C., Arisi, A. C., & Sant'anna, E. S. (2009). Bifidobactérias: isolamento, identificação e aplicação em alimentos probióticos. *Boletim CEPPA*, 27(1), 119-134.

Oda, H., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Sato, T., Xiao, J., Abe, F., & Watsuki, K. (2013). Isolation of a bifidogenic peptide from the pepsin hydrolysate of bovine lactoferrin. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6), 1843–1849.

Pacheco, M. T. B., Dias, N. F. G., Baldini, V. L. S., Tanikawa, C., & Sgarbieri, C. (2005). Propriedades funcionais de hidrolisado obtidos a partir de concentrados proteicos de soro de leite. *Ciência Tecnologia Alimentos*, 25(2), 333-338.

Saad, S. M. I., Cruz, A. G., Faria, & J. A. F. (2011). Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela.

Santos, R. B., Barbosa, L. P. J. L., & Barbosa, F. H. F. (2011). Probióticos: microrganismos funcionais. *Ciência Equatorial*, 1(2), 28-38.

Santos, T. T., & Varavallo, A. M. (2011). A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. *Revista Científica do ITAP*, 4(1), 40-49.