

Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* 1127 e *Lactobacillus plantarum* 270, Liofilizados Após Fermentação em Leite Caprino

Samuel Carneiro de Barcelos¹
Georgia Maciel Dias Moraes²
Karina Olbrich dos Santos³
Antônio Sílvio do Egito³

¹Discente do IFCE – *Campus* Sobral, Bolsista PIBIC/CNPq/Embrapa.

²Doutoranda da Rede Nordeste de Biotecnologia RENORBIO/Docente do IFCE – *Campus* Sobral. georgiamoraes@yahoo.com.br

³Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral – CE.

Resumo

O uso industrial de lactobacilos como culturas iniciadoras para a indústria de alimentos depende de tecnologias de preservação necessárias para garantir a entrega de culturas estáveis em termos de atividade, viabilidade e funcionalidade. Métodos de congelamento e liofilização têm sido utilizados para este fim, mas estas técnicas podem resultar em efeitos indesejáveis como a desnaturação de proteínas sensíveis. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* 1127 e *Lactobacillus plantarum* 270 liofilizados em leite de cabra fermentado, submetidos a diferentes temperaturas de armazenamento, visando a produção de fermentos lácteos para uso em produtos fermentados. As cepas bacterianas foram cultivadas em leite de cabra desnatado, que foi liofilizado e armazenado a temperatura ambiente (37°C) e a -26°C. A viabilidade de ambas as cepas no produto liofilizado foi satisfatória em ambas as temperaturas testadas pois durante o período de armazenamento de 90 dias, os microrganismos apresentaram-se viáveis em concentração superior a 9 log UFC/mL após reativação em leite. Desta forma pode-se concluir que o leite de cabra fermentado pode ser utilizado como crioprotetor durante a liofilização das cepas 1127 e 270, bem como o armazenamento do fermento liofilizado pode ser realizado a temperatura ambiente ou de congelamento, por 90 dias.

Palavras-chave: Bactérias probióticas; sobrevivência; fermento láctico

1. Introdução

As bactérias lácticas tem sido largamente estudadas em virtude de sua aplicabilidade como culturas iniciadoras (*starters*) em diversos produtos fermentados. O uso industrial de lactobacilos como culturas iniciadoras para a indústria de alimentos depende de tecnologias de preservação necessárias para garantir a entrega de culturas estáveis em termos de atividade, viabilidade e funcionalidade (1). Métodos de congelamento e liofilização têm sido

utilizados para este fim, mas estas técnicas podem resultar em efeitos indesejáveis como a desnaturação de proteínas sensíveis (2).

Muitos compostos têm sido testados para melhorar a viabilidade e sobrevivência de bactérias lácticas durante a liofilização. Os crioprotetores agem diminuindo o ponto de congelamento do sistema e reduzem a quantidade e o tamanho dos cristais de gelo durante a redução da temperatura, contribuindo para a proteção física das membranas celulares e impedindo o aumento da concentração do produto no congelamento (3). Para tanto o meio no qual o fermento será liofilizado deverá ser testado, pois cada microrganismo possui um comportamento frente aos diferentes crioprotetores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* 1127 e *Lactobacillus plantarum* 270 liofilizados em leite de cabra fermentado após armazenamento em diferentes temperaturas, visando a produção de novos fermentos lácticos.

2. Metodologia

Para a realização do experimento foram selecionadas as cepas *Lactobacillus rhamnosus* 1127 e *Lactobacillus plantarum* 270, isoladas de leite e queijos artesanais do Vale do Jaguaribe (Ceará), que fazem parte da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agroindústria Tropical, da Embrapa. As atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos (LCTA) da Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral - CE.

Para a produção do fermento, a cepa foi ativada em caldo MRS (Oxoid) com incubação a 37°C por 24h. Em seguida transferiu-se 100 µl da cultura ativada para 10mL de caldo MRS, seguida de incubação a 37°C por 20h. O material foi centrifugado a 10.000rpm durante 15min em centrífuga refrigerada (4°C) (Eppendorf, 5810 R) e o *pellet* obtido foi lavado em 10ml de solução salina a 0,85% e centrifugado sob as mesmas condições. O *pellet* foi então inoculado em 100ml de leite de cabra desnatado (0,5%), previamente pasteurizado a 90°C/15 min e incubado a 37°C/24h. Os leites fermentados com as cepas 1127 e 270 foram acondicionados em porções de 10ml, congelados em nitrogênio líquido (-180°C) e liofilizados (Liofilizador de bancada Enterprise I, Terroni®) durante 48 horas. Os fermentos liofilizados foram armazenados durante 90 dias a -26°C e 37°C.

Para avaliar a viabilidade dos microorganismos, suspendeu-se o fermento liofilizado em 40 ml de leite pasteurizado e submeteu-se à incubação a 37°C por 24h. Em seguida realizou-se diluições decimais do produto, seguida de semeadura em profundidade em MRS

ágar (Oxoid®) acidificado a pH 5,4 com ácido acético glacial. Procedeu-se com a incubação das placas em anaerobiose (Sistema de Anaerobiose Anaerogen, Oxoid®) a 37°C por 24h.

3. Resultados e Discussões

A concentração de células viáveis no leite após a liofilização (dia 1) e depois de 90 dias de armazenamento em diferentes temperaturas é apresentada na tabela 1. Verificou-se que a viabilidade dos fermentos lácteos liofilizados foi satisfatória, pois após o período de armazenamento de 90 dias em ambas as temperaturas testadas, os microrganismos apresentaram-se viáveis, atingindo contagens superiores a 9 log UFC/ml após reativação em leite.

Tabela 1 - Populações de *L. rhamnosus* 1127 e *L. plantarum* 270 durante 90 dias de armazenamento a 37°C e -26°C.

Tempo (dias)	Viabilidade (log UFC/ml)			
	1127 (37°C)	270 (37°C)	1127 (-26°C)	270 (-26°C)
1**	8,98	8,92	8,98	8,92
90	9,01	9,15	9,32	9,71

** Análise realizada após a ativação e fermentação em leite de cabra a 37°C/24h.

Os fermentos preparados com base na fermentação do leite e liofilização da base fermentada favoreceram a manutenção da viabilidade dos microrganismos durante todo o período de armazenamento. Embora (5) afirmem, em seu trabalho, que culturas liofilizadas possuem mais viabilidade se, durante o armazenamento, forem submetidas a microencapsulação ou imobilizada em polímeros, os resultados aqui apresentados para a temperatura ambiente foram superiores, em média 1 log, aos encontrados pelos autores ao avaliarem *L. rhamnosus* R011 liofilizados com adição de polímeros gelatina, maltodextrinas e goma xantana armazenados a 20°C, durante 12 meses. Embora o período de estocagem avaliado no presente trabalho tenha sido bastante inferior, os resultados obtidos indicam que o uso do leite propicia uma adequada manutenção da viabilidade das cepas estudadas.

A sobrevivência de um microrganismo é influenciada pela espécie e não de forma generalizada pelo polímero utilizado como crioprotetor (5). Esta afirmação fortalece a recomendação de se avaliar o crioprotetor mais eficaz para cada microrganismo a ser liofilizado.

Com base nos resultados, é possível afirmar que a liofilização das cepas 1127 e 270 em leite de cabra fermentado apresentou bons resultados, assim como os encontrados por (6) ao estudarem a viabilidade e atividade de *Lactobacillus plantarum* liofilizados em diferentes crioprotetores como sacarose, lactose e gelatina e leite em pó desnatado, sendo que os microrganismos inoculados em leite em pó apresentaram 100% de viabilidade após liofilização.

4. Conclusão

O leite de cabra fermentado pode ser utilizado como crioprotetor durante a liofilização das cepas 1127 e 270, bem como o armazenamento pode ser realizado a temperatura ambiente ou de congelamento, por 90 dias.

5. Referencias

1. CARVALHO, A. S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F. X., & GIBBS, P. Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **International Dairy Journal**, 13(6), 463–468, (2003).
2. LESLIE, S. B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J. H., & CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(10), 3592–3597, (1995).
3. ANDRADE, L. M. **Avaliação de formas de preparação de estoques de trabalho na preservação de *Streptomyces clavuligerus* visando a produção de ácido clavulânico.** São Carlos, Agosto, Collections, 2002, n.1, v.3,p.25-32 de 2008
4. CHAMPAGNE, C. P., GARDNER, N., BROCHU, E. & BEAULIEU, Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, 24, 118-128, (1991).
5. CHAMPAGNE, C. P.; RAYMOND, F. M. Y & DENIS ROY. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International**, Vol. 29, Nos S-6, pp. 555-562, 1996.
6. TSVETKOV, TS.; BRANKOVA, R. Viability of Micrococci and Lactobacilli upon Freezing and Freeze-Drying in the Presence of Different Cryoprotectants. **Cryobiology** 20, 318-323, 1983.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem à CNPq/Embrapa pelo suporte financeiro.