

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO DO PODER FERMENTATIVO DE *Lactobacillus casei* CSL3 NA PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO E SUA VIABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO

M. V. Fouchy¹, H. R. S. Vitola², A. L. Oliveira³, M. F. F. Siqueira⁴, P. V. Rodrigues⁵, A. M. Fiorentini⁶

1- Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) – Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) – CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 98485-7225 – e-mail: (marinaveira01@gmail.com)

2- DCTA – UFPEL – PPGCTA - CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 99162-4244 – e-mail: (helena_rsv@hotmail.com)

3 - DCTA – UFPEL – PPGCTA - CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 99964-4534 – e-mail: (alaneh09@gmail.com)

4- DCTA – UFPEL – PPGCTA - CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 98158-1085 – e-mail: (maria.fernanda.fs97@gmail.com)

5- DCTA – UFPEL – PPGCTA - CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 99943-9760 – e-mail: (paolarodrigues.sls@gmail.com)

6- DCTA – UFPEL – PPGCTA - CEP: 96160-000 – Capão do Leão – RS – Brasil, Telefone: 55 (53) 9913-87367 – e-mail: (angefiore@gmail.com)

RESUMO – A busca dos consumidores por alimentos funcionais é crescente, e isso se deve aos vários benefícios que os componentes como, os probióticos presentes em muitos desses produtos, proporcionam ao organismo humano. O objetivo deste estudo foi avaliar o poder fermentativo de *Lactobacillus casei* CSL3, isolado de silagem de colostro bovino, em leite fermentado bem como, sua viabilidade durante o período de armazenamento do produto, sob refrigeração. Análises de pH e acidez titulável (% ácido lático) foram realizadas durante a produção de leite fermentado, a cada 2h, até alcançar pH 4,5-4,6 e posteriormente, avaliou-se semanalmente a viabilidade da bactéria, no período de 28 dias. O processo fermentativo durou 14 h e no produto *L. casei* CSL3 manteve-se viável durante todo o período de armazenamento, sob refrigeração, em concentrações > 7 log UFC g⁻¹.

PALAVRAS-CHAVE: alimentos funcionais, probióticos, bactéria ácido-láctica

ABSTRACT – The consumer search for functional foods is growing, and this is due to the various benefits that the components, such as the probiotics present in many of these products, provide to the human organism. The objective of this study was to evaluate the fermentative power of *Lactobacillus casei* CSL3, isolated from bovine colostrum silage, in fermented milk as well as its viability during the storage period of the product under refrigeration. Analyzes of pH and titratable acidity (% lactic acid) were carried out during the production of fermented milk, every 2 hours, until reaching pH 4.5-4.6 and thereafter, the viability of the bacteria was evaluated weekly, in the period of 28 days. The fermentation process lasted 14h and the product *L. casei* CSL3 remained viable throughout the storage period, under refrigeration, in concentrations > 7 log UFC g⁻¹.

KEYWORDS: functional food, probiotics, lactic acid bacteria

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores vêm buscando, constantemente, consumir alimentos funcionais, visto que, os componentes presentes em muitos desses produtos como os probióticos, exercem papel fundamental na modulação do sistema imunológico humano (Valls et al., 2013). Os produtos lácteos, como os leites fermentados, apresentam o número mais significativo entre esses alimentos, através da inserção de microrganismos denominados probióticos (Granato et al., 2010).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, fornecem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). O gênero *Lactobacillus*, pertencente ao grupo de bactérias ácido-láticas (BAL), é um dos probióticos mais estudados quanto à sua aplicabilidade em produtos alimentícios. Estes favorecem o desenvolvimento de produtos funcionalmente e tecnologicamente valiosos, além de promover a conservação desses alimentos, através da acidificação do meio e produção de outros agentes inibidores da microbiota deteriorante e/ou patogênica (Kanmani et al., 2013; Boricha et al., 2019).

A bactéria *L. casei* CSL3, de importância neste estudo, foi isolada de silagem de colostro bovino e caracterizada quanto ao seu potencial tecnológico, probiótico e de segurança por Vitola et al. (2018). O isolado livre foi adicionado em manteiga com adição do antioxidante bixina, sendo que o aditivo não interferiu na viabilidade da bactéria (Bellinazo et al., 2019). Vitola et al. (2020) submeteram *L. casei* CSL3 à imobilização em pedaços de abacaxi, e desenvolveram o queijo *petit suisse* com potencial probiótico.

O presente estudo objetivou avaliar o poder fermentativo de *L. casei* CSL3 em leite fermentado bem como, sua viabilidade durante o período de armazenamento do produto, sob refrigeração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o poder fermentativo de *L. casei* CSL3 foram elaboradas duas formulações de leite fermentado: (F1) contendo somente *L. casei* CSL3; (F2) com *L. casei* CSL3 + *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen®), ambos em leite integral *Ultra High Temperature* (UHT).

2.1 Inóculos de *Lactobacillus casei* CSL3 e *Streptococcus thermophilus*

As bactérias utilizadas para as formulações encontravam-se congeladas (-80 °C) em leite em pó reconstituído. Anteriormente à contagem em placas, os inóculos foram retirados do ultrafreezer e mantidos em temperatura de refrigeração (8 °C) por 24h. Logo após, realizou-se diluições seriadas em água peptonada (AP) 0,1% até a diluição de 10⁻⁹ e plaqueou-se, em superfície (0,1 mL), as três últimas diluições, em duplicata, em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Acumedia, EUA) (APHA, 2002). A contagem foi realizada a fim de se obter o resultado da concentração em que as bactérias se encontravam no inóculo, sendo o resultado expresso em log UFC mL⁻¹.

2.2 Avaliação do poder fermentativo de *Lactobacillus casei* CSL3

Adicionou-se 2 L de leite em panela de aço inoxidável, 10% de sacarose e após a homogeneização, foram aquecidos até 95 °C. Logo após, dispensou-se 1 L em cada iogurteira (Fun Kitchen® e Izumi®) e resfriou-se até 43 °C, em banho de gelo. Adicionou-se 0,1% de cada inóculo, mantendo-se em repouso.

A cada 2h, uma alíquota de 10 mL do produto era retirada para análise de pH em pHmetro (Servylab®) e acidez titulável em ácido láctico com solução de NaOH 0,1 M (IAL, 2008). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O parâmetro para interromper a fermentação foi o pH 4,5-4,6 (Terpou et al., 2016). Em seguida, o leite fermentado foi levado à refrigeração e após 24h, o produto foi homogeneizado.

2.3 Viabilidade de *L. casei* CSL3 em leite fermentado

A avaliação da viabilidade foi realizada a cada 7 dias, totalizando 28 dias de armazenamento sob refrigeração, ou seja, as contagens foram realizadas no tempo 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento do

produto. A contagem das células viáveis foi realizada a partir da pesagem de 10g da amostra em saqueta esterilizada e posterior homogeneização em 90 mL de AP 0,1%, com o auxílio do *Stomacher*. As diluições seriadas foram feitas até 10^{-8} e, apenas as três últimas foram plaqueadas em ágar MRS com adição de 0,02% de sais biliares (Vitola et al., 2018). As placas foram incubadas a 37 °C, em anaerobiose, durante 72h (APHA, 2002).

2.4 Determinação de pH e acidez titulável do leite fermentado

Foram realizadas também, no tempo 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento do produto, análises de pH e acidez titulável em ácido lático (IAL, 2008).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os inóculos encontravam-se nas concentrações $10 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ (*L. casei* CSL3) e $9 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ (*S. thermophilus*), quando foram adicionados ao leite.

Os valores de pH e acidez em ácido lático, durante o período de fermentação do leite estão apresentados na Tabela 1 e nas Figura 1 e 2.

Tabela 1. Valores de pH e acidez das formulações F1 e F2, realizadas durante o processo fermentativo do leite fermentado.

Tempo (h)	F1		F2	
	pH	Acidez (% ácido lático)	pH	Acidez (% ácido lático)
0	6,63 ± 0,062	0,137 ± 0,002	6,64 ± 0,100	0,136 ± 0,002
2	6,56 ± 0,055	0,148 ± 0,005	6,60 ± 0,064	0,154 ± 0,002
4	6,70 ± 0,051	0,152 ± 0,003	6,33 ± 0,015	0,187 ± 0,018
6	6,53 ± 0,095	0,148 ± 0,001	6,06 ± 0,057	0,237 ± 0,015
8	6,51 ± 0,095	0,156 ± 0,003	5,80 ± 0,015	0,283 ± 0,028
10	6,07 ± 0,044	0,234 ± 0,002	5,82 ± 0,130	0,289 ± 0,010
12	4,91 ± 0,069	0,541 ± 0,039	5,72 ± 0,026	0,353 ± 0,002
14	4,58 ± 0,095	0,645 ± 0,029	5,28 ± 0,126	0,444 ± 0,004

(F1) *L. casei* CSL3; (F2) *L. casei* CSL3 + *Streptococcus thermophilus* (Chr. Hansen®)

Figura 1. Valores de pH durante o processo de fermentação do leite, para as formulações (F1) *L. casei* CSL3; (F2) *L. casei* CSL3 + *Streptococcus thermophilus*

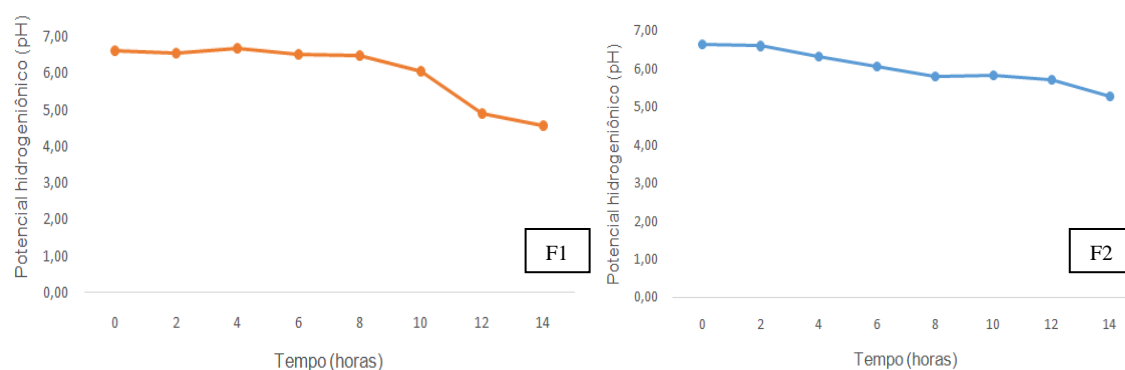
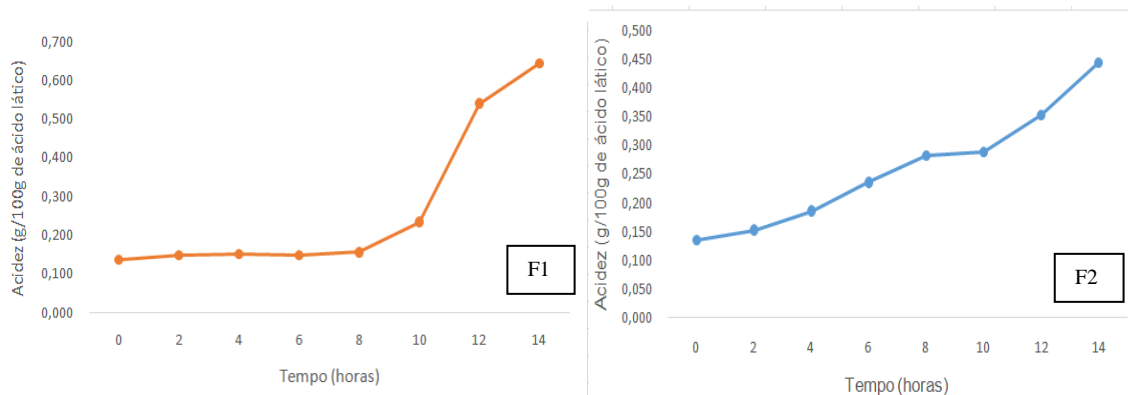


Figura 2. Percentual de acidez em ácido láctico durante o processo de fermentação do leite, para as formulações (F1) *L. casei* CSL3; (F2) *L. casei* CSL3 + *Streptococcus thermophilus*)



A adição da cepa comercial de *S. thermophilus* na F2 foi efetuada porque a mesma atua como cultura iniciadora da acidificação do leite para produção de iogurte a partir da formação de ácido fórmico, ácido láctico e CO₂, beneficiando o crescimento de *L. bulgaricus* (Spreer & Mixa, 1998). Observando os resultados na Tabela 1 e Figuras 1 e 2, percebe-se que o percentual de ácido láctico para a F1 aumentou bruscamente a partir da 8ª hora de fermentação. Isso se deve pela multiplicação de *L. casei* CSL3, uma vez que conforme o microrganismo consome os carboidratos do alimento, aumenta a produção de ácido láctico, reduzindo o pH. Já na F2 o aumento na acidez ocorreu antes, ou seja, a partir de 4ªh de fermentação permanecendo superior a F1 apenas até a 10ª hora. A Instrução Normativa nº 46/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), preconiza que os leites fermentados apresentem acidez entre 0,6-2,0 g de ácido láctico/100 g de alimento. Portanto, a F1 encontra-se dentro dos padrões exigidos pela Legislação, uma vez que ao final da fermentação, apresentou acidez de 0,645 (Brasil, 2007). Em contrapartida, a F2 não atingiu este valor e após as 14 h de fermentação, a acidez estava em 0,444%. De acordo com o objetivo da pesquisa, os demais testes que seguem, foram realizados apenas com a formulação F1.

Ordaz et al. (2019) submeteram *L. casei* Shirota à fermentação em leite com adição de dois prebióticos (suco de agave e inulina) e o pH 4,5 foi atingido após 18h e 34h de processo fermentativo, respectivamente. Em comparação com o presente estudo, *L. casei* CSL3 fermentou os carboidratos do leite mais rapidamente do que no estudo citado, sem necessitar do auxílio de prebióticos. Como justificativa para a diferença de tempo que os microrganismos levam para fermentar os carboidratos dos alimentos, Heller (2001) supõe que a composição química da matéria-prima (acidez, atividade de água, teor lipídico, nitrogênio, teor protéico, entre outros) pode agir como interferente no processo, bem como o estado fisiológico da bactéria (injurada, concentração baixa, metabolismo lento), condições físicas (tempo e temperatura) e/ou possíveis interações das culturas (produção de bacteriocinas, sinergismo, antagonismo). Porém, a busca constante por inovações tecnológicas corrobora com a aplicação de probióticos isolados de diferentes alimentos para o desenvolvimento de novos produtos que, além de serem apreciados sensorialmente, poderão agregar valor à indústria de alimentos.

Além das vantagens tecnológicas e de segurança que a aplicação de probióticos proporciona ao alimento, Puupponen-Pimiã et al. (2002) afirmam que os probióticos exercem influência positiva na microbiota intestinal humana através dos efeitos antagonísticos como, na competição com as bactérias patogênicas por sítios de ação, resultando em manutenção da imunidade. Assim, pela ingestão de produtos com potencial probiótico, ocorre a multiplicação da microbiota benéfica em detrimento à proliferação das bactérias patogênicas, fortalecendo os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. Entretanto, para que o microrganismo possa cumprir todos os benefícios propostos no hospedeiro, o mesmo deve manter-se viável no alimento, até o final da vida útil, em concentrações entre 6-7 log UFC g⁻¹ ou mL⁻¹ (FAO/WHO, 2002).

A Tabela 2, demonstra as concentrações (log UFC g⁻¹) de *L. casei* CSL3 durante 28 dias de armazenamento do leite fermentado, sob refrigeração, assim como o valor de pH e acidez (% ácido láctico).



Tabela 2. Contagens de *L. casei* CSL3 e valores de pH e acidez durante os 28 dias de armazenamento do leite fermentado, sob refrigeração

Tempo (dias)	<i>L. casei</i> CSL3 (log UFC g ⁻¹)	pH	Acidez (% ácido láctico)
0	7,75	4,58 ± 0,095	0,645 ± 0,029
7	9,37	4,56 ± 0,060	0,730 ± 0,001
14	8,02	4,47 ± 0,057	0,849 ± 0,019
21	8,11	4,93 ± 0,042	0,768 ± 0,005
28	7,16	4,51 ± 0,096	0,930 ± 0,005

É possível afirmar que a concentração de *L. casei* CSL3 aumentou aproximadamente 2 ciclos logarítmicos entre 0 e 7 dias de armazenamento do produto e logo após, estabilizou próximo a 8 log UFC g⁻¹ nos tempos 14 e 21 dias. Vitola et al. (2018) constataram que esse isolado apresenta capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração. Entretanto, no tempo 28 dias, a concentração do isolado baixou 1 ciclo logarítmico bem como, no estudo de Ordaz et al. (2019), onde o probiótico *L. rhamnosus* GG apresentou esta queda no 21º dia de armazenamento sob refrigeração. Todavia, a concentração de *L. casei* CSL3 se manteve > 7 log UFC g⁻¹, conforme recomendação da FAO/WHO (2002).

Couret et al. (2004), avaliaram 10 amostras de leites fermentados comerciais e encontraram diversas irregularidades como, concentrações menores do que as declaradas de *L. casei* (5 log UFC g⁻¹), concentrações estas que não são favoráveis para garantir a colonização no intestino. Ranadheera et al. (2010), afirmam que as condições físicas de armazenamento (tempo e temperatura) dos produtos com potencial probiótico é um dos pontos mais importantes para que as bactérias possam se manter viáveis, assim como a presença de nutrientes específicos no alimento.

Alguns autores acreditam que, apesar das BAL suportarem certo percentual de acidez e se adaptarem bem à matriz láctea devido à presença de lactose, a pós-acidificação dos leites fermentados pode interferir na viabilidade dos probióticos (Kailasapathy et al., 2008; Donkor et al., 2006). Entretanto, o isolado *L. casei* CSL3 se manteve viável e em concentrações desejáveis durante os 28 dias analisados, sendo possível, após sua ingestão, aderir-se às células epiteliais do intestino beneficiando a saúde do hospedeiro.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o isolado *L. casei* CSL3 apresentou poder fermentativo e atingiu o percentual de acidez estabelecido pela Legislação vigente, após 14 h de fermentação. O isolado também se manteve viável em > 7 log UFC g⁻¹, durante o período de armazenamento sob refrigeração, tornando possível o desenvolvimento de um leite fermentado com potencial probiótico. Outros estudos como, tolerância de *L. casei* CSL3 ao trato gastrointestinal (TGI) *in vitro* e análise sensorial do produto, serão realizados posteriormente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA - American Public Health Association. (2002). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington.
- Bellinazo, P. L., Vitola, H. R. S., Cruzen, C. E. dos S., Braun, K. L. K., Hackbart, H. C. dos S., Silva, W. P. da, Fiorentini, A. M. (2019). Probiotic butter: Viability of *Lactobacillus casei* strains and bixin antioxidant effect (*Bixa orellana* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 43, 14088.
- Boricha, A. A., Shekh, S. L., Pithva, S. P., Ambalam, P. S., Vyas, B. R. M. (2019). *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin. *LWT- Food Science and Technology*. 106, 201-208.
- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). (2007). Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados*.
- Couret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2004). Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 147-56.
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181-1189.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2001). *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*.
- FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9, 292-302.
- Heller, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. (2002). *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 374-379.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Kailasapathy, K., Harmstorf, I., Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1317-1322.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, A., Pattukumar, V. Arul, V. (2013). Probiotics and Its Functionally Valuable Products. *A Review, Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (6), 641-658.
- Ordaz, J. J., Ramírez, X. M., Guerrero, A. E. C., López, E. C., Niño, A. A., Rosas, J. C., Olivares, L. G. G. (2019). Survival and proteolytic capacity of probiotics in a fermented milk enriched with agave juice and stored in refrigeration. *Food Sci. Technol*, 39 (1), 188-193.
- Puupponen-Pimiä, R., Aura, A. M., Oksmancaldentey, K. M. (2002). Myllärinen, P.; Saarela, M.; Mattila - Sanholm, T.; Poutanen, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci. Technol.*, 13, 3-11.
- Ranadheera, R. D. C. S., Baines, S. K., Adams, M. C. (2010) Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Sreer, E., Mixa, A. (1998). Milk and dairy product technology. New York: Marcel Dekker. *Food Science Technology*, 84, 438.
- Terpou, A., Gialleli, A-I., Bosnea, L., Kanellaki, M., Koutinas, A. A., Castro, G. R. (2017). Novel cheese production by incorporation of sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides* L.) supported probiotic cells. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 616-624.
- Vitola, H. R. S., Cruxen, C. E. dos S., Silva, F. T. da, Thiel, P. R., Marques, J. de L., Silva, W. P da, Fiorentini, Â. M. (2020). *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in *Petit Suisse* cheese and passage through gastrointestinal transit *in vitro*. *LWT – Food Science and Technology*, 127, 109381.
- Vitola, H. S. R., Dannenberg, G. S., Marques, J. L., Lopez, G. V., Silva, W. P., Fiorentini, A. M. (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*, 73, 1-7.
- Valls, J., Pasamontes, N., Pantaleón, A., Vinaixa, S., Vaqué, M., Arantza, S. (2013). Prospects of functional foods/nutraceuticals and markets. K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (Eds.), *Natural products*, 2491-2525

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br