

ANA PAULA DO CARMO

**PRODUÇÃO DE CULTURA DVS (*DIRECT VAT SET*) PARA  
*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 CULTIVADO EM SORO DE  
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C287p  
2006

Carmo, Ana Paula do, 1982-

Produção de cultura DVS (*Direct Vat Set*) para  
*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro  
de queijo Minas Frescal / Ana Paula do Carmo. – Viçosa :  
UFV, 2006.

xvi, 66f. : il. ; 29cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 60-64.

1. Microbiologia industrial. 2. Probióticos.  
3. *Lactobacillus delbrueckii*. 4. Liofilização. 5. Secagem  
em spray. 6. Cultura de células. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.62

ANA PAULA DO CARMO

**PRODUÇÃO DE CULTURA DVS (*DIRECT VAT SET*) PARA  
*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 CULTIVADO EM SORO DE  
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 10 de maio de 2006.

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Co-Orientador)

---

Prof<sup>a</sup>. Magdala Alencar Teixeira  
(Co-Orientadora)

---

Prof. Mauro Mansur Furtado

---

Prof. Maurício Dutra Costa

---

Prof<sup>a</sup>. Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

*Aos meus pais, Mauro e Lúcia.  
À minha irmã Renata.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a Deus, por me dar saúde e perseverança durante todo o caminho percorrido.

Aos meus pais, Mauro e Lúcia, pelo amor e o incentivo constantes que permitiram chegar aonde cheguei. Agradeço a eles por tantas vezes terem postergado seus sonhos em nome da realização dos sonhos de suas filhas, além de serem meu porto seguro, onde sempre ancorei para superar todas as adversidades que encontrei. Agradeço à minha irmã Renata, pelo amor, pelos conselhos, pela presença constante e apoio incondicional. Aos meus avós, Donato e Tereza, pelos momentos inesquecíveis da infância, pelo carinho e incentivo. A todos os meus tios e primos, pelas brincadeiras e pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa, por ter propiciado a realização do curso de Mestrado, que foi uma experiência muito valiosa onde pude crescer tanto intelectual como profissionalmente. Ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade que me foi dada. Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos imprescindíveis que contribuíram grandemente para minha formação intelectual. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Faço um agradecimento especial à Professora Célia, pela orientação, pelas palavras de estímulo e pelos ensinamentos. Admiro-a muito, tanto como pessoa como profissional, pois sempre confiou em mim e acreditou em meu potencial.

Aos Professores Arnaldo Chaer Borges e Magdala Alencar Teixeira, pela co-orientação e pelas valiosas sugestões dadas a este trabalho.

Ao Professor Maurício Dutra Costa, pela grande colaboração nas análises estatísticas e na interpretação dos resultados deste trabalho.

Ao amigo Maurício, pela amizade, pelos conselhos e pela grande atenção dispensada em todos os momentos em que precisei da sua ajuda.

Ao Sr. Valente, pela boa vontade e imensa contribuição durante a execução de parte deste trabalho.

À Nilcéa, D. Aparecida e Laura, pela ajuda e carinho; aos funcionários do almoxarifado e da cozinha, pela ajuda.

A todos os meus amigos, por me darem carinho e apoio durante os momentos difíceis. Aos amigos que me acompanham desde a infância e adolescência em Cataguases, aqueles que conheci ao longo do curso de Graduação, aos amigos que fiz durante o Mestrado, enfim, muito obrigada por fazerem parte da minha vida, e eu sou muito feliz por ter sabido escolher as amizades que tenho.

Aos amigos que conquistei na Microbiologia Industrial, Alessandra, Alexandra, Aline, Carla, Danielle, Fernanda, Inês, José Carlos, Marcelo, Marta, Murilo, Néia e Thiago.

À Eliana, Emiliane e Tiago, pela grande contribuição em diferentes etapas deste trabalho.

A todos os amigos dos demais laboratórios do Departamento de Microbiologia, pela agradável convivência.

A todas as minhas irmãs da “República Éramos Seis” (Lívia, Jaqueline, Juliana, Cassiana, Vanessa, Lara, Mônica e Rejane), pelas histórias, pela convivência, compreensão e pelos momentos de alegria, que sempre enterneceram as minhas horas.

À Cláudia que, além de ser uma amiga e fazer o papel da minha mãe nas horas vagas, é uma pessoa espetacular e de um enorme coração. Agradeço também ao Maurílio que, juntamente com a Cláudia, muito me ajudaram a chegar até aqui.

Por fim, faço um agradecimento especial a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

ANA PAULA DO CARMO, filha de Luiz Mauro do Carmo e Maria Lúcia Pacheco do Carmo, nasceu no dia onze de maio de 1982 em Miraf, Estado de Minas Gerais.

Em fevereiro de 2000, ingressou no curso de Ciência e Tecnologia de Laticínios da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios em janeiro de 2004.

Em março de 2004, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Evolução dos processos para produção de culturas <i>starter</i> .....	7
Figura 2.	Procedimento para acompanhar o crescimento do <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e a 40°C.....	16
Figura 3.	Preparo do concentrado de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 a ser utilizado durante a desidratação por liofilização.....	19
Figura 4.	Preparo do concentrado de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 a ser utilizado durante a desidratação por <i>spray-drying</i> .....	21
Figura 5.	Procedimento para acompanhar o crescimento do <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 em Leite Desnatado Reconstituído a 10% (LDR 10%) a 40°C.....	26
Figura 6.	Crescimento do <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 e acidificação em Leite Desnatado Reconstituído a 10% (LDR 10%).....	43
Figura 7.	Atividade em LDR 10% de culturas liofilizadas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFVH2b20, com e sem a adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal, após 2 meses de estocagem a -80°C.....	44
Figura 8.	Efeito do choque térmico sobre a atividade em LDR 10% de culturas liofilizadas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFVH2b20, com e sem a adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal, após 2 meses de estocagem a -80°C.....	45



Figura 9. Efeito do choque ácido sobre a atividade em LDR 10% de culturas liofilizadas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFVH2b20, com e sem a adição de substâncias protetoras, após 2 meses de estocagem a -80°C.....	46
Figura 10. Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFVH2b20 desidratadas por <i>spray-drying</i> após 2 meses de estocagem a -20°C.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tempos de geração (g) e velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal sob duas temperaturas de incubação, 37°C e 40°C.....	29
Tabela 2.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20.....	31
Tabela 3.	Efeito dos pré-tratamentos e da adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal sobre a sobrevivência e a resistência de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 ao processo de liofilização.....	31
Tabela 4.	Viabilidade das culturas liofilizadas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20, previamente submetidas aos pré-tratamentos, choque térmico e choque ácido, e adicionadas de soluções protetoras.....	33
Tabela 5.	Efeito do processo de liofilização sobre a capacidade de acidificação das células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20.....	33
Tabela 6.	Capacidade de acidificação, determinada como valores de pH de leite desnatado reconstituído (LDR 10%), de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.....	38

Tabela 7.	Capacidade de acidificação, determinada como porcentagem de acidez titulável (p/v), de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.....	39
Tabela 8.	Tempo de coagulação de leite desnatado reconstituído (LDR 10%) como medida da atividade de acidificação de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.....	40
Tabela 9.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a viabilidade de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20.....	49
Tabela 10.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e a resistência de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 ao processo de desidratação por <i>spray-drying</i> .....	49
Tabela 11.	Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a sobrevivência de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 antes e após a desidratação por <i>spray drying</i> , durante o período de estocagem de dois meses a -20°C.....	51
Tabela 12.	Capacidade de acidificação, determinada como valores de pH de leite desnatado reconstituído (LDR 10%), de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 antes e após a desidratação por <i>spray-drying</i> em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -20°C.....	54
Tabela 13.	Capacidade de acidificação, determinada como porcentagem de acidez titulável (p/v), de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 antes e após a desidratação por <i>spray-drying</i> em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -20°C.....	54
Tabela 14.	Tempo de coagulação de leite desnatado reconstituído (LDR 10%) como medida da atividade de acidificação de células de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20, antes e após a desidratação por <i>spray-drying</i> , em soro de queijo Minas Frescal, armazenadas a -20°C.....	55

## ÍNDICE

	RESUMO.....	xiii
	ABSTRACT.....	xv
1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1.	Microrganismo.....	14
3.2.	Crescimento do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e 40°C.....	15
3.3.	Padronização da cultura de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	16
3.4.	Efeito de pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 submetidas aos processos de desidratação.....	17
3.4.1.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 antes e após o processo de liofilização.....	17
3.4.1.1.	Controle.....	17
3.4.1.2.	Choque térmico.....	17
3.4.1.3.	Choque ácido.....	18
3.4.2.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 antes e após o processo de desidratação por <i>spray-drying</i> .....	18
3.4.2.1.	Controle.....	18
3.4.2.2.	Choque térmico.....	20
3.4.2.3.	Choque ácido.....	20
3.5.	Adição de soluções protetoras às células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 antes do processo de liofilização.....	22
3.6.	Desidratação de soro de queijo Minas Frescal contendo células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	22

3.6.1.	Liofilização.....	22
3.6.2.	<i>Spray-drying</i> .....	23
3.7.	Viabilidade e atividade das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 durante o período de estocagem.....	23
3.7.1.	Análise de viabilidade.....	23
3.7.1.1.	Viabilidade de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por liofilização.....	23
3.7.1.2.	Viabilidade de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por <i>spray-drying</i> .....	24
3.7.2.	Atividade de acidificação em leite de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por liofilização ou <i>spray-drying</i> .....	24
3.7.2.1.	Velocidade de coagulação do leite de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por liofilização ou <i>spray-drying</i> .....	24
3.7.2.2.	Determinação da capacidade de acidificação de leite por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por liofilização ou <i>spray-drying</i> via acidez titulável e potencial hidrogeniônico (pH).....	25
3.8.	Crescimento do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em Leite Desnatado Reconstituído a 10%.....	25
3.9.	Atividade das culturas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 desidratadas por liofilização e por <i>spray-drying</i> em Leite Desnatado Reconstituído a 10%.....	26
3.10.	Análises estatísticas.....	27
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.	Crescimento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e 40°C.....	28
4.2.	Conservação de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal por liofilização.....	29
4.2.1.	Efeito dos pré-tratamentos e da adição de substâncias protetoras sobre a sobrevivência e a resistência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ao processo de liofilização.....	29
4.2.2.	Sobrevivência do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 submetido à liofilização e armazenado a -80°C.....	32
4.2.3.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a capacidade de acidificação do leite por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por liofilização.....	35
4.2.4.	Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células liofilizadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 após 2 meses de estocagem a -80°C.....	41
4.3.	Conservação de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal por <i>spray-drying</i> .....	47

4.3.1.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e a resistência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 ao processo de desidratação por <i>spray-drying</i> .....	47
4.3.2.	Sobrevivência do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 antes da desidratação por <i>spray-drying</i> e após, durante o período de armazenamento a -20°C.....	50
4.3.3.	Efeito dos pré-tratamentos sobre a capacidade de acidificação do leite por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 conservado por <i>spray-drying</i> .....	51
4.3.4.	Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células desidratadas por <i>spray-drying</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 após 2 meses de armazenamento a -20°.....	55
5.	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	APÊNDICE.....	65

## RESUMO

CARMO, Ana Paula do, M.S. Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006.  
**Produção de cultura DVS (*Direct Vat Set*) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal.**  
Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-Orientadores: Arnaldo Chaer Borges e Magdala Alencar Teixeira.

Os parâmetros fisiológicos e tecnológicos de importância para o desenvolvimento de sistema DVS para *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado foram estudados. A maior atividade fermentativa das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo ocorreu a 40°C. Por essa razão, essa temperatura de incubação foi adotada para a condução dos experimentos. Foi observado que a aplicação de choque térmico, 50°C por 30 minutos, ou choque ácido, pH 3,5 por 30 minutos, a 40°C, às células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não afetaram seu crescimento. Foi avaliado ainda se a aplicação de tais pré-tratamentos afetava a sobrevivência aos processos de desidratação das células por liofilização e *spray-drying*. Foi observado que o choque ácido não afetou a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 aos dois processos de desidratação avaliados. Por outro lado, o choque térmico teve efeito deletério sobre a sobrevivência das células submetidas aos mesmos processos de desidratação. Para as culturas liofilizadas, foi avaliado se a adição de diferentes soluções protetoras (manitol 6%, sorbitol 1,25%, glutamato monossódico 1,25% e mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%) exercia efeito sobre a sobrevivência de *L.*

*delbrueckii* UFV H2b20 à liofilização, bem como durante o período de estocagem das células desidratadas a -80°C por 2 meses. A sobrevivência das células ao processo de liofilização foi maior quando não se adicionaram substâncias crioprotetoras ao soro de queijo. Maior viabilidade durante o armazenamento a -80°C foi observada quando as células foram pré-tratadas em soro de queijo pH 3,5, ajustado com HCl e sem a adição de outras substâncias antes da liofilização. Observou-se que os choques térmico ou ácido não afetaram a recuperação imediata em leite desnatado reconstituído a 10% das culturas liofilizadas que não sofreram adição de substâncias protetoras. Nas culturas desidratadas por *spray-drying*, observou-se que as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, previamente submetidas ao choque ácido, lograram crescimento comparável ao obtido pelas células ativas que não foram submetidas a qualquer condição que possa causar injúria. Essas culturas permaneceram com elevado número de células, mesmo após 2 meses de estocagem a -20°C. Os resultados obtidos levam à conclusão de que a cultura *starter* probiótica produzida em soro de queijo Minas Frescal estabilizado, desidratada por *spray-drying* e previamente submetida ao choque ácido, demonstrou características de viabilidade e atividade mais promissoras, e seu uso pode ser recomendado para a elaboração de produtos lácteos fermentados contendo células do *L. delbrueckii* UFV H2b20.



## ABSTRACT

CARMO, Ana Paula do, M.S. Universidade Federal de Viçosa, May of 2006.  
**Production of Direct Vat Set culture of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivated in Minas Frescal cheese whey.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Magdala Alencar Teixeira.

The physiological and technological parameters important to the development of Direct Vat Set culture of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivated in Minas Frescal cheese whey were studied. Greater fermentative activity on cheese whey was observed at 40°C and therefore all bacterial growth experiments were performed at this temperature. Heat shock, 50°C for 30 minutes, or acid stress, cheese whey with pH 3.5 for 30 minutes, did not affect growth of *L. delbrueckii* UFV H2b20 on cheese whey. The survival of heat or acid pre-treated cells was assessed after dehydration by lyophilization and spray-drying. Cell survival to either dehydration processes was not affected by acid pre-treatment, whereas heat shock had a deleterious effect on survival. The addition of protective substances (6% mannitol, 1,25% sorbitol, 1,25% monosodium glutamate and mixture of 6% sucrose and 4% trehalose) to cheese whey in which the cells were submitted to lyophilization did not improve cell survival to dehydration and storage at -80°C for two months. Cell survival was greater when lyophilization was performed on cheese whey alone. Acid pre-treated cells on cheese whey, pH 3.5 adjusted with HCl, without any further addition, retained higher viable counts after lyophilization and subsequent

-80°C storage. Cell activity recovery in 10% reconstituted skimmed milk was not affected by either heat shock or acid pre-treatment when cells were lyophilized in cheese whey with no additional substances. Spray-dried cultures submitted to acid stress demonstrate recovery comparable to active cells which were not subjected to any condition that could result in cell injury. Those cultures exhibit a high activity even after two months storage at -20°C. The hereby presented results demonstrate that the probiotic culture produced in stabilized Minas Frescal cheese whey, pre-treated at pH 3.5, and spray-dried have desirable viability and activity characteristics, and its use can be recommended for the elaboration of milk fermented products containing *L. delbrueckii* UFV H2b20 cells.

## 1. INTRODUÇÃO

As culturas *starter* são freqüentemente fornecidas para as indústrias de laticínios como um concentrado em pó, obtido por liofilização ou por *spray-drying*. A alta concentração de células permite que as culturas sejam inoculadas diretamente no tanque de fermentação, sendo assim denominadas culturas DVS (*Direct Vat Set*). Uma cultura DVS pode ser embalada em filmes laminados, mantendo-se estável por anos quando estocada a 5°C na ausência de luz. Vários produtos podem ser fabricados com essas culturas concentradas, como iogurtes, leites fermentados e queijos.

As bactérias lácticas probióticas podem ser veiculadas em produtos lácteos fermentados por meio da introdução desses microrganismos em culturas *starter*. Esta estratégia constitui-se numa alternativa tecnológica que atende às exigências do consumidor atual, cuja tendência é buscar produtos inovadores, diferenciados e que, ao mesmo tempo, promovam o bem-estar e tragam benefícios à saúde.

Os processamentos por liofilização ou por *spray-drying* podem ser adotados como métodos para conservação de culturas de bactérias do ácido láctico. Nesses processos, as células são submetidas a diversos estresses, como o osmótico, o térmico e o oxidativo. Os mecanismos celulares de adaptação envolvem o acúmulo de compostos intracelulares, como substâncias osmoprotetoras. Essas substâncias podem ser adicionadas ao meio de cultivo com o objetivo de garantir a sobrevivência das células durante

tais processos, evitando a perda de viabilidade das células ao longo da estocagem no estado desidratado.

A aplicação potencial de estresses subletais para aumentar a resistência microbiana ao processo de desidratação tem sido demonstrada. Esses tipos de estresses induzem a síntese transitória de proteínas específicas e levam a alterações fisiológicas que, geralmente, aumentam a capacidade de resistência do microrganismo a condições adversas. As bactérias probióticas são exemplos de microrganismos naturalmente sujeitos às condições de estresse ao longo do seu ciclo de vida, como aquelas encontradas durante os processos de conservação de culturas, como congelamento e desidratação. Além disso, bactérias probióticas também estão sujeitas a condições adversas na sua passagem através do trato digestivo, onde exercem sua função.

Um concentrado de células viáveis ou inativadas de *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado com citrato de sódio já foi desenvolvido. A partir dessa estratégia, foi possível delinear fluxogramas para fabricação de produtos lácteos contendo o concentrado das células dessa bactéria.

A elaboração de protocolos para a preparação de culturas *starter* contendo células ativas e resistentes às condições adversas pode ser considerada vantajosa do ponto de vista industrial. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de características fisiológicas da bactéria láctica *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 para ser usada no desenvolvimento de sistema DVS a partir do cultivo das células em soro de queijo Minas Frescal estabilizado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A definição de probióticos tem sido aprimorada ao longo dos anos, à medida que os mecanismos de ação, os critérios de seleção, a viabilidade ou não viabilidade, além dos efeitos cientificamente documentados sobre a saúde do consumidor vão sendo elucidados. O conceito que melhor exprime essas propriedades é o de que os probióticos “são preparações de células microbianas ou componentes das mesmas que apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro” (SALMINEN et al., 1999). Esta definição implica que os microrganismos não precisam necessariamente estar viáveis, uma vez que formas não viáveis também demonstram efeitos na saúde humana.

Os critérios regulatórios para produtos probióticos no Brasil não contemplam o fato de que células inativadas podem contribuir significativamente para a imunoestimulação ou imunomodulação, ou, ainda, que alguns microrganismos podem exercer efeitos benéficos, mesmo em concentrações abaixo dos níveis estabelecidos (NEUMANN, 1998, VINDEROLA et al., 2000). De acordo com o Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Leite Fermentado, aprovado pela Resolução 47/97 do Grupo de Mercado Comum (GMC) e apoiada pela Resolução Nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a contagem de bactérias totais em leite cultivado ou fermentado é da ordem de  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> do produto (BRASIL, 2000).

Para que um produto fermentado seja considerado como probiótico, segundo a legislação brasileira, é pré-requisito que as bactérias utilizadas para sua fabricação sobrevivam à desidratação e à subsequente estocagem. Não obstante, elas devem permanecer viáveis durante a vida de prateleira do alimento. Finalmente, após seu consumo, as bactérias probióticas devem resistir às condições do trato gastrointestinal antes de alcançarem os prováveis sítios de ação, onde seu efeito benéfico será exercido (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2002). É essencial que: (i) o alimento carreador possua pelo menos  $10^6$  UFC  $g^{-1}$ ; (ii) as espécies sejam de origem humana; e (iii) a ingestão semanal do produto deve ser correspondente a 3 a 4 x  $10^8$  UFC  $g^{-1}$  aproximadamente (SAMONA & ROBINSON, 1994 apud VINDEROLA et al., 2000).

A viabilidade das células em produtos probióticos é geralmente baixa. Assim, os maiores desafios tecnológicos para a produção industrial de probióticos concentram-se na manutenção da estabilidade e viabilidade das células em níveis satisfatórios durante o prazo de validade do produto (KRASAEKOOPT et al., 2003).

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de leite. A produção estimada em 2005 foi de 23 bilhões de litros, sendo que, deste volume, 430 milhões de litros foram destinados à fabricação de iogurtes (EMBRAPA, 2006).

As bactérias lácticas probióticas podem ser veiculadas em produtos lácteos fermentados. A introdução desses microrganismos em culturas *starter* constitui-se numa alternativa tecnológica que atende às exigências do consumidor atual, cuja tendência é buscar produtos inovadores, diferenciados e que, ao mesmo tempo, promovam o bem-estar e tragam benefícios à saúde do organismo (LEROY & DE VUYST, 2004; HANSEN, 2002; VINDEROLA et al., 2000).

Uma cultura *starter* pode ser conceituada como uma preparação microbiana de elevado número de células, contendo pelo menos um tipo de microrganismo, que é adicionada às matérias-primas para produzir alimentos fermentados. O grupo das bactérias do ácido láctico ocupa um papel central nesse processo e possui um longo histórico de utilização segura durante a produção de alimentos e de bebidas, uma vez que são consideradas GRAS (*Generally Recognised as Safe*) (CAPLICE & FITZGERALD, 1999 apud LEROY & DE VUYST, 2004). Os microrganismos presentes em culturas *starter*

promovem a acidificação rápida e uniforme do material por meio da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico. Além disso, pode haver a produção de outros compostos, como ácido acético, etanol, compostos de aroma, bacteriocinas, exopolissacarídeos e inúmeras enzimas. Dessa forma, elas aumentam a vida de prateleira dos produtos e garantem a segurança microbiológica, além de melhorar a textura e contribuir para características sensoriais desejáveis ao produto final (HANSEN, 2002).

Nos primórdios da produção de alimentos fermentados, os produtos eram elaborados a partir da fermentação espontânea dos alimentos, oriunda do desenvolvimento da microbiota naturalmente presente no material. A qualidade do produto final era dependente da carga microbiana presente na matéria-prima. A fermentação espontânea foi otimizada por meio da inoculação do material *in natura* com uma pequena quantidade do mesmo material que apresentou uma fermentação bem sucedida. Este método resultava na dominância da linhagem mais bem adaptada e representava uma maneira, embora empírica, de utilizar uma cultura *starter* selecionada para reduzir o tempo de fermentação e, conseqüentemente, o risco de haver falhas no processo de fermentação (LEROY & DE VUYST, 2004).

Com a modernização do processo de fermentação e produção em larga escala de produtos fermentados, houve a necessidade de se elaborarem os produtos com maior padronização de características sensoriais e de textura. Assim, surgiram os métodos de produção de culturas *starter* em escala industrial. A cultura líquida representa o método mais simples de produção de culturas. Basicamente, as células são cultivadas no meio apropriado para o seu crescimento, sendo então estocadas sob refrigeração. O fluxograma de produção é básico e é a partir dele que derivam todos os outros métodos de produção de culturas (Figura 1). Entretanto, este tipo de cultura não tem mais aplicabilidade industrial, pois apresenta muitas desvantagens, tais como: o curto período de viabilidade, a necessidade de repicagens sucessivas em meio novo estéril, além da inviabilização em razão dos altos custos com transporte, uma vez que o transporte no estado líquido ocupa muito espaço e encarece o processo (PEPPLER & PERLMAN, 1979).

A cultura congelada, por sua vez, representa uma cultura líquida que é congelada (Figura 1). Este tipo de cultura não tem mais uso comercial, pois apresenta inconvenientes, resultantes das variações no número de células de

um lote de produção para outro, ou seja, não se garante uniformidade das características típicas dos produtos fabricados com diferentes lotes de uma mesma cultura, e também pela necessidade do uso de congelamento permanente, desde a fábrica fornecedora das culturas até a indústria, os custos com transporte são ainda mais expressivos quando se considera a planilha de custo do produto (PEPPLER & PERLMAN, 1979).

Os inconvenientes citados foram eliminados com o advento da liofilização de culturas, conhecidas como *Dri-vac* (Figura 1). Uma cultura liofilizada contém microrganismos com características bastante homogêneas e altamente viáveis. Além disso, há pouca variação no estado fisiológico das células entre os diferentes lotes de produção. Entretanto, a principal limitação da cultura liofilizada se concentra na necessidade de sucessivas propagações, pelo menos três repicagens, para ativação das células antes da sua utilização (PEPPLER & PERLMAN, 1979). Esse tipo de procedimento é conhecido como “pés-de-cuba” e aumenta consideravelmente os riscos de contaminação da cultura a cada transferência.

Finalmente, a cultura congelada concentrada, também conhecida como *Direct Vat Set* ou simplesmente DVS, surgiu com a necessidade de se contornar a limitação que existe para a ativação de uma cultura liofilizada comum (Figura 1). A cultura DVS é de uso direto devido à alta concentração de células, que é obtida com a centrifugação anterior ao processo de desidratação. Esse processo pode ser por liofilização ou por *spray-drying*. As células produzidas no sistema DVS possuem alta viabilidade e elevada uniformidade entre diferentes lotes de produção (PEPPLER & PERLMAN, 1979). Além disso, a necessidade de inóculo é muito pequena, por exemplo, 1g dessa cultura pode ser suficiente para inocular 500 litros de leite. Uma cultura DVS pode ser embalada em filmes laminados, mantendo-se estável por mais de dez anos quando é estocada a 5°C na ausência de luz (ZIADI et al., 2005). Produtos como iogurtes, leites fermentados e queijos podem ser fabricados utilizando essas culturas, que podem ser adicionadas para a elaboração do produto em si ou ainda como adjunto dietético, para aumentar o valor agregado do alimento.



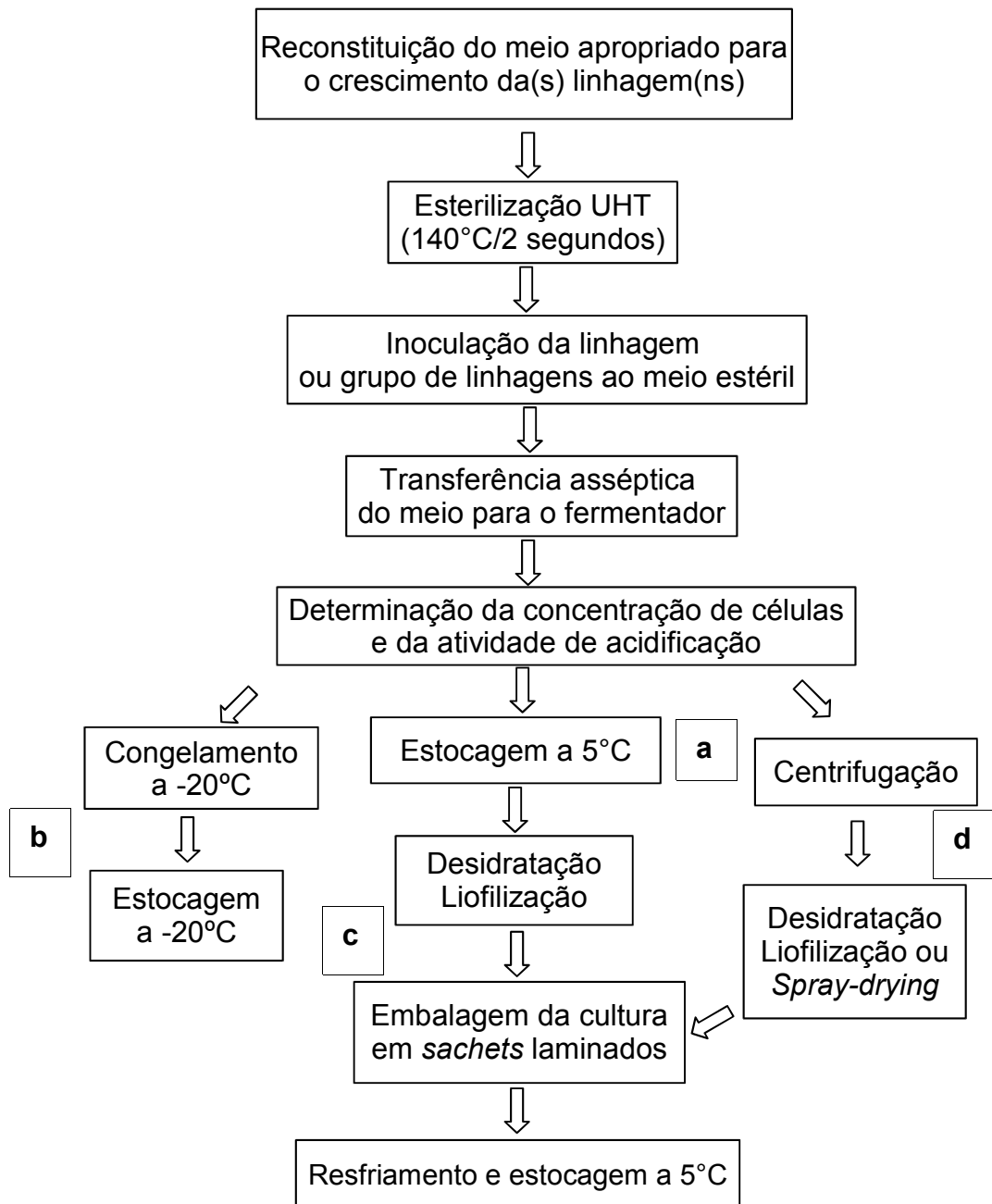


Figura 1. Evolução dos processos para produção de culturas *starter* (PEPPLER & PERLMAN, 1979), onde: **a** – cultura líquida; **b** – cultura congelada; **c** – cultura liofilizada ou *Dri-vac*; **d** – cultura DVS (*Direct Vat Set*).

Os métodos de desidratação por liofilização ou por *spray-drying* podem ser adotados para conservação de culturas de bactérias do ácido láctico. Estudos sobre a avaliação dos processos de desidratação concentram-se na otimização dos parâmetros de processamento, seleção do meio de cultura apropriado para a secagem, além do monitoramento de condições ambientais que afetam a viabilidade das células durante a estocagem no estado

desidratado (TEIXEIRA et al., 1995ab; BROADBENT & LIN, 1999; GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2002; LIAN et al., 2002; CARVALHO et al., 2003b; ZAYED & ROOS, 2004; CARVALHO et al., 2004; ANANTA et al., 2005; ZIADI et al., 2005; MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2006).

A liofilização normalmente está combinada a tratamentos prévios, como choques térmico e ácido (BROADBENT & LIN, 1999; MONTEIRO, 1999; PALMFELDT & HÄGERDAL, 2000; ZIADI et al., 2005) ou a substâncias protetoras, que podem estar presentes no próprio meio de cultivo ou então serem adicionadas ao meio, como os açúcares e álcoois-derivados (ANDERSEN et al., 1999; CARVALHO et al., 2003a). Na liofilização, as células são submetidas a estresse osmótico, e os mecanismos celulares de adaptação envolvem o acúmulo de compostos intracelulares, os quais podem garantir a sobrevivência das células durante tal processo (CARVALHO et al., 2004). Os sacarídeos parecem ser indispensáveis quando materiais viáveis são congelados e desidratados, uma vez que os mesmos protegem tanto a membrana plasmática quanto as proteínas citosólicas. Esses compostos associam-se aos grupos hidrofóbicos dos fosfolipídios e previnem a cristalização durante a desidratação (ANANTA et al., 2005). A adição de sorbitol ou glutamato monossódico, bem como de componentes de constituição complexa, como peptona, triptona e extrato de carne, ao meio de crescimento de bactérias lácticas, pode levar ao aumento na produção e acúmulo de osmoprotetores e, conseqüentemente, evitar a perda de viabilidade das células ao longo da estocagem no estado desidratado (CARVALHO et al., 2003a).

Células de *Streptococcus thermophilus* liofilizadas com manitol e mantidas sob atmosfera de N<sub>2</sub> mostram estabilidade durante o armazenamento, e quanto maior a concentração do sacarídeo, maior o seu efeito na estabilidade da cultura sob estocagem (ANDERSEN et al., 1999).

*Spray-drying* é um outro método de desidratação que pode ser adotado para produção de culturas *starter* em escala industrial (TEIXEIRA et al., 1995b; FURTADO, 2001; DESMOND et al., 2002; LIAN et al., 2002; ANANTA et al., 2005). O processamento por *spray-drying* apresenta maior taxa de produtividade e menor custo operacional quando comparado ao processo de liofilização, dado o alto custo de aquisição do liofilizador. A estratégia de produzir culturas *starter* adotando o processamento por *spray-drying* para

desidratação pode ser economicamente viável, uma vez que esse método de secagem consiste numa tecnologia amplamente disseminada nas indústrias de alimentos. Além disso, uma cultura *starter* desidratada por *spray-drying* apresenta as mesmas vantagens do transporte e estocagem que os materiais liofilizados.

A exposição das bactérias às altas temperaturas do ar quente, que é necessário para facilitar a evaporação de água durante a passagem das bactérias pela câmara de *spray-drying*, exerce um impacto negativo sobre a viabilidade e atividade bacteriana no produto submetido a esse processamento. A água contribui para a estabilidade de muitas moléculas, e a sua remoção pode causar alterações irreversíveis na integridade das membranas e proteínas celulares (ANANTA et al., 2005). As condições de secagem a serem adotadas para um determinado microrganismo devem ser as que assegurem a manutenção das características intrínsecas de resistência ao calor. Assim, a preservação da estrutura e das funções essenciais dos constituintes celulares permitirá a maior sobrevivência da bactéria e melhor retenção de sua funcionalidade.

O leite em pó desnatado e reconstituído é amplamente empregado como meio para secagem de bactérias lácticas, por prevenir injúria celular, por meio da estabilização dos constituintes da membrana, formando uma estrutura porosa no produto desidratado, o que propicia uma espécie de capa protetora para as células. (TEIXEIRA et al., 1995b; DESMOND et al., 2002; GARDINER et al., 2002; LIAN et al., 2002; CARVALHO et al., 2003b; ZAYED & ROOS, 2004; ANANTA et al., 2005; MIYAMOTO & SHINOHARA, 2006). Entretanto, a produção de biomassa celular em escala industrial utilizando leite dificulta o processo de separação das células bacterianas após seu crescimento (PEPPLER & PERLMAN, 1979).

O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo-esverdeado que contém cerca de 55% dos sólidos totais existentes no leite original e representa cerca de 80- 90% do volume de leite utilizado na fabricação do queijo (HAYES, 1985 apud ANDRADE, 2002). O soro de queijo Minas Frescal desnatado apresenta em sua composição química cerca de 5,19% de lactose, 0,53% de cinzas, 0,10% de ácido láctico, 0,63% de proteínas, 0,8 mg/L de succinato e 10mg/L de acetato e de propionato (LEITE, 2005). Possui alto valor nutricional, conferido pela presença de proteínas com elevado teor de aminoácidos

essenciais, destacando-se seu conteúdo em aminoácidos sulfurados (WIT, 1998 apud CAPITANI, 2005). Dependendo do processo utilizado na elaboração do queijo, o soro pode possuir uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) entre 300000 e 600000 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. A descarga desse efluente em cursos de água não é permitida, uma vez que é impraticável reduzir a carga orgânica do efluente para a DBO máxima permitida pela legislação, que é de 600 mg de O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup> (COPAM, 1980). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, a produção nacional em 2004 foi de aproximadamente 445.000 toneladas de queijo, gerando cerca de 4,5 milhões de toneladas de soro (EMBRAPA, 2006). Conseqüentemente, esse soro produz uma imensa quantidade de efluentes, estimada em 4,7 milhões de litros. Em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (ZALL, 1979 apud ANDRADE, 2002).

A disposição indevida do soro em rios, lagos e cursos d'água leva à ocorrência do fenômeno da eutrofização, provocando a morte de peixes e de outros seres aeróbios, o que causa um grave impacto ambiental. Essa prática é bastante comum em indústrias queijeiras de pequeno porte, que não possuem meios econômicos ou tecnologia disponível para o reprocessamento desse efluente. O aproveitamento desse subproduto atinge apenas 15% do total de soro produzido no país (CAPITANI, 2005). Dentre as alternativas para seu aproveitamento, podem ser citadas o uso do soro *in natura* para alimentação animal, fabricação de ricota, fabricação de bebida láctea, concentração, produção de soro em pó, separação das proteínas e lactose com posterior secagem, as quais constituem formas de valorização deste derivado lácteo, ao mesmo tempo contribuindo para a melhoria do meio ambiente e proporcionando ganhos às indústrias (GIROTO & PAWLOWSKY, 2001).

A produção de soro pelas indústrias nacionais é expressiva. Contudo, o Brasil ainda importa esse ingrediente para utilizá-lo na elaboração de produtos de maior valor agregado. Segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, o Brasil gastou cerca de US\$ 31 milhões com importação desse subproduto beneficiado, na forma de soro em pó (EMBRAPA, 2006). Esse dado demonstra a importância desse subproduto para a indústria e os prejuízos acarretados devido ao seu não beneficiamento.

A utilização de soro de queijo para a produção de culturas *starter* em escala industrial tem sido amplamente pesquisada nos últimos anos, uma vez que este subproduto possui os nutrientes essenciais ao crescimento de bactérias nutricionalmente fastidiosas, como é o caso das bactérias lácticas. Formulações de meio de culturas, de baixo custo, à base de soro de queijo ultrafiltrado, com proteína hidrolisada ou suplementada com fontes de nitrogênio para produção de células viáveis em larga escala já foram definidas para o *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (PASSOS, 1997). Mais recentemente, o soro de queijo Minas Frescal esterilizado e estabilizado com 0,10% de citrato de sódio foi utilizado com sucesso para produção de um concentrado de células viáveis ou inativadas dessa bactéria. Os resultados sugerem que o concentrado pode ser utilizado para a produção de produtos probióticos em escala industrial (LEITE, 2005).

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 apresenta características promissoras para sua aplicação como probiótico (SANTOS, 1984; AGOSTINHO, 1988; NEUMANN, 1998; TEIXEIRA, 2004; FERREIRA, 2006). A utilização desse microrganismo já foi bem sucedida tanto em produtos contendo células viáveis, para uso imediato, como em produtos estáveis com prazos de validade mais longos (FIGUEIREDO, 1997), assim como em produtos contendo células inativadas, destinados a pacientes com deficiência imunológica, ou ainda em formulações nas quais não se deseja a proliferação de células (NEUMANN et al., 1998). Mais recentemente, um concentrado contendo células viáveis ou inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi utilizado para fabricação de produtos probióticos, como leite fermentado, sorvete, leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT (LEITE, 2005).

As bactérias lácticas probióticas são exemplos de microrganismos sujeitos a condições de estresse ao longo do seu ciclo de vida, tais como: baixas temperaturas, baixo pH e baixa atividade de água ( $a_w$ ). Não obstante, o processo de preservação de culturas lácticas na forma desidratada, bem como suas condições de estocagem, compreende etapas nas quais as células são submetidas a diversos estresses, como o térmico, o osmótico e o oxidativo (VAN DE GUTCHE et al., 2002). Essas condições causam danos em vários alvos na célula, como a membrana plasmática, a parede celular e o DNA. Além disso, ocorre a inibição do transporte ativo, alterações morfológicas e perda de viabilidade (STORZ & HENGGE-ARONIS, 2000; DE ANGELIS & GOBBETTI,

2004). A principal causa da perda de viabilidade das culturas *starter* está relacionada à oxidação de lipídeos presentes na membrana plasmática (ANDERSEN et al., 1999). Células de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* submetidas ao processo de *spray-drying* demonstraram perda de material citoplasmático, sensibilidade ao cloreto de sódio (NaCl) e permeabilidade a *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo, ONPG (TEIXEIRA et al., 1995a). O efeito desse método de desidratação sobre a membrana citoplasmática também foi demonstrado para células de *L. rhamnosus* GG, e o grau de desintegração da mesma aumentou proporcionalmente ao aumento da temperatura de saída do material desidratado (ANANTA et al., 2005).

Os sistemas microbianos de resistência a condições de estresse evoluíram no sentido de propiciar adaptação a alterações bruscas no ambiente em que elas vivem. Os mecanismos de resistência podem ser divididos em duas classes: a primeira engloba um sistema específico induzido por um estresse subletal de natureza física ou química, o qual permite a sobrevivência contra doses subseqüentes do mesmo agente. A segunda classe é constituída por sistemas mais gerais, e a pré-adaptação a uma condição de estresse pode tornar as células mais resistentes a outros tipos de estresses (DE ANGELIS & GOBBETTI, 2004). É importante ressaltar que as bactérias lácticas estão submetidas a alterações ambientais adversas não somente durante seu processamento industrial, como também no seu *habitat* natural, onde é essencial que sua capacidade em responder a um determinado tipo de estresse seja rápida e eficiente (STORZ & HENGGE-ARONIS, 2000).

O uso potencial de estresses subletais para aumentar a resistência microbiana ao processo de desidratação já foi demonstrado (BROADBENT & LINN, 1999; MONTEIRO, 1999; PALMFELDT & HÄGERDAL, 2000; FURTADO, 2001; DESMOND et al., 2002; ZIADI et al., 2005). A resposta ao estresse mais bem estudada em bactérias é a resposta ao choque térmico, que se caracteriza pela indução transitória da síntese de proteínas específicas e de alterações fisiológicas que, geralmente, aumentam a capacidade de resistência do microrganismo a condições adversas, como aquelas existentes nos processos de desidratação e estocagem no estado desidratado.

Durante a fermentação do leite, o estresse ácido é uma condição comumente imposta às culturas *starter*, uma vez que o metabolismo da lactose resulta no acúmulo de ácido láctico com conseqüente acidificação do meio até

pH em torno de 4,0 (HANSEN, 2002). Células de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 demonstraram maior sobrevivência quando foram submetidas a pH 5,0, 2,5 horas após a entrada na fase estacionária de crescimento (LORCA et al., 1998). Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 submetidas ao choque ácido (pH 3,5 por 30 minutos a 37°C) demonstraram uma resistência quase 10000 vezes maior a pH 2,5 por 2,5 horas que as células não tratadas (MONTEIRO, 1999). O efeito protetor desse choque ácido foi observado também quando as células foram submetidas à desidratação por *spray-drying* para produção de leite em pó contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFVH2b20 (FURTADO, 2001).

Recentemente, foi desenvolvido um concentrado de células viáveis ou inativadas de *L. delbrueckii* UFVH2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado com citrato de sódio (LEITE, 2005). A partir dessa estratégia, foi possível delinear fluxogramas para fabricação de produtos lácteos contendo o concentrado das células dessa bactéria.

A elaboração de protocolos para a preparação de culturas *starter* contendo células ativas e mais resistentes a condições ambientais adversas pode ser vantajosa do ponto de vista industrial. O presente trabalho teve como objetivo estudar parâmetros fisiológicos de importância para o desenvolvimento de sistema DVS para *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal estabilizado.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em três etapas: a padronização das células e todas as análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa. O processo de liofilização foi realizado no Laboratório de Genética Molecular de Plantas II do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Finalmente, o processo de secagem por *spray-drying* foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento de Novos Produtos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

#### 3.1. Microrganismo

A bactéria utilizada neste estudo foi *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (SANTOS, 1984; UETANABARO, 1999; FLORESTA, 2003). Os estoques dessas células foram produzidos em caldo MRS contendo 2% de glicose. A cultura congelada a -80°C foi ativada em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) e incubada a 37°C. Após coagulação do leite, entre 18 e 24 horas de incubação, foram feitas estrias compostas em ágar MRS e incubadas a 37°C sob microaerofilia por 24 horas. Colônias isoladas foram transferidas para 10 mL de caldo MRS contendo 2% de glicose. Após 12



horas de incubação, uma alíquota de 2 mL foi inoculada em 50 mL de caldo MRS contendo 2% de glicose e incubados nas mesmas condições citadas anteriormente. Transcorrido o período de incubação, 30 mL dessa cultura foram submetidos à centrifugação em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C, rotor SS34, a 4000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de caldo MRS contendo 2% de glicose e distribuído em volumes de 800 µL em tubos Eppendorf contendo 200 µL de glicerol esterilizado. Em seguida, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C.

### **3.2. Crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e 40°C**

Uma alíquota do estoque da cultura contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi previamente ativada em LDR 10% e incubada a 40°C. Após coagulação do leite, foram feitas estrias compostas em ágar MRS e incubadas por 24 horas a 37°C ou a 40°C, sob condições de microaerofilia.

Após esse período, colônias isoladas foram transferidas para erlenmeyers contendo 40 mL de soro de queijo Minas Frescal esterilizado e estabilizado com 0,10% de citrato de sódio (LEITE, 2005). O crescimento foi acompanhado por 24 horas. A cada duas horas de incubação, uma alíquota da cultura foi retirada e diluída sucessivamente. As três últimas diluições ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ ) foram inoculadas em superfície de ágar MRS e incubadas sob condições de microaerofilia a 37°C ou a 40°C. O experimento foi conduzido em duplicata. A Figura 2 demonstra o esquema ilustrativo do procedimento realizado.

Foi feito o acompanhamento do pH durante todo o período do crescimento. A cada duas horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL da cultura para leitura do pH em pH metro Fischer Scientific modelo 15.

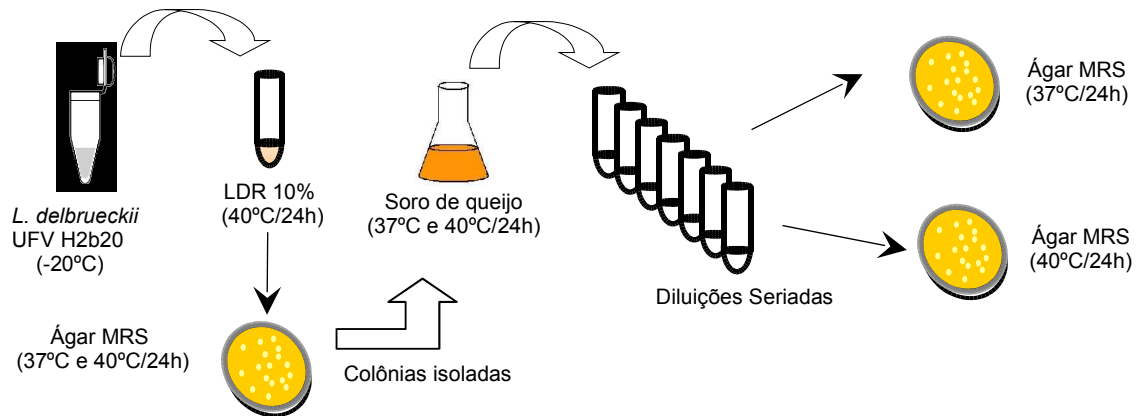


Figura 2. Procedimento para acompanhar o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e 40°C.

### 3.3. Padronização da cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Em todos os experimentos, uma alíquota do estoque da cultura contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi previamente ativada em LDR 10% e incubada a 40°C. Após sua coagulação, foram feitas estrias compostas em ágar MRS e incubadas por 24 horas a 40°C, sob condições de microaerofilia. Transcorrido o período de incubação, colônias isoladas foram transferidas para soro de queijo Minas Frescal, estabilizado e esterilizado, e novamente incubada a 40°C por 12 horas. Foram feitas pelo menos três transferências para volumes gradualmente maiores de soro, até que se atingisse o volume final necessário para a condução dos experimentos. Para a liofilização, o volume final da cultura foi de 850 mL e de 1000 mL para o *spray drying*. Após 12 horas de incubação, alíquotas foram distribuídas em tubos GSA de 250 mL para concentração das células em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C, a 5000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em soro esterilizado com pH 6,4 ou soro com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M.

### **3.4. Efeito de pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 submetidas aos processos de desidratação**

O estudo foi conduzido submetendo-se as células padronizadas a: choque térmico, 50°C por 30 minutos, e choque ácido, exposição a pH 3,5 por 30 minutos. Os processos de desidratação foram liofilização e *spray drying*. Todo o procedimento realizado para obtenção do concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, previamente submetidos aos pré-tratamentos e destinados aos processos de desidratação, estão detalhados nas Figuras 3 e 4, respectivamente. Para cada situação testada nos experimentos, foram realizadas três repetições.

#### **3.4.1. Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes e após o processo de liofilização**

##### **3.4.1.1. Controle**

Para o tratamento controle, alíquotas de 90 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA, sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 45 mL de soro estéril. Essa suspensão foi mantida a 40°C por 30 minutos. O fluxograma detalhado do procedimento está demonstrado na Figura 3.

A determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) do *L. delbrueckii* UFV H2b20, antes e após o período de incubação, foi realizada com o emprego da técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000).

##### **3.4.1.2. Choque térmico**

Alíquotas de 90 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA, sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 45 mL de soro estéril. A seguir, foram mantidas em banho-maria a 50°C por 30 minutos, segundo MONTEIRO (1999). O procedimento detalhado consta no fluxograma da Figura 3.

Determinou-se o número de UFC do *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes e após o tratamento térmico pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000).

#### **3.4.1.3. Choque ácido**

Alíquotas de 90 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA, sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspensas em 45 mL de soro estéril, com pH ajustado para 3,5 com solução de HCl 3 M. A suspensão de células foi mantida nesse pH por 30 minutos a 40°C, segundo MONTEIRO (1999). Transcorrido esse período, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com 45 mL de água estéril e centrifugadas novamente. O sedimento foi ressuspendido em 45 mL de soro estéril e o número de UFC do *L. delbrueckii* UFV H2b20, antes e após o choque ácido, foi determinado pelo uso da técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). A Figura 3 demonstra o fluxograma detalhado do procedimento.

#### **3.4.2. Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes e após o processo de desidratação por *spray-drying***

##### **3.4.2.1. Controle**

Para o tratamento controle, alíquotas de 100 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA, sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspensas em 100 mL de soro estéril. Essa suspensão foi mantida a 40°C por 30 minutos. O fluxograma detalhado do procedimento está demonstrado na Figura 4.

A determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) do *L. delbrueckii* UFV H2b20, antes e após o período de incubação, foi realizada com o emprego da técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000).

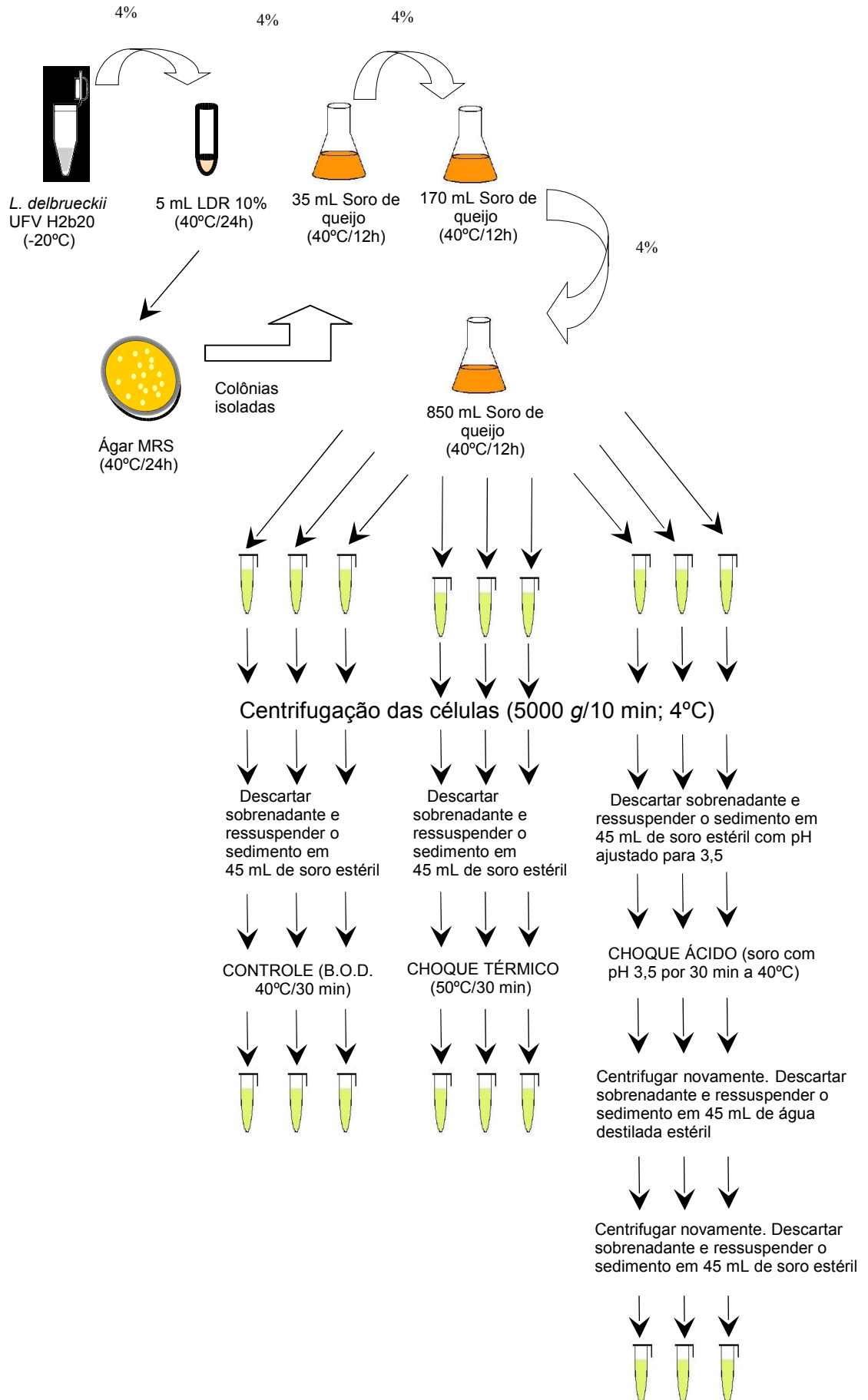


Figura 3. Preparo do concentrado de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 a ser utilizado durante a desidratação por liofilização.

### **3.4.2.2. Choque térmico**

Alíquotas de 100 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA, sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 100 mL de soro estéril. A seguir, foram mantidas em banho-maria a 50°C por 30 minutos, segundo MONTEIRO (1999).

Determinou-se o número de UFC do *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes e após o tratamento térmico pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). O procedimento detalhado consta no fluxograma da Figura 4.

### **3.4.2.3. Choque ácido**

Alíquotas de 100 mL da cultura padronizada foram transferidas em triplicata para tubos GSA sendo as células coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 100 mL de soro estéril, com pH ajustado para 3,5 com solução de HCl 3 M. A suspensão de células foi mantida nesse pH por 30 minutos a 40°C, segundo MONTEIRO (1999). Transcorrido esse período, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com 100 mL de água estéril e centrifugadas novamente. O sedimento foi ressuspendido em 100 mL de soro estéril e, a seguir, determinou-se o número de UFC do *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes e após o choque ácido pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). A Figura 4 demonstra um fluxograma detalhado do procedimento.

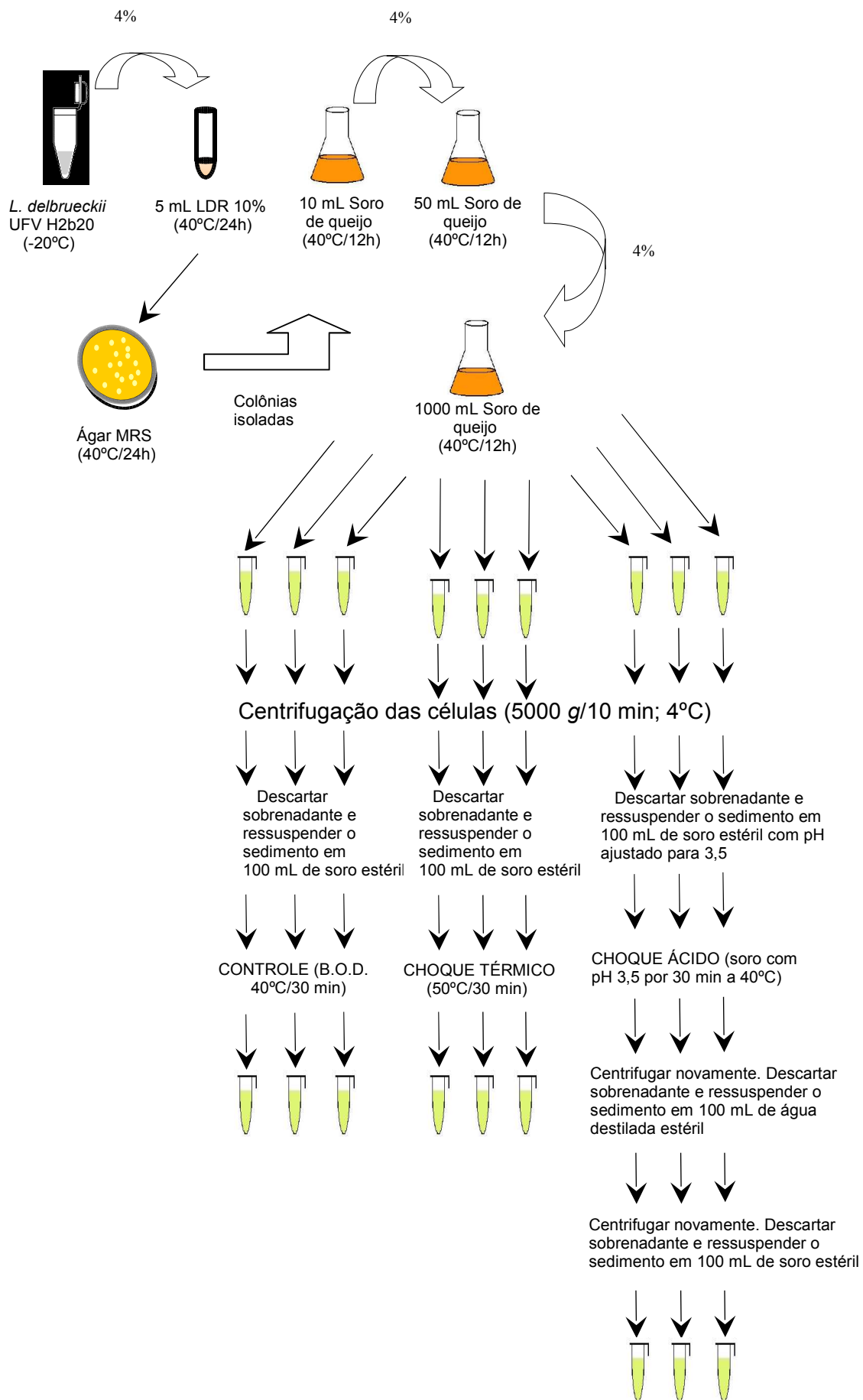


Figura 4. Preparo do concentrado de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 a ser utilizado durante a desidratação por *spray-drying*.

### **3.5. Adição de soluções protetoras às células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes do processo de liofilização**

A partir do concentrado de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20, padronizado e previamente submetido aos pré-tratamentos, foram transferidas alíquotas de 1 mL das amostras para frascos de vidro esterilizados com tampão de algodão hidrofóbico (AGOSTINHO, 1988). Nos frascos em que não houve adição de crioprotetores (controle), foram transferidos 2 mL da cultura. Aos demais frascos, foram adicionados 1 mL das soluções protetoras a seguir descritas:

Solução 1: Manitol 6% (ANDERSEN et al., 1999);

Solução 2: Sorbitol 1,25% (CARVALHO et al., 2003b);

Solução 3: Glutamato monossódico 1,25% (CARVALHO et al., 2003b);

Solução 4: Mistura de sacarose 6% e trealose 4% (ZAYED & ROOS, 2004);

Solução 5: Sem adição de crioprotetor (controle).

### **3.6. Desidratação de soro de queijo Minas Frescal contendo células de *L. delbrueckii* UFV H2b20**

#### **3.6.1. Liofilização**

Os frascos de vidro contendo 2 mL de soro contendo as células ressuspendidas do *L. delbrueckii* UFV H2b20, juntamente com as soluções protetoras, foram congelados a -80°C e posteriormente submetidos ao processo de liofilização.

Esse processamento foi realizado no liofilizador Edwards Super Modulyo (ENGLAND-UK). As condições adotadas para a liofilização foram: temperatura da câmara de -60°C, aproximadamente, e tempo de liofilização de 12 horas. O experimento foi conduzido em triplicata.

Determinou-se o número de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a liofilização pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). Após a desidratação, o material liofilizado foi estocado a -80°C.



### **3.6.2. *Spray-drying***

A partir das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 previamente submetidas aos pré-tratamentos citados anteriormente, 300 mL do concentrado foram misturados a 10 litros de soro de queijo Minas Frescal estabilizado e estéril. A mistura foi introduzida no *spray-dryer* Niro Atomizer (COPENHAGEN-DENMARK) e submetida à desidratação. O experimento foi conduzido em triplicata.

As condições de secagem foram: temperatura do ar de secagem entre 170°C e 180°C e temperatura de saída do material entre 80°C e 90°C (LEITE, 2005).

Determinou-se o número de unidades formadoras de colônias do *L. delbrueckii* UFV H2b20 após o *spray-drying* pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). Após a desidratação, o material foi acondicionado em sacos plásticos estéreis e mantido a -20°C.

### **3.7. Viabilidade e atividade das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante o período de estocagem**

#### **3.7.1. Análise de viabilidade**

Este procedimento foi realizado antes de as amostras serem submetidas aos métodos de desidratação e após, mensalmente, durante o período de estocagem de dois meses.

##### **3.7.1.1. Viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por liofilização**

As células desidratadas foram ressuspensas em 1 mL de água destilada estéril, nos mesmos frascos em que foram liofilizadas. Retirou-se uma alíquota de cada frasco e efetuaram-se diluições sucessivas. As três últimas diluições foram distribuídas, pela técnica de microgotas, em placas contendo ágar MRS (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). As placas foram incubadas sob microaerofilia por 24 horas e, após este período, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mL.

### **3.7.1.2. Viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por *spray-drying***

Um grama de cada uma das amostras desidratadas foi ressuspendido em 3 mL de água destilada estéril em frascos de vidro. Retirou-se uma alíquota de cada frasco e efetuaram-se diluições sucessivas. As três últimas diluições foram distribuídas em placas contendo ágar MRS, pela técnica de microgotas, e incubadas sob condições microaerofílicas por 24 horas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). Após este período, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por mL.

### **3.7.2. Atividade de acidificação em leite de *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por liofilização ou *spray-drying***

O procedimento para avaliar a atividade de acidificação das culturas desidratadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi idêntico tanto para as amostras liofilizadas como para aquelas desidratadas por *spray-drying*, sendo realizado antes da desidratação e, mensalmente, durante o período de estocagem de dois meses (SARAIVA, 2000; BRASIL, 2003).

Foi avaliado o efeito dos processos de desidratação, liofilização e *spray-drying*, sobre a capacidade de acidificação das culturas desidratadas. A capacidade de acidificação das culturas foi medida por três métodos diferentes: potencial hidrogeniônico (pH), acidez titulável e tempo de coagulação de leite desnatado reconstituído a 10%.

#### **3.7.2.1. Velocidade de coagulação do leite de *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por liofilização ou *spray-drying***

A partir das amostras reidratadas, alíquotas de 200 µL foram inoculadas em tubos contendo 2 mL de LDR 10% esterilizado. O acompanhamento da velocidade de coagulação do leite foi feito por observação visual até que ocorresse a coagulação completa nos tubos de ensaio (SARAIVA, 2000).

### **3.7.2.2. Determinação da capacidade de acidificação de leite por *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por liofilização ou *spray-drying* via acidez titulável e potencial hidrogeniônico (pH)**

Alíquotas de 400 µL foram retiradas das amostras reidratadas e transferidas para tubos contendo 10 mL de LDR 10% esterilizado. Os tubos foram incubados a 40°C por 12 horas e após a incubação, foram coletadas alíquotas de 5 mL para titulação com NaOH 0,1N (SARAIVA, 2000). O cálculo da acidez titulável foi de acordo com o estabelecido na Instrução Normativa Nº 22 para leites fermentados (BRASIL, 2003). Além disso, foi feita a leitura do pH da amostra em pH metro Fischer Scientific modelo 15.

### **3.8. Crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em Leite Desnatado Reconstituído a 10%**

Uma alíquota da cultura contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi previamente ativada em LDR 10% e incubada a 40°C. Após a coagulação, foi feita uma estria composta em ágar MRS e a placa foi incubada sob microaerofilia por 24 horas. Em seguida, colônias isoladas foram transferidas para tubos de 2 mL de LDR 10%, e incubados a 40°C por 12 horas. Após esse período, alíquotas das culturas foram transferidas para erlenmeyers contendo 40 mL de LDR 10% estéril. Simultaneamente, foram transferidos 80 µL das culturas para 2 mL de LDR 10% esterilizado e a coagulação do leite foi conferida após 12 horas de incubação. As culturas foram incubadas a 40°C e o acompanhamento da atividade foi feito até que houvesse a coagulação completa do tubo com 2 mL das culturas. A cada duas horas de incubação, uma alíquota da cultura foi retirada e diluída sucessivamente. As três últimas diluições foram utilizadas para a contagem do número de células viáveis na superfície de ágar MRS pela técnica de microgotas (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). Os experimentos foram conduzidos em duplicata. A Figura 5 detalha o procedimento descrito acima.

Foi feito o acompanhamento do pH durante o crescimento da cultura. A cada duas horas de incubação, foram retiradas alíquotas de 2 mL para leitura em pH metro Fischer Scientific modelo 15.

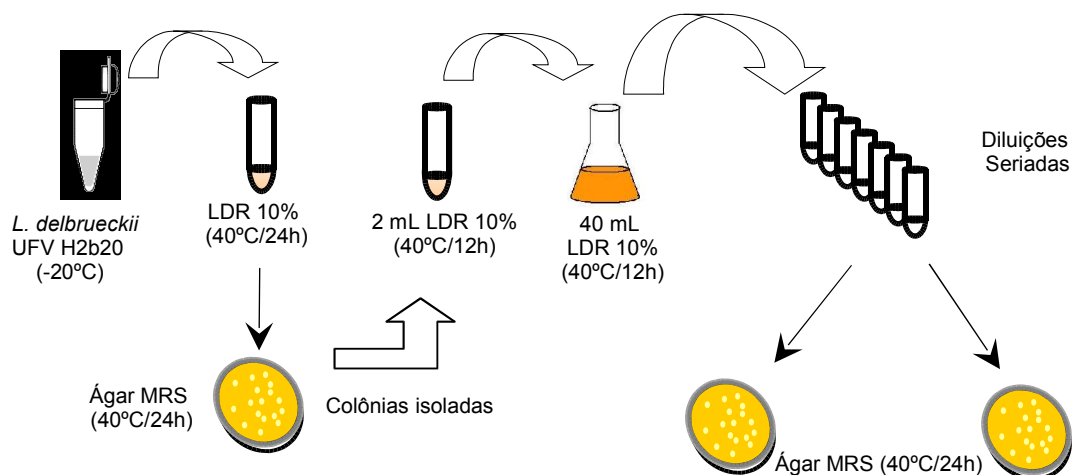


Figura 5. Procedimento para acompanhar o crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em Leite Desnatado Reconstituído a 10% (LDR 10%) a 40°C.

### 3.9. Atividade das culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por liofilização e por *spray-drying* em Leite Desnatado Reconstituído a 10%

Determinou-se a atividade em LDR 10% das culturas do *L. delbrueckii* UFV H2b20, desidratadas por liofilização e por *spray-drying*, após 2 meses de armazenamento das mesmas sob as temperaturas de -80°C e -20°C, respectivamente.

As amostras foram ressuspendidas em 1 mL de água destilada esterilizada, nos mesmos frascos em que foram liofilizadas. Aliquotas das culturas foram transferidas para erlenmeyers contendo 40 mL de LDR 10% estéril. Simultaneamente, foram transferidos 80 µL das culturas para 2 mL de LDR 10% esterilizado e a coagulação do leite foi conferida após 12 horas de incubação. As culturas foram incubadas a 40°C e o acompanhamento da atividade foi feito até que houvesse a coagulação completa do tubo com 2 mL das culturas. A cada quatro horas de incubação, alíquotas foram retiradas e diluídas sucessivamente. As três últimas diluições foram distribuídas na superfície de ágar MRS. A técnica de microgotas foi utilizada para a contagem do número de células viáveis (NORRIS & RIBBONS, 1969 apud FERREIRA, 2000). Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

### **3.10. Análises estatísticas**

O delineamento adotado para a condução dos experimentos foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. A influência do processo de liofilização sobre a capacidade de acidificação do meio foi verificada em um experimento montado em DIC, constituído de fatorial triplo desbalanceado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os contrastes entre médias comparados pelo teste F a 5% de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal estabilizado a 37°C e 40°C

A Tabela 1 demonstra os parâmetros de crescimento, velocidade de crescimento e tempo de geração, calculados para *L. delbrueckii* UFV H2B20, em soro de queijo Minas Frescal estabilizado, a 37°C e 40°C.

A velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) observada para as células cultivadas a 37°C foi maior do que a encontrada a 40°C (Apêndice A). Esse resultado difere do relatado por FIGUEIREDO (1997), que obteve melhor crescimento em soro de queijo a 40°C e em caldo MRS a 37°C. A diferença pode ser atribuída ao método de esterilização do soro, dependente de estabilização com citrato de sódio 0,1%. A estabilização mantém as proteínas em suspensão e, possivelmente, tornam o soro de queijo Minas Frescal um meio mais rico e aproximado ao MRS. Entretanto, verificou-se maior decréscimo do pH durante o crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 a 40°C, de 6,39 para 5,84, enquanto na cultura a 37°C, a redução foi de 6,48 para 6,17 após 12 horas de cultivo (Apêndice A). Dessa maneira, houve maior produção de ácido láctico nas células a 40°C que a 37°C.

O ácido láctico produzido influencia importantes características em produtos fermentados, como textura e índice de umidade. A taxa de produção de ácido é crítica na fabricação de produtos, uma vez que, do ponto de vista

industrial, é desejável que as culturas tenham máxima produção de ácido no menor intervalo de tempo possível (LEROY & DE VUYST, 2004).

Os resultados obtidos e as condições aplicadas neste experimento indicaram a temperatura de incubação de 40°C como a mais adequada para propiciar maior atividade fermentativa das células. Este tipo de comportamento é relevante quando se considera a introdução de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em uma cultura *starter* para fabricação de produtos lácteos fermentados.

Tabela 1. Tempos de geração (g) e velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal sob duas temperaturas de incubação, 37°C e 40°C.

Variável	Temperatura de incubação	
	37°C	40°C
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0,67	0,60
g (min)	61,8	69

## 4.2. Conservação de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal por liofilização

### 4.2.1. Efeito dos pré-tratamentos e da adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal sobre a sobrevivência e a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao processo de liofilização

As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 destinadas à liofilização, quando previamente submetidas à pré-tratamentos de choque térmico ou ácido, não diferem estatisticamente das do controle com relação à viabilidade (Tabela 2). A temperatura do choque térmico está na faixa de crescimento desta bactéria, embora acima da temperatura ótima para o crescimento (MONTEIRO, 1999). O pH 3,5 é fator restritivo ao crescimento (MONTEIRO, 1999), mas não se mostra letal. Condições de estresse são aquelas que, embora não letais para o organismo, elicitam uma resposta protetora do mesmo (STORZ & HENGGE-ARONIS, 2000; VAN DE GUTCHE et al., 2002; DE ANGELIS & GOBETTI, 2004).

*Lactobacillus acidophilus* CRL 639 apresentou redução de três a quatro ciclos logarítmicos quando as células foram expostas a pH 4,0 e pH 3,5,

respectivamente, por 24 horas. Quando as células, coletadas no início da fase estacionária de crescimento, foram pré-tratadas a pH 4,2 por 15 minutos e pH 5,0 por 60 minutos, houve indução de uma resposta de tolerância a ácido, tornando-as mais tolerantes ao choque ácido posterior (LORCA et al., 1998).

A aplicação dos pré-tratamentos às células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, choque térmico ou ácido, e posterior adição de diferentes soluções protetoras não resultou em aumento de viabilidade das células após a liofilização (Tabela 3). A sobrevivência das células após a liofilização foi maior quando não se adicionaram substâncias crioprotetoras ao soro de queijo, não havendo diferença significativa entre as células antes e após a desidratação. O fato dos tratamentos com as soluções protetoras não terem demonstrado diferenças significativas na viabilidade imediatamente após a liofilização também foi observado por CARVALHO et al. (2003b), que adotou soluções de sorbitol 1,25% e glutamato monossódico 1,25% como crioprotetores das células de *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e duas linhagens de *Enterococcus*.

Não houve diferença significativa na viabilidade entre as células controle, sem pré-tratamento, e as células submetidas ao choque ácido, pH 3,5 por 30 minutos (Tabela 3). As células tratadas pelo choque térmico demonstraram uma perda significativamente maior na viabilidade durante a liofilização.

O efeito do choque térmico, 45°C por 30 minutos, sobre a viabilidade das células de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* submetidas à liofilização e subsequente estocagem sob diferentes temperaturas foi o de prolongar o período de vida útil da cultura *starter* por até 86 dias, quando estocadas a 4°C (ZIADI et al., 2005). As células não tratadas apresentaram vida útil de 48 dias, sob as mesmas condições. Foi verificado também que o armazenamento em temperaturas superiores a essa causou efeito destrutivo sobre a viabilidade das células. A sobrevivência das células de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* aos processos de congelamento e liofilização é significativamente melhorada quando se aplica choque térmico (42°C por 25 minutos para *L. lactis* subsp. *lactis* e 39°C por 25 minutos para *L. lactis* subsp. *cremoris*) antes desses processos (BROADBENT & LIN, 1999).

A adição das soluções de sacarose 4% e trealose 4%, aliada ao LDR 18%, possibilitam maior sobrevivência das células de *Lactobacillus salivarius*



subsp. *salivarius*, ao processo de liofilização e aumentam a estabilidade das células durante a estocagem a -85°C (ZAYED & ROOS, 2004).

Tabela 2. Efeito dos pré-tratamentos sobre a viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Pré-tratamento	Log UFC mL <sup>-1</sup>		Média
	UFC inicial	Após pré-tratamento	
Controle <sup>1</sup>	8,6832	8,6498	8,6665
Choque térmico <sup>2</sup>	8,6832	8,5408	8,6120
Choque ácido <sup>3</sup>	8,6832	8,7763	8,7297
Média	8,6832	8,6556	8,6694

<sup>1</sup> – No controle, as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos, a 40°C.

Tabela 3. Efeito dos pré-tratamentos e da adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal sobre a sobrevivência e a resistência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 ao processo de liofilização.

Pré-tratamento	Log UFC mL <sup>-1</sup>						Média
	Antes da liofilização		Após liofilização				
	Após pré-tratamento	Manitol 6%	Sorbitol 1,25%	GMS 1,25% <sup>4</sup>	Sac 6% + Tre 4% <sup>5</sup>	Soro <sup>6</sup>	
Controle <sup>1</sup>	8,6498	8,2663	7,8761	8,5879	8,6046	8,9123	8,5114 A
Choque térmico <sup>2</sup>	8,5408	7,9855	8,0000	8,1127	7,9756	8,2692	8,2238 B
Choque ácido <sup>3</sup>	8,7763	8,4968	8,4565	8,2137	8,0775	8,2827	8,4267 A
Média	8,6556 A	8,2495 B	8,111 B	8,3047 B	8,2193 B	8,4881 A	8,3873

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – No controle, as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos, a 40°C.

<sup>4</sup> – GMS 1,25%: solução de glutamato monossódico a 1,25%.

<sup>5</sup> – Sac 6% + Tre 4%: mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%.

<sup>6</sup> – Soro – sem adição de substâncias protetoras.

A maior viabilidade das culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a liofilização foi observada para as células desidratadas sem a adição de outras substâncias protetoras e previamente tratadas em soro de queijo com pH 3,5, ajustado com HCl. A partir dessa observação, infere-se que a adição de substâncias protetoras pode ser dispensada, uma vez que o próprio meio de cultivo desse microrganismo possui compostos que atuam como protetores, aumentando a estabilidade e integridade das células durante a desidratação causada pela liofilização. Consequentemente, esse efeito é refletido na maior sobrevivência das células após o emprego da liofilização.

#### **4.2.2. Sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 submetido à liofilização e armazenado a -80°C**

A determinação do número de células viáveis pela técnica de microgotas após 1 e 2 meses de estocagem demonstrou ausência de UFC nas placas. Porém, a avaliação de sobreviventes nas culturas liofilizadas por meio da inoculação das mesmas em LDR 10% esterilizado evidenciou a existência de atividade das células após 0, 4 ou 8 horas de incubação a 40°C (Tabela 4). É possível que as células tenham sido submetidas a condições que levaram à injúria muito intensa, daí a incapacidade das mesmas em formar colônias imediatamente após a reidratação. Provavelmente, a viabilidade após esses períodos de incubação representa o número de sobreviventes após o período de estocagem. Como não foi possível quantificá-los imediatamente após a inoculação no leite, sugere-se que essas culturas necessitaram de tempo maior de adaptação para conseguirem retomar o crescimento.

Tabela 4. Viabilidade das culturas liofilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, previamente submetidas aos pré-tratamentos, choque térmico e choque ácido, e adicionadas de soluções protetoras.

Soluções protetoras	Log UFC mL <sup>-1</sup>					
	Controle <sup>1</sup>		Choque térmico <sup>2</sup>		Choque ácido <sup>3</sup>	
	Tempo após liofilização (meses) <sup>4</sup>					
	0	2	0	2	0	2
Manitol 6%	8,2662	5,8420	7,9854	5,7993	8,4968	6,5563
Sorbitol 1,25%	7,8761	5,5740	8,0000	6,0000 <sup>6</sup>	8,4564	5,8692 <sup>6</sup>
GMS 1,25% <sup>5</sup>	8,5879	5,6628 <sup>7</sup>	8,1126	6,0414 <sup>7</sup>	8,2136	6,0107 <sup>6</sup>
Sacarose 6% + trealose 4%	8,6046	5,5378 <sup>6</sup>	7,9756	5,2553 <sup>6</sup>	8,0775	5,7076
Soro	8,9122	5,5441 <sup>6</sup>	8,2692	4,7076	8,2827	7,2175

As culturas foram reidratadas com água esterilizada, inoculadas em leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) e incubadas a 40°C.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos, a 40°C.

<sup>4</sup> – A contagem das células foi efetuada imediatamente após a liofilização (0) e após 2 meses de estocagem a -80°C.

<sup>5</sup> – GMS 1,25%: solução de glutamato monossódico a 1,25%.

<sup>6</sup> – O tempo necessário para recuperação da viabilidade das células em LDR 10% foi de 4 horas de incubação a 40°C.

<sup>7</sup> – O tempo necessário para recuperação da viabilidade das células em LDR 10% foi de 8 horas de incubação a 40°C.

As células liofilizadas sem adição de crioprotetor apresentaram maior sobrevivência à desidratação (Tabela 4). Após 2 meses de estocagem a -80°C, foi possível quantificar o número de sobreviventes somente nas culturas contendo as soluções de manitol 6% e sorbitol 1,25%. Houve redução de dois ciclos logarítmicos com relação ao número de células viáveis após a liofilização. As demais culturas não apresentaram crescimento imediatamente após a reidratação e inoculação em LDR 10% esterilizado. Entretanto, após 4 ou 8 horas de incubação, foi possível quantificar o número de células presentes nessas culturas (Tabela 4).

No experimento realizado neste trabalho, foi obtida uma viabilidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> na suspensão de células liofilizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após 2 meses de estocagem, enquanto CARVALHO et al. (2003b) obtiveram pouco mais de 10<sup>4</sup> UFC mL<sup>-1</sup> após o mesmo período de armazenamento a 20°C para *L. bulgaricus*. Acredita-se que os valores superiores aqui evidenciados sejam em função da temperatura de estocagem, que foi inferior à adotada por CARVALHO et al. (2003b), além do meio utilizado

para desidratação, que foi o soro em vez de LDR 11%. Ao mesmo tempo, esses autores demonstraram que o efeito da adição das soluções de sorbitol 1,25% e de glutamato monossódico 1,25% só é pronunciado durante o período de estocagem, quando as linhagens de *Lactobacillus* são submetidas à liofilização em LDR 11%. Nesse caso, a viabilidade das células foi superior à apresentada pelas células sem protetores, mesmo após 4 meses de armazenamento a 20°C.

Para culturas de *Lactobacillus acidophilus* seladas a vácuo e armazenadas sob refrigeração durante 20 anos, observou-se uma sobrevivência das células superior a 96% após o período de estocagem (MIYAMOTO-SHINOHARA, 2006). Os autores observaram ainda que as bactérias Gram-positivas submetidas à liofilização demonstraram maior taxa de sobrevivência que as estirpes Gram-negativas analisadas.

O efeito da solução de manitol sobre as células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 possivelmente se explica pela sua atividade antioxidativa. O manitol possui um efeito de anulação do risco oferecido pelos radicais hidroxil, pois ele se complexa com peróxido de hidrogênio, além de atuar como quelante de íons metálicos, o que aumenta suas propriedades antioxidativas (ANDERSEN et al., 1999). Nesse trabalho, a condição que propiciou melhor estabilidade das células de *Streptococcus thermophilus* durante a estocagem foi a que integrou manitol à matriz sob uma atmosfera aeróbia, indicando que a principal causa da deterioração das culturas *starter* está relacionada à oxidação de lipídeos. Além disso, a atividade de acidificação das culturas foi preservada. Os autores justificam seus dados com base no fato de que, durante a desidratação, altas concentrações de sacarídeos freqüentemente formam uma matriz vítrea. Assim, a mobilidade nesse estágio da matéria é tão lenta que não há difusão significativa de moléculas, o que pode limitar uma série de reações químicas na matriz e, possivelmente, restringir a difusão de oxigênio e com isso reduzir os danos na membrana das bactérias.

O choque térmico não protegeu as células da injúria celular, uma vez que o tempo necessário para recuperação da viabilidade foi alcançado somente após 4 horas de incubação, como é o caso das culturas contendo sorbitol ou mistura de sacarose e trealose, ou ainda após 8 horas de incubação, a exemplo das culturas liofilizadas com glutamato monossódico (Tabela 4). Provavelmente, as culturas liofilizadas nestas condições foram as

que mais sofreram os efeitos da desidratação extrema causada pela liofilização.

O tratamento de choque ácido promoveu redução menor do que 1 ciclo logarítmico nas culturas que foram liofilizadas com soro (sem substâncias protetoras) (Tabela 4). Neste caso, o choque ácido, aliado às proteínas presentes no soro, parece exercer papel importante, tanto durante a desidratação das células como para a manutenção da viabilidade durante a estocagem das culturas. Nas demais situações, houve redução de 1 ciclo logarítmico para as culturas liofilizadas em meio com manitol e de 2 ciclos para as culturas contendo sorbitol e mistura de sacarose e trealose (Tabela 4). Na situação em que foram liofilizadas com sorbitol e glutamato monossódico, foi possível quantificar a sobrevivência somente após 4 horas de incubação a 40°C em LDR 10% (Tabela 4).

Este trabalho é o primeiro relato na literatura que correlaciona o efeito do choque ácido e da adição de soluções protetoras sobre a sobrevivência *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao processo de liofilização.

#### **4.2.3. Efeito dos pré-tratamentos sobre a capacidade de acidificação do leite por *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por liofilização**

O processo de desidratação por liofilização afetou significativamente a capacidade de acidificação das células, durante o período de estocagem a -80°C, para as três variáveis analisadas, pH, acidez titulável e tempo para coagulação de LDR 10% (Tabela 5). Resultado similar foi obtido quando avaliou-se a evolução do pH em leite desnatado reconstituído inoculado com células liofilizadas de *L. bulgaricus* (TEIXEIRA et al., 1995). Esses autores constataram que o processo de desidratação afetou significativamente a sobrevivência e a capacidade acidificação das células quando comparadas ao controle.

Tabela 5. Efeito do processo de liofilização sobre a capacidade de acidificação das células do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Variável <sup>2</sup>	ANOVA <sup>1</sup>		
	Contraste	Valor F	Pr > F
pH	010 020 030 vs (111 112 113 114 115 121 122 123 124 125	8,94	0,0037*
Acidez titulável	131 132 133 134 135 211 212 213 214 215	236,76	< 0,001*
Tempo de coagulação	221 222 223 224 225 231 232 233 234 235) <sup>3</sup>	65,27	< 0,001*

<sup>1</sup> – ANOVA analisada pelo *software* SAS V8. O teste estatístico aplicado foi o F, com um nível de significância de 5%.

<sup>2</sup> – Variáveis analisadas: pH, acidez titulável (% de ácido lático p/v) e tempo para coagulação de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%).

<sup>3</sup> – Os tratamentos estão codificados por três algarismos. O primeiro número corresponde ao período em que foram quantificadas as variáveis (0 – antes da liofilização; 1 – após a liofilização e estocagem a -80°C por 1 mês; e 2 – após a liofilização e estocagem a -80°C por 2 meses);

O segundo indica o tratamento aos quais as células foram submetidas antes da liofilização (1 – controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos; 2 – choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C; e 3 – choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C);

O terceiro algarismo corresponde à substância protetora adicionada antes da liofilização (1 – solução de manitol a 6%; 2 – solução de sorbitol a 1,25%; 3 – solução de glutamato monossódico a 1,25%; 4 – mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%; e 5 – soro, sem adição de protetor).

\* – Significativo a 5% de probabilidade.

Observou-se que a capacidade das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 liofilizadas e estocadas a -80°C de reduzir o pH em LDR 10% foi comprometida durante o período de estocagem, diminuindo após 1 e 2 meses de estocagem a -80°C (Tabela 6). As células liofilizadas com as diferentes substâncias protetoras não diferiram significativamente das que não sofreram adição de protetores com relação às suas capacidades de reduzirem o pH no referido meio. Ao mesmo tempo, os pré-tratamentos, choque térmico e choque ácido, não afetaram significativamente a capacidade de acidificação do meio LDR 10% pelas células, sendo que os valores de pH medidos nessas condições foram estatisticamente iguais ao medido na condição controle (Tabela 6).

A porcentagem de acidez titulável (% p/v) obtida em LDR 10% após o período de estocagem manteve-se estável (Tabela 7). Os pré-tratamentos adotados não afetaram significativamente a capacidade de acidificação para a variável testada. Observou-se ainda que, em todas as condições avaliadas, os valores encontrados para a acidez titulável foram estatisticamente similares,

exceto para as células liofilizadas com sorbitol, as quais apresentaram valores distintos e estatisticamente menores para essa variável, sendo uma possível indicação de que essa condição afeta negativamente a atividade fermentativa do *L. delbrueckii* UFV H2b20.

O tempo para a coagulação de LDR 10% inoculado com as células liofilizadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi significativamente afetado pelo período de estocagem das células a -80°C (Tabela 8). Ocorreu um aumento significativo do tempo de coagulação para as culturas que permaneceram estocadas, em todas as condições avaliadas. Em contrapartida, em células liofilizadas sem a adição de substâncias protetoras foram constatados tempos de coagulação estatisticamente menores do que as liofilizadas com as demais soluções protetoras.

Os dados apresentados indicam que o soro por si só confere proteção às células durante o processo de desidratação dispensando a adição de substâncias protetoras. Esse fato é relevante do ponto de vista econômico, uma vez que tais substâncias possuem custo elevado, e a sua substituição pelo soro, como meio para o cultivo das células em escala industrial, possibilitaria um efeito similar e reduziria ainda mais os custos de produção. A proteção conferida pode advir da presença de 5,19% de lactose, pela presença das proteínas estabilizadas no soro, ou ainda pelo efeito de ambos.

Tabela 6. Capacidade de acidificação, determinada como valores de pH de leite desnatado reconstituído (LDR 10%), de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.

Pré- Tratament o	VALORES DE pH <sup>4</sup>										Média
	Tempo de estocagem (em meses)										
	Manitol 6%		Sorbitol 1,25%		GMS 1,25% <sup>5</sup>		Sac 6% + Tre 4% <sup>6</sup>		Soro <sup>7</sup>		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Controle <sup>1</sup>	5,35Bb	5,90Aa	5, 57Ba	5,97Aa	5,61Ba	6,14Aa	5,52Ba	6,10Aa	5,49Aa	5,79Ab	5,74 A
Choque térmico <sup>2</sup>	5,64Aa	5,64Aa	5,50Ba	5,86Aa	5,60Aa	5,86Ab	5,56Ba	5,88Ab	5,50Ba	6,02Aa	5,71 A
Choque ácido <sup>3</sup>	5,35Bb	5,81Aa	5,39Ba	5,97Aa	5,46Ba	5,83Ab	5,51Aa	5,74Ab	5,26Ba	6,24Aa	5,66 A
Média	5,45 A	5,78 A	5,49 A	5,93 A	5,56 A	5,94 A	5,53 A	5,91 A	5,42 A	6,02 A	5,70

As médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Valores de pH de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubado com 4% (p/v) de células desidratadas por liofilização em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – GMS 1,25% - solução de glutamato monossódico a 1,25%.

<sup>6</sup> – Sac 6% + Tre 4% - mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%.

<sup>7</sup> – Soro: sem adição de substâncias protetoras.



Tabela 7. Capacidade de acidificação, determinada como porcentagem de acidez titulável (p/v), de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.

Pré- Tratament o	ACIDEZ TITULÁVEL <sup>4</sup>										Média
	Tempo de estocagem (em meses)										
	Manitol 6%		Sorbitol 1,25%		GMS 1,25% <sup>5</sup>		Sac 6% + Tre 4% <sub>6</sub>		Soro <sup>7</sup>		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Controle <sup>1</sup>	0,93	0,80	0,60	0,47	0,67	0,87	0,67	0,60	0,80	0,73	0,71 A
Choque térmico <sup>2</sup>	0,60	0,60	0,53	0,60	0,60	0,80	0,60	0,80	0,67	0,60	0,64 A
Choque ácido <sup>3</sup>	0,80	0,60	0,67	0,60	0,67	0,73	0,60	0,93	0,73	0,67	0,70 A
Média	0,78 A	0,67 A	0,60 B	0,56 B	0,65 A	0,80 A	0,62 A	0,78 A	0,73 A	0,67 A	0,68

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Acidez titulável, expressa em % de ácido láctico, de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubado com 4% (p/v) de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por liofilização em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – GMS 1,25% - solução de glutamato monossódico a 1,25%.

<sup>6</sup> – Sac 6% + Tre 4% - mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%.

<sup>7</sup> – Soro: sem adição de substâncias protetoras.

Tabela 8. Tempo de coagulação de leite desnatado reconstituído (LDR 10%) como medida da atividade de acidificação de células liofilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em soro de Queijo Minas Frescal e armazenadas a -80°C.

Pré- Tratament o	TEMPO PARA COLAGULAÇÃO DE LEITE (EM HORAS) <sup>4</sup>										Média
	Tempo de estocagem (em meses)										
	Manitol 6%		Sorbitol 1,25%		GMS 1,25% <sup>5</sup>		Sac 6% + Tre 4% <sup>6</sup>		Soro <sup>7</sup>		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Controle <sup>1</sup>	15,3Ba	24,0Aa	11,0Bb	23,3Aa	12,7Bc	24,0Aa	16,0Bb	23,7Aa	11,0Bb	22,7Aa	18,2 B
Choque térmico <sup>2</sup>	16Ba	24,0Aa	19,0Ba	24,0Aa	16,3Bb	24,0Aa	19,0Ba	24,0Aa	14,3Ba	23,7Aa	20,4 A
Choque ácido <sup>3</sup>	11,0Bb	24,0Aa	11,0Bb	24,0Aa	19,0Ba	24,0Aa	11,0Bc	23,3Aa	11,0Bb	21,3Aa	18,0 B
Média	14,1 A	24,0 A	13,7 A	23,8 A	16,0 A	24,0 A	15, A	23,7 A	12,1 B	22,6 B	18,9

As médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Tempos de coagulação, em horas, de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubados com 10% (p/v) de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por liofilização em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – GMS 1,25% - solução de glutamato monossódico a 1,25%.

<sup>6</sup> – Sac 6% + Tre 4% - mistura das soluções de sacarose 6% e trealose 4%.

<sup>7</sup> – Soro: sem adição de substâncias protetoras.

#### 4.2.4. Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células liofilizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após 2 meses de estocagem a -80°C

O crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em LDR 10% e a alteração concomitante do pH encontram-se representados na Figura 6. Após 4 horas de incubação a 40°C, constatou-se um número de células na ordem de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, e a intensificação da produção de ácido foi observada durante o período de crescimento (Figura 6). Durante 12 horas de atividade em LDR 10%, o pH decresceu 1,0 unidade, demonstrando inequívoca de alta atividade das células no substrato utilizado como meio de crescimento.

A atividade de células liofilizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após 2 meses de armazenamento a -80°C, quando desidratadas em meio contendo as soluções de manitol 6% e de sorbitol a 1,25%, é demonstrada imediatamente após sua inoculação em LDR 10%. (Figura 7). Essas soluções provavelmente protegem contra injúria celular de maneira mais eficiente que as demais soluções testadas.

Com a aplicação do choque térmico às células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes da liofilização é possível observar que, durante o período de estocagem a -80°C, as células liofilizadas sem a adição de crioprotetores são imediatamente ativas em LDR 10%, com uma viabilidade aproximada de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> (Figura 8). De maneira similar, o soro apresentou o mesmo comportamento com as células tratadas previamente com o choque ácido (Figura 9). Entretanto, a viabilidade das células submetidas ao choque ácido foi superior às submetidas ao choque térmico, cerca de dois ciclos logarítmicos a mais. É possível que a lactose presente no soro de queijo Minas Frescal desnatado, cujo teor aproximado é de 5,19%, tenha papel fundamental na crioproteção. Ademais, a aplicação adicional do choque ácido pode ter estabilizado os constituintes do soro de tal forma que resultaram em maior efeito protetor do que as demais substâncias analisadas.

Uma cultura *starter* considerada ideal deve atender a três requisitos primordiais, que devem ser cuidadosamente observados. Antes de se apontar a melhor condição, dentre todas as avaliadas neste trabalho, foram levadas em consideração os seguintes aspectos: (i) qual condição propiciou recuperação imediata das células após inoculação em LDR 10%; (ii) qual das situações propiciou maior sobrevivência ao processo de liofilização; (iii) qual a natureza

das células que evidenciaram maior sobrevivência durante o período de armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; e (iv) qual cultura demonstrou maior atividade de acidificação após o período de estocagem no estado desidratado. Considerando todos esses critérios, pode-se concluir que as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 liofilizadas em soro de queijo Minas Frescal e tratadas previamente pelo choque ácido foram as que corresponderam mais positivamente à essas exigências, demonstrando que essa cultura apresenta potencial para ser utilizada como cultura *starter* para fabricação de produtos lácteos fermentados contendo microrganismos probióticos. Todavia, para que esses produtos sejam considerados como tal, conforme a legislação brasileira vigente, estudos posteriores devem ser conduzidos para avaliar a sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a fabricação e durante a vida de prateleira dos produtos lácteos elaborados com essa cultura *starter* probiótica.

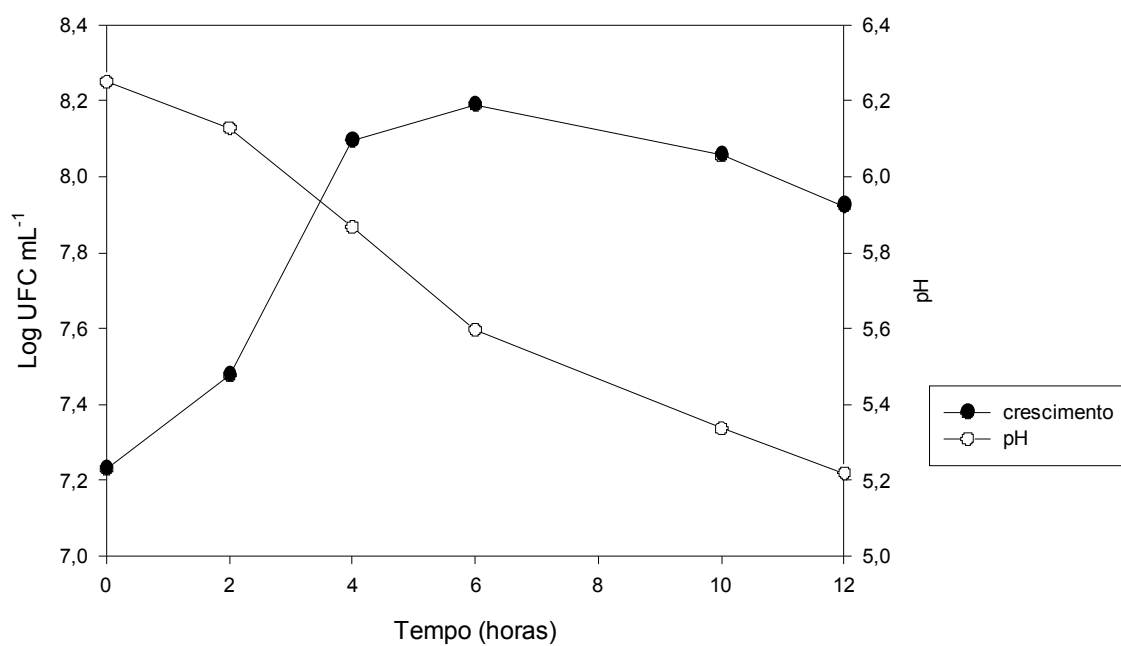
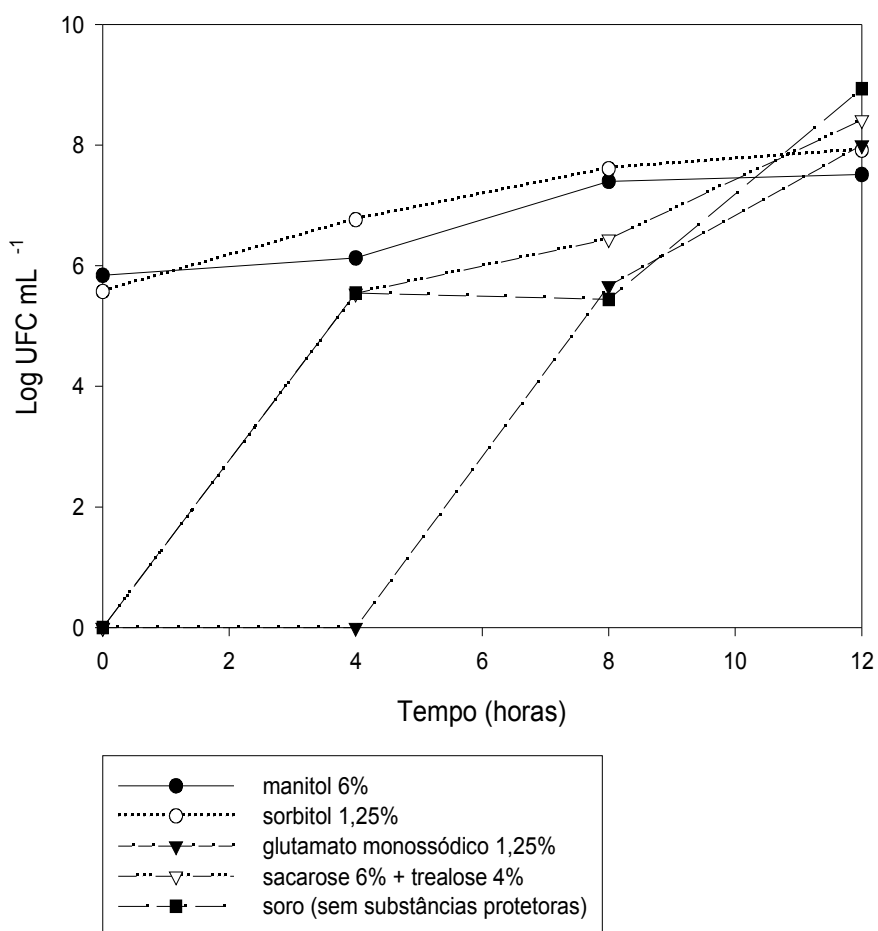


Figura 6. Crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e acidificação em Leite Desnatado Reconstituído a 10% (LDR 10%). As células foram anteriormente ativadas em LDR 10% e incubadas a 40°C.



UFV H2b20

liofilizadas, com e sem a adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal, após 2 meses de estocagem a -80°C. Após o período de estocagem, o crescimento das culturas foi avaliado mediante a contagem do número de células viáveis (Log UFC mL<sup>-1</sup>).

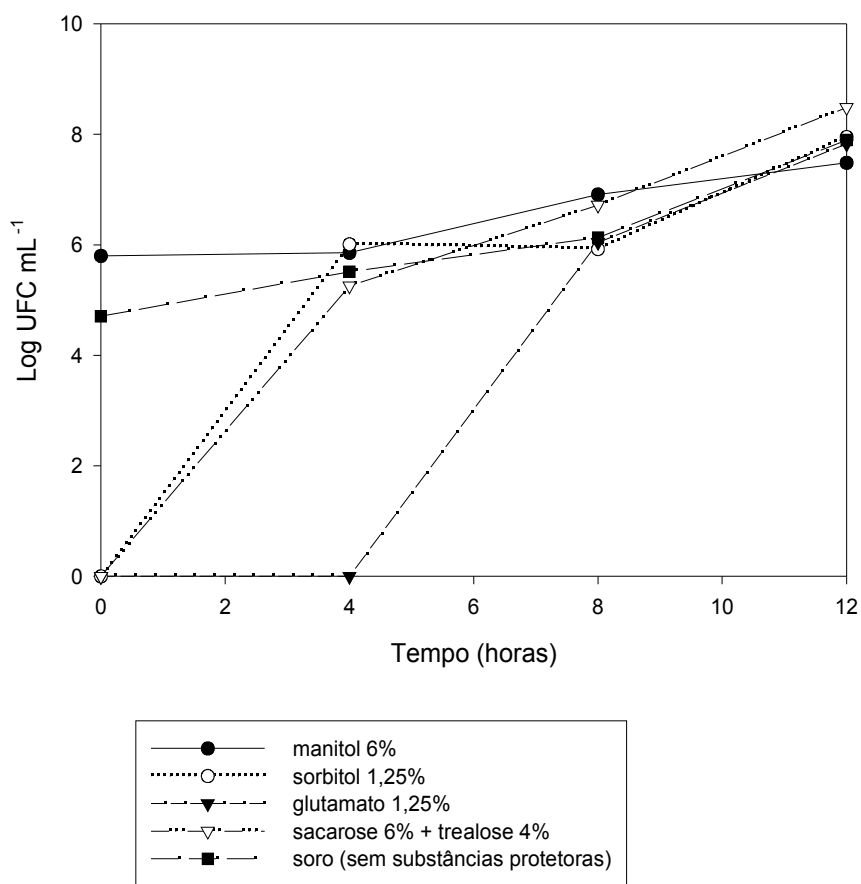


Figura 8. Efeito do choque térmico sobre a atividade em LDR 10% de culturas liofilizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20, com e sem a adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal, após 2 meses de estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o período de estocagem, o crescimento das culturas foi avaliado mediante a contagem do número de células viáveis (Log UFC mL<sup>-1</sup>).

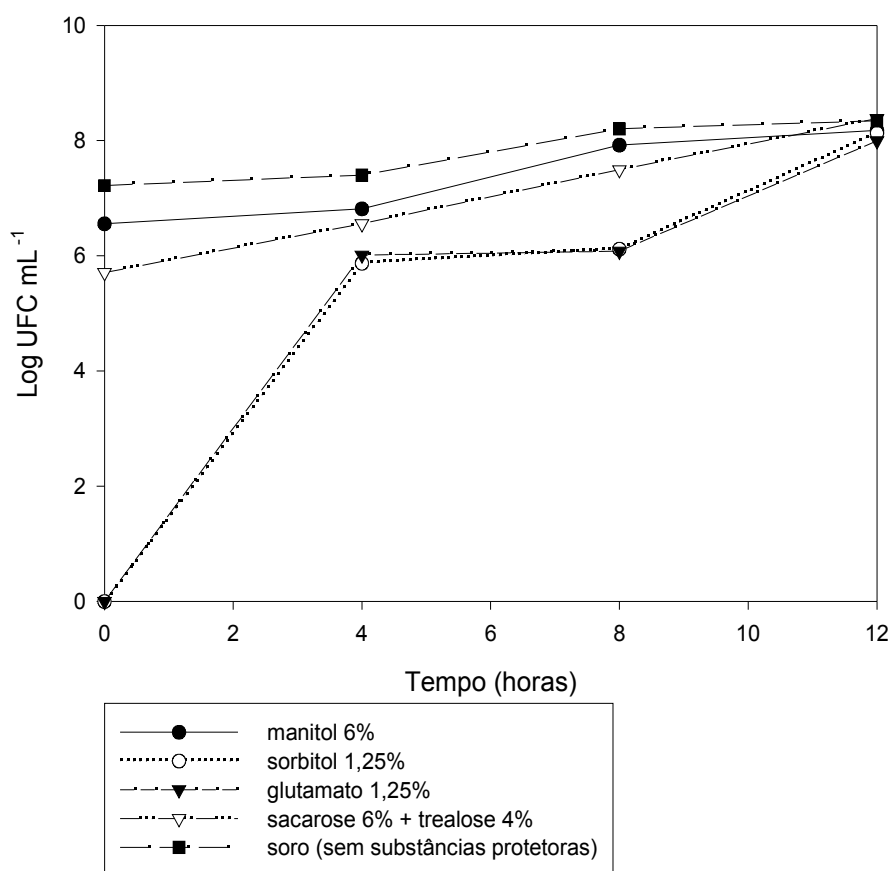


Figura 9. Efeito do choque ácido sobre a atividade em LDR 10% de culturas liofilizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20, com e sem a adição de substâncias protetoras ao soro de queijo Minas Frescal, após 2 meses de estocagem a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após o período de estocagem, o crescimento das culturas foi avaliado mediante a contagem do número de células viáveis ( $\text{Log UFC mL}^{-1}$ ).



### **4.3. Conservação de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal por *spray-drying***

#### **4.3.1. Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao processo de desidratação por *spray-drying***

Os resultados dos efeitos dos choques térmico e ácido sobre as células destinadas ao processo de desidratação por *spray-drying* não afetaram estatisticamente o número de células iniciais das amostras (Tabela 9). Entretanto, o choque térmico provocou uma redução significativa no número de células após a sua aplicação, quando comparado aos demais tratamentos empregados. Não houve diferença significativa entre o número de células após estas terem sido submetidas ao choque ácido daquelas sem tratamento.

O número de células presentes antes do processamento por *spray-drying* foi comparado ao número final de sobreviventes após a desidratação (Tabela 10) constatando-se que houve redução significativa de 1 ciclo logarítmico no número de células após a secagem por *spray-drying* comparado ao número inicial.

A maior perda de viabilidade ocorreu quando as células foram tratadas pelo choque térmico, enquanto aquelas submetidas ao choque ácido não apresentaram diferenças estatísticas com as células sem pré-tratamento (Tabela 10). Condições para choques térmico e ácido, específicas para o *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram estabelecidas (MONTEIRO, 1999), e o efeito desses choques sobre a resistência dessa bactéria em leite em pó também foram estudados (FURTADO, 2001). Em ambos os casos, o caldo MRS foi utilizado como meio de cultivo das células, e a temperatura de incubação adotada foi de 37°C. Diferentemente, no presente trabalho conduzido com o *L. delbrueckii* UFV H2b20, foi avaliado o efeito de ambos os choques sobre a sobrevivência das células após os processos de desidratação, liofilização ou *spray-drying*. Além disso, o soro foi adotado como meio para crescimento e a incubação foi a 40°C. Mesmo assim, os resultados mostram-se coerentes com os dois estudos anteriores. As diferenças foram por isso atribuídas às diferenças em meios e métodos.

As células do *L. delbrueckii* UFV H2b20, quando submetidas ao choque térmico, têm a sua viabilidade reduzida após a secagem. Todavia, o choque ácido não resulta em alteração na viabilidade das células desidratadas (Tabela

10). Observando a viabilidade inicial das células, verifica-se que o número de células submetidas ao choque térmico foi ligeiramente menor do que os das demais condições. Provavelmente, as diferenças apontadas pela análise estatística podem ter sido provocadas por esse número reduzido de células.

A aplicação do choque térmico correspondente a 52°C por 30 minutos aumenta a viabilidade das células de *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, na fase exponencial de crescimento, quando as mesmas são submetidas ao processo de *spray-drying*, tendo o LDR 20% como meio para desidratação (DESMOND et al., 2002). Em um estudo anterior (TEIXEIRA et al., 1995<sup>a</sup>) demonstrou-se que o choque térmico de 50°C por 30 minutos aumenta a sobrevivência de células de *L. bulgaricus* na fase exponencial de crescimento durante o processamento por *spray-drying*. Entretanto, quando as células na fase estacionária de crescimento foram desidratadas, o mesmo choque não mostrou efeito. Assim, os autores concluíram que o choque térmico não é útil como método para se aumentar a sobrevivência de *L. bulgaricus* ao processo de *spray-drying*.

A desidratação das células de diferentes linhagens das espécies de *Bifidobacterium longum* e *B. infantis* pelo método de *spray-drying* é influenciada pela temperatura de saída do pó, quanto maior for essa temperatura, menor será a sobrevivência das células de ambas as linhagens após a desidratação e estocagem a 4°C (LIAN et al., 2002). As condições de desidratação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram estabelecidas como sendo de 170°C na câmara e de 95°C na saída do pó, aproximadamente (LEITE, 2005). O leite em pó obtido apresentou um número de células viáveis acima de 10<sup>6</sup> após 60 dias de estocagem a -20°C.

Nas condições de secagem adotadas, ou seja, temperatura entre 180°C e 190°C na câmara e 80°C a 90°C na saída do pó, constatou-se um aumento na sobrevivência após 60 dias de armazenamento a -20°C, obtendo-se soro em pó contendo 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (Tabela 10). Em *Streptococcus thermophilus*, a solução contendo soro acrescida de sacarose é a que conferiu melhor capacidade de proteção de células, dentre as demais soluções testadas CHAMPAGNE et al. (2001). Os autores justificam os resultados com base na existência de compostos tamponantes no soro, como citratos e fosfatos, aliada à presença da sacarose, que é um osmoprotetor, contribuem substancialmente para uma maior sobrevivência das células ao processo de desidratação por *spray-drying*.

Tabela 9. Efeito dos pré-tratamentos sobre a viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Pré-tratamento	Log UFC mL <sup>-1</sup>		
	UFC inicial	Após pré-tratamento	Média
Controle <sup>1</sup>	8,4946	8,4023	8,4485 A
Choque térmico <sup>2</sup>	8,15 61	8,2341	8,1951 B
Choque ácido <sup>3</sup>	8,4690	8,5189	8,4940 A
Média	8,3732 A	8,3851 A	8,3792

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – No controle, as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

Tabela 10. Efeito dos pré-tratamentos sobre a sobrevivência e a resistência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 ao processo de desidratação por *spray-drying*.

Pré-tratamento	Log UFC mL <sup>-1</sup>		Média
	Antes <i>spray-drying</i>	Após <i>spray-drying</i>	
Controle <sup>1</sup>	8,4023	7,1713	8,0227 A
Choque térmico <sup>2</sup>	8,2341	6,9680	7,7861 B
Choque ácido <sup>3</sup>	8,5189	7,2329	8,0736 A
Média	8,3851 A	7,1241 B	7,9608

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

#### **4.3.2. Sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 antes da desidratação por *spray-drying* e após, durante o período de armazenamento a -20°C**

O número de células viáveis imediatamente após o processo de *spray-drying* foi comparado ao obtido após a secagem (Tabela 11). Verificou-se que ocorreu a manutenção da viabilidade das culturas durante o período de estocagem, uma vez que não se constatou diferenças entre as médias. O choque ácido não diferiu estatisticamente do controle, com relação ao número de células sobreviventes após a secagem e durante o período de estocagem. Por outro lado, o choque térmico provocou uma redução significativa no número de células viáveis após a desidratação.

Embora tenha ocorrido uma redução de 1 ciclo logarítmico no número de sobreviventes após a secagem (Tabela 10), essa redução não influenciou a manutenção do número de células tanto para as culturas submetidas ao choque ácido como para aquelas sem pré-tratamentos (controle). Entretanto, este comportamento não foi o observado para as culturas tratadas com choque térmico (Tabela 11).

As células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 mantiveram sua viabilidade em torno de  $3,0 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>, mesmo após 2 meses de armazenamento a -20°C. Entretanto, não foram avaliadas outras temperaturas de estocagem para verificar se as mesmas interfeririam na sobrevivência das células desidratadas. A viabilidade das células de *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 e *L. salivarius* UCC 118 desidratadas por *spray-drying* em LDR 20% após 2 meses de estocagem a 4°C permaneceu constante para *L. paracasei* NFBC 338, enquanto para *L. salivarius* UCC 118, houve um declínio de 1 ciclo logarítmico na sobrevivência após o mesmo período (GARDINER et al., 2000). Os autores observaram que a sobrevivência das culturas durante a estocagem é maior quanto menor for a temperatura de armazenamento. Mais recentemente, uma cultura *starter* contendo células de *L. paracasei* NFBC 338 (Rif<sup>r</sup>), também desidratadas por *spray-drying*, foi utilizada para fabricação de queijo tipo Cheddar (GARDINER et al., 2002). O número de células obtido no produto foi 2 ciclos logarítmicos menor que a contagem inicial da cultura. Após 3 meses da elaboração do queijo, o número de células não apresentou reduções logarítmicas. A cultura demonstrou-se viável até mesmo após 7 meses de estocagem sob refrigeração.

Tabela 11. Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 antes e após a desidratação por *spray drying*, durante o período de estocagem de dois meses a -20°C.

Pré-tratamento	Log UFC mL <sup>-1</sup>			Média
	Tempo (meses) <sup>4</sup>			
	0	1	2	
Controle <sup>1</sup>	7,1713	7,2301	7,3461	7,2492 A
Choque térmico <sup>2</sup>	6,9681	6,9863	7,0551	7,0031 B
Choque ácido <sup>3</sup>	7,2329	7,1231	7,2305	7,1955 A
Média	7,1241 A	7,1132 A	7,2106 A	7,1493

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Viabilidade de *L. delbrueckii* UFVH2b20 imediatamente após a liofilização (0) e após 1 e 2 meses de estocagem.

#### 4.3.3. Efeito dos pré-tratamentos sobre a capacidade de acidificação do leite por *L. delbrueckii* UFV H2b20 conservado por *spray-drying*

A produção de ácido pelas culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi avaliada mediante a determinação do pH do meio de crescimento (Tabela 12), da avaliação da acidez titulável (Tabela 13) e do tempo de coagulação do LDR 10% (Tabela 14), antes do processo de desidratação por *spray-drying* e, também, durante o período de estocagem a -20°C, no estado desidratado.

O choque térmico ou o ácido não interferiram significativamente na capacidade de acidificação das culturas no que se refere aos valores de pH (Tabela 12) ou os de acidez titulável (Tabela 13). Ao contrário, a capacidade de acidificação das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por *spray-drying* foi significativamente afetada pelo tempo de estocagem.

Sendo assim, o processo de desidratação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 por *spray-drying* afeta significativamente a capacidade de acidificação das células durante o período de estocagem a -20°C para as três variáveis analisadas (Tabelas 12, 13 e 14). A evolução do pH em leite

desnatado reconstituído inoculado com células de *L. bulgaricus* desidratadas por *spray-drying* afeta significativamente a sobrevivência e a capacidade acidificação das células (TEIXEIRA et al., 1995a). No entanto, esse trabalho considerou os valores de pH como a única forma de avaliação da capacidade de acidificação.

O choque térmico promoveu a manutenção da capacidade de acidificação das células no estado desidratado, mesmo quando estocadas por 2 meses a -20°C (Tabela 12). Houve um aumento significativo da produção de ácido pelas células inoculadas em leite, após 12 horas de incubação a 40°C, em relação ao controle, sendo que o mesmo comportamento não foi observado para as células tratadas pelo choque ácido, uma vez que estas não diferiram do controle.

Com relação aos valores da acidez titulável, a capacidade de acidificação das células tratadas pelo choque térmico, após 2 meses de estocagem no estado desidratado, diferiu significativamente daquela apresentada pelas células controle antes do processo de *spray-drying* (Tabela 13). O choque térmico, aplicado previamente ao processo de desidratação das células, propiciou aumento na capacidade de acidificação das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 de acidificar o substrato LDR 10% em relação às células sem pré-tratamento e as submetidas ao choque ácido.

O processo de desidratação por *spray-drying* afetou significativamente o tempo necessário para a ocorrência da coagulação do leite inoculado com células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 estocadas a -20°C (Tabela 14). Ressalta-se que o pré-tratamento choque térmico não diferiu estatisticamente do controle (Tabela 14), enquanto as células pré-tratadas pelo choque ácido demonstraram-se mais lentas nesse processo de coagulação, porém não menos capazes de acidificarem o meio e produzirem ácido, conforme já discutido (Tabelas 12 e 13).

Em resumo, o choque ácido aplicado às culturas novamente demonstrou ser um tratamento que resulta na manutenção da capacidade de acidificação das células durante a estocagem, uma vez que as mesmas demonstraram comportamento comparável ao das células sem pré-tratamento. Assim, pode-se inferir que a aplicação de tratamentos prévios, que podem tornar o *L. delbrueckii* UFV H2b20 mais resistente à passagem pelo trato digestivo, não afetariam negativamente suas atividades metabólicas básicas, neste caso expressas pela sua capacidade de acidificação. Essa observação é

relevante quando se considera a introdução desse tipo de células em uma cultura *starter* para fabricação de alimentos fermentados, uma vez que os efeitos probióticos sobre a saúde do consumidor do alimento contendo células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 dependem da sua passagem e implantação no intestino do organismo. Os resultados embasam ainda a inferência de que uma cultura *starter* contendo células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por *spray-drying* e pré-tratadas pelo choque térmico pode ser recomendada para fabricação de queijos e iogurtes, uma vez que é desejável rápida acidificação do leite, o que reduziria o tempo para elaboração desses produtos sem prejudicar suas características típicas desejáveis. Não foram encontrados na literatura consultada relatos correlacionando o efeito do choque ácido sobre a sobrevivência de bactérias ao processo de desidratação por *spray-drying*.

Tabela 12. Capacidade de acidificação, determinada como valores de pH de leite desnatado reconstituído (LDR 10%), de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 antes e após a desidratação por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -20°C.

Pré-tratamento	VALORES DE pH <sup>4</sup>			Média
	Tempo (meses) <sup>5</sup>			
	0	1	2	
Controle <sup>1</sup>	4,49 Bb	4,48 Ab	5,20 Aa	4,73 A
Choque térmico <sup>2</sup>	4,86 Aa	4,59 Ab	4,56 Bb	4,67 A
Choque ácido <sup>3</sup>	4,83 Ab	4,56 Ac	5,20 Aa	4,87 A
Média	4,73 B	4,54 C	4,98 A	4,76

As médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Valores de pH de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubado com 4% (p/v) de células desidratadas por liofilização em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – Valores de pH para células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a aplicação dos pré-tratamentos (0), e após a desidratação por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal estabilizado, durante o período de estocagem de 2 meses.

Tabela 13. Capacidade de acidificação, determinada como porcentagem de acidez titulável (p/v), de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 antes e após a desidratação por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -20°C.

Pré-tratamento	ACIDEZ TITULÁVEL <sup>4</sup>			Média
	Tempo (meses) <sup>5</sup>			
	0	1	2	
Controle <sup>1</sup>	1,80 Aa	1,20 Ab	1,20 Bb	1,50 A
Choque térmico <sup>2</sup>	1,47 Ab	1,07 Ac	1,93 Aa	1,50 A
Choque ácido <sup>3</sup>	1,60 Aa	1,47 Aa	1,27 Ba	1,45 A
Média	1,62 A	1,24 B	1,47 A	1,48

As médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células, cultivadas a 40°C, em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Acidez titulável, expressa em % de ácido láctico, de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubado com 4% (p/v) de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por liofilização em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – Acidez titulável (p/v) para células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a aplicação dos pré-tratamentos (0), e após a desidratação por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal, durante o período de estocagem de 2 meses.



Tabela 14. Tempo de coagulação de leite desnatado reconstituído (LDR 10%) como medida da atividade de acidificação de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, antes e após a desidratação por *spray-drying*, em soro de queijo Minas Frescal e armazenadas a -20°C.

Pré-tratamento	TEMPO DE COAGULAÇÃO (HORAS) <sup>4</sup>			Média
	Tempo (meses) <sup>5</sup>			
	0	1	2	
Controle <sup>1</sup>	7,7 Bc	10,0 Aa	9,0 Bb	8,9 B
Choque térmico <sup>2</sup>	7,0 Cc	10,0 Aa	9,0 Bb	8,7 B
Choque ácido <sup>3</sup>	8,7 Ab	10,0 Aa	10,0 Aa	9,6 A
Média	7,8 C	10,0 A	9,3 B	9,1

As médias seguidas por uma mesma letra, minúscula na horizontal e maiúscula na vertical, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> – Controle: as células cultivadas a 40°C foram mantidas nessa temperatura por 30 minutos.

<sup>2</sup> – Choque térmico: tratamento a 50°C por 30 minutos, sobre células cultivadas a 40°C.

<sup>3</sup> – Choque ácido: ressuspensão das células, cultivadas a 40°C, em soro de queijo Minas Frescal com pH 3,5, ajustado com solução de HCl 3 M, por 30 minutos a 40°C.

<sup>4</sup> – Tempos de coagulação, em horas, de leite desnatado reconstituído a 10% (LDR 10%) incubados com 10% (p/v) de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal estabilizado por 12 horas.

<sup>5</sup> – Tempos de coagulação do leite para células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a aplicação dos pré-tratamentos (0), e após a desidratação por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal, durante o período de estocagem de 2 meses.

#### 4.3.4. Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células desidratadas por *spray-drying* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 após 2 meses de estocagem a -20°C

Na Figura 10, o efeito dos pré-tratamentos sobre a atividade do *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratado por *spray-drying* e estocado por 2 meses a -20°C demonstrou que, imediatamente após a inoculação das células LDR 10%, o número de células pouco se altera, tanto para a condição controle como nas culturas submetidas ao choque térmico ou ácido ( $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>). Entretanto, após 4 horas de incubação a 40°C, as células tratadas pelo choque ácido demonstraram crescimento mais pronunciado, chegando a atingir números acima de  $10^8$  células por mL da cultura. Esse valor é comparável ao obtido para as células que não foram submetidas à desidratação (Figura 6). Além disso, o pH medido durante o crescimento apontou um decréscimo de 2,0 unidades, novamente indicando alta atividade das células presentes nessa cultura.

Uma cultura *starter* considerada ideal deve atender a três requisitos primordiais, que devem ser cuidadosamente observados. Antes de se apontar a melhor condição, dentre todas as avaliadas neste trabalho, foram levadas em consideração os seguintes aspectos: (i) qual condição propiciou recuperação imediata das células após inoculação em LDR 10%; (ii) qual das situações propiciou maior sobrevivência ao processo de desidratação por *spray-drying*; (iii) qual a natureza das células que evidenciaram maior sobrevivência durante o período de armazenamento a -20°C; e (iv) qual cultura demonstrou maior atividade de acidificação após o período de estocagem no estado desidratado. Considerando todos esses pré-requisitos, pode-se concluir que as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 processadas por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal e tratadas previamente pelo choque ácido foram as que mais corresponderam a essas exigências, demonstrando que essa cultura apresenta potencial para ser utilizada como cultura *starter* para fabricação de produtos lácteos fermentados contendo microrganismos probióticos. Todavia, para que esses produtos sejam considerados como tal, conforme a legislação brasileira vigente, estudos posteriores devem ser conduzidos para avaliar a sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 após a fabricação e durante a vida de prateleira dos produtos fermentados elaborados com a cultura *starter* probiótica.

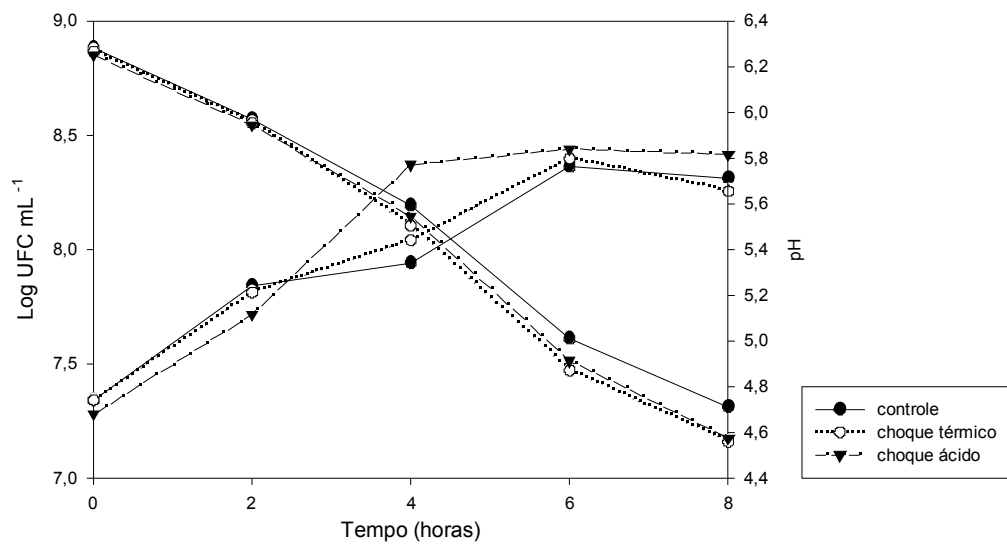


Figura 10. Efeito do choque térmico e choque ácido sobre a atividade de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por *spray-drying* após 2 meses de estocagem a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após o período de estocagem, o crescimento das culturas foi avaliado mediante a contagem do número de células viáveis e a determinação do potencial hidrogeniônico (pH).

## 5. CONCLUSÕES

As características fisiológicas de *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal estabilizado foram estudadas, com vistas ao desenvolvimento de sistema DVS. A maior atividade fermentativa das células em soro de queijo ocorre a 40°C.

A aplicação de choque térmico, 50°C por 30 minutos, ou choque ácido, pH 3,5 por 30 minutos a 40°C, às células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não afeta seu crescimento. O choque ácido não afeta a sobrevivência das células após a desidratação por liofilização ou *spray-drying*. Por outro lado, o choque térmico tem efeito deletério sobre a sobrevivência das células aos mesmos processos de desidratação.

A sobrevivência das células aos processos de liofilização foi maior quando não se adicionaram substâncias crioprotetoras ao soro de queijo. Maior viabilidade durante o armazenamento a -80°C foi observada quando as células foram pré-tratadas em soro de queijo pH 3,5, ajustado com HCl e sem a adição de outras substâncias antes da liofilização. Os choques térmico ou ácido não afetam a recuperação imediata em leite desnatado reconstituído a 10% das culturas liofilizadas que não sofreram adição de substâncias protetoras. As células sem pré-tratamento, por sua vez, precisaram de, pelo menos, 4 horas de incubação para recuperação do crescimento. Diferentemente, todas as culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 desidratadas por *spray-drying* conservam-se ativas e suas células são imediatamente recuperadas em LDR 10%. As culturas submetidas ao choque ácido e desidratadas por *spray-drying* lograram crescimento comparável ao obtido

pelas células ativas que não foram submetidas a qualquer condição que pudesse causar injúria celular.

A cultura *starter* probiótica com *L. delbrueckii* UFV H2b20, desidratada por *spray-drying* em soro de queijo Minas Frescal, e previamente tratada pelo choque ácido, permaneceu com elevado número de células viáveis, mesmo após 2 meses de estocagem a -20°C. Essa cultura demonstra características de viabilidade e atividade promissoras, e seu uso pode ser recomendado para a elaboração de produtos lácteos fermentados contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *L. acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa: UFV, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ANANTA, E., VOLKERT, M., KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, 15: 399-409, 2005.

ANDERSEN, A.B., FOG-PETERSEN, M.S., LARSEN, H., SKIBSTED, L.H. Storage stability of freeze-dried starter cultures (*Streptococcus thermophilus*) as related to physical state of freezing matrix. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, 32: 540-547, 1999.

ANDRADE, R.L.P., MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22: 249-253, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 nov. 2000. Seção 1, p. 9.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 maio. 2003. Seção 1, p. 3.

BROADBENT, J.R., LIN, C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. **Cryobiology**, 39: 88-102, 1999.

CAPITANI, C.D., PACHECO, M.T.D, GUMERATO, H.F., VITALI, A., SCHIMIDT, F.L. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 1123-1128, 2005.

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* subsp. *bulgaricus*. **International Dairy Journal**, 13: 463-468, 2003a.

CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X., GIBBS, P. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. **Lait**, 83: 203-210, 2003b.

CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X., GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, 14: 835-847, 2004.

CHAMPAGNE, C.P., GARDNER, N.J. The effect of protective ingredients on the survival of immobilized cells of *Streptococcus thermophilus* to air and freeze-drying. **Electronic Journal of Biotechnology**, 4: 146-152, 2001.

COPAM (Conselho de Política Ambiental). Deliberação Normativa 04/81. Artigo 5º, item 1, lei nº 7772, de 8 de setembro de 1980.

DE ANGELIS, M., GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. **Proteomics**, 4: 106-122, 2004.

DESMOND, C., STANTON, C., FITSGERALD, G.F., COLLINS, K., ROSS, R.P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray-drying. **International Dairy Journal**, 12: 183-190, 2002.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Produção anual de leite e produtos lácteos até o ano de 2005. Disponível em <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acessado em maio de 2006.

FERREIRA, A.B. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse**. Viçosa: UFV, 53p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

FERREIRA, L.C. **Aspectos do estabelecimento de sistema HACCP e desenvolvimento de metodologia para monitoramento tecnológico em linha de pasteurização de leite**. Viçosa: UFV, 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

FIGUEIREDO, H.M. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo e sua estabilidade em leite em pó e leite fluido**. Viçosa: UFV, 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

FLORESTA, F.A. **Análise da região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: Filogenia e presença de seqüência de inserção putativa.** Viçosa: UFV, 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

FURTADO, W.C.A. **Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó.** Viçosa: UFV, 34p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

GARDINER, G.E., O'SULLIVAN, E., KELLY, J., AUTY, M.A.E., FITZGERALD, G.F., COLLINS, J.K., ROSS, R.P., STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, 66: 2605-2612, 2000.

GARDINER, G.E., BOUCHIER, P., O'SULLIVAN, E., KELLY, J., COLLINS, J.K., FITZGERALD, G., ROSS, R.P., STANTON, C. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. **International Dairy Journal**, 12: 749-756, 2002.

GIROTO, J.M., PAWLOWSKY, U. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, 10: 43-46, 2001.

HANSEN, E.B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, 78: 119-131, 2002.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, 13: 3-13, 2003.

LEITE, M.O. **Desenvolvimento de processos para a produção de probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20.** Viçosa: UFV, 76p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, 15: 67-78, 2004.

LIAN, W-C., HSIAO, H-C., CHOU, C-C. Survival of bifidobacteria after spray-drying **International Journal of Food Microbiology**, 74: 79-86, 2002.

LORCA, G.L., RAYA, R.R., TARANTO, M.P., FONT DE VALDEZ, G. Adaptative acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnology Letters**, 20: 239-241, 1998.

LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B.C. Yoghurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, 11: 1-17, 2001.

MONTEIRO, R.C.B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFVH2b20.** Viçosa: UFV, 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.



MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., SUKENOBE, J., IMAIZUMI, T., NAKAHARA, T. Survival curves for microbial species stored by freeze drying. **Cryobiology**, 52: 27-32, 2006.

NEUMANN, E., OLIVEIRA, M.A.P., CABRAL, C.M., MOURA, L.N., NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., CARA, D.C., PODOPRIGORA, G.I., VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 31: 1565-1573, 1998.

PALMFELDT, J., HAN-HÄGERDAL, B. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. **International Journal of Food Microbiology**, 55: 235-238, 2000.

PASSOS, L.M.L. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo ultrafiltrado e suplementado**. Viçosa: UFV, 48p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

PEPPLER, H.J., PERLMAN, D. **Microbial Technology Microbial Process**. Academic Press, New York, 59-91, 1979.

SALMINEN, S., OUWEHAND, A., BENNO, Y., LEE, Y.K., Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, 10: 107-110, 1999.

SANTOS, N.S. **Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa: UFV, 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1984.

SARAIVA, M.A.F. **Características bioquímicas de importância tecnológica de bactérias lácticas isoladas de salame italiano**. Viçosa: UFV, 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

STORZ, G., HENGGE-ARONIS, R. **Bacterial Stress Responses**. ASM Press, Washington, DC, 3-18, 2000.

TEIXEIRA, L.M. **Caracterização fisiológica e genética do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 desprovido da capacidade de imunoestimulação**. Viçosa: UFV, 38p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

TEIXEIRA, P., CASTRO, H., KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Applied Bacteriology**, 78: 456-462, 1995a.

TEIXEIRA, P.C., CASTRO, M.H., MALCATA, F.X., KIRBY, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, 78: 1025-1031, 1995b.

UETANABARO, A.P.T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa: UFV, 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

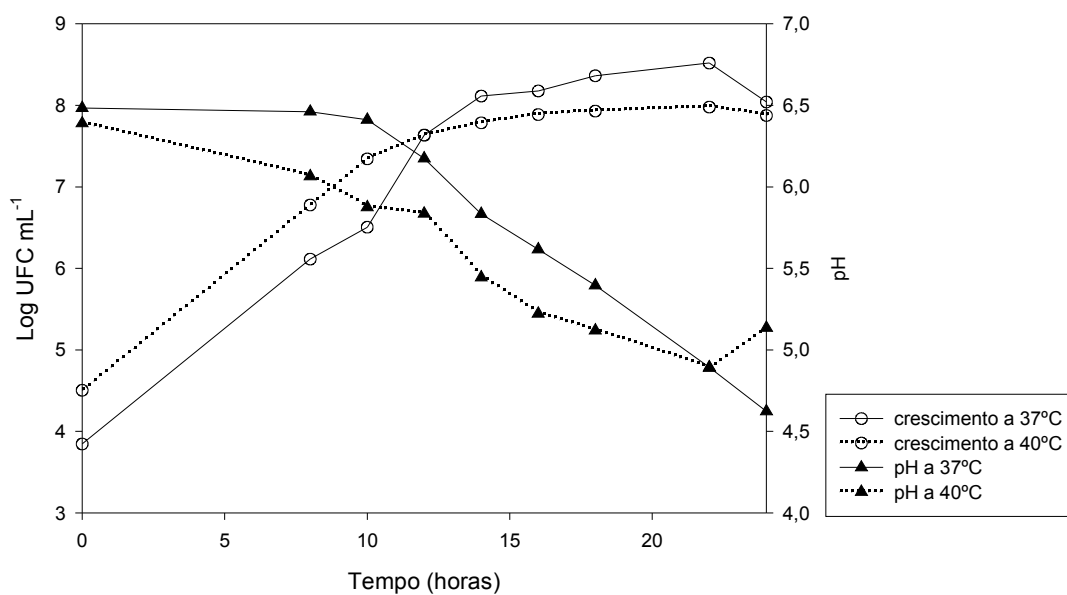
VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRLICH, S.D., MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 82: 187-216, 2002.

VINDEROLA, C.G., BAILO, N., REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, 33: 97-102, 2000.

ZAYED, G., ROOS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, 39: 1081-1086, 2004.

ZIADI, M., TOUHAMI, Y., ACHOUR, M., THONART, P., HAMDI, M. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. **Biochemical Engineering Journal**, 24: 141-145, 2005.

## APÊNDICE



**APÊNDICE A.** Crescimento do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, cultivado em soro de queijo Minas Frescal estabilizado, sob duas temperaturas de incubação, 37°C e 40°C.