

Avaliação da capacidade bioprotetora de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* contra bolor e levedura em iogurte

Palavras-Chave: CULTURAS BIOPROTETORES, BOLOR E LEVEDURA, IOGURTE

Autores(as):

Júlia Venâncio Kurnick, FEA- UNICAMP

Kelrolayne Sthefany da Costa, FEC/FAU- UNICAMP

Roberta Camila de Lima Pinheiro, NEPA-UNICAMP

Prof(a). Dr(a). Alline Artigiani Lima Tribst (orientadora), NEPA-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de leite, atrás apenas dos Estados Unidos e da Índia, segundo dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2019). O leite é uma matéria-prima multifacetada, que permite a produção de uma variedade de produtos, incluindo bebidas lácteas, queijos, doces de leite, manteigas e iogurtes. Essa diversidade de produtos agrega valor ao leite e possibilita a geração de renda em diferentes segmentos da cadeia produtiva (Capitani et al., 2014).

Define-se como iogurte o leite fermentado com culturas protosimbióticas de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuam para a determinação das características do produto final (Brasil, 2007).

Por ser um rico em nutrientes, o iogurte é suscetível à deterioração microbiana, embora certas características reduzam a probabilidade de crescimento de organismos potencialmente patógenos. Estas características incluem (i) o fato de a lactose ser a fonte de carbono, (ii) a escassez de aminoácidos livres, requerendo que os microrganismos sejam capazes de proteolisar a caseína para obter tais nutrientes e (iii) o baixo pH do produto, em torno de 4,6, devido à conversão parcial de lactose em ácido láctico durante a fermentação pelas culturas iniciadoras (Garnier et al, 2017). Apesar da inibição de patógenos em geral, o iogurte é susceptível à deterioração por outros microrganismos, especialmente bolores e leveduras, cujo crescimento altera visualmente e sensorialmente o produto, levando à redução do prazo de validade e prejuízos econômicos (Garnier et al, 2017). No Brasil, a instrução normativa 60 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o limite máximo de bolores e leveduras em produtos lácteos fermentados como 3 log UFC/mL (Brasil, 2019).

Entre as técnicas utilizadas para evitar ou retardar a deterioração por microrganismos indesejáveis, tem-se a bioproteção ou biopreservação. Essa técnica utiliza a adição de microrganismos específicos no alimento, ou de seus metabólitos, para controlar o crescimento de microbiota contaminante. Este controle é feito através de competição por nutrientes e da produção de compostos como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Kamal et al., 2018, Tribst e Leite Júnior et al., 2022). O uso de bioproteção é uma alternativa interessante para obtenção produtos *clean label*, uma vez que torna desnecessária a adição de conservantes sintéticos para estabilização microbiológica dos alimentos (Tribst e Leite Júnior et al., 2022). Assim, o objetivo desse projeto foi avaliar a efetividade da utilização de dois bioprotetores (*Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum*) em iogurte, a fim de evitar ou retardar o crescimento de bolores e leveduras neste produto.

METODOLOGIA:

Teste desafio com *Kluyveromyces marxianus*

Leite em pó foi reconstituído a 11%, tratado termicamente à 90°C/ 5 min, resfriado a 43°C e dividido em 4 porções, que foram adicionadas, respectivamente, de $\sim 10^6$ UFC/mL de:

- (1) cultura de iogurte convencional (*St. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*),
- (2) cultura de iogurte convencional e Bioprotetor contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* (Bioprotetor A),
- (3) cultura de iogurte convencional e Bioprotetor contendo apenas *L. rhamnosus* – cepa diferente da utilizada no bioprotetor A (Bioprotetor B),
- (4) cultura de iogurte convencional e Bioprotetores A e B.

Cada porção foi então divididas em três partes e cada parte foi inoculada com suspensão de *Kluyveromyces marxianus* (10^5 , 10^3 ou 10^1 UFC/mL). As amostras foram então fermentadas até atingir pH 4,6. Após, foram batidas com o auxílio de uma espátula estéril, divididas em 2 potes estéreis e estocada a 12°C. Cada amostra foi produzida em duplicata.

Teste adicional de resistência com *Kluyveromyces marxianus* (10^1 UFC/mL) foi realizado em leite pasteurizado inoculado como concentração de 10 maior ($\sim 10^7$ UFC/mL) de bioprotetores A e B. A amostra foi fermentada, batida, dividida e estocada conforme descrito no parágrafo anterior.

Nestes testes foram feitas as contagens de leveduras e bactérias lácticas após 0 e 10 dias de estocagem. Em alguns intervalos realizou-se a avaliação visual do crescimento de leveduras, registrados com fotografias.

Teste desafio com *Penicillium roqueforti*

Leite em pó foi reconstituído a 11%, tratado a 90°C/ 5 min, resfriado a 43°C e dividido em 3 porções, que foram adicionadas de 10^6 UFC/mL de cultura de iogurte. Em seguida, duas das porções foram adicionadas, respectivamente, de 10^6 e 10^7 UFC/mL de culturas bioprotetoras A e B. A terceira porção foi mantida como controle (sem adição de bioprotetores). Em seguida, cada porção foi dividida em 2 partes, que foram inoculadas com 10^1 e 10^3 UFC/mL de *Penicillium roqueforti*. As amostras foram então fermentadas até atingir pH 4,6. Após, as amostras foram batidas com o auxílio de uma espátula estéril, divididas em potes estéreis (Tribst et al., 2018) e estocadas a 12°C. Cada amostra foi produzida em duplicata. Neste teste, as contagens de bolor e bactérias lácticas foram determinadas após 0 e 10 dias de estocagem. Em alguns intervalos realizou-se a avaliação visual do crescimento de bolores, registrados com fotografias.

Teste desafio com isolados de laticínios e produtos lácteos

Leite em pó foi reconstituído 11%, tratado a 90°C/ 5 min, resfriado a 43°C e dividido em 4 porções, que foram adicionadas de 10^6 UFC/mL de cultura de iogurte. Em seguida, a primeira porção foi mantida como controle (sem adição de bioprotetores) e três das porções foram adicionadas de 10^7 UFC/mL de culturas bioprotetoras A e B. Em seguida, a primeira porção (controle) e a segunda porção (1 das porções com os bioprotetores) foram divididas em sete partes, que foram inoculadas com 10^2 UFC/mL de 4 bolores e 3 leveduras (microrganismos selvagens obtidos de produtos lácteos contaminados ou de testes ambientais em laticínios) em cada parte. As 4 porções foram então fermentadas até atingir pH 4,6. Após isso, a terceira e a quarta porção (amostras de iogurte fermentado sem contaminação intencional e adicionada dos bioprotetores) foram divididas em sete partes, que foram inoculadas com 10^1 e 10^2 UFC/mL dos mesmos bolores e leveduras, respectivamente. Após, as amostras foram batidas com o auxílio de uma espátula estéril (Tribst et al., 2018) e estocadas a 12°C. Cada amostra foi produzida em duplicata. Neste teste, a avaliação visual das amostras foi conduzida em intervalos de 3-4 dias e, para aquelas que não apresentaram

crescimento visual até 21 dias, realizou-se a contagem de bolores e leveduras neste tempo. As avaliações visuais foram registradas com fotografias.

Teste desafio com bolor selvagem e temperatura de estocagem de 7°C e 12°C

Leite em pó foi reconstituído 11%, tratado a 90°C/ 5 min, resfriado a 43°C e dividido em 4 porções, que foram adicionadas de 10^6 UFC/mL de cultura de iogurte. Após isso, uma porção foi mantida como controle (sem adição de bioprotetores) e três das porções foram adicionadas de 10^7 UFC/mL de culturas bioprotetoras (A, B ou A+B). Em seguida, as porções foram divididas em quatro partes, sendo que duas partes foram inoculadas com 25 UFC/ml e as outras duas partes foram inoculadas com 250 UFC/ml de um dos microrganismos selvagens estudados no item anterior (bolor que apresentou melhor resposta de inibição pelos antimicrobianos). As amostras foram então fermentadas até atingir pH 4,6 e resfriadas à 7 °C. Após, as amostras foram batidas com o auxílio de uma espátula estéril (Tribst et al., 2018) e estocadas a 7 °C e a 12 °C. Cada amostra foi produzida em duplicata. Neste teste, a avaliação visual das amostras foi registrada com fotografias, sendo conduzida em intervalos de 5-7 dias. Realizou-se contagens de bolores e leveduras com 0, 15 e 30 dias de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No teste desafio com *K. marxianus*, observou-se crescimento 1-2 log UFC/mL dos bioprotetores nas amostras. No entanto, eles não foram capazes de inibir o desenvolvimento da levedura independentemente da concentração desafio utilizada, uma vez que esta população atingiu contagens >7 log UFC/mL em todas as condições testadas ($10^1 - 10^5$ UFC/mL) após 10 dias à 12 °C.

Frente aos resultados obtidos, um novo teste foi realizado aumentando em 10 vezes a concentração das culturas bioprotetoras e utilizando a associação delas como tentativa de controlar o crescimento de *K. marxianus* inoculado à concentração de 10^1 UFC/mL. Os resultados obtidos, entretanto, foram insatisfatórios, uma vez que a população de levedura atingiu contagens similares a do teste anterior após 10 dias de estocagem. Desta forma, concluiu-se que esta levedura apresenta alta resistência às culturas bioprotetoras avaliadas.

No teste desafio com *P. roqueforti*, as amostras adicionadas de bioprotetores mantiveram a população de bactérias lácticas estável ou tiveram um ligeiro crescimento (< 1 log UFC/mL) durante a estocagem, mas estas não foram capazes de inibir o crescimento do bolor, independentemente da concentração desafio utilizada, uma vez que esta população atingiu contagens entre 4-5 log UFC/mL em todas as condições testadas. A figura 3 claramente indica que houve rápido crescimento dos bolores em todas as amostras, com diferença na formação de esporos (cor escura) dos bolores.

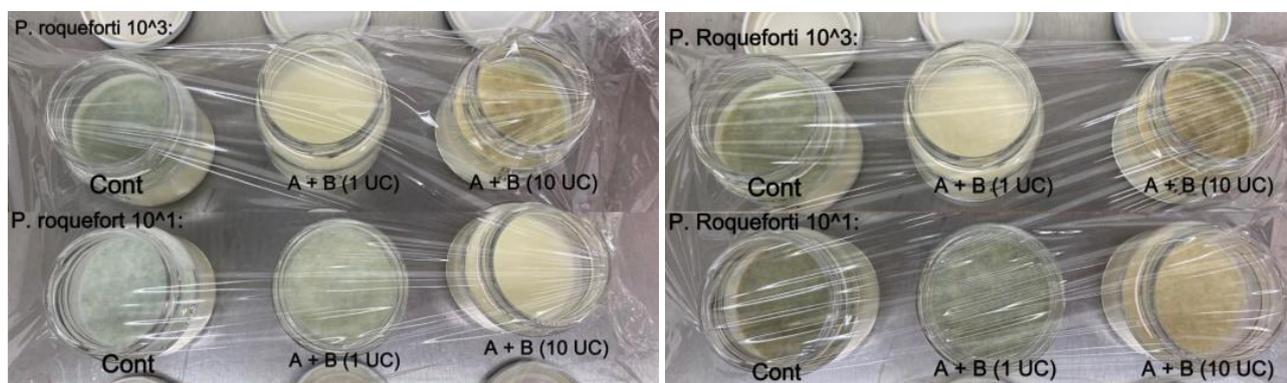


Figura 1: Crescimento visível de *P. roqueforti* após 5 (esquerda) e 10 dias (direita) de inoculação de 10^1 e 10^3 UFC/mL em iogurte e estocagem a 12 °C.

Legenda: 1 UC = 10^6 UFC/mL e 10 UC = 10^7 UFC/mL. Cont = amostra sem bioprotetor. A e B = bioprotetores adicionados, conforme descrito na metodologia.

A avaliação geral dos resultados indica que os microrganismos inicialmente selecionados como alvos da bioproteção foram resistentes mesmo em contagens iniciais bem baixas (10^1 UFC/mL) e utilizando alta concentração de culturas bioprotetoras (10^7 UFC/mL). Isso pode ser explicado por estas serem culturas secundárias para adição em produtos lácteos fermentados e que, portanto, podem ser linhagens selecionadas que apresentam resistência à antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas, com o objetivo de reduzir o risco de não crescimento destes microrganismos caso o produto contenha bactérias lácticas não iniciadoras (NS-LABs) capazes de produzir bacteriocinas como as produzidas pelas cepas utilizadas no presente estudo (Lynch et al., 2014).

Mediante estes resultados, optou-se por fazer triagem de contaminantes isolados em laticínios e produtos lácteos (4 bolores e 3 leveduras) e utilizá-los como alvo dos testes de bioproteção. Nestes novos ensaios, o crescimento aparente de bolores e leveduras no intervalo de até 21 dias de estocagem foi observado. Após este tempo, as amostras que não apresentaram crescimento aparente de colônias foram analisadas em termos de contagem de bolores e leveduras e os resultados desta análise indicaram populações entre 5 - 6 log UFC/mL em todas as condições testadas, independentemente do microrganismo alvo, de sua concentração desafio ou do momento que foi adicionado ao iogurte (antes ou após a fermentação). Ainda assim, para a uma das leveduras testadas, foi observada contagens 0,5 -1 log menores nas amostras com bioprotetor e, para dois bolores, foi considerado que, apesar das contagens atingidas após 21 dias de estocagem, a ausência de crescimento aparente em algumas amostras inoculadas com bioprotetores até este tempo poderia sugerir algum nível de inibição. Mediante este resultado, foi feito um novo pré-teste para seleção do microrganismo alvo final como aquele que apresentou maior susceptibilidade aparente às culturas bioprotetoras avaliadas, sendo selecionado um dos bolores selvagens.

Assim, para este bolor, foi realizado a etapa final, na qual foram testados o efeito da temperatura de estocagem (7 ou 12 °C) e da contaminação inicial (25 ou 250 UFC/mL). Os resultados deste teste (Tabela 1) mostraram que as amostras contendo cultura bioprotetora A ou A+B apresentaram ligeira menor taxa de crescimento do contaminante após 15 dias de estocagem à 12 °C, atingindo contagens 0,6 – 1,6 log UFC/mL menores do que as observadas para as amostras controles (ainda que sem diferenças significativas, dada a alta variação de algumas amostras).

Tabela 1: Contagens do contaminante após 0, 15 e 30 dias de estocagem a 7 e 12 °C

Bioproteção	Amostra		Contagem de Bolores e Leveduras (log UFC/ g)		
	[Contaminante] UFC/mL	Temperatura de Estocagem (°C)	0 dias	15 dias	30 dias
Sem	25	7	1,57 ± 0,67 ^b	1,57 ± 0,67 ^a	3,19 ± 0,61 ^a
Sem	250	7	2,77 ± 0,33 ^a	2,57 ± 0,42 ^a	4,46 ± 0 ^a
Sem	25	12	1,25 ± 0,5 ^a	5,15 ± 0,55 ^a	---
Sem	250	12	2,98 ± 0,04 ^a	4,73 ± 0,59 ^a	---
Biop A	25	7	1,5 ± 0,58 ^b	2,39 ± 0,47 ^a	4 ± 0 ^a
Biop A	250	7	2,76 ± 0,26 ^a	2,73 ± 0,1 ^a	am. perdida
Biop A	25	12	2,62 ± 1,87 ^a	3,59 ± 0,83 ^a	6,88 ± 0 ^a
Biop A	250	12	2,85 ± 0,13 ^a	4,11 ± 0,45 ^a	6,86 ± 0,11 ^a
Biop B	25	7	1,5 ± 0,58 ^b	1,57 ± 0,67 ^a	4,12 ± 0,94 ^a
Biop B	250	7	2,87 ± 0,17 ^a	2,66 ± 0,24 ^a	4,02 ± 0,18 ^a
Biop B	25	12	1,9 ± 0,62 ^a	4,73 ± 0,23 ^a	---
Biop B	250	12	2,52 ± 0,18 ^a	5,37 ± 1,27 ^a	---
Biop. A+B	25	7	1 ± 0 ^b	1,62 ± 0,74 ^a	3,59 ± 0,22 ^a
Biop. A+B	250	7	2,88 ± 0,44 ^a	2,56 ± 0,43 ^a	4,34 ± 1,47 ^a
Biop. A+B	25	12	1,25 ± 0,5 ^a	4,25 ± 0,48 ^a	7,29 ± 0 ^a
Biop. A+B	250	12	2,52 ± 0,35 ^a	4,16 ± 0,3 ^a	6,56 ± 1,04 ^a

Conseqüentemente, as amostras contendo bioprotetores A ou A+B apresentaram crescimento visível na amostra apenas após 21 dias de estocagem, enquanto que, nas demais, esse crescimento foi perceptível uma semana após a produção. Por outro lado, no caso das amostras estocadas à 7 °C, observou-se que a temperatura retardou o crescimento do microrganismo selvagem nos primeiros 15 dias de estocagem (crescimento < 0,89 log UFC/mL), o que era esperado, visto que, a temperatura ótima de crescimento dos bolores varia entre 20 a 30°C (Gava et al., 2008). Porém, nos 15 dias subsequentes, foi observado crescimento nas amostras controle e bioprotetidas com todas as alternativas testadas, atingindo contagens de 4 log UFC/mL. Tal fato sugere que o microrganismo se adaptou à baixa temperatura, uma vez que alguns bolores podem se desenvolver em temperatura de refrigeração (Gava et al., 2008) e que esta adaptação tenha também acontecido em relação ao efeito do bioprotetor A. Ainda assim, apesar da similaridade em termos de contagens, o crescimento nas amostras mantidas à 7 °C foi visível após 20 dias de estocagem apenas nas amostras sem bioproteção ou adicionadas apenas de bioprotetor B.

CONCLUSÕES:

Os resultados mostraram que as culturas testadas tiveram baixo potencial de inibição contra os microrganismos de uso intencional na indústria de laticínios (*Kluyveromyces marxianus* e *Penicillium roqueforti*) e contra os microrganismos selvagens isolados de laticínios. Ainda assim, a cultura bioprotetora contendo *L. plantarum* se mostrou potencialmente mais efetiva. Finalmente, o uso de adequadas temperaturas de estocagem (7 °C) ao invés de temperaturas de abuso (12 °C) foi o principal fator de retardo no crescimento dos contaminantes avaliados.

BIBLIOGRAFIA

- Capitani, C. et al., (2014). Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, 8, 1285-1300.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2019). Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>.
- Garnier, L., et al (2017). Microorganisms 5 (3), 42.
- Gava, A. J., et al (2008). Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações. Nobel, 2, 87.
- Kamal, R. M., et al (2018). International Dairy Journal, 85,1-7.
- Lynch, K. M., et al (2014).International Dairy Journal, 34 (1), 167-173.
- Nacional, I. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 - DOU - Imprensa Nacional. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>.
- Página 4 do Diário Oficial da União - Seção 1, nº 205, de 24 de outubro de 2007 - Imprensa Nacional. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=24/10/2007&jornal=1&pagina=4&totalArquivos=96>>.
- Tribst, A. A. L., et al (2018). International Dairy Journal, 78, 36–45.
- Tribst, A. A. L.; Leite Júnior B. R. DE C., et al (2022). Food Bioscience, 50, 102096.