

WALÉRIA CRISTINA DE ARRUDA FURTADO

EFEITO DE CHOQUES TÉRMICO E ÁCIDO NA RESISTÊNCIA DE
***Lactobacillus* UFV H2b20 EM LEITE EM PÓ**

Tese 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
2001

WALÉRIA CRISTINA DE ARRUDA FURTADO

**EFEITO DE CHOQUES TÉRMICO E ÁCIDO NA RESISTÊNCIA DE
Lactobacillus UFV H2b20 EM LEITE EM PÓ**

Tese 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: 5 de novembro de 2001

Prof^a Maria Cristina D. Vanetti

Dr^a Virgínia M. Chaves Alves

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Conselheiro)

Prof. Paulo César Stringheta
(Conselheiro)

Prof^a Célia Alencar de Moraes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque foi testemunha das dificuldades do percurso e aliado na superação, conservou-me distante do frio desânimo da descrença, deu-me lucidez nos momentos de necessidade e ensinou-me a ser paciente. Que eu saiba no correr dos meus dias corresponder à Sua confiança.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação, confiança, atenção; minha mais profunda admiração como pessoa e mestre.

Ao professor Frederico José Vieira Passos pelo aconselhamento e pelo interesse no projeto.

Ao laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais do Departamento de Tecnologia de Alimentos, na pessoa do professor Paulo César Stringheta pelo apoio e empréstimo de equipamentos. Aos amigos Leonardo e Valério que foram imprescindíveis.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti pelos ensinamentos, apoio e sugestões.

À Doutora Virgínia, pelas críticas e sugestões.

Aos meus pais, Walter e Wilma, pelo carinho, pelo apoio e pelo estímulo em mais essa etapa.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, pela alegria de tê-los como familiares.

Ao Paulo, pelo amor e pelo incentivo em todos os momentos, pelas palavras certas nas horas de necessidade, por ter aceitado os momentos de ausência no noivado e casamento, por secar minhas lágrimas a cada choro e por revestir-me de força e coragem a cada encontro, o que me permitia enxergar os obstáculos de maneira diferente e lutar para superá-los.

A Ana Lúcia, Kérley, Cláudia e Alessandra, pela companhia, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pela grande amizade.

A Néia, por compartilhar humildemente seus conhecimentos, pela paciência, pelas sugestões, pelo auxílio imprescindível à execução deste trabalho e pela amizade.

Ao Júpiter, pelos auxílios na área de informática.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, Néia, Dani, Juliana, Ed Carlos, Margarete, Marciana, Alessandra, José Carlos, Leonardo, Fernanda, Cida e Patrícia, pelo bate-papo, pelos risos, pelas sugestões e pela companhia.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial a José Reinaldo, Sr Raimundo e Esquilo; às secretárias Nilcéa, Laura e Aparecida pela colaboração e amizade.

DEDICATÓRIA

A Deus

A meus Pais, irmãos e sobrinhos

Ao Paulo

A nossa filha Júlia

Com muito amor

BIOGRAFIA

WALÉRIA CRISTINA DE ARRUDA FURTADO, filha de Walter Pires de Arruda e Wilma Pereira de Arruda, nasceu em Ubá, Estado de Minas Gerais, no dia 31 de agosto de 1974.

Em julho de 1997, graduou-se em Tecnólogo em Laticínios e em março de 1999 concluiu o bacharelado em Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

CONTEÚDO

LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Microrganismo	10
3.2. Padronização da cultura.....	11
3.3. Obtenção de leite em pó adicionado de células de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 ...	11
3.3.1. Controle.....	11
3.3.2. Pré-tratamento a 50°C por 30minutos	12
3.3.3. Pré-tratamento em pH3,5 a 37°C por 30minutos	12
3.3.4. Desidratação.....	12
3.4. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	15
3.5. Testes de Resistência a Condições Ambientais.....	15
3.5.1. Resistência a Calor	15
3.5.2. Resistência a pH.....	16
3.5.3. Resistência à lisozima	16
3.5.4. Resistência a sais biliares	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18

4.1. Efeito dos pré-tratamentos na sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 à desidratação a 180°C em leite concentrado com 40% de EST.	18
4.2. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a temperatura em leite em pó reconstituído.	20
4.3. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 ao pH em leite em pó reconstituído.	22
4.4. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 à lisozima em leite em pó reconstituído a 10% EST.	24
4.5. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a sais biliares em leite em pó reconstituído a 10% EST.	25
5. RESUMO DE CONCLUSÕES	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	31
APÊNDICE	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a temperatura de 65°C, por 20 e 40min, em leite em pó reconstituído a 10% EST.....	21
Quadro 2 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a pH2,5 a 37°C em leite em pó reconstituído a 10% EST.	23
Quadro 3 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a lisozima na concentração de 0,8mg/ml mantido a 25°C, por 60 min em leite em pó reconstituído a 10% EST	25
Quadro 4 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 a 1% de sais biliares mantido a 37°C, por 30min, 1,2,3 e 24h em leite em pó reconstituído a 10% EST.....	28
Quadro 1– Parâmetros utilizados no processamento de leite concentrado com 40% EST, adicionado de <i>Lactobacillus</i> , UFV H2b20 em Mini “Spray-Dryer” B-191.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mini Spray Dryer B-191	14
Figura 2 – Efeito do choque térmico e do choque ácido na sobrevivência de <i>Lactobacillus</i> UFV H2b20 à desidratação a 180°C em leite pasteurizado, concentrado com 40% de EST.	19

RESUMO

FURTADO, Waléria Cristina de Arruda, M. S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. **Efeito de Choques Térmico e Ácido na Resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 em Leite em Pó.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Paulo César Stringheta.

Os efeitos do choque térmico, 50°C por 30min, e do choque ácido, em pH3,5 por 2h e 30min a 37°C, na sobrevivência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à desidratação em “spray dryer” a 180°C e na resistência a condições ambientais foi estudado. Em relação ao controle, em leite contendo 10% EST após o processamento do leite em pó, observou-se que tanto o choque térmico quanto o choque ácido conferiram às células maior tolerância ao processo de desidratação testado, sendo a diferença na sobrevivência de quase 2 ciclos logarítmicos. Fica demonstrado o efeito protetor do choque térmico e do choque ácido ao tratamento a 65°C, por 20min, em que o controle, cerca de 10³UFC/ml, não logrou sobrevivência, enquanto as células pré-tratadas sofreram redução de apenas 2 ciclos logarítmicos. O mesmo efeito protetor ao tratamento em pH2,5 por 2h e 30min foi observado. No tratamento em 0,8mg/ml de lisozima por 60min não foi verificado efeito protetor ou deletério desses pré-tratamentos. No tratamento com 1% de sais biliares, verifica-se maior sobrevivência do controle quando comparado com as amostras pré-tratadas. Houve sobrevivência de 10%

das células do controle e 1% das células pré-tratadas, nos primeiros 30min de exposição. Nas células submetidas ao choque ácido, houve efeito deletério nos primeiros 30min e efeito protetor nos demais períodos demonstrando seu efeito protetor na manutenção do número de células sobreviventes a esse tratamento. Observou-se melhor efeito do tratamento com ácido, quando comparado ao choque térmico.

ABSTRACT

FURTADO, Waléria Cristina de Arruda, M. S., Universidade Federal de Viçosa, November 2001. **Effect of heat and acid shocks on *Lactobacillus* UFV H2b20 in spray dried milk.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Committee Members: Frederico José Vieira Passos and Paulo César Stringheta.

The objectives of this work were to determine the effect of heat shock, 50°C for 30min, and of acid shock, pH3.5 for 2hr and 30min at 37°C, on the survival of *Lactobacillus* UFV H2b20 to milk spray drying and its resistance to stress conditions thereafter. Both heat and acid shocks increased the cell tolerance to the dehydration process, since the heat and acid treated cells presented a number of survivors two log cycles greater than that of the control, i. e. the non-shocked cells. Both pre-treatments, heat and acid, conferred resistance to heat treatment at 65°C for 20min, yielding a number of survivors at least two log cycles greater than that of the control. The same protective effect was observed when heat and acid pre-treated cells were subject to pH2.5 for 2h and 30min. No effect was detected on the resistance to lysozyme. Exposure to 1% bile salts for 30min resulted in the survival of 10% of the control cells and of only 1% of the heat or acid pre-treated cells. However, a protective effect of the acid shock was observed after 30min of exposure to bile salts. The control and the heat shocked

cells continued to die and the acid pre-treated cells survived for longer periods of time. As a pre-treatment, acid was more effective than heat shock.

1. INTRODUÇÃO

A estirpe de *Lactobacillus* UFV H2b20, de origem humana, foi isolada de fezes de criança recém-nascida e alimentada exclusivamente ao seio com até 3 dias de idade e foi definida como probiótica por suas características de resistência às condições ambientais que prevalecem no trato gastrointestinal como lisozima, concentrações elevadas de sais biliares, pH semelhante ao do suco gástrico e presença de antibióticos de administração oral. Essas características, associadas ao seu amplo espectro antimicrobiano, sugerem que, em condições anormais, como desequilíbrio na microbiota intestinal, o *Lactobacillus* UFV H2b20 também apresentaria capacidade de se instalar no organismo hospedeiro.

A resistência do *Lactobacillus* UFV H2b20 a condições de estresse ambiental é importante na vida útil e na atividade dos produtos probióticos. Condições ambientais adversas, como o baixo pH do estômago, precisam ser superadas por pelo menos parte das células de *Lactobacillus* presentes no probiótico. Estudos demonstram adaptação de *Lactobacillus* a condições de estresse e também tolerância cruzada a diferentes fatores de estresse. Verificou-se que o choque térmico, 50°C/30min, sobre a estirpe de *Lactobacillus* UFV H2b20 confere resistência a tratamentos térmicos e aumenta a faixa de temperatura para o seu crescimento. Pode-se constatar também que as células, na

ordem de 10^8 /ml, foram incapazes de resistir ao pH 2,5 por 2,5 horas, quando não submetidas a uma pré-adaptação. O pré-tratamento a 50°C torna-as mais tolerantes a essas condições experimentais.

Lactobacillus UFV H2b20, quando adicionado ao leite evaporado para posterior secagem, proporcionou a obtenção de um probiótico com boa estabilidade o qual não necessita de refrigeração para sua manutenção. No entanto, nada se sabe sobre os efeitos das condições a que são expostas as células durante o processamento, bem como da associação desses fatores de estresse sobre a resistência dessa estirpe às condições ambientais a que estarão sujeitas na passagem pelo trato digestivo.

Considerando-se a necessidade de se conhecer o efeito do estresse ambiental e das condições de processamento sobre a viabilidade e resistência do *Lactobacillus* UFV H2b20, o presente trabalho trata do estudo da desidratação de células dessa estirpe em leite pasteurizado e evaporado e do efeito do choque térmico e do choque ácido sobre sua tolerância a ácido clorídrico, sais biliares, lisozima e temperatura alta por meio de testes “in vitro” em leite em pó ressuspenso a 10% extrato seco total (EST) contendo células viáveis de *Lactobacillus* UFV H2b20 .

2. REVISÃO DE LITERATURA

Para que um microrganismo seja considerado probiótico ele deve ser habitante normal do trato intestinal do hospedeiro, não apresentar patogenicidade, exibir resistência a processamentos tecnológicos, apresentar resistência às barreiras naturais do organismo, como suco gástrico e sais biliares, apresentar capacidade de aderência ao tecido epitelial, persistir no trato intestinal por um período de tempo determinado, produzir substâncias antimicrobianas, estimular o sistema de resposta imunológico do hospedeiro e ter habilidade para influenciar o metabolismo com a degradação de glicídios, assimilação de colesterol e produção de vitaminas (DUNNE, 1999; SAARELA, 2000).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* são Gram positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos e produzem ácido láctico como maior ou único produto a partir da fermentação de glicose (BALOWS, 1992). Aquelas conhecidas por trazerem benefícios à saúde humana e animal são denominadas probióticos (SANDERS, 1999). Estão amplamente distribuídas na natureza e são de grande importância para a indústria de alimentos e para a medicina. Nos alimentos, são utilizadas com diversos propósitos, como o de preservá-los e melhorar suas características sensoriais (KONINGS, 2000). A prevenção de infecções intestinais por meio do controle da microbiota, o efeito

anticarcinogênico, o controle do nível de colesterol sérico e a degradação de lactose são algumas das vantagens da utilização dessas bactérias (JAY, 1992).

É necessária uma ingestão diária mínima de 10^9 a 10^{10} células viáveis do microrganismo para que ele possa exercer efeito probiótico no organismo (CANGANELLA, 1997; SANDERS, 1999).

A estirpe de *Lactobacillus* UFV H2b20, de origem humana, foi isolada por SANTOS (1984). A autora obteve 375 isolados, oito deles identificados como *L. acidophilus*. Após a realização de estudos relacionados às propriedades antagônicas e de resistência às condições intestinais, foi constatado que duas linhagens de origem humana e três de origem bovina poderiam sobreviver e se fixarem no trato intestinal humano e bovino. Dentre elas a linhagem de *Lactobacillus* UFV H2b20 apresentou características que tornariam possível sua utilização como adjunto dietético. UETANABARO (1999) em seu estudo com *Lactobacillus* UFV H2b20 observou o seu rDNA 16S apresentava maior identidade de seqüência de bases com o de *Lactobacillus delbrueckii* (número de acesso: dbj [AB007908] e a identidade entre essas duas seqüências é de 99% (1.507/1.516, relação do número de nucleotídeos em acordo entre *Lactobacillus* UFV H2b20 e *L. delbrueckii*). Com base nessa observação, essa estirpe será denominada de *Lactobacillus* UFV H2b20 neste trabalho.

AGOSTINHO (1988), ao estudar o comportamento de *Lactobacillus* UFV H2b20 “in vitro” em condições semelhantes às do trato gastrointestinal humano, constatou sua resistência à lisozima de clara de ovo, em concentrações semelhantes às da lisozima do leite humano, da saliva e do leite bovino. Observou também sobrevivência a concentrações elevadas de sais biliares e resistência a pH semelhante ao do suco gástrico. Tudo isso sugere sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal. Em condições normais do trato gastrointestinal, *Lactobacillus* UFV H2b20 provavelmente sobreviveria. Foi estudado ainda o comportamento dessa bactéria em presença de antibióticos de administração oral como, Ácido Nalidíxico, Colistina, Neomicina, Nitrofurantoína, Rifampicina, Sulfanamida e Sulfazotrim, observando-se que o microrganismo sobrevive e pode se multiplicar nessas condições. Essa

característica, associada ao seu amplo espectro antimicrobiano observado por RIBEIRO, (1995), sugerem que em condições anormais, como desequilíbrio na flora intestinal, o *Lactobacillus* UFV H2b20 também apresentaria capacidade de se instalar.

Um determinante essencial na seleção de um microrganismo probiótico é a sua habilidade para alcançar, influenciar, sobreviver e persistir no ambiente onde se pretende que ele tenha atividade (CHARTERIS et al., 1998; YUKI et al., 1999). Para tanto, as células necessitam chegar viáveis ao trato intestinal onde exercem sua atividade probiótica (MONTEIRO, 1999).

CHARTERIS et al., (1998) desenvolveram uma metodologia “in vitro” na tentativa de simular a tolerância de bactérias ao trânsito na porção gastrointestinal “in vivo”. Essa metodologia foi utilizada para triagem de uma coleção de bactérias lácticas e bifidobactérias capazes de apresentar tolerância ao trânsito intestinal. Os isolados utilizados na metodologia proposta já haviam sido testados com relação a efeitos de peristaltismo e de sais de bile, e foi constatada resistência aos mesmos. Quase todos os isolados examinados perderam completamente a viabilidade durante a simulação do trânsito gástrico, no entanto, *Lactobacillus fermentum* KDL exibiu um apreciável nível de sobrevivência, em torno de 30% da contagem inicial, e foi considerado intrinsecamente tolerante ao trânsito gástrico. Constatou-se ainda que *Lactobacillus rhamnosus* GG exibe tolerância limitada ao trânsito gástrico com menos que 0,1% de células sobreviventes após exposição por 1,5hora.

As células estão freqüentemente expostas a variações das condições do ambiente, e a sua capacidade de lidar com essas variações é que determina sua sobrevivência. As agressões a que as células estão expostas podem ser de naturezas variadas, como alteração brusca na temperatura, radiação UV, alta concentração de metais pesados, álcool, resultados de infecções virais e bacterianas, carência nutricional e mudanças no pH. O notável é que a exposição a esses agentes de estresse desencadeia resposta similar em todos os organismos estudados até o momento, conhecida como resposta ao estresse (WHITAKER e BATT, 1991; BOUTIBONNES et al., 1993; MONTEIRO, 1999).

As células desenvolvem um número de mecanismos para auxiliarem a sua sobrevivência em um ambiente adverso. Frequentemente um ambiente inadequado ativa um conjunto de genes, cujos produtos protegem a célula dos efeitos desse ambiente. Um desses mecanismos é a resposta ao choque térmico, que é provocada pela exposição das células a altas temperaturas, entre a temperatura ótima e a máxima para crescimento.

A resposta ao choque térmico promove um aumento transitório de um grupo de proteínas requeridas para o crescimento celular e para sobrevivência. As proteínas do choque térmico funcionam como *chaperones* moleculares (MADIGAN et al., 2000; NELSON & COX, 2000).

Quando *Escherichia coli* cresce a 30°C, a síntese da subunidade da RNA polimerase, σ^{32} , produto de *rpoH*, é direcionada pela subunidade σ^{70} da RNA polimerase. σ^{32} regula a expressão dos genes *htp*. Uma explicação é que, com o aumento na temperatura, há um aumento na síntese de σ^{32} , bem como sua liberação do complexo com outras proteínas, que o tornam inativo. Seu nível aumentado torna-o mais competitivo pela RNA polimerase, resultando numa preferência desta enzima pelos *loci htp*. Essa mudança causa um acréscimo na produção das proteínas do choque térmico. Resposta semelhante à do choque térmico pode ser dada também a outros estímulos do ambiente tais como etanol, radiação Ultra Violeta, peróxido de hidrogênio entre outros (MOAT & FOSTER, 1995).

Lactobacillus UFV H2b20 vem sendo utilizado na pesquisa de alimentos probióticos. A resistência dessas células a condições de estresse ambiental é importante na vida útil e na atividade dos produtos. Condições ambientais adversas, como o baixo pH do estômago, precisam ser superadas por pelo menos parte das células de *Lactobacillus* presentes no probiótico. Existem estudos que demonstram adaptação a condições de estresse e também tolerância cruzada entre diferentes fatores de estresse (MONTEIRO, 1999). Estudos com *Lactobacillus* UFV H2b20 mostraram que o crescimento dessa bactéria em meio MRS, 1% de glicose, ocorre entre 15°C e 50°C, com a faixa normal de temperatura de 15°C a 37°C (MONTEIRO, 1999). Em estudos de avaliação do efeito do choque térmico

nessa estirpe verificou-se que a exposição das células por 30 minutos a 50°C promovia uma termotolerância evidenciada pelo nível de sobrevivência quando submetidas à temperatura de 65°C, por 20 e 40 minutos. Após 20 minutos, houve uma redução de 5,19 ciclos no controle e nas células pré-tratadas, houve redução de 3,98 ciclos, o que significa sobrevivência em 1,21 ciclo logarítmico em relação ao controle. No tratamento a 65°C por 40 minutos, o mesmo comportamento foi observado (MONTEIRO, 1999). Além disso, as células pré-tratadas a 50°C apresentavam crescimento a 55°C, ainda que com velocidade baixa, o que não foi observado no controle. Com base nesses dados, MONTEIRO (1999) concluiu que o choque térmico tem efeito sobre as células, conferindo-lhes tanto resistência a tratamentos térmicos quanto aumentando sua faixa de temperatura para crescimento.

MONTEIRO (1999) estudou o efeito do choque térmico sobre a resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a ácido clorídrico, onde pode constatar que as células, cerca de 10^8 /ml, foram incapazes de resistir ao pH 2,5 por 2,5 horas, em caldo MRS 2% de glicose, sem uma pré-adaptação. O pré-tratamento a 50°C torna-as mais tolerantes a essas condições experimentais, ressaltando a importância de que se dê atenção a esses aspectos na determinação dos parâmetros tecnológicos de produção das células.

A utilização de bactérias em produtos lácteos faz-se, principalmente, por meio de culturas congeladas ou liofilizadas. As culturas preparadas por essas técnicas apresentam um elevado número de células sobreviventes, entretanto, implicam em um custo elevado quando comparadas a culturas preparadas por outros métodos convencionais como desidratação a vácuo (PRAJAPATI et al, 1987). Considerações econômicas têm estimulado a procura de outros métodos para preservação dessas culturas (FIGUEIREDO, 1997).

Segundo AGOSTINHO (1988), a liofilização em leite desnatado reconstituído a 20% ESD com 1% de tiouréia pode ser utilizada para a preservação de culturas de *Lactobacillus* UFV H2b20, por manter boa estabilidade durante 210 dias de estocagem, apresentando bons resultados quanto à viabilidade das células e à atividade de produção de ácido láctico.

A desidratação em “spray dryer” promove a redução de umidade de um produto líquido para a formação de um produto sólido a ser utilizado na formulação de muitos produtos alimentícios manufaturados, além de reduzir custos com transporte e estocagem. O uso de “spray dryer” é uma das técnicas mais utilizadas para a desidratação de leite e produtos lácteos (HALL e HEDRICK, 1971).

As operações essenciais em um equipamento “spray dryer” são: circulação, filtração e aquecimento de ar; atomização e aquecimento do produto; mistura do ar quente com produto atomizado para remoção da sua umidade; separação de partículas grandes do ar e separação de partículas pequenas que se depositam em sistemas de coletores (HALL e HEDRICK, 1971).

Antes da desidratação em “spray dryer”, o produto é condensado em sistema de tachos abertos ou é evaporado a vácuo. Diferentes métodos de atomização são utilizados, entretanto, o mais comum nas indústrias de leite nos Estados Unidos é o bombeamento do produto sob alta pressão. A atomização leva à formação de partículas pequenas e uniformes, geralmente com 50 a 150 μ m de diâmetro, aumentando a área superficial, o que facilita a troca de calor. Dessa forma, a desidratação torna-se mais eficiente e o produto é mantido sob temperatura elevada por período de tempo menor. Depois da atomização o produto líquido é misturado com o ar quente e tem sua umidade reduzida até formação de um produto em pó que é separado do ar quente, coletado e empacotado (HALL e HEDRICK, 1971).

FIGUEIREDO (1997) estudou o efeito do processo de secagem em “spray dryer” na viabilidade de *Lactobacillus* UFV H2b20. Antes do processo de secagem, o leite concentrado apresentava uma população de $2,7 \times 10^8$ UFC/ml e $1,6 \times 10^{10}$ UFC/ml da bactéria. No final do processo de secagem o produto apresentava uma população de $2,1 \times 10^7$ UFC/g e $4,1 \times 10^8$ UFC/g quando as temperaturas de secagem foram 215°C e 230°C, respectivamente. O leite seco a 230°C apresentou velocidade de morte das células, durante o período de estocagem, bem maior que a do leite seco a 215°C. Possivelmente, essa menor temperatura (215°C) implica em menores danos sofridos pelas células que

sobrevivem à secagem, o que causa menor taxa de inativação por ocasião da estocagem.

O propósito da utilização do “spray dryer” é a obtenção de um produto de boa qualidade com teor reduzido de umidade. Durante a desidratação substâncias termolábeis e microrganismos podem ser inativados. A extensão da inativação de enzimas e bactérias durante a desidratação é dependente da sua termolabilidade, da combinação de tempo e temperatura utilizados no processo e do teor de sólidos totais (EST) da mistura submetida a desidratação (DAEMEN e STEGE, 1982).

O processo de secagem por atomização ocorre em um tempo muito curto. A temperatura do ar de entrada situa-se normalmente entre 180°C e 215°C, no entanto, em virtude da evaporação da água do alimento, a temperatura na câmara de secagem situa-se em torno de 95°C, semelhante à do ar de saída; quando a secagem é feita em um só estágio, esse valor é 20 ou 30°C acima da temperatura do produto (Knipschildt 1986, citado por FIGUEIREDO, 1997)

Foi investigado o efeito da temperatura utilizada durante a secagem em “spray dryer” sobre a viabilidade das células e constatou-se que a temperatura de entrada, ou inicial, exerce pouco efeito sobre a inativação das células, entretanto, a temperatura de saída do produto exerce um considerável efeito sobre essa inativação. Quanto mais elevada a temperatura de saída do produto maior o grau de inativação celular (LABUZA et al.,1970; LABUZA et al.,1972; DAEMEN et al.,1983; DAEMEN, 1984).

BRENNAN et al., (1986) demonstraram que após serem submetidos ao processo de secagem por liofilização e secagem a vácuo os microrganismos são danificados, provavelmente, na parede celular, o que os torna sensíveis à oxigal e à lisozima. Por meio de análise em microscopia eletrônica, os autores observaram uma parcial perda de material da membrana e da parede celular. Segundo TEIXEIRA et al (1996) o efeito da desidratação sobre as células se reflete na porção lipídica da membrana citoplasmática, onde há uma variação na relação de lipídeos saturados e insaturados, indicando um efeito de transformação ou oxidação na estrutura desses compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas: o processamento do leite foi realizado no Laboratório de Secagem e Pigmentos Naturais do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa e os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Microrganismo

Foi utilizada a bactéria isolada e caracterizada por SANTOS (1984) identificada como *Lactobacillus* UFV H2b20. As culturas foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C em caldo MRS (DE MAN et al., 1960) contendo 20% de glicerol. Em todos os experimentos, as culturas foram previamente ativadas em leite em pó desnatado reconstituído a 10% e esterilizado. Após coagulação, entre 8 e 12 horas de incubação, as culturas foram repicadas em caldo MRS e incubadas por aproximadamente 12 horas a 37°C .

3.2. Padronização da cultura

Em cada experimento, a cultura congelada foi reativada em leite desnatado, desidratado e reconstituído a 10% e, após aproximadamente 12 horas de incubação, transferida para caldo MRS contendo 2% de glicose. Após 12 horas de cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a 4500rpm em rotor GSA10, a 4°C, por 12 minutos, em centrífuga Sorvall RC5C. A massa celular ressuspensa em caldo MRS foi padronizada a uma densidade ótica de aproximadamente 0,6 em espectrofotômetro Spectronic 20D, em comprimento de onda de 630nm.

3.3. Obtenção de leite em pó adicionado de células de *Lactobacillus* UFV H2b20

Para cada experimento foram realizadas 3 repetições.

3.3.1. Controle

O leite em pó adicionado de células não submetidas a pré-tratamentos foi preparado da forma seguinte:

Alíquotas de 10ml da cultura padronizada foram transferidas para erlenmeyers contendo 1000ml de caldo MRS com 0,5% de glicose. Após aproximadamente 12 horas de incubação a 37°C, em banho com água sob circulação, as células foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 400ml de leite pasteurizado concentrado com aproximadamente 40% de extrato seco total EST, sendo essa mistura submetida a desidratação.

O número de unidades formadoras de colônias do *Lactobacillus* UFV H2b20 adicionado ao produto antes do seu processamento foi determinado por plaqueamento em superfície de agar MRS adicionado de 30µg/ml de Ácido Nalidíxico. Foi feita também a contagem no leite pasteurizado, concentrado, antes da inoculação.

3.3.2. Pré-tratamento a 50°C por 30minutos

Alíquotas de 50ml, em duplicatas, da cultura padronizada foram transferidas para erlenmeyers contendo 1000ml de caldo MRS com 2% de glicose. Após aproximadamente 12horas de incubação a 37°C, em banho com água sob circulação, as células contidas em 2000 ml foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 300ml de caldo MRS 0,5% de glicose a 50°C sendo incubadas em banho à mesma temperatura, por 30minutos, segundo MONTEIRO (1999). Transcorrido esse período, as células foram novamente centrifugadas e depois ressuspensas em 400ml de leite pasteurizado concentrado com 40% EST. Essa mistura foi submetida a desidratação.

Foi feita a contagem de células viáveis antes e após a desidratação.

3.3.3. Pré-tratamento em pH3,5 a 37°C por 30minutos

Alíquotas de 50ml, em duplicatas, da cultura padronizada foram transferidas para erlenmeyers contendo 1000ml de caldo MRS com 2% de glicose. Após aproximadamente 12horas de incubação a 37°C, em banho com água sob circulação, as células contidas em 2000 ml foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 300ml de caldo MRS 2% de glicose com pH ajustado para 3,5 a 37°C e incubadas em banho a mesma temperatura por 30minutos, segundo MONTEIRO (1999). Transcorrido esse período, as células foram novamente centrifugadas e depois ressuspensas em 400ml de leite pasteurizado concentrado com 40% EST. Essa mistura submetida a desidratação.

Foi feita a contagem de células viáveis antes e após a desidratação.

3.3.4. Desidratação

Após ressuspensão das células de *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite concentrado, essa mistura foi submetida a aquecimento, sob agitação, mantendo-se a temperatura entre 48°C e 50°C, durante o período de desidratação, aproximadamente 80minutos, quando alíquotas de 30ml eram retiradas e

submetidas a desidratação a 180°C em Mini Spray Dryer B-191 com sistema de aquecimento elétrico.

Para o processo de secagem, foram utilizadas as condições especificadas no manual BUCHI: aspiração de 75%, alimentação de 15 a 17%, para o produto concentrado e temperatura de saída do produto entre 93°C e 99°C.

Após a desidratação, o leite em pó adicionado de células de *Lactobacillus* UFV H2b20 foi acondicionado em frascos de vidro esterilizado, protegido da luz e mantido à temperatura ambiente.



Figura 1 - Mini Spray Dryer B-191

3.4. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Para a contagem das unidades formadoras de colônias do *Lactobacillus* UFV H2b20 as amostras foram diluídas em solução salina 0,85% e 0,1ml foi espalhado com auxílio de uma alça de Drigalsky, em placas contendo ágar MRS adicionado de 30µg/ml de Ácido Nalidíxico, antibiótico ao qual o *Lactobacillus* UFV H2b20 apresenta resistência (AGOSTINHO, 1988). As placas foram acondicionadas em dessecadores de vidro estabelecendo-se um ambiente de microaerofilia utilizando-se velas e incubadas a 37°C em estufa por períodos de 36 a 40 horas quando as unidades formadoras de colônias foram contadas.

Os resultados dos tratamentos foram discutidos como redução decimal, RD, definida como:

$$RD = \text{Log } \frac{N_0}{N}$$

Onde: N_0 é o número inicial de UFC/ml e N é o número final de UFC/ml

3.5. Testes de Resistência a Condições Ambientais

Todas as análises foram feitas entre 06 e 24 horas após a desidratação.

3.5.1. Resistência a Calor

O leite em pó adicionado de células de *Lactobacillus* UFV H2b20 foi primeiramente reconstituído a 10% de EST em água destilada esterilizada, a 65°C, sob agitação e em condições assépticas.

Alíquotas de 5ml, em duplicatas, do leite em pó reconstituído foram mantidas em banho a 65°C, por 20 e 40 minutos. Após os tratamentos, foram realizados plaqueamentos em superfície, em duplicatas, para contagem de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* UFV H2b20.

3.5.2. Resistência a pH

O leite em pó adicionado de células de *Lactobacillus* UFV H2b20 foi primeiramente reconstituído a 10% de EST em água destilada esterilizada sob agitação em condições assépticas.

Alíquotas de 10ml, em duplicatas, do leite em pó reconstituído foram acidificadas até pH2,5 utilizando-se solução de HCl 1:1 e colocadas em banho a 37°C, por 2,5 horas. Após o tratamento foram feitas contagens de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* UFV H2b20 .

Alíquotas de 10ml, em duplicatas, do leite em pó reconstituído a 10% com pH5,11-5,6, encontrado para o leite em pó obtido por esse processo, foram colocadas em banho a 37°C, por 2,5 horas. Após o tratamento foram feitas contagens de unidades formadoras de colônias de *Lactobacillus* UFV H2b20, como descrito.

3.5.3. Resistência à lisozima

A lisozima de clara de ovo (mucopéptido N-acetil-moramoil-hidrolase Sigma Grade, 50.000 Unit./mg) foi preparada na concentração de 0,8mg/ml, diluindo-se o reagente em pó em água Milli-Q pH7,0 sob agitação. Essa solução foi posteriormente filtrada em filtro com poro de 0,45µm, dividida em alíquotas de 1ml que foram mantidas sob congelamento a -20°C. Para sua utilização, eram colocadas à temperatura ambiente até descongelamento.

As amostras de leite em pó reconstituídas a 10% foram adicionadas à solução de enzima na proporção de 1:1 e incubadas a 25°C por 60 minutos, segundo AGOSTINHO (1988). Após o tratamento foram feitas contagens de UFC/ml.

3.5.4. Resistência a sais biliares

A solução de sais biliares (Oxoid) foi preparada na concentração de 0,02g/ml, diluindo-se o reagente em pó em água destilada estéril sob agitação.

Essa solução foi filtrada em filtro com poro de 0,45µm e alíquotas de 5ml foram acondicionadas em tubos estéreis que foram mantidos sob refrigeração de 4 a 10°C.

Alíquotas de 5ml, em duplicatas, do leite em pó adicionado de células de *Lactobacillus* UFV H2b20 reconstituído a 20% foram acrescidas de 5ml da solução de 1% sais biliares. Contagens de UFC/ml foram feitas após 30 minutos, 1,2,3 e 24 horas de contato a 37°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito dos pré-tratamentos na sobrevivência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à desidratação a 180°C em leite concentrado com 40% de EST.

A Figura 2 mostra o efeito protetor exercido pelo choque térmico, 50°C/30min, e pelo choque ácido, pH3,5 a 37°C, por 30min, sobre *Lactobacillus* UFV H2b20, quando adicionado em leite pasteurizado e concentrado com 40% de EST e submetido à desidratação a 180°C.

No leite inoculado com células sem pré-tratamento, houve redução decimal de 4,69 ciclos, após o processamento do leite em pó. Com leite inoculado das células pré-tratadas por choque térmico a redução foi de 3,98 ciclos, após o processamento, o que representa aproximadamente 1 ciclo logarítmico de redução a menos que o controle. Efeito similar foi constatado quando as células foram pré-tratadas com choque ácido com redução de 3,88 ciclos, após o processamento. Pode-se concluir, com base nesses dados, que o tratamento a 50°C por 30 minutos antes da desidratação e o tratamento em pH3,5 a 37 °C por 30 minutos tornaram as células mais tolerantes ao processo de desidratação testado neste estudo.

Uma das mais importantes características que um microrganismo probiótico deve possuir é exibir resistência a processos tecnológicos com

consequente viabilidade e atividade após o processamento para que possa ser veiculado e prover benefícios ao organismo hospedeiro (DUNNE et al.,1999).

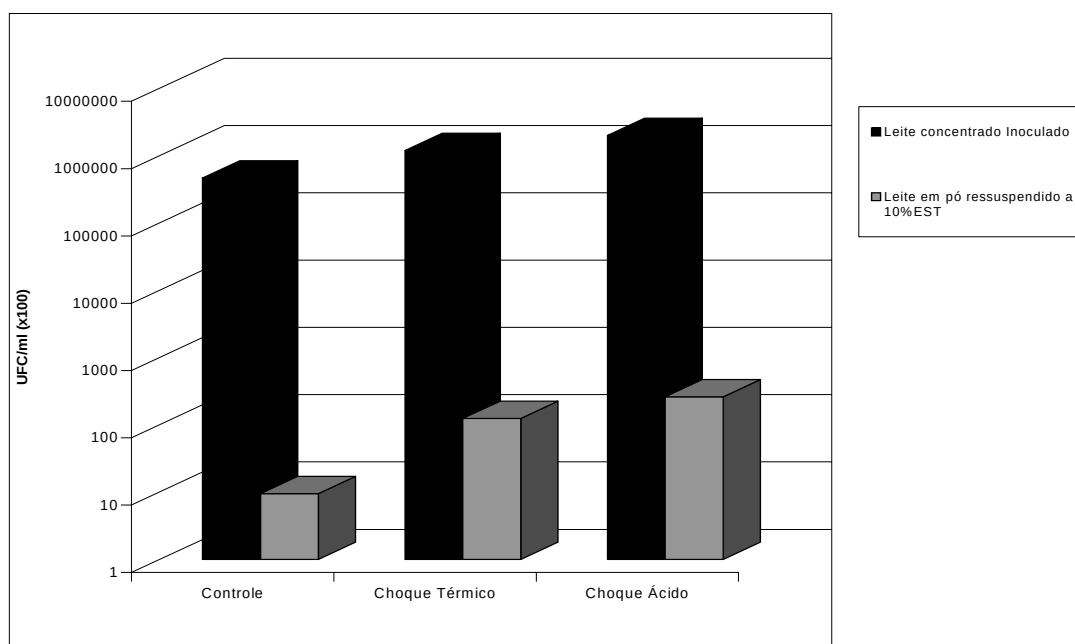


Figura 2 – Efeito do choque térmico e do choque ácido na sobrevivência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à desidratação a 180°C em leite pasteurizado, concentrado com 40% de EST.

Controle - células cultivadas a 37°C e adicionadas ao leite concentrado para desidratação. (Referência a 10% EST). **Choque Térmico** - células cultivadas a 37°C e tratadas a 50°C por 30min antes da adição ao leite concentrado para desidratação. **Choque Ácido** - células cultivadas a 37°C e tratadas em pH3,5 a 37°C por 30min antes da adição ao leite concentrado para a desidratação.

BRENNAN et al., (1986) demonstraram que após serem submetidos ao processo de secagem por liofilização e secagem a vácuo os microrganismos são danificados, provavelmente, na parede celular, tornando-os sensíveis à oxigal e à lisozima. Por meio de análise em microscopia eletrônica, os autores observaram uma parcial perda de material da membrana e da parede celular.

FIGUEIREDO (1997) partiu de uma cultura de *Lactobacillus* UFV H2b20 com $2,7 \times 10^8$ UFC/ml, cultivada em soro de queijo “Minas-padrão” ultrafiltrado e suplementado com 1% de proteose peptona. Procedeu-se sua adição ao leite evaporado previamente concentrado em sistema de tacho aberto, sendo essa mistura posteriormente submetida à secagem por atomização. Assim, possibilitou a obtenção de leite em pó adicionado de células viáveis de *Lactobacillus* UFV H2b20 com $2,1 \times 10^7$ UFC/ml, proporcionando a obtenção de um probiótico com boa estabilidade, o qual não necessita de refrigeração para sua manutenção.

As diferenças nas condições presentes no equipamento industrial usado por FIGUEIREDO (1997) e o “spray-dryer” de bancada usado no presente estudo podem responder pelas diferenças no resultado. A diferença nos resultados vem apenas validar a hipótese inicial do nosso trabalho.

4.2. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 ao calor em leite em pó reconstituído.

O Quadro 1 mostra o efeito protetor do choque térmico, 50°C, por 30min e do choque ácido, pH3,5 a 37°C, por 30min, ao tratamento a 65°C, por 20 min, em *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó reconstituído a 10% EST. Observa-se que o controle, com número de células na ordem de 10^3 UFC/ml, não submetido a nenhum pré-tratamento, não sobreviveu a esse tratamento, no entanto, as células que foram pré-tratadas com choque térmico e choque ácido tiveram uma redução de 1,57 e 2,23 ciclos logarítmicos, respectivamente, o que representa pelo menos um ciclo de redução a menos que o controle. Esses dados estão de acordo com os obtidos por MONTEIRO (1999), que observou o efeito deletério do tratamento a 65°C sobre as células de *Lactobacillus* UFV H2b20 não submetidas a nenhum pré-tratamento, observando ainda que houve aumento no

número de sobreviventes quando essas são submetidas ao tratamento a 50°C, por 30 min, antes do tratamento a 65°C por 20 minutos.

Quadro 1 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a temperatura de 65°C, por 20 e 40min, em leite em pó reconstituído a 10% EST.

	UFC/ml após tempo de exposição		
	0 min	20 min	40 min
Controle ¹	9,50 x 10 ²	<100	<100
CT ²	1,25 x 10 ⁴	3,33 x 10 ²	<100
CA ³	2,63 x 10 ⁴	1,55 x 10 ²	<100

¹Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C.

²Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque térmico: tratamento a 50°C, por 30min.

³Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque ácido: tratamento em pH3,5 a 37°C, por 30min.

MONTEIRO (1999) testou a resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 ao tratamento a 65°C por 20minutos em caldo MRS, quando verificou que as células não pré-tratadas a 50°C, por 30min, sofreram uma redução de 5,18 ciclos. Nas células que foram submetidas a esse pré-tratamento, houve uma redução de 3,98, que representa 1,2 ciclo logarítmico de redução a menos que o controle.

As células que receberam choque térmico ou choque ácido e as que não foram submetidas a nenhum pré-tratamento responderam igualmente após 40minutos, à temperatura de 65°C onde nenhuma colônia foi contabilizada na menor diluição testada de 1:10.

4.3. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 ao pH2,5 em leite em pó reconstituído.

O Quadro 2 mostra o efeito protetor do choque térmico, 50°C, por 30min e do choque ácido, pH3,5 a 37°C, por 30min, ao tratamento em pH2,5, por 2h e 30min, a 37°C em *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó reconstituído a 10% EST. Observa-se que o controle, com de 10^3 UFC/ml, não submetido a nenhum pré-tratamento não sobreviveu a esse tratamento. Esses dados estão de acordo com MONTEIRO (1999), que testou a resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 ao tratamento em pH2,5, por 2h e 30min, a 37°C em caldo MRS, e verificou que as células não pré-tratadas a 50°C, por 30minutos partindo-se de $1,95 \times 10^8$ UFC/ml não apresentaram sobrevivência. AGOSTINHO (1988) estudou a tolerância de *Lactobacillus* UFV H2b20 ao ácido clorídrico por períodos de uma, duas e três horas de exposição a temperatura de 37°C em leite acidificado, em diversas faixas de pH. Partiu de 10^6 UFC/ml e observou o decréscimo para aproximadamente 10^5 UFC/ml após uma, duas e três horas, nas faixas de pH de 3,21-3,00 e 2,90-2,73. Na faixa de pH de 2,60-2,40, a viabilidade celular decresceu para 10^5 UFC/ml com uma hora de exposição, e, após esse período, não foi detectada sobrevivência. Na faixa de pH de 2,30-2,00 também não foram encontradas células viáveis.

Segundo MONTEIRO (1999), nas células que foram submetidas ao choque térmico, houve uma redução de 3,7ciclos. Os dados encontrados no Quadro 2, para as células submetidas ao choque térmico antes do tratamento em pH2,5 por 2,5 horas, demonstram sobrevivência em aproximadamente dois ciclos logarítmicos, quando comparados ao controle. Com base nesses dados, pode-se concluir que o choque térmico, 50°C por 30minutos, tornou as células de *Lactobacillus* UFV H2b20 mais tolerantes a essa condição experimental. O mesmo pode ser inferido para o pré-tratamento em pH3,5 por 30 minutos a 37°C estando também de acordo com os resultados encontrados por MONTEIRO (1999), que partiu de $1,45 \times 10^8$ UFC/ml obtendo $2,5 \times 10^3$ UFC/ml para as células submetidas ao choque ácido antes do tratamento em pH2,5 por 2h e

30 minutos e para o controle, partindo-se de $6,7 \times 10^8$ UFC/ml nenhuma célula sobreviveu.

Antes de alcançar o trato intestinal, o probiótico necessita sobreviver ao trânsito pelo estômago onde a secreção ácido-gástrica constitui um mecanismo primário de defesa contra a maioria dos microrganismos ingeridos juntamente com os alimentos (DUNNE et al., 1999). Os resultados aqui apresentados demonstram o efeito protetor conferido pelos pré-tratamentos representados pelos choques térmico e ácido.

Quadro 2 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a pH 2,5 a 37°C em leite em pó reconstituído a 10% EST.

	UFC/ml	
	pH 5,11-5,6	pH 2,5
Controle ¹	$2,34 \times 10^3$	<100
CT ²	$2,46 \times 10^4$	$2,23 \times 10^2$
CA ³	$3,21 \times 10^4$	$1,33 \times 10^2$

¹Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C.

²Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque térmico: tratamento a 50°C, por 30min.

³Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque ácido: tratamento em pH 3,5 a 37°C, por 30min.

4.4. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à lisozima em leite em pó reconstituído a 10% EST.

O Quadro 3 mostra que o choque térmico, 50°C, por 30min e o choque ácido, pH3,5 a 37°C, por 30min, não exerceram efeito protetor nem deletério sobre as células de *Lactobacillus* UFV H2b20 no que se refere à exposição a solução de lisozima 0,8mg/ml a 25°C por 60 minutos em leite em pó ressuspenso a 10% EST. Observa-se que o controle na ordem de 10^3 UFC/ml sobreviveu a esse tratamento com um número de células sobreviventes de $7,0 \times 10^1$ UFC/ml, efeito esse justificado por BRENNAN, (1986) que demonstrou o aumento da sensibilidade do *L. acidophilus* à lisozima após ser submetido a secagem a vácuo. As células pré-tratadas com choque térmico ou choque ácido apresentam um número maior de sobreviventes, sendo observada a redução em um ciclo logarítmico, igual a observada para o controle. Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados por AGOSTINHO (1988), que partiu de 10^8 UFC/ml de *Lactobacillus* UFV H2b20 e obteve $5,0 \times 10^7$ UFC/ml após 60 minutos de exposição, uma redução de um ciclo logarítmico.

AGOSTINHO (1988), estudando o comportamento de *Lactobacillus* UFV H2b20 “in vitro” em condições semelhantes às do trato gastrointestinal humano, constatou sua resistência à lisozima de clara de ovo, em concentrações semelhantes às da lisozima de leite humano, da saliva e do leite bovino. O *Lactobacillus* UFV H2b20 apresentou uma taxa de lise correspondente a 0,05% transmitância/ min, e a contagem de células sobreviventes após 60 minutos de exposição à lisozima foi superior a $5,0 \times 10^7$ UFC/ml. A mesma autora sugeriu haver resistência dessa estirpe à lisozima da saliva humana.

Neste trabalho é confirmada a resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à lisozima e demonstrado que pré-tratamentos e estresse do processamento não afetam essa resistência.

Quadro 3 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a lisozima na concentração de 0,8mg/ml mantido a 25°C, por 60 min em leite em pó reconstituído a 10% EST

	UFC/ml após tempo de exposição a Lisozima	
	0min	60min
Controle ¹	9,50 x 10 ²	7,00 x 10 ¹
CT ²	1,25 x 10 ⁴	1,04 x 10 ³
CA ³	2,63 x 10 ⁴	2,67 x 10 ³

¹Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C.

²Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque térmico: tratamento a 50°C, por 30min.

³Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque ácido: tratamento em pH 3,5 a 37°C, por 30min.

4.5. Efeito dos choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a sais biliares em leite em pó reconstituído a 10% EST.

Com base nos resultados obtidos no Quadro 4 para exposição a 1% de sais biliares em leite reidratado a 10% EST, verifica-se sobrevivência, após 30minutos de exposição, de aproximadamente 10²UFC/ml para o controle, partindo-se de aproximadamente 10³UFC/ml e, após aumentado o período de exposição, uma diminuição considerável do número de sobreviventes, efeito esse justificado por BRENNAN, (1986) que demonstrou o aumento da sensibilidade do *L. acidophilus* aos sais biliares após ser submetido a secagem a vácuo. Quando as células foram submetidas ao choque ácido em pH3,5 a 37°C por 30minutos antes da exposição aos sais biliares, a redução foi de 2 ciclos logarítmicos, maior que aquela observada para o controle, o que demonstra um efeito deletério do choque ácido sobre as células nos primeiros 30minutos de exposição aos sais biliares, que pode ser superado aumentando-se o número

inicial de células. Nota-se, no entanto, que a sobrevivência foi mantida após aumentado o período de exposição, sugerindo assim, um efeito protetor desse pré-tratamento sobre *Lactobacillus* UFV H2b20 durante a exposição aos sais biliares após 1 hora e até 3 horas. O pré-tratamento a 50°C por 30 minutos, por outro lado, não promoveu nenhum efeito benéfico de pré-adaptação às células de *Lactobacillus* UFV H2b20 aos sais biliares sendo a redução de 10^4 UFC/ml para quase 10^2 células. Essa sobrevivência foi menor que a obtida para o controle demonstrando o efeito deletério desse pré-tratamento às células de *Lactobacillus* UFV H2b20 em relação à exposição aos sais biliares. Pode-se observar, nesse caso, a irrelevância do choque térmico para pré-adaptação de *Lactobacillus* UFV H2b20 aos sais biliares e a eficiência do choque ácido na manutenção do número de células sobreviventes aos sais biliares.

SANTOS (1984) estudou o comportamento de *Lactobacillus* UFV H2b20 na presença de sais biliares em várias concentrações e verificou sua sobrevivência à exposição a 1% de sais biliares numa ordem de $6,8 \times 10^7$ UFC/ml quando partiu de $1,1 \times 10^9$ UFC/ml. Ficou demonstrada assim a correlação entre a capacidade do microrganismo em habitar o trato intestinal no que se refere à resistência à bile.

AGOSTINHO (1988) estudou a sensibilidade de *Lactobacillus* UFV H2b20 a 1% de sais biliares durante 30 minutos, 1, 2, 3 e 24 horas de exposição, a 37°C, em leite desnatado e em caldo MRS. A autora observou após 24 horas de exposição uma redução decimal de 1,5623 em leite desnatado, inferior a 2,0834 RD, obtido no caldo MRS, o que indica que a composição do meio de cultura pode auxiliar na resistência do lactobacilo aos sais biliares. Nesse experimento partiu-se de células numa ordem de 10^7 UFC/ml para o teste em leite desnatado e em caldo MRS, obtendo sobrevivência numa ordem de 10^7 UFC/ml após 30 minutos, 1, 2, e 3 horas de exposição e de 10^6 UFC/ml após 24 horas de exposição em leite desnatado. Já para o caldo MRS, os resultados foram numa ordem de 10^6 UFC/ml após 30 minutos, 1, 2, e 3 horas de exposição e 10^5 UFC/ml após 24 horas de exposição.

Embora os pré-tratamentos não tenham aumentado a resistência aos sais biliares, ficou demonstrado a resistência intrínseca do *Lactobacillus* UFV H2b20 a esses sais.

Quadro 4 – Efeito do choque térmico (CT) e do choque ácido (CA) na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 a 1% de sais biliares mantido a 37°C, por 30min, 1,2,3 e 24h em leite em pó reconstituído a 10% EST.

	Tempo de exposição aos sais biliares					
	0 min	30 min	1 h	2 h	3 h	24h
Controle ¹	9,50 x 10 ²	1,36 x 10 ²	9,20 x 10 ¹	7,30 x 10 ¹	1,10 x 10 ²	1,00 x 10 ¹
Choque Térmico ²	1,25 x 10 ⁴	7,00 x 10 ¹	7,00 x 10 ¹	1,20 x 10 ²	4,00 x 10 ¹	5,60 x 10 ¹
Choque Ácido ³	2,63 x 10 ⁴	1,20 x 10 ²	1,25 x 10 ²	1,03 x 10 ²	1,70 x 10 ²	1,00 x 10 ¹

¹Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C.

²Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque térmico: tratamento a 50°C, por 30min.

³Leite em pó adicionado de células cultivadas a 37°C e submetidas a choque ácido: tratamento em pH 3,5 a 37°C, por 30min.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Estudou-se o efeito do choque térmico, 50°C, por 30min e do choque ácido em pH3,5, por 2h e 30min a 37°C na sobrevivência de *Lactobacillus* UFV H2b20 à desidratação a 180°C em leite concentrado com 40% de extrato seco total (EST). Em leite contendo 10% EST, no leite inoculado com células não pré-tratadas, houve redução de $4,68 \times 10^7$ UFC/ml para $9,50 \times 10^2$ UFC/ml, após o processamento do leite em pó. Com leite inoculado com células pré-tratadas por choque térmico a redução foi de $1,19 \times 10^8$ UFC/ml para $1,25 \times 10^4$ UFC/ml, após o processamento, isto é, quase dois ciclos logarítmicos de redução a menos que o controle. O mesmo efeito foi constatado quando as células foram pré-tratadas com choque ácido com redução de $2,00 \times 10^8$ UFC/ml para $2,63 \times 10^4$ UFC/ml, após o processamento. Pode-se concluir que o choque térmico e o choque ácido, antes da desidratação, tornaram as células mais tolerantes ao processo de desidratação testado neste estudo.

Com o objetivo de testar o efeito das condições de estresse na sobrevivência do *Lactobacillus* UFV H2b20 a condições ambientais, foi estudado o efeito dos choques térmico e ácido na sobrevivência dessa bactéria, em leite em pó reconstituído a 10% EST por meio dos seguintes testes “in vitro”: temperatura de 65°C, por 20 e 40min, solução de lisozima na concentração de 0,8mg/ml, a 25°C

por 30min, pH2,5 por 2h e 30min, a 37°C e solução de sais biliares na concentração de 1%, a 37°C, por 30min, 1,2,3 e 24horas.

Fica demonstrado o efeito protetor do choque térmico e do choque ácido, ao tratamento a 65°C, por 20min, em *Lactobacillus* UFV H2b20. Observa-se que o controle, 10^3 UFC/ml, não submetido a nenhum pré-tratamento não logrou sobrevivência a esse tratamento, no entanto, as células que foram pré-tratadas tiveram uma redução de dois ciclos logarítmicos, um ciclo de redução a menos que o controle. As células que receberam choque térmico ou choque ácido e as que não foram submetidas a nenhum pré-tratamento responderam igualmente após 40minutos, à temperatura de 65°C, onde nenhuma colônia foi contabilizada na menor diluição testada, de 1:10.

Podemos constatar que 10^3 UFC/ml de *Lactobacillus* UFV H2b20, foram incapazes de resistir ao tratamento por 60minutos em 0,8mg/ml lisozima, e que os pré-tratamentos a 50°C, por 30 min ou , pH3,5 a 37°C, por 30min não as tornam mais tolerantes a essas condições experimentais.

Observou-se o efeito protetor do choque térmico e do choque ácido, ao tratamento em pH2,5, por 2h e 30min, a 37°C em *Lactobacillus* UFV H2b20. Observa-se que o controle, 10^3 UFC/ml, não submetido a nenhum pré-tratamento, não sobreviveu a esse tratamento, no entanto, as células submetidas ao choque térmico antes do tratamento em pH2,5 por 2,5 horas demonstram sobrevivência em aproximadamente dois ciclos logarítmicos, quando comparados ao controle. O mesmo pode ser inferido para o pré-tratamento em pH3,5 por 30 minutos a 37°C.

No tratamento com 1% de sais biliares, verifica-se maior sobrevivência do controle quando comparado com as amostras pré-tratadas. Houve sobrevivência de 10% das células do controle e 1% das células pré-tratadas, nos primeiros 30min de exposição. Nas células submetidas ao choque ácido houve efeito deletério nos primeiros 30minutos e efeito protetor nos demais períodos demonstrando seu efeito protetor na manutenção do número de células sobreviventes a esse tratamento. Observou-se melhor efeito do tratamento com ácido, quando comparado ao choque térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AGOSTINHO, S. M. M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- BALOWS, A. *et al.* **The Procaryotes.** 2^a ed. New York – USA: Springer – Verlag. VII. 1992. p. 1508-1534.
- BOUTIBONNES, P., GIARD, J. C., HARTKE, A, THAMMAVONGS, B., AUFFRAY, Y. Characterization of the heat shock response in *Enterococcus faecalis* .**Antonie van Leeuwenhock.** v. 64, n.1, p. 47-55, 1993.
- BRENNAN, M., WANISMAIL, B., JOHNSON, M. C. *et al.* Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 1, p. 47-53, janeiro, 1986.
- CANGANELLA, F., PAGANINI. S., OVIDI. M., VETTRAINO. A. M., BEVILACQUA. L., MASSA. S., TROVATELLI. L. D. A microbiological investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. **Microbial Research.** v. 152. p. 171-179. 1997.
- CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L., COLLINS, J. K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 759-768. 1998.

- DAEMEN, A. L. H. The destruction of enzymes and bacteria during the spray-drying of milk and Whey. 4. A comparison of theoretical computed results concernig the destruction os phosphatase with those obtained experimentally. **Netherlands milk and Dairy Journal**, v. 38, p. 55-70. 1984.
- DAEMEN, A. L. H., KRUCK, A., STEGE, H. J. van der. The destruction of enzymes and bacteria during the spray-drying of milk and Whey. 3. Analysis of the drying process according to the stages in which the destruction occurs. **Netherlands milk and Dairy Journal**, v. 37, p. 213-228. 1983.
- DAEMEN, A. L. H., STEGE, H. J. van der. The destruction of enzymes and bacteria during the spray-drying of milk and Whey. 2. The effect of the drying conditions. **Netherlands milk and Dairy Journal**, v. 36, p. 211-229. 1982.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M., SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135. 1960.
- DUNNE, C. *et al.* Probiotics: from yth to reality. Demosntration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 279-292. 1999.
- 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, MG: UFV, 1997. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- HALL, C. M., HEDRICK, T. I. Spray drying. In: _ **Drying of milk and milk products.** 2^a. ed. Westport: Avi, 1971. p. 59 – 93.
- JAY, M. J. **Modern Food Microbiology.** 4^a ed. New York: Van Nostrand Reinhold. 1992. p. 400-401.
- KONINGS, W.N., KOK, J., KUIPERS, O. P., POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**. v. 3, p. 276-282. 2000.
- LABUZA, T. P., JONES, K.A., SINSKEY, A. J., *et al.* Effect of drying conditions on cell viability and functional properties of single-cell protein. **Journal of Food Science**, v. 37, p. 103-107. 1972.
- LABUZA, T. P., ROUX, J.P., FAN, T. S., *et al.* Engineering factors in single-cell protein production. II. Spray drying and cell visibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, p. 135-140. 1970.

- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 9th ed. Prentice Hall. New Jersey. 2000. p. 229-230.
- MOAT, A. G. & FOSTER, J. W. **Microbial Physiology**. 3rd ed. Wiley Liss, Inc. 1995. p. 185-187.
- MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- NELSON, D. L., COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 3rd ed. Worth Publishers. New York. 2000. p. 197.
- PRAJAPATI, J. B., SHAH, R. K., DAVE, J. M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended-spray dried acidophilus preparations. **Australian Journal of Dairy Technology**, p. 17 - 21. 1987.
- RIBEIRO, M. A. **Aspectos da Produção de Peróxido de Hidrogênio e Inibição de Bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1995
- SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional, and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84. p. 197-215. 2000.
- SANDERS, M. E., VELD, J. H. Bringing a probiotic- containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 293-315. 1999.
- SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, MG: UFV, 1984. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- TEIXEIRA, P., CASTRO, H., KIRBY, R. Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. **Letters in Applied Microbiology**, v. 22, p. 34-38. 1996.
- UETANABARO, A. P. T., **Seqüência e Caracterização da Região Codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.

- WHITAKER, R.D., BATT, C. A. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1408-1412. 1991.
- YUKI, N., WATANABE, K., MIKE, A., TAGAMI, Y., TANAKA, R., OHWAKI, M., MOROTOMI, M. Survival of probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48, p. 51-57. 1999.

APÊNDICE

Quadro 1– Parâmetros utilizados no processamento de leite concentrado com 40% EST, adicionado de *Lactobacillus*, UFV H2b20 em Mini “Spray-Dryer” B-191

Leite em pó	Temperatura de secagem °C	Temperatura de saída °C	Alimentação %	Aspiração %	Tempo de processamento min	Rendimento g
Controle	180	99	16	75	83	35
CT	180	99	16	75	89	37,6
CA	180	91	16	75	71	26