

**CONTAGEM DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 E EFEITO DA
ADIÇÃO DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 E DO
TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM
IOGURTE**

Luciano Fachin

Orientadora: Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Mieko Kimura

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.L.A. – UNICAMP

F118c Fachin, Luciano
Contagem de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 e efeito da
adição de *Propionibacterium freudenreichii* PS- 1 e do
tratamento térmico do leite sobre o desenvolvimento de
Bifidobacterium animalis Bb 12 em iogurte / Luciano Fachin. –
Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Walkiria Hanada Viotto

Co-orientador: Mieko Kimura

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Bifidobacterium. 2.Propionibacterium. 3.Tratamento
térmico. 4.Crescimento. I.Viotto, Walkiria Hanada. II.Kimura,
Mieko. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. IV.Título.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Bifidobacterium, Propionibacterium, Heat
Treatment, Growth

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Walkiria Hanada Viotto

Carmen Silvia Fávaro Trindade

Izildinha Moreno

Lucio Alberto Forti Antunes

Salvador Massaguer Roig

Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Fernando Leite Hoffmann

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**CONTAGEM DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 E EFEITO DA
ADIÇÃO DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 E DO
TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM
IOGURTE**

Luciano Fachin

Mestre em Tecnologia de Alimentos

Profa. Dra. Walkíria Hanada Viotto

Orientadora

Profa. Dra. Mieko Kimura

Co-orientadora

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor
em Tecnologia de Alimentos.**

Campinas SP / 2005

BANCA EXAMINADORA

**PROF^a Dr^a WALKÍRIA HANADA VIOTTO
(ORIENTADORA)**

**PROF^a Dr^a CARMEN SÍLVIA FÁVARO TRINDADE
(MEMBRO)**

**PROF. DR. FERNANDO LEITE HOFFMANN
(MEMBRO)**

**DR. LÚCIO ALBERTO FORTI ANTUNES
(MEMBRO)**

**Dr^a IZILDINHA MORENO
(MEMBRO)**

**PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE
(MEMBRO)**

**PROF. DR. SALVADOR MASSAGUER ROIG
(MEMBRO)**

Campinas - 2004

*para todos aqueles que desistiram da vida,
especialmente Manuel.*

*e para todos aqueles iluminados que trouxeram alegria e felicidade à vida,
especialmente Cyntia.*

...nos encontraremos novamente no mundo onde o tempo não existe...

“Porque isto é também como um homem que, partindo para fora da terra, chamou os seus servos, e entregou-lhes os seus bens. E a um deu cinco talentos, e a outro dois, e a outro um, a cada um segundo a sua capacidade, e ausentou-se logo para longe. E, tendo ele partido, o que recebera cinco talentos negociou com eles, e granjeou outros cinco talentos. Da mesma sorte, o que recebera dois, granjeou também outros dois. Mas o que recebera um, foi e cavou na terra e escondeu o dinheiro do seu senhor. E muito tempo depois veio o senhor daqueles servos, e fez contas com eles. Então aproximou-se o que recebera cinco talentos, e trouxe-lhe outros cinco talentos, dizendo: Senhor, entregaste-me cinco talentos; eis aqui outros cinco talentos que granjeei com eles. E o seu senhor lhe disse: Bem está, servo bom e fiel. Sobre o pouco foste fiel, sobre muito te colocarei; entra no gozo do teu senhor. E, chegando também o que tinha recebido dois talentos, disse: Senhor, entregaste-me dois talentos; eis que com eles granjeei outros dois talentos. Disse-lhe o seu SENHOR: Bem está, bom e fiel servo. Sobre o pouco foste fiel, sobre muito te colocarei; entra no gozo do teu senhor. Mas, chegando também o que recebera um talento, disse: Senhor, eu conhecia-te, que és um homem duro, que ceifas onde não semeaste e ajuntas onde não espalhaste; e, atemorizado, escondi na terra o teu talento; aqui tens o que é teu. Respondendo, porém, o seu senhor, disse-lhe: Mau e negligente servo; sabias que ceifo onde não semeei e ajunto onde não espalhei? Devias então ter dado o meu dinheiro aos banqueiros e, quando eu viesse, receberia o meu com os juros. Tirai-lhe pois o talento, e dai-o ao que tem os dez talentos. Porque a qualquer que tiver será dado, e terá em abundância; mas ao que não tiver até o que tem ser-lhe-á tirado. Lançai, pois, o servo inútil nas trevas exteriores; ali haverá pranto e ranger de dentes.”

Mateus, 25-24

“Feliz daquele que não teme aquilo que lhe é dado.”

Agradecimentos

À professora Walkiria por todos os inúmeros ensinamentos passados em 9 anos de orientação, desde o mestrado e o doutorado. Pela confiança e amizade e pelas incontáveis ajudas prestadas nestes 9 anos.

Aos membros da banca, Prof^ª Dr^ª Carmen Sílvia Fávaro Trindade, Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, Dr. Lúcio Alberto Forti Antunes, Dr^ª Izildinha Moreno, Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, que fizeram o grande favor de corrigir a tese em tempo absolutamente recorde.

À Chr. Hansen, na pessoa de Lúcio Alberto Forti Antunes, por ter cedido as culturas de *Bifidobacterium animalis* Bb12 e *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 durante todo o trabalho.

À Danisco Brasil, por ter cedido a sua Planta Piloto de Laticínios necessária à realização dos dois últimos capítulos desta tese.

À Mieko e a Karla, por terem me ensinado tudo o que eu sei sobre HPLC e pela grande amizade.

À Ana Lourdes, pelos ensinamentos e pela paixão dividida ao olharmos aqueles “micro-seres” que se desenvolviam nas milhares de placas semeadas nestes cinco anos de tese.

À Bernardete, pela grande ajuda durante os trabalhos no laboratório. E pela bíblia, que sempre estará comigo ...

Ao Marcos e o Luciano, pelos imprescindíveis conselhos micro-informáticos ...

À todos os amigos que, de uma forma ou de outra, possibilitaram que esta tese fosse defendida em tempo hábil. São tantos nomes que seria impossível citar todos aqui sem esquecer de alguém. À todos os meus amigos o meu sincero “MUITO OBRIGADO” e estejam certos que sempre estaremos juntos, mesmo que às vezes a distância pense que possa nos separar ...

À minha mãe Elena, meu pai Hélio e minha irmã Andrelisa, por todo o apoio nos momentos de tristeza e desânimo. A família é o lugar onde sempre acharemos luz nos momentos em que tudo parece estar em trevas.

Ao descobridor do pó de guaraná, por motivos óbvios.

À FAPESP, por todo o suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUÇÃO GERAL	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
MÉTODOS PARA CONTAGEM DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> SPP. NA PRESENÇA DAS CULTURAS DO IOGURTE	19
TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE.....	20
<i>PROPIONIBACTERIUM</i> SPP. COMO PROMOTOR DE DESENVOLVIMENTO DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> SPP.	22
BIBLIOGRAFIA	24
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A CONTAGEM DE <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb 12 NA PRESENÇA DAS BACTÉRIAS DO IOGURTE	
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
CULTURAS	31
PREPARAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS INÓCULOS	31
ÁGAR MRS (DE MAN, ROGOSA, SHARPE)	32
ÁGAR RCPB PH5 (REINFORCED CLOSTRIDIAL PRUSSIAN BLUE AT PH5)	32
ÁGAR MALTOSE-MRS (MALTOSE - DE MAN, ROGOSA, SHARPE)	32
ÁGAR MRS-NNLP.....	33
TRATAMENTOS	33
CONTAGEM.....	34
ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
ÁGAR M-MRS	34
ÁGAR MRS-NNLP.....	35
ÁGAR RCPB PH5	36
CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	39

**CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A CONTAGEM
DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM IOGURTE APÓS A ESTOCAGEM
REFRIGERADA**

1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. CULTURAS	44
2.2. ATIVAÇÃO DO INOCULO.....	44
2.3. AVALIAÇÃO DO ÁGAR RCPB PH5, MRS-LP E DO ÁGAR RCPB PH5 FORTIFICADO DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA DO IOGURTE	45
2.4. EFEITO DA ADIÇÃO DOS SAIS NA FORTIFICAÇÃO DO ÁGAR RCPB PH5	45
2.5. MEIOS DE CULTURA	46
2.5.1. ÁGAR MRS	46
2.5.2. ÁGAR RCPB PH5	46
2.5.3. ÁGAR MRS-LP	46
2.5.4. ÁGAR RCPB PH5 FORTIFICADO	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1. AVALIAÇÃO DO ÁGAR RCPB PH5, MRS-LP E DO ÁGAR RCPB PH5 FORTIFICADO DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA DO IOGURTE	47
EFEITO DA ADIÇÃO DOS SAIS NA FORTIFICAÇÃO DO ÁGAR RCPB PH5	50
4. CONCLUSÃO.....	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

**CAPÍTULO III - ESTIMULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium*
animalis Bb 12 POR *Propionibacterium freudenreichii* PS-1**

1. INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 MATERIAL	56
2.2 ATIVAÇÃO DAS CULTURAS	57
2.3 CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 E <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1 EM LEITE.....	57
2.4 DESENVOLVIMENTO ASSOCIADO DE <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1 E <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM LEITE	57
2.5 PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 POR <i>P. FREUDENREICHII</i> PS- 1 EM FUNÇÃO DO NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	58
2.6 EFEITO DO TEMPO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 SOBRE A PROMOÇÃO DE DESENVOLVIMENTO	59
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1 DESENVOLVIMENTO ASSOCIADO DE <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1 E <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM LEITE	59

3.2 PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 POR <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1 EM FUNÇÃO DO NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	60
3.3 EFEITO DO TEMPO DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 SOBRE A PROMOÇÃO DE DESENVOLVIMENTO	62
4. CONCLUSÃO.....	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

**CAPÍTULO IV - EFEITO DA ADIÇÃO DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM
IOGURTE E SOBRE A SUA VIABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM
REFRIGERADA**

1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1 CULTURAS.....	68
2.2 MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DAS CULTURAS	68
2.3 SISTEMAS MODELO PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM IOGURTE COM <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1.....	69
2.4 PRODUÇÃO DO IOGURTE	70
2.5 MEDIDAS DE PH.....	71
2.6 TEOR DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DOS IOGURTES	71
2.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	72
2.8 ANÁLISE DE PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL (TPA).....	73
2.9 AVALIAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE SORO DO IOGURTE DURANTE A ESTOCAGEM	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.1 DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM IOGURTE COM <i>P. FREUDENREICHII</i> PS-1 EM TESTES MODELO	74
3.2 CURVAS DE PH	75
3.3 DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12, <i>S. THERMOPHILUS</i> E <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> SUBSP. <i>BULGARICUS</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO DO IOGURTE	77
3.4 TEOR DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS (LÁTICO, ACÉTICO E PROPIÔNICO)	79
3.5 VIABILIDADE DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12, <i>S. THERMOPHILUS</i> E DE <i>LACTOBACILLUS DELBRUECKII</i> SUBSP. <i>BULGARICUS</i> DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA	84
3.6 PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL	86
3.7 SEPARAÇÃO DE SORO.....	88
4. CONCLUSÃO.....	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

**CAPÍTULO V - EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM IOGURTE E
SOBRE A SUA VIABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA**

1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 CULTURAS	97
2.2 MANUTENÇÃO E ATIVAÇÃO DAS CULTURAS	97
2.3 SISTEMA MODELO PARA AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM IOGURTE COM LACTULOSE	97
2.4 PRODUÇÃO DO IOGURTE	98
2.5 MEDIDAS DE PH.....	99
2.6 TEOR DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DOS IOGURTES	99
2.7 CONTAGEM MICROBIOLÓGICA	100
2.8 ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL (TPA)	102
2.9 AVALIAÇÃO DA SINERESE DO IOGURTE DURANTE A ESTOCAGEM.....	102
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	102
3.1 DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12 EM IOGURTE COM LACTULOSE EM TESTES MODELO.....	102
3.2 CURVAS DE PH	103
3.3 DESENVOLVIMENTO DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12, <i>S. THERMOPHILUS</i> E <i>L. BULGARICUS</i> DURANTE A FERMENTAÇÃO DO IOGURTE	105
3.4 MEDIDAS DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS (LÁTICO, ACÉTICO E PROPIÔNICO) DURANTE A FERMENTAÇÃO DO IOGURTE	107
3.5 VIABILIDADE DE <i>B. ANIMALIS</i> Bb 12, <i>S. THERMOPHILUS</i> E DE <i>L. BULGARICUS</i> DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA	109
3.6 PERFIL DE TEXTURA INSTRUMENTAL	111
3.7 SEPARAÇÃO DE SORO.....	113
4. CONCLUSÃO.....	114
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
CONCLUSÃO GERAL	117

Lista de Abreviações

ATCC – “American Type Culture Collection”

CBRCA - “China Blue-Blood-RCA”

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”

HTST – “High Temperature Short time”

IFO – “Institute for Fermentation, Osaka”

MRS – “de Man, Rogosa, Sharpe Agar”

M-MRS – “Maltose de Man, Rogosa, Sharpe Agar”

MRS-LP – “de Man, Rogosa, Sharpe-Lithium Chloride Sodium Propionate Agar”

MRS-NNLP – “de Man, Rogosa, Sharpe-Nalidixic acid, Neomycin sulfate, Lithium chloride e Paromomycin sulfate Agar”

NCFB – “National Collection of Food Bacteria”

PCA – “Plate Count Agar”

PET – “Polietileno Tereftalato”

RCA – “Reinforced Clostridial Agar”

RCPB pH5 – “Reinforced Clostridial Prussian Blue Agar at pH5”

SMA – “Skim Milk Agar”

TPA – “Textura Profile Analysis”

UHT – “Ultra High Temperature”

RESUMO GERAL

A produção de iogurtes com *Bifidobacterium* spp. tem crescido muito nas últimas décadas visando a produção de alimentos funcionais. Contudo, para que o produto possa apresentar tais propriedades, tem sido alegado que o número mínimo de células viáveis de *Bifidobacterium* spp. presentes no momento do consumo deva ser de 10^6 UFC/g de produto. Entretanto, vários estudos têm mostrado produtos comerciais com contagens menores do que as recomendadas, durante a estocagem do iogurte. Esse fato é reflexo tanto da dificuldade de incorporação destes microrganismos ao iogurte, devido às condições de processo que não são favoráveis ao desenvolvimento da bifidobactéria, bem como pela dificuldade de enumeração destes microrganismos na presença das culturas do iogurte. Este trabalho avaliou o uso dos meios M-MRS, MRS-NNLP, MRS-LP, RCPB pH5 e RCPB pH5 enriquecido com extrato de fígado, visando a contagem seletiva ou diferencial de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 na presença das culturas do iogurte e estudou o efeito do tratamento térmico do leite, visando o aumento do teor de lactulose e, da adição de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, sobre o desenvolvimento e manutenção do número de células viáveis de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação e estocagem do iogurte. Dos meios estudados, o meio RCPB pH5, enriquecido com 150mL/L de extrato de fígado, foi o mais indicado para a contagem de *B. animalis* Bb 12 em iogurte por ter apresentado uma excelente diferenciação deste microrganismo, após a estocagem refrigerada do iogurte. O tratamento térmico do leite de 142°C/15 segundos não afetou o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação do iogurte e também não influenciou a sua resistência à estocagem refrigerada. Entretanto, o tratamento térmico alterou significativamente a textura, diminuindo consideravelmente a dureza, gomosidade e adesividade do iogurte, resultando em um produto com menor separação de soro. A adição de *P. freudenreichii* PS-1 aumentou em aproximadamente duas vezes o número de células de *B. animalis* Bb 12 ao final da fermentação e melhorou a resistência da bifidobactéria à estocagem refrigerada. A presença da propionibactéria também alterou significativamente a textura final do iogurte, aumentando consideravelmente a gomosidade e adesividade do produto final, bem como resultou em um iogurte com menor separação de soro durante a estocagem refrigerada.

ABSTRACT

Bifidobacterium spp. has been used to produce probiotic yoghurts due to its therapeutic properties. However, it has been claimed that the number of bifidobacteria in yoghurt at the time of consuming must be 10^6 CFU /g of product to perform their therapeutic functions. Many studies found a low recovery of bifidobacteria from commercial products during shelf life. The low viability of bifidobacteria can be attributed to the process conditions of yoghurt, which is not favorable to the growth of bifidobacteria, and to the difficulty for enumeration of bifidobacteria in the presence of yoghurt bacteria. The objectives of this work were to evaluate the following media: M-MRS, MRS-NNLP, MRS-LP, RCPB pH5 and fortified RCPB pH5 to enumerate *B. animalis* Bb 12 in yoghurt, and to evaluate the heat treatment of milk (142°C/15 seconds) and the addition of *P. freudenreichii* PS-1 on the growth of *B. animalis* Bb 12 during yoghurt fermentation and during shelf life. RCPB pH5 fortified with 150 mL/L of liver extract was the best media due to its excellent differentiation during refrigerated storage of yoghurt. The heat treatment of milk (142°C/15 seconds) did not have effect on the growth of bifidobacteria during fermentation and it also did not improve the bifidus viability during storage. Heat treatment, however, had a strong effect on yoghurt texture, decreasing the sineresis and some parameters of TPA (hardness, gumminess and adhesiveness). The addition of *P. freudenreichii* PS-1 increased two fold the bifidobacteria growing during yoghurt fermentation and it also increased the viability of bifidobacteria during yoghurt shelf life. The addition of *P. freudenreichii* PS-1 also decreased the sineresis and increased TPA parameters of hardness, gumminess and adhesiveness. Addition of *P. freudenreichii* PS-1 to the yoghurt seems to be a good growth promoter for *B. animalis* Bb 12.

INTRODUÇÃO GERAL

O iogurte é um dos produtos lácteos mais produzidos e consumidos em todo o mundo. Nos últimos anos, tem-se dado muita atenção à utilização de bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp. em produtos lácteos, devido às suas excelentes propriedades terapêuticas e nutricionais, visando a produção dos chamados “iogurtes probióticos”. Segundo Gomes & Malcata (1999), probióticos “são microrganismos viáveis (bactérias lácticas ou extratos celulares desidratados aplicados em um produto fermentado), que possuem um efeito benéfico após sua ingestão na saúde do hospedeiro pelo melhoramento da sua microbiota”. Entretanto, a incorporação destes microrganismos ao iogurte é uma tarefa muito difícil, devido às necessidades nutricionais da bifidobactéria e sua grande sensibilidade às condições usuais de processo, principalmente a presença do oxigênio.

A lactulose é um isômero da lactose que tem sido descrito como um composto prebiótico, isto é, um composto que promove a proliferação do gênero *Bifidobacterium* spp. no intestino (Tamura, Mizota, Shimamura & Tomita, 1993; Mizota, 1996). A lactulose não está presente em leite cru e só aparece em leite processado com tratamento térmico intenso. Visto que o tratamento térmico é prática usual na fabricação do iogurte, a indução da formação de lactulose por tratamentos térmicos intensos parece ser um bom fator para o aumento da viabilidade de *B. animalis* Bb 12 em iogurtes.

Por outro lado, alguns pesquisadores (Kaneko, Mori, Iwata & Meguro, 1994; Mori, Sato, Taketomo, Kamiyama, Yoshiyama, Meguro & Sato, 1997; Yamazaki, Kano, Ikeda, Isawa & Kaneko, 1999) demonstraram que o gênero *Propionibacterium* spp. produz um estimulante forte e específico para as bifidobactérias: o 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona (ACNQ). Esse estimulante age como mediador da reação de regeneração de NAD(P)^+ , a qual permite a utilização do O_2 , aumentando a resistência da bifidobactéria a condição de aerobiose. Além da produção de ACNQ, o gênero *Propionibacterium* spp. produz ácido acético e propiônico (Taniguchi, Nakazawa, Takeda, Kaneko, Hoshino & Tanaka, 1998), os quais têm sido descritos como estimulantes de bifidobactéria (Kaneko *et alii*, 1994).

O objetivo deste trabalho foi o de melhorar a viabilidade de *B. animalis* Bb 12 em iogurtes através de dois fatores: o melhoramento do valor nutricional do leite, através da produção de lactulose por tratamentos térmicos intensos, e o aumento da resistência de bifidobactéria ao oxigênio, pela incorporação da espécie *P. freudenreichii* PS-1. A

linhagem escolhida para o trabalho foi o *B. animalis* Bb 12, da Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda, devido a sua já comprovada ação como microrganismo probiótico (Salminen, 1998).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O uso do gênero *Bifidobacterium* spp. em produtos lácteos tornou-se popular no fim da década de setenta devido às suas propriedades terapêuticas e nutricionais. Devido a isso, tem havido um interesse crescente no estudo desse gênero, principalmente no Japão, Estados Unidos e alguns países europeus (Gomes & Malcata, 1999). No Japão, existem mais de 53 tipos diferentes de produtos com a presença do gênero *Bifidobacterium* (Salminen, Wright & Decker, 1993).

Tem sido verificado que certas espécies desse gênero possuem a capacidade de resistir à digestão ácida e a ação dos sais biliares, conseguindo assim sobreviver ao trânsito intestinal, alcançando o cólon em número considerável para uma ação terapêutica efetiva. Dentre os efeitos terapêuticos e nutricionais, podem ser citados: aumento do nível de defesa do organismo contra bactérias patogênicas, auxílio na produção de vitaminas e aminoácidos, suspensão da intolerância à lactose e possível redução do nível de colesterol. Além disso, alguns estudos têm apontado um possível efeito “anti-tumor” em algumas espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Salminen *et alii*, 1993). Tem sido alegado que para o gênero *Bifidobacterium* ter efeito probiótico, o número de células viáveis no produto final deva estar entre 10^5 - 10^6 UFC/g (Gomes & Malcata, 1999; Salminen *et alii*, 1993; Berrada, Lemeland, Laroche, Thouverot & Piaia, 1991). Segundo Berrada *et alii* (1991), a escolha de uma cultura resistente para a produção de leites fermentados é muito importante, pois nem todas as espécies podem trazer benefícios ao homem. Isso ocorre porque diferentes espécies de *Bifidobacterium* possuem diferentes resistências às condições gástricas do estômago. Atualmente as espécies usadas como probióticas são: *B. breve*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (Lee, Nomoto, Salminen & Gorbach, 1999). Estas espécies não são usadas como culturas puras, pois possuem uma velocidade lenta de acidificação e, como produzem ácido acético além do ácido láctico, apresentam um sabor indesejável de vinagre. Por isto, são usadas em combinação com outras espécies de bactérias lácticas, como o *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Law, 1997).

Métodos para contagem de Bifidobacterium spp. na presença das culturas do iogurte

A falta de um método padrão para a enumeração de *Bifidobacterium* spp. na presença de culturas do iogurte é um fator que dificulta em muito a otimização da tecnologia de fabricação de iogurtes probióticos e o controle da sua eficácia como agente terapêutico. Os meios de cultura usados se dividem em seletivos e diferenciais. Meios seletivos são baseados na ação de um ou mais antibióticos que inibem o desenvolvimento das culturas do iogurte (por exemplo, meio MRS-NNLP e MRS-LP) ou na seleção do desenvolvimento de *Bifidobacterium* spp. pelo uso de um carboidrato que usualmente não é fermentado pelas culturas do iogurte (por exemplo, a maltose no meio M-MRS). Meios diferenciais se baseiam no uso de corantes especiais que diferenciam as colônias de *Bifidobacterium* spp. das colônias das culturas do iogurte.

Um dos primeiros trabalhos estudando a contagem seletiva de *Bifidobacterium* spp. em iogurte que produziu bons resultados foi descrito, na língua japonesa, por Teraguchi, Uehara, Ogasa & Mitsuoka em 1978 (Laroia & Martin, 1991). O trabalho indicava o uso do ágar Glicose-Sangue-Fígado, associado aos inibidores ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paramomicina. Modler & Villa-Garcia (1993) apontaram que a formulação descrita por Laroia & Martin dois anos antes estava incompleta, pois o componente sangue desfibrinado (50 mL de sangue de cavalo ou ovelha/L) foi retirado inadvertidamente da formulação. Posteriormente, Dave & Shah (1997) propuseram o uso do meio MRS-NNLP, associando os antibióticos NNLP (ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paramomicina) ao meio MRS para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurtes.

Lapierre, Undeland & Cox (1992) propuseram o uso de cloreto de lítio e propionato de sódio como inibidores das bactérias do iogurte associados ao ágar Fígado-Cistina-Lactose visando a contagem de *Bifidobacterium* em produtos de leite fermentado. Vinderola & Reinheimer (1999) usaram esses inibidores para a contagem de *Bifidobacterium* spp. em iogurtes associados ao meio MRS (MRS-LP).

O meio Maltose-de Man, Rogosa, Sharpe (M-MRS) foi desenvolvido como um meio seletivo para o isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de iogurtes (Rybka & Kailasapathy, 1996). Durante as análises foi notado que *Bifidobacterium* spp. poderia se

desenvolver em ágar M-MRS devido à capacidade de algumas linhagens em fermentar a maltose (Rybka & Kailasapathy, 1996). Dave & Shah (1997) usaram com sucesso este meio para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* spp. em iogurtes.

O primeiro trabalho a descrever o uso do corante Azul da Prússia foi escrito por Van Wiel-Korstanje & Winkler (1970). Eles usaram o meio CBRCA (“China Blue-Blood-RCA”) para a contagem diferencial da flora anaeróbica predominante em fezes humanas. Onggo & Fleet (1993) usaram o ágar RCPB para o isolamento e diferenciação de *Bifidobacterium*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em iogurtes. Rybka & Kailasapath (1996) propuseram o ajuste do pH do meio para 5, visando evitar o desenvolvimento da biota não láctica do leite. Ghodussi & Robinson (1996) obtiveram um excelente resultado com o meio RCPB para a contagem diferencial de *Bifidobacterium* spp. em iogurtes. Já Payne, Morris & Beers (1999) não obtiveram uma boa diferenciação entre as colônias de *Bifidobacterium* spp. e as culturas do iogurte com este meio.

Além da falta de um método padrão para a contagem de *Bifidobacterium* spp. na presença das culturas do iogurte, um dos maiores problemas para a produção de iogurtes probióticos é a dificuldade de manutenção do número mínimo de 10^6 UFC/g deste microrganismo durante toda a estocagem refrigerada do produto. Vários são os estudos que podem ser encontrados na literatura que mostram uma queda na viabilidade de *Bifidobacterium* em iogurtes (Vinderola, Bailo & Reinheimer, 2000; Dave & Shah, 1997; Rosenthal & Bernstein, 1998; Gilliland, Reilly, Kim & Kim, 2002). Desta forma, várias técnicas têm sido estudadas nos últimos anos, visando melhorar a viabilidade das culturas probióticas em iogurte: seleção de culturas resistentes ao meio ácido, uso de embalagens de vidro, pré-fermentação do leite com as culturas probióticas antes da inoculação das culturas do iogurte, microencapsulação, adaptação da cultura por “stress” celular à condição ácida, adição de ácido ascórbico, adição de cisteína e uso de células lisadas das culturas do iogurte visando à liberação da enzima β -galactosidase (Shah, 2000).

Tratamento térmico do leite

Tratamentos térmicos variando de 75°C por 1 a 5 minutos até 95°C por 5 a 10 minutos têm sido usados na produção do iogurte. Entretanto, outras combinações de tempo

temperatura também podem ser empregadas, como os tratamentos HTST e UHT. A maioria dos estudos mostra que o tratamento térmico do leite aumenta a capacidade de retenção de água do iogurte (Sondini, Remeuf, Haddad & Corrieu, 2004).

Durante o tratamento térmico, a principal mudança que ocorre no leite é a desnaturação e agregação das proteínas do soro com as caseínas e os glóbulos de gordura. As quantidades das proteínas do soro ligadas às caseínas são muito maiores do que as quantidades ligadas aos glóbulos de gordura (Sondini *et alii*, 2004). Segundo Corredig & Dalgleish (1996), em tratamentos térmicos até 90°C por 60 minutos, dois tipos de reações podem ocorrer: a) interação direta da β -lactoglobulina com a caseína por intermédio da κ -caseína e b) reação entre β -lactoglobulina e α -lactalbumina com as micelas de caseína através da formação de um intermediário em solução. A solubilização do cálcio, fosfatos inorgânicos e magnésio das micelas durante a acidificação permanecem inalteradas com o tratamento térmico.

Dannenberg & Kessler (1988) mostraram uma relação linear entre a capacidade de retenção de água e a desnaturação das proteínas do soro provocada pelo tratamento térmico. A estrutura protéica mais ramificada e menos grosseira formada pelo tratamento térmico consegue imobilizar grandes volumes de água. Dannenberg & Kessler (1988) sugeriram que uma grande desnaturação da β -lactoglobulina reduz a capacidade de coalescência das micelas de caseína durante a fermentação, o que resulta em uma matriz protéica composta de cadeias de caseína capaz de imobilizar grandes quantidades de água. Quando a formação dos complexos entre a β -lactoglobulina e as caseínas atingem o seu máximo (99% de desnaturação da β -lactoglobulina, com um tratamento térmico de 95°C por 5 minutos), um aumento adicional no tratamento térmico não aumenta a capacidade de retenção de água (Dannenberg & Kessler, 1988).

Segundo Sondini *et alii* (2004), a maioria dos estudos mostra que existe um ponto ótimo para a intensidade do tratamento térmico em relação as suas conseqüências na textura do iogurte. Tem-se demonstrado que a desnaturação da β -lactoglobulina deva estar entre 60 a 90% para uma otimização da capacidade de retenção de água do iogurte. Se o tratamento térmico for muito severo, com uma desnaturação acima de 90% da β -lactoglobulina, ocorrerá um efeito negativo na capacidade de retenção de água. Parnell-Clunies, Kakuda & de Man (1986) mostraram que um tratamento térmico UHT conduz a um iogurte com uma menor firmeza do gel e uma menor viscosidade quando comparado com o tratamento

convencional (85°C por 10-30 minutos). Segundo Mottar *et alii* (1989), este fato provavelmente se relaciona com diferenças na cinética de desnaturação das proteínas do soro, principalmente com a β -lactoglobulina e a α -lactalbumina. Também tem sido proposto que a agregação das caseínas em partículas grandes durante o processo de UHT pode conduzir a um gel mais fraco (Dannenberg & Kessler, 1998).

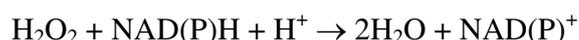
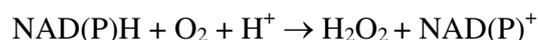
Além do efeito do tratamento térmico na estrutura do iogurte, devido a interação que ocorre entre as proteínas do soro com a κ -caseína das micelas (Lucey, Cheng, Munro & Singh, 1998; Corredig & Dalgleish, 1996; Mottar, Bassier, Joniau & Baert, 1989), tratamentos térmicos intensos provocam a produção de lactulose no leite. A lactulose é um dissacarídeo onde o resíduo glicose da lactose foi isomerizado à frutose. O papel da lactulose como fator de desenvolvimento do gênero *Bifidobacterium* spp. tem sido demonstrado por alguns pesquisadores (Mizota, 1996; Tamura *et alii*, 1993). A isomerização da lactose a lactulose só é induzida por tratamentos térmicos intensos (Andrews, 1986; Martinez-Castro & Olano, 1980), portanto a lactulose não é encontrada em leite cru ou em leite pasteurizado. No leite esterilizado, a lactulose aparece na forma livre ou ligada a aminogrupos das proteínas do leite. A isomerização também é grandemente afetada pelo pH, sendo que a neutralização a pH 7-7,5 aumenta o grau de isomerização a até 13,7% (Martinez-Castro & Olano, 1980). Assim, a possibilidade de se produzir iogurtes probióticos com leites tratados termicamente visando o melhoramento das condições nutricionais do leite para a sobrevivência e manutenção do número necessário de células viáveis de *Bifidobacterium* spp. durante o período de estocagem, representa um tema muito interessante a ser investigado, visto que o tratamento térmico do leite é prática usual da indústria para a produção do iogurte visando um melhoramento da textura final do produto.

Propionibacterium spp. como promotor de desenvolvimento de *Bifidobacterium*

A produção de iogurtes probióticos também é dificultada pela sensibilidade de *Bifidobacterium* spp. a condição de aerobiose (Talwalkar & Kailasapathy, 2003). Como uma bactéria anaeróbia naturalmente derivada do intestino humano, ela não possui meios

de reduzir o oxigênio à água, como ocorre com as bactérias aeróbias. O sistema de utilização do oxigênio em bactérias probióticas é geralmente reduzido ou completamente ausente. A falta de um sistema de transporte de elétrons nestas bactérias resulta na redução incompleta do oxigênio até peróxido de hidrogênio. Conjuntamente, estas bactérias não possuem a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio à água. Em consequência, a exposição ao oxigênio causa a acumulação de compostos tóxicos como o ânion superperóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), possivelmente conduzindo a morte da célula. Algumas técnicas têm sido estudadas visando a proteção de culturas probióticas frente ao oxigênio, de maneira que um número adequado de células possa permanecer viável durante toda a vida útil do iogurte. Dentre estas técnicas pode-se citar: uso de linhagens do iogurte capazes de consumir o oxigênio, uso de ascorbato e L-cisteína como removedores de oxigênio do meio, microencapsulação, “stress” adaptativo frente ao oxigênio e o uso de matérias especiais de embalagem (Talwalkar & Kailasapathy, 2003).

Kaneko *et alii* (1994) relataram a existência de um forte estimulante para o desenvolvimento de *Bifidobacterium* produzido por *Propionibacterium* spp., o qual age minimizando os efeitos indesejáveis do oxigênio sobre a cultura de bifidus. *P. freudenreichii* 7025 foi a espécie mais estudada, mas outras espécies também apresentaram a produção do estimulador: *P. freudenreichii* IFO 12391, *P. freudenreichii* ATCC 8262, *P. jensenii* ATCC 4964 e o *P. acidipropionici* ATCC 4875. Este estimulante, codificado de ACNQ, se mostrou bastante específico para o gênero *Bifidobacterium*, não apresentando efeito sobre outras bactérias intestinais. Mori *et alii* (1997) determinaram a sua estrutura química: 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona ($C_{11}H_7NO_4$). Segundo Yamazaki *et alii* (1999), o ACNQ não age como substrato, e sim como mediador da transferência de elétrons nas reações:



Estas reações são catalisadas pelas enzimas NAD(P)H oxidase e NAD(P)H peroxidase. O mesmo papel na transferência de elétron acontece com a forma NADH, onde as enzimas NADH oxidase e NADH peroxidase atuam, mas o estímulo do ACNQ é maior para o sistema com a forma NAD(P)H. A atividade final das enzimas do sistema NADH é um

terço daquelas com o NAD(P)H. Shimamura *et alii* (1992) demonstraram que a sensibilidade de *Bifidobacterium* spp. ao O₂ é inversamente proporcional à sua capacidade de apresentar atividade de NADH oxidase e peroxidase. Essas duas reações enzimáticas conduzem a formação de água ao invés de peróxido de hidrogênio, o qual age inibindo o desenvolvimento da bifidobactéria.

Alem disso, Kaneko *et alii* (1994) também estudaram a influência de ácidos graxos de cadeia curta, através da adição dos seus respectivos sais (acetato, butirato e propionato), e demonstraram que estes (especialmente o propionato), são estimulantes de desenvolvimento para *Bifidobacterium* spp. em meios sintéticos, enquanto inibem o desenvolvimento de outras bactérias como por exemplo as espécies de *Clostridium perfringens* 7028, *Bacterioides vulgatus* JCM 5826^T e *Escherichia coli* O-601. Estes dados sugerem a possibilidade de utilização de *Propionibacterium* spp. e *Bifidobacterium* spp. em desenvolvimento associado na produção de iogurtes, visto o possível aumento da resistência de *Bifidobacterium* ao oxigênio, bem como pela presença de ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido acético e propiônico, provenientes do metabolismo da propioniobactéria.

Bibliografia

- Andrews, G. P. (1986). Formation and occurrence of lactulose in heated milk. Review. *Journal of Dairy Research* 53 (4) 665-680.
- Berrada, N., Lemeland, J. F., Laroche, G., Thouverot, P., Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *Journal of Dairy Science* 74, 409-413.
- Corredig, M., Dalgleish, D. G. (1996). Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, Vol. 29 (1) 49-55.
- Dannenberg, F., Kessler, H.G. (1988). Effect of denaturation of β-lactoglobuline on texture properties of set-style non-fat yogurt. 1. Syneresis and flow properties. *Milchwissenschaft*, 43: 632-635.

- Dave, R.I., Shah, N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
- Gilliland, S.E., Reilly, S.S., Kim, G.B, Kim, H.S. (2002). Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in a yogurt-like product. *Food Microbiology and Safety*, 67 (8) 3091-3095.
- Ghodussi, H.B. and Robinson, R.K. (1996). Enumeration of starter cultures in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, 63, 151-158.
- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trends in Food Science & Technology* 10, 139-157.
- Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., Meguro, S. (1994). Growth stimulator for *Bifidobacterium* produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *Journal of Dairy Science* 77, 393-404.
- Lapierre, L., Undeland, P. and Cox, L. J. (1992). Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science* 75 (5) 1192-1196.
- Laroia, S., Martin, J.H. (1991). Methods for enumerating and Propagating Bifidobacteria. *Cultured Dairy Products Journal*, May, 32-33.
- Law, B. A. (1997). *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk*, 2nd edition. Blackie Academic & Professional, London, 365p.
- Lee, Y. K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L. (1999). *Handbook of Probiotics*, Editora John Wiley & Sons, New York, USA, 211p.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P. A. (1998). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65, 555-567.
- Kaneko, T. (1997). Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Dairy Science* 80, 1959-1964.
- Martinez-Castro, I., Olano, A. (1980). Influence of thermal processing on carbohydrate composition of milk. Formation of epilactose. *Milchwissenschaft* 35 (1) 5-8.
- Mizota, T. (1996). Lactulose as a growth promoting factor for bifidobacterium and its physiological aspects. *Bulletim of the IDF* 313, 43-48.

- Modler, H.W., Villa-Garcia, L. (1993). The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. *Cultured Dairy Products Journal*, February, 4-8.
- Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H., Mottar, J., Bassier, A., Joniau, M., Baert, J. (1989). Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *J. Dairy Science* 72, 2247-2256.
- Onggo & Fleet, G.H. (1993). Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology* 48, 89-92.
- Payne, J. F., Morris, A. E. J. & Beers, P. (1999). Note: Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk. *Journal of Applied Microbiology* 86, 353-358.
- Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., de Man, J.M. (1986). Influence of heat treatment of milk on the flow properties of yogurt. *Journal of Food Science* 51, 1459-1462.
- Rybka, S. & Kailasapathy, K. (1996). Media for the enumeration of Yoghurt Bacteria. *International Dairy Journal* 6, 839-850.
- Rosenthal, I., Bernstein, S. (1998). The survival of a commercial culture of bifidobactéria in milk products. *Milchwissenschaft* 53 (8), 441-443.
- Salminen, S., Wright, A., Decker, M., (1993). *Lactic Acid Bacteria*. Editora Marcell Dekker Inc., New York, USA, 442p.
- Salminen, S. (1998). Probiotics: state of the art in the efficacy, mechanisms and safety. Proceedings of 25th International Dairy Congress, 21-24, September, Aarhus, Denmark.
- Samona, A., Robinson, R.K., Marakis, S. (1996). Acid production by bifidobactéria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13, 275-280.
- Shah, D. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.
- Shihata, A., Shah, N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10, 401-408.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T., Tomita, M. (1992). Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species, *Journal of Dairy Science*, 75: 3296-3306.

- Sondini, I., Remeuf, F., Haddad, S., Corrieu, G. (2004). The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44: 113-137.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2003). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 117-124.
- Tamura, Y., Mizota, T., Shimamura, S., Tomita, M. (1993). Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. *Bulletin of the International Dairy Federation* 289, 43-53.
- Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., Tanaka, T. (1998). Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (8) 1522-1527.
- Van der Wiel-Korstanje, J. A. A. & Winkler, K. C. (1970). Medium for differential count of the anaerobic flora in human feces. *Applied Microbiology*, July, 168-169.
- Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal* 9 (8) 497-505.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T. (1999). Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for *Bifidobacterium*, as an electron transfer mediator for NA(P)⁺ regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1428, 241-250.

CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A CONTAGEM DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 NA PRESENÇA DAS BACTÉRIAS DO IOGURTE

Artigo será submetido à publicação no “Brazilian Journal of Microbiology”.

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A CONTAGEM DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 NA PRESENÇA DAS BACTÉRIAS DO IOGURTE

Fachin, L.; Moriya, J.; Gandara, A. L. N.; Viotto, W. H.¹

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos, CP 6121, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

RESUMO

Tem-se dado muita atenção a utilização de *Bifidobacterium* spp. em iogurtes devido às suas excelentes propriedades terapêuticas e nutricionais. Contudo, para que este produto possa apresentar tais propriedades, é necessário que o número mínimo de células viáveis de *Bifidobacterium* presente no iogurte no momento do consumo seja de 10⁶ UFC/g de produto. Vários estudos têm mostrado um número menor do que o recomendado em produtos comerciais durante a estocagem do iogurte. Entretanto, para a correta avaliação do número de células viáveis de *Bifidobacterium* durante a estocagem, é necessário a padronização de um método de contagem confiável quando este estiver em presença das culturas do iogurte. Este trabalho avaliou o uso dos ágar M-MRS (“Maltose-de Man Rogosa Sharpe”), MRS-NNLP (“de Man Rogosa Sharpe- Nalidixic acid, Neomycin sulfate, Lithium chloride, Paromomycin sulfate”) e RCPB pH5 (“Reinforced Clostridial Prussian Blue at pH5”), visando a contagem do número de células de *B. animalis* Bb 12 na presença das bactérias do iogurte. O ágar M-MRS não foi seletivo, apresentando crescimento de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*. Apesar da boa seletividade para *Bifidobacterium*, o ágar MRS-NNLP apresentou uma leve redução no número de células, quando comparado ao ágar padrão MRS. O ágar RCPB pH5 apresentou crescimento diferencial de *B. animalis* Bb 12 em relação às bactérias do iogurte e uma recuperação de células igual ao do padrão MRS.

Palavras-chave: contagem, *Bifidobacterium*, bactérias lácticas, iogurte.

INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como “microrganismos viáveis que apresentam um efeito benéfico na saúde do hospedeiro após a ingestão, pelo melhoramento de sua microbiota” (5). Bactérias cientificamente comprovadas como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus* (NCFB 1478), *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus* GG (ATCC 53103), *Bifidobacterium animalis* Bb 12, *Lactobacillus johnsonii* Lj 1 e *Lactobacillus reuteri* (13). Para que o iogurte exerça funções terapêuticas no organismo, a concentração de bactérias probióticas exigida é de 10^6 UFC/g de produto (5). Entretanto, as condições de fabricação do iogurte não são ótimas para a sobrevivência de bifidobactérias, resultando em uma baixa viabilidade destes microrganismos em produtos comerciais. Além disso, a falta de um método padrão para a contagem destes microrganismos na presença das culturas do iogurte torna muito difícil o melhoramento da tecnologia de fabricação destes produtos. Conseqüentemente, a padronização de um método para contagem seletiva ou diferencial de *Bifidobacterium*, quando em presença das culturas do iogurte, torna-se extremamente importante. Vários métodos para contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurte baseados em culturas puras têm sido propostos (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14).

O ágar seletivo Maltose-de Man Rogosa Sharpe (M-MRS) desenvolvido para o isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de iogurtes (10) permite o desenvolvimento de linhagens de *Bifidobacterium* fermentadoras de maltose. Dave & Shah (3, 4) usaram com sucesso este ágar para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* spp. em iogurtes.

Van der Wiel-Korstanje & Winkler (12) usaram o corante Azul da China no ágar CBRCA (Azul da China-Sangue-RCA) para a contagem diferencial da microbiota anaeróbia predominante em fezes humanas, estabelecendo uma concentração de 0.03% para o uso do corante. Posteriormente, Onggo & Fleet (10) propuseram o ágar RCPB para o isolamento e diferenciação de *Bifidobacterium*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em iogurtes. Estas espécies foram facilmente diferenciadas neste ágar devido às características distintas de suas colônias por ação do corante, formando halos ao redor de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Posteriormente, Rybka & Kailasapathy (11) propuseram o ajuste do pH do ágar para 5 (RCPB pH5) visando o não desenvolvimento da microbiota não láctica do leite.

Em 1991, Laroia & Martin (8) traduziram da língua japonesa para o inglês o trabalho de Teraguchi, Uehara, Ogasa e Mitsuoka (1978), que indicava o uso do ágar Glicose-Sangue-

Fígado associado aos inibidores ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paromomicina. Em 1993, Modler & Villa-Garcia (9) apontaram que a formulação descrita por Laroia & Martin dois anos antes estava incompleta, pois o componente sangue desfibrinado (50 mL de sangue de cavalo ou ovelha/L) foi retirado inadvertidamente da formulação. Posteriormente, Dave & Shah (3, 4) propuseram os antibióticos NNLP (ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paromomicina) em conjunto com o ágar MRS para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurtes.

De acordo com Vinderola & Reinheimer (13), poucos métodos são eficientes para uma contagem correta das culturas do iogurte contendo bifidobactéria, causando dificuldades no controle de qualidade. Apesar do grande número de métodos propostos na literatura, nem todos apresentam bons resultados para a contagem de *Bifidobacterium* na presença de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (14). Para assegurar a qualidade dos produtos probióticos é necessário haver um método de rotina seguro e confiável para quantificar células viáveis de *Bifidobacterium* na presença das culturas do iogurte. O objetivo deste trabalho foi avaliar os ágars RCPB pH5, M-MRS e MRS-NNLP na contagem de *Bifidobacteriu*, em presença das culturas lácticas do iogurte.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas

Foram utilizadas culturas puras liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 (Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda), *Streptococcus thermophilus* A (VisbyVac, Série 1000) e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (LB341 TEXEL- Rhodia).

Preparação e manutenção dos inóculos

O inóculo de *B. animalis* Bb 12 foi preparado como segue (para 100 mL de inóculo):

Passo 1) *Leite com extrato de levedura*: leite em pó desnatado marca Molico (12,5 gramas) foi adicionado de extrato de levedura (1 grama) e diluído em 85 mL de água Milli-

Q, sendo posteriormente submetido à esterilização à 115°C por 10 minutos (Autoclave Universal Ortossíntese);

Passo 2) 1 grama de glicose e 0,05 g de L-cisteína foram diluídas em 15 mL de água Milli-Q e submetida à esterilização por filtração em membrana com poro de 0,45µm de diâmetro (Millipore®).

Passo 3) o leite esterilizado com extrato de levedura (1) foi então misturado à solução de L-cisteína e glicose (2) em fluxo laminar.

O inóculo das culturas do iogurte foi preparado com leite em pó desnatado reconstituído (11% de sólidos) e esterilizado à 115°C por 10 minutos.

As culturas do iogurte e *B. animalis* Bb 12 foram então ativadas separadamente a 37°C por 18 horas e então resfriadas em banho de gelo.

Ágar MRS (de Man, Rogosa, Sharpe)

Ágar MRS (Oxoid) foi esterilizado à 121°C por 15 minutos e usado como meio padrão para *B. animalis* Bb 12 quando em cultura pura.

Ágar RCPB pH5 (Reinforced Clostridial Prussian Blue at pH5)

O ágar RCA (Oxoid) comercial foi suplementado com 1% de glicose e ajustado a pH 5 de acordo com Rybka e Kailasapathy (11). O ágar RCA e o corante Azul da Prússia (IRON III Ferrocyanide, Sigma-Aldrich) foram esterilizados separadamente à 115°C por 15 minutos, resfriados à 50°C e misturados assepticamente. O corante Azul da Prússia foi adicionado ao ágar numa concentração final de 0,03%.

Ágar Maltose-MRS (Maltose - de Man, Rogosa, Sharpe)

Todos os ingredientes para a composição normal do ágar MRS, com exceção do ágar e da glicose, foram suspensos em 1 L de água destilada e o pH foi ajustado para 6,6. Após o ajuste do pH, foram adicionados 10g de ágar e a mistura foi esterilizada em autoclave à 121°C por 15 minutos. Para a preparação da solução de maltose, 25g de maltose foram

dissolvidos em 50mL de água destilada. A solução foi esterilizada em filtro 0,45 µm (Millipore®). 4 mL da solução de maltose foram adicionados em 100mL de ágar base à temperatura de aproximadamente 50°C. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada, sem agitação excessiva, para evitar incorporação de ar.

Ágar MRS-NNLP

O ágar MRS (Oxoid), obtido comercialmente, foi esterilizado à 121°C por 15 minutos. Os agentes inibidores (cloreto de lítio 3 mg/mL, ácido nalidíxico 15 µg/mL, sulfato de neomicina 100 µg/mL e sulfato de paromomicina 200µg/mL) e L-cisteína (0,5 g/mL) foram dissolvidos em água destilada (aproximadamente 4 % do volume total do ágar) e esterilizados por filtração à vácuo, em membrana com poro de 0,42 µm de diâmetro.

Tratamentos

Após o resfriamento dos inóculos em banho de gelo os seguintes testes foram realizados:

A) Um cultivo de *B. animalis* Bb 12 foi produzido após incubação de 1% do inóculo ativado em leite reconstituído (12% de sólidos adicionado de 1% de extrato de levedura) a 37°C por 4 horas e 40 minutos;

B) Um iogurte padrão foi produzido com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* com o uso de 1% dos inóculos ativados após uma incubação em leite a 37°C por 4 horas e 40 minutos;

C) mistura do cultivo de *B. animalis* Bb 12 (A) com o iogurte padrão (B) inoculados diretamente na superfície dos meios (M-MRS, MRS-NNLP ou RCPB pH5);

D) iogurte probiótico produzido com *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* após incubação em leite a 37°C por 4 horas e 40 minutos.

O tempo de 40 horas e 40 minutos foi o tempo no qual o iogurte probiótico (D) atingiu o pH 4,6. Para todos os experimentos, foi usado o mesmo tempo de incubação. Para os testes B,C e D, a contagem foi realizada nos ágars M-MRS, MRS-NNLP e RCPB pH5, pois o ágar MRS não é seletivo ou diferencial. Para a contagem do teste A, a contagem foi realizada no ágar MRS (usado como padrão para avaliação da capacidade de recuperação) e nos meios M-MRS, MRS-NNLP e RCPB pH5.

Contagem

Alíquotas de 1,0 mL do cultivo de *B.animalis* Bb 12 (A), do iogurte padrão (B) e do iogurte probiótico (D) foram decimalmente diluídos em água peptonada (0,1%) até 10^{-6} . Para o plaqueamento, 0,1 mL das diluições de 10^{-4} à 10^{-6} foi semeado na superfície dos ágars de culturas avaliados. Para a mistura do item C, alíquotas de 0,05 mL das diluições de 10^{-4} à 10^{-6} de *B.animalis* Bb 12 e do iogurte padrão foram semeadas na superfície dos ágars. As placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas em jarras de anaerobiose (Merck), utilizando o gerador de anaerobiose Anaerocult A[®] (Merck). Após este período, os meios foram analisados quanto ao crescimento diferenciado ou crescimento seletivo e a capacidade de recuperação celular de *B.animalis* Bb 12 foi comparada com a contagem obtida com o ágar padrão MRS para o caso do cultivo puro de *B. animalis* Bb 12 (A). Os testes foram feitos em triplicata.

Análise estatística

O teste de Tukey foi aplicado para verificar diferença na recuperação do microrganismo nos ágars estudados em relação ao ágar padrão MRS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ágar M-MRS

Este meio de cultura não apresentou seletividade para *B. animalis* Bb 12, tendo sido verificada a presença de *L. bulgaricus* com uma alta contagem de células (4.8×10^6 UFC/mL). Rybka & Kailasapathy (11) relataram que algumas linhagens de *L. bulgaricus* podem fermentar a maltose e, além disso, a presença de outros substratos no meio, como o extrato de carne, pode favorecer o desenvolvimento desta espécie. Por outro lado, Dave & Shah (3) observaram que em ágar M-MRS não houve crescimento das bactérias do iogurte e houve uma excelente recuperação de células de *Bifidobacterium*, porém os autores deste trabalho usaram outras linhagens de *Bifidobacterium* (*B .bifidum* 1900 e 1901, *B .longum*

1941 e 20097, *B. adolescentis* 1920, *B. pseudolongum* 20099, *B. breve* 1930 e *B. infantis* 1912).

Ágar MRS-NNLP

Tabela 1. Contagem de *B. animalis* Bb 12 em ágar MRS-NNLP e no ágar padrão MRS.

	Contagem (UFC/mL)	
	Ágar MRS	Ágar MRS-NNLP
A	2,4 x 10 ⁶	1,1 x 10 ⁶ *
B	nd	<10 ⁴
C	nd	7,5 x.10 ⁵
D	nd	2,2 x 10 ⁶

* Média difere significativamente (p < 0,05) da contagem padrão em ágar MRS.

A – cultivo de *B. animalis* Bb 12;

B – iogurte padrão *S. thermophilus* + *L.bulgaricus*;

C – mistura de *B. animalis* Bb 12 com o iogurte padrão *S. thermophilus* + *L.bulgaricus* plaqueados diretamente na superfície do meio;

D – iogurte probiótico com *B. animalis* Bb 12 + *S. thermophilus* + *L.bulgaricus*.

nd - não determinado devido ao ágar MRS não ser seletivo ou diferencial para *B. animalis* Bb 12;

A Tabela 1 mostra a contagem de 1,1 x 10⁶ UFC/mL para o cultivo puro de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 em ágar MRS-NNLP. Apesar da diferença ser bastante pequena, houve uma menor contagem de *B. animalis* Bb 12 no ágar MRS-NNLP quando comparado ao ágar padrão MRS (2,4 x 10⁶ UFC/mL).

O ágar MRS-NNLP apresentou uma boa seletividade para *Bifidobacterium*, pois *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (iogurte padrão) não se desenvolveram neste ágar. Também não houve desenvolvimento das culturas do iogurte na mistura (C) e no iogurte probiótico (D). *B. animalis* Bb 12 se desenvolveu produzindo colônias brancas de aproximadamente 1 mm de diâmetro quando em cultura pura (A) e no iogurte probiótico (D). Vinderola & Reinheimer (13) observou que *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram capazes de se desenvolver em ágar MRS-NNLP apesar do baixo número. Dave & Shah (3) obtiveram um

bom desempenho do ágar MRS-NNLP para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurte e usaram este ágar para a contagem de *Bifidobacterium* em um trabalho posterior (4).

Ágar RCPB pH5

Tabela 2. Contagem de *S.thermophilus*, *L.bulgaricus* e *B. animalis* linhagem Bb 12 em ágar RCPB pH5.

	Contagem (UFC/mL)	
	Ágar MRS	Ágar RCPB pH5
A	3,6 x 10 ⁶	3,8 x 10 ⁶ *
B	nd	3,4 x.10 ⁶ Lb
		2,5 x 10 ⁶ St
C	nd	3,4 x 10 ⁶ Bb 12
		1,1 x.10 ⁶ Lb
D	nd	1,9. x 10 ⁷ Bb 12
		5,0 x 10 ⁷ Lb

* Media não difere significativamente (p < 0,05) da contagem padrão em ágar MRS.

A – cultivo de *B. animalis* Bb 12;

B – iogurte padrão *S. thermophilus* + *L.bulgaricus*;

C – mistura de *B. animalis* Bb 12 com o iogurte padrão *S. thermophilus* + *L.bulgaricus* plaqueados diretamente na superfície do meio;

D – iogurte probiótico com *B. animalis* Bb 12 + *S. thermophilus* + *L.bulgaricus*.

Bb 12= *Bifidobacterium animalis* Bb 12; Lb= *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*;

St= *Streptococcus thermophilus*.

nd - não determinado devido ao ágar MRS não ser seletivo ou diferencial para *B. animalis* Bb 12;

A contagem de *B.animalis* Bb 12 em ágar RCPB pH5 foi similar à contagem em ágar padrão MRS (Tabela 2). A contagem da cultura pura de *B.animalis* Bb 12 foi 3,8 x 10⁶UFC/mL e na mistura foi 3,4 x 10⁶ UFC/mL, valores muito próximos ao obtido pelo

padrão MRS que foi $3,6 \cdot 10^6$ UFC/mL. No iogurte probiótico, a contagem de *B. animalis* foi $1,9 \times 10^7$ UFC/mL. Houve crescimento de *S. thermophilus* somente quando provindo da inoculação do iogurte padrão, cuja contagem foi $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. *L. bulgaricus* se desenvolveu consideravelmente em todas as situações, mas suas colônias eram bastante distinguíveis de *B. animalis* Bb 12 pela presença do halo azul (Figura 1).

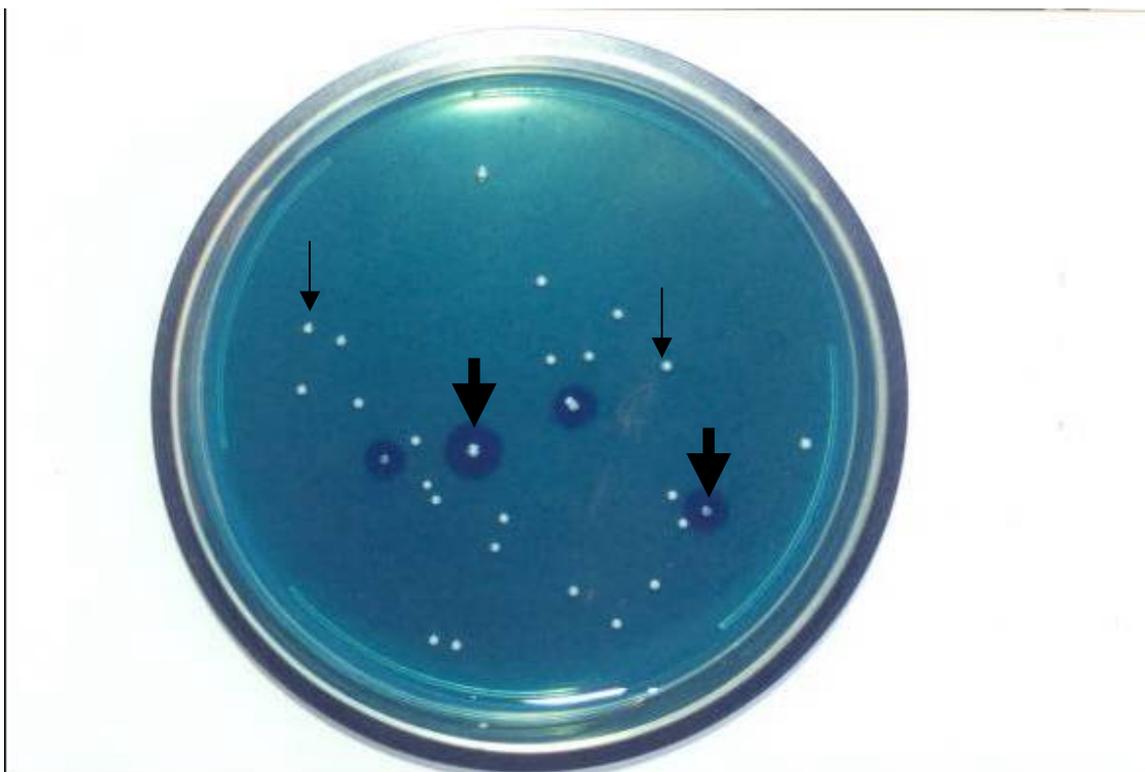


Figura 1. Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 e do iogurte padrão inoculados diretamente na superfície do ágar RCPB pH5. Incubação em anaerobiose por 72 horas a 37°C. Setas largas – *L. bulgaricus*; Setas estreitas – *B. animalis* Bb 12.

B. animalis Bb 12 se desenvolveu produzindo colônias brancas, sem halo azul, como descrito na literatura (11). Porém, o diâmetro da colônia se apresentou menor do que as colônias descritas por Rybka & Kailasapathy (11), de 2 mm de diâmetro. Em nosso trabalho, as colônias de *B. animalis* Bb 12 apresentaram um diâmetro de aproximadamente 1 mm. No iogurte padrão, *L. bulgaricus* produziu colônias com halo azul e centro branco, com diâmetro variando de 1 a 2 mm. Rybka & Kailasapathy (11) observaram que o ajuste do pH do ágar para 5 impediu o crescimento de *S. thermophilus*. Entretanto, em nossos experimentos, quando apenas as culturas do iogurte foram inoculadas no ágar, houve

desenvolvimento de *S. thermophilus* com a formação de colônias extremamente pequenas, com leve halo azul e centro branco. Por outro lado, não houve desenvolvimento de *S. thermophilus* quando se usou a mistura da cultura pura de *B. animalis* Bb 12 com a cultura mista de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, inoculados diretamente na superfície do ágar (Figura 1). Na Figura 1 podem ser visualizadas claramente as colônias de *B. animalis* Bb 12 em branco e as colônias de *L. bulgaricus* circundadas pelo halo azul.

O fator responsável por essa diferenciação ainda não foi completamente elucidado. Onggo & Fleet (10) explicam a formação do halo azul em função de um possível metabolismo preferencial do corante pelas culturas do iogurte, com a produção das zonas azuis ao redor destas. Outra possibilidade sugerida seria a mudança no potencial de óxido redução do ágar causada por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Em nossos estudos, foi percebido que a formação do halo azul só ocorreu após a exposição da superfície da placa ao ar por alguns minutos e às vezes horas, o que aponta para a segunda hipótese como sendo a mais provável. Outro fator que parece ter influência no surgimento e intensidade das zonas azuis é a maior acidificação das culturas de *L. bulgaricus* sobre o ágar. A adição de HCl 6 N com o auxílio de uma pipeta de Pasteur sobre o ágar RCPB pH5 aumentou consideravelmente a tonalidade azul do ágar, mostrando que uma maior acidificação tende a formar zonas com um azul mais intenso. De forma contrária, a adição de hidróxido de sódio concentrado formou uma zona completamente transparente sobre o ágar, fazendo com que a cor azul claro, característica deste meio, desaparecesse. A reação de formação do Azul da Prússia é conhecida e bastante usada em medicina para a determinação de ferro em casos de anemia.

O ágar RCPB pH5 se apresentou bastante adequado para a contagem de *Bifidobacterium* na presença das bactérias do iogurte, não só pelo desenvolvimento diferencial entre as colônias, como pela excelente recuperação de suas células.

CONCLUSÃO

Dos meios de cultivo estudados, o ágar RCPB pH5 é o mais indicado para a contagem de *Bifidobacterium* na presença das bactérias do iogurte, por apresentar facilidade de preparação e boa recuperação de *Bifidobacterium*.

Referência Bibliográfica

1. Chateris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 35 (1). 1-27, Mar, 1997.
2. Clark, P.A.; Cotton, L.N.; Martin, J.H. Selection of bifidobactéria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: Tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cultured Dairy Products Journal* 28, 11-14, 1993.
3. Dave, R.I.; Shah, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Journal of Dairy Science* 79, 1529-1536, 1996.
4. Dave, R.I.; Shah, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*. 1997.
5. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. *Trends in Food Science & Technology* 139-157, 1999.
6. Hartemink, R.; Kok, B.J.; Ween, G.H.; Rombouts, F.M. Raffinose-*Bifidobacterium* (RB) Ágar, a new selective medium for Bifidobactéria. *Journal of Microbiological Methods* 27 (1) 33-43, 1996.
7. Lankaputhra, W.E.V.; Shah, N.P.; Britz, M.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Food Australia*. 48(3) 113-118, mar. 1996.
8. Laroia, S.; Martin, J.H. Methods for enumerating and propagating *Bifidobactéria*. *Cultured Dairy Products Journal* May, 1991.
9. Modler, H.W.; Villa-Garcia, L. The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. *Cultured Dairy Products Journal*, February, 4-8, 1993.
10. Onggo, I.; Fleet, G.H. Media for the isolation and enumeration of lactic acid bacteria from yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. Nov. 1993.

11. Rybka, S.; Kailasapathy, K. Media for the enumeration of yoghurt Bacteria. *Int. Dairy Journal* 6, 839-850, 1996.
12. Van der Wiel-Korstanje, J. A. A.; Winkler, K. C. Medium for differential count of the anaerobic flora in human feces. *Applied Microbiology* July, 168-169, 1970.
13. Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal* 9 (8) 497-505,1999.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA A CONTAGEM DE *B. animalis* Bb 12 EM IOGURTE APÓS A ESTOCAGEM REFRIGERADA

Este trabalho será submetido à publicação na revista “Milchwissenschaft”.

Avaliação de meios de cultura para a contagem de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 em iogurte após estocagem refrigerada

Por L. FACHIN, A. L. N. GANDARA & W. H. VIOTTO

Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, C.P. 6121, São Paulo, Brasil

O ágar RCPB pH5 tem sido apontado como uma boa alternativa para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurte. Entretanto, existe uma grande dificuldade para a contagem deste microrganismo em iogurtes após a estocagem refrigerada, em virtude do tamanho das colônias, que se apresentam muito pequenas e só podem ser enumeradas com o auxílio de um estereoscópio. Outro ágar, MRS-LP, tem sido recomendado para a contagem de *Bifidobacterium* na presença de bactérias do iogurte. Este trabalho avaliou a suplementação do ágar RCPB pH5 com extrato de fígado dessecado e com os sais KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, visando melhorar a diferenciação das colônias de *Bifidobacterium* em iogurte após estocagem refrigerada, bem como também avaliou a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurte com o ágar MRS-LP. O ágar MRS-LP apresentou a mesma recuperação de células do ágar RCPB pH5 não fortificado, sendo uma boa opção para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurte. A adição do extrato de fígado desidratado no ágar RCPB pH5 (RCPB pH5-Liver) possibilitou aumentar significativamente o tamanho das colônias de *Bifidobacterium* após a estocagem refrigerada, tornando a diferenciação das colônias bastante fácil e confiável. A adição deste extrato também resultou em uma pequena inibição no desenvolvimento de *L. bulgaricus*. A adição dos sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) não teve influência sobre o desempenho do ágar RCPB pH5.

1. Introdução

Atualmente, muita atenção tem sido dada ao uso de iogurtes probióticos (1). Para que o produto exerça funções terapêuticas no organismo humano, a concentração de culturas probióticas deve ser de no mínimo 10^6 UFC/g no momento do consumo do produto (4). Entretanto, as condições de fabricação do iogurte estão longe de serem favoráveis para a sobrevivência de *Bifidobacterium* e isso tem resultado em um número de células viáveis, menor do que o recomendado durante a estocagem refrigerada do iogurte. Além disso, a falta de um método padrão para a contagem de *Bifidobacterium* na presença das bactérias do iogurte reduz a confiabilidade na tecnologia de produção destes iogurtes. Poucos métodos têm sido eficientes para uma contagem correta de *Bifidobacterium* na presença das culturas do iogurte, causando dificuldades no controle de qualidade (10).

Onggo & Fleet (7) usaram o ágar RCPB para o isolamento e diferenciação de *Bifidobacterium* spp., *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* em iogurtes. Rybka & Kailasapath (9) propuseram o ajuste do pH do ágar para 5, visando evitar o desenvolvimento da biota não láctica do leite. Ghodussi & Robinson (3) obtiveram um excelente resultado com o ágar RCPB para a contagem diferencial de *Bifidobacterium* em iogurtes. Já Payne, Morris & Beers (8) não obtiveram uma boa diferenciação entre as colônias de *Bifidobacterium* e as culturas do iogurte com este ágar, não sendo possível a contagem diferencial de *Bifidobacterium*. Em um trabalho anterior, encontramos que o ágar RCPB pH5 apresentou uma excelente diferenciação e recuperação de *Bifidobacterium* em relação as culturas do iogurte quando a contagem foi feita logo após a fermentação do iogurte e também quando foram inoculadas na superfície do ágar culturas de cada microrganismo crescidas separadamente. Entretanto, quando este ágar foi usado para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurtes durante a estocagem refrigerada, as colônias se apresentaram com um diâmetro extremamente pequeno, e só puderam ser visualizadas com o uso de um estereoscópio com um aumento de 15 a 20 vezes. Consequentemente, a capacidade da bifidobactéria em se desenvolver no ágar RCPB pH5 numa condição de maior “stress celular”, como ocorre na estocagem refrigerada, se mostrou bastante inferior, de forma que este ágar não se mostrou uma boa opção para a contagem de *Bifidobacterium* nesta condição.

Lapierre, Undeland & Cox (5) propuseram o uso de cloreto de lítio e propionato de sódio como inibidores das bactérias do iogurte visando a contagem de *Bifidobacterium* em produtos de leite fermentado associados ao ágar Lactose-cistína-fígado. Vinderola & Reinheimer (10) usaram esses inibidores para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurtes associados ao ágar MRS.

Baseado nas fortificações propostas por Teraguchi, Uehara, Ogasa e Mitsuoka (1978) em seu trabalho para contagem seletiva de *Bifidobacterium*, que foi descrito em Laroia & Martin (6), o objetivo deste trabalho foi melhorar a diferenciação do ágar RCPB pH5 e também avaliar o uso do meio MRS-LP para a contagem de *Bifidobacterium* em iogurte, após a estocagem refrigerada.

2. Material e métodos

2.1. Culturas

Foram utilizadas culturas puras liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 (Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda), *Streptococcus thermophilus* A (Wiesby Starter Cultures & Media) e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 18 (Wiesby Starter Cultures & Media) e *S. thermophilus* TA 040 e *L. bulgaricus* LB 340 cedidas pela Rhodia Food.

2.2. Ativação do inoculo

O inóculo para *B. animalis* Bb 12 foi preparado em leite em pó reconstituído a 12% de sólidos, suplementado de 1% de extrato de levedura e esterilizado a 115°C por 10 minutos. A incubação da cultura liofilizada de *B. animalis* Bb 12 foi feita a 37°C por 6 horas. O inóculo das culturas do iogurte foi preparado com leite em pó desnatado reconstituído (11% de sólidos) e submetido a esterilização em autoclave a 115°C por 10 minutos. As culturas liofilizadas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram ativadas à 37°C até coagulação do leite (6-7 horas para *S. thermophilus* e 14-15 horas para *L. bulgaricus*).

2.3. Avaliação do ágar RCPB pH5, MRS-LP e do ágar RCPB pH5 fortificado durante a estocagem refrigerada do iogurte

Os meios foram testados para:

A) cultivos de *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* TA 040 e *L. bulgaricus* LB 340, ativados separadamente em leite (conforme descrito no item 2.2), foram plaqueadas nos meios RCPB pH5, MRS-LP e RCPB pH5 fortificado com sais e infusão de fígado desidratado. Os cultivos também foram plaqueados em ágar MRS, usado como padrão.

B) iogurte probiótico produzido com *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* TA 040 e *L. bulgaricus* LB 340 após 30 dias de estocagem a 7°C.

Para o teste A, após ativação das culturas, cada inóculo foi decimalmente diluído em água peptonada a 0,1% até 10^{-6} , sendo que uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi plaqueada no ágar em estudo através da técnica de semeadura em superfície. Foram plaqueadas diluições de 10^{-4} a 10^{-6} para RCPB pH5 e de 10^{-1} até 10^{-6} para o ágar seletivo MRS-LP e RCPB pH5 fortificado. As placas foram mantidas à 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose (Merck), utilizando-se como gerador de anaerobiose Anaerogen® (Oxoid). Após a incubação, os meios foram analisados quanto ao desenvolvimento diferenciado ou seletivo e quanto à recuperação celular de *B. animalis* Bb 12, comparando com a contagem obtida no ágar padrão MRS no caso das culturas puras (item A) e comparando-se ao ágar padrão RCPB pH5 no caso do iogurte probiótico (item B).

A diferença entre as médias foi analisada usando o teste t pareado, com o auxílio do Software Statistica for Windows.

2.4. Efeito da adição dos sais na fortificação do ágar RCPB pH5

Com objetivo de avaliar o efeito da adição dos sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) no desempenho do ágar RCPB pH5 fortificado, o seguinte experimento foi delineado: um iogurte probiótico foi produzido com *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* A e *L. bulgaricus* 18. A contagem de *B. animalis* Bb 12 foi realizada no ágar RCPB pH5 fortificado com os sais e com a infusão de fígado desidratado e comparado ao

ágar RCPBpH 5 fortificado somente com a infusão de fígado desidratado. A contagem foi feita após 30 dias da estocagem refrigerada do iogurte.

O experimento foi realizado em duplicata e a diferença entre as médias foi analisada usando o teste t pareado com o auxílio do Software Statistica for Windows.

2.5. Meios de Cultura

2.5.1. Ágar MRS

Ágar MRS (DIFCO ou MERCK) foi usado como ágar padrão para *B. animalis* Bb 12 quando em cultura pura. As placas foram mantidas à 37°C por 72 horas em condições anaeróbias.

2.5.2. Ágar RCPB pH5

O ágar RCA (OXOID) e o corante Azul da Prússia (SIGMA-ALDRICH) foram esterilizados separadamente a 121°C por 15 minutos, sendo resfriados a 50°C e misturados assepticamente. O peso equivalente a 0,03% de corante Azul da Prússia no ágar final foi dissolvido em água destilada (12% do volume do ágar), sendo que o restante do volume de água (88%) usado para dissolver os ingredientes do ágar RCA comercial, sendo este posteriormente ajustado ao pH 5. A solução de corante não foi ajustada ao pH 5.

2.5.3. Ágar MRS-LP

O ágar MRS (OXOID ou MERCK) foi dissolvido conforme instruções do fabricante em 93% do volume de água do ágar e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Os agentes inibidores (cloreto de lítio a 0.2 g/L e propionato de sódio 0.3 g/L) foram dissolvidos em 7% do volume de água do ágar e esta solução foi esterilizada em filtro de 0,22µm. A solução de antibióticos filtrada foi cuidadosamente misturada em câmara de fluxo laminar a 50°C ao ágar MRS, evitando a incorporação de ar.

2.5.4. Ágar RCPB pH5 fortificado

O ágar RCPB pH5 foi fortificado com os seguintes sais: KH_2PO_4 (1 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L) e com infusão de fígado desidratado (150 mL/L). A infusão de fígado foi preparada segundo Laroia & Martin (5) e esterilizada separadamente a 121°C/15 minutos (tanto o precipitado quanto o sobrenadante da extração foram esterilizados no mesmo frasco). Para a adição posterior no ágar, o extrato esterilizado foi deixado a decantar à temperatura ambiente, e o sobrenadante (150 mL/L) foi adicionado ao ágar RCA já adicionado dos sais e da água em capela de fluxo laminar. O pH do ágar RCA com os sais, o extrato de fígado e a água já adicionados foi ajustado para 5. O volume de água usado para a dissolução do corante Azul da Prússia foi 12% do volume total do ágar. Por exemplo: para a produção de 300 mL de RCPB pH5 fortificado, os sais e o ágar RCA (pesado conforme orientação do fabricante) foram dissolvidos em 219 mL de água Milli-Q (Milipore[®]) e misturados com a infusão de fígado (45 mL) sendo posteriormente ajustados para pH 5 e esterilizados a 121°C/15 minutos. Simultaneamente, o corante Azul da Prússia (0,03 %) foi dissolvido em 36 mL de água e também esterilizado a 121°C/15 minutos. A mistura do corante e do ágar foi feita em fluxo laminar como no ágar RCPB pH5. Em um segundo experimento, o ágar RCPB pH5 foi fortificado apenas com a adição do extrato de fígado sem a adição dos sais mencionados (RCPB pH5-Liver).

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação do ágar RCPB pH5, MRS-LP e do ágar RCPB pH5 fortificado durante a estocagem refrigerada do iogurte

A recuperação de *B. animalis* Bb 12 em cada meio pode ser vista através dos dados da Tabela 1. A contagem de *B. animalis* Bb 12 em cultura pura nos meios estudados não foi significativamente diferente da contagem em ágar padrão MRS ($p < 0,05$). *S. thermophilus* foi totalmente inibido em ágar RCPB pH5 e em ágar RCPB pH5 fortificado quando em cultura pura (linha B), devido ao baixo pH do ágar, como descrito por Rybka & Kailasapathy (1996), e foi parcialmente inibido em ágar MRS-LP. Apesar de não termos

Tabela 1- Contagem (log UFC/mL) de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. animalis* Bb 12 nos diversos meios estudados após 30 dias de estocagem refrigerada.

Culturas	RCPB pH5	MRS-LP	RCPB pH5 fortificado
A ^a	8,54*	9,49*	9,53*
B ^a	sc	5,19	sc
C ^a	8,55	7,60	6,50
Iogurte ^b	6,40**	6,41**	6,60

^a A - contagem de *B. animalis* Bb 12 em cultura pura, B – contagem de *S. thermophilus* TA 040 em cultura pura e C – contagem de *L. bulgaricus* LB 340 em cultura pura. As contagens padrões para *B. animalis* Bb 12 feitas em meio MRS foram de 8,54, 9,49 e 9,53 log UFC/mL, quando os experimentos foram feitos com: RCPB pH5, MRS-LP e RCPB pH5 fortificado, respectivamente.

^bContagem de *B. animalis* Bb 12 em iogurte após 30 dias de estocagem.

* Contagem não difere significativamente da contagem no ágar controle MRS a $p < 0,05$.

** Contagem difere significativamente do ágar RCPB pH5 fortificado a $p < 0,05$.

sc – sem desenvolvimento.

contado o número de células de *S. thermophilus* em ágar padrão MRS, é sabido que este microrganismo geralmente se desenvolve até 8-9 log UFC/mL nas condições usadas neste estudo. Nos capítulos IV e V, nós verificamos que *S. thermophilus* se desenvolveu até em torno de 5×10^8 UFC/mL em iogurte. A inibição de *S. thermophilus* no ágar MRS-LP pode ser comprovada pela baixa contagem obtida (5,19 log UFC/mL). O ágar RCPB pH5 pode ser usado para a contagem diferencial de *L. bulgaricus* em iogurte (9), como pode ser visto na Tabela 1, que mostra a boa recuperação de células deste microrganismo neste ágar (8,55 log UFC/mL) quando em cultura pura. O ágar MRS-LP apresentou uma redução de aproximadamente 1 log na contagem de *L. bulgaricus* LB 340, quando comparado a recuperação deste microrganismo no ágar RCPB pH5 (que não é inibidor). Apesar deste nível de redução ter sido satisfatório para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* neste estudo, é bastante conhecido que a sensibilidade aos antibióticos é dependente da cepa do microrganismo usado. Uma redução de apenas 1 ciclo logarítmico no número de células de *Lactobacillus* torna o uso do ágar MRS-LP bastante arriscado, uma vez que este ágar é seletivo e não diferencial. Como exemplo, caso seja usada uma cepa de *L. bulgaricus* com

uma maior resistência aos antibióticos deste ágar, as colônias de *Lactobacillus* poderão ser facilmente confundidas com as colônias da bifidobactéria. Surpreendentemente, o ágar RCPB pH5 fortificado também apresentou uma redução na contagem de *L. bulgaricus* de cerca de 2 ciclos logarítmicos quando este foi inoculado em cultura pura (6,50 log UFC/mL) e comparado ao ágar RCPB pH5.

As colônias de *B. animalis* Bb 12 se desenvolveram tendo um diâmetro médio em torno de 1 mm no ágar fortificado após a estocagem refrigerada do iogurte. As colônias de *Bifidobacterium* no ágar RCPB pH5 só puderam ser vistas com o auxílio de um estereoscópio, enquanto que no ágar MRS-LP as colônias de *Bifidobacterium* apresentaram um diâmetro médio em torno de 0,1 mm.

A contagem de *B. animalis* Bb 12 no ágar RCPB pH5 e no ágar MRS-LP após a estocagem refrigerada do iogurte não foi significativamente diferente em $p < 0,05$ (Tabela 1). O ágar RCPB pH5 fortificado apresentou uma contagem levemente maior que os dois meios citados após a estocagem refrigerada do iogurte. Apesar do ágar RCPB pH5 ter apresentado uma boa recuperação de células após o período de estocagem do iogurte, a visualização das colônias de *Bifidobacterium* só pôde ser feita com o uso de um estereoscópio, o que tornou a contagem bastante difícil e passível de erros. Payne *et alii* (8) não conseguiram distinguir as espécies de *Bifidobacterium* em relação às culturas do iogurte quando culturas mistas foram inoculadas no ágar RCPB. A fortificação deste ágar com os sais e a infusão de fígado desidratado resolveu este problema, fazendo com que as colônias de *Bifidobacterium* se desenvolvessem com um diâmetro de cerca de 1 mm facilitando bastante a contagem e a diferenciação das colônias. O ágar MRS-LP também apresentou seletividade e pode ser usado para a contagem de *Bifidobacterium* ao final da estocagem refrigerada do iogurte. O meio MRS-LP pode ser mais indicado que o meio RCPB pH5 fortificado na situação em que o número de células das culturas presentes no iogurte esteja em desequilíbrio. Em situações onde o *L. bulgaricus* estiver com uma contagem muito superior à contagem de *B. animalis* Bb12, provavelmente a contagem da bifidobactéria será mais difícil devido à sobreposição das muitas colônias de *Lactobacillus* na superfície da placa sobre as da bifidobactéria. Em casos onde as culturas estejam em equilíbrio, o meio RCPB pH5 fortificado é mais indicado devido ao maior desenvolvimento do tamanho das colônias (1 mm contra 0,1 mm no meio MRS-LP), o que evidencia a sua

melhor capacidade de promover o crescimento células de *Bifidobacterium* na superfície do agar, e a redução de apenas 1 ciclo logarítmico no número de células de *Lactobacillus* proporcionada pelo meio MRS-LP.

Efeito da adição dos sais na fortificação do ágar RCPB pH5

Tabela 2: Contagem (log UFC/mL) de <i>B. animalis</i> Bb 12 nas diversas fortificações do ágar RCPB pH5.		
A	B	C
7,30 ± 0,40	7,24 ± 0,51	7,41 ± 0,59
A) ágar padrão RCPB pH5.	B) ágar RCPB pH5 fortificado com todos os sais e com o extrato de fígado.	C) ágar RCPB pH5 fortificado apenas com extrato de fígado (ágar RCPB pH5-Liver).

A Tabela 2 mostra o efeito da adição dos sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) no desempenho do ágar RCPB pH5 fortificado. Neste segundo experimento, não houve diferença entre a recuperação de células do ágar RCPB pH5 fortificado e do ágar RCPB pH5. Também não houve diferença na contagem de *Bifidobacterium* com as diferentes fortificações utilizadas, mostrando que a presença dos sais não afeta o desempenho do ágar RCPB pH5 fortificado. Portanto, apenas a adição do extrato de fígado desidratado é suficiente para que o ágar RCPB pH5 aumente consideravelmente a sua capacidade de diferenciação de *Bifidobacterium* após a estocagem refrigerada do iogurte, quando estas células estão mais estressadas devido ao pH ácido do iogurte.

A Figura 1 mostra o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 no ágar RCPB pH5 e no ágar RCPB pH5-Liver. As colônias de *B. animalis* Bb 12 são praticamente invisíveis a olho nu no ágar RCPB pH5, enquanto que as colônias de *B. animalis* Bb 12 são facilmente visualizadas no ágar RCPB pH5-Liver. Na Figura 1 também podemos verificar uma leve inibição na contagem de *L. bulgaricus* (colônias com o halo azul) no ágar RCPB pH5 fortificado (direita) quando comparado ao ágar RCPB pH5 (esquerda). Neste caso, a inibição foi bem menor do que os dois ciclos logarítmicos encontrados (Tabela 1). Esta diferença é provavelmente devida a menor sensibilidade linhagem utilizada neste

experimento (*L. bulgaricus* 18) à fortificação do ágar RCPHpH5, em relação à cepa de *L. LB 340* usada no experimento anterior.

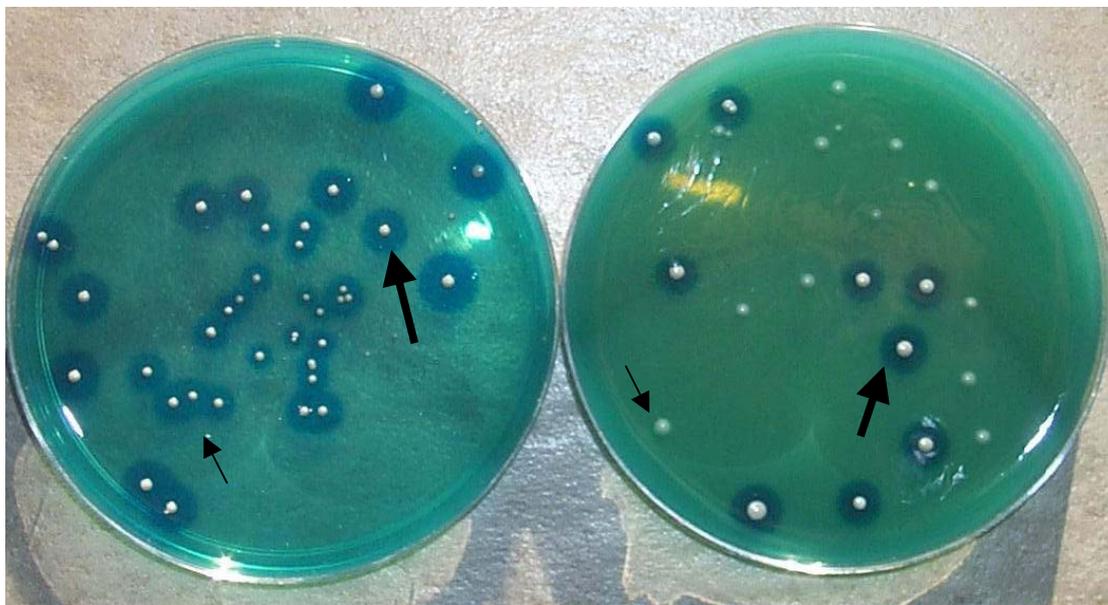


Figura 1. Placas de Petri da contagem do iogurte estocado a 7°C por 30 dias. Colônias brancas de *B. animalis* Bb 12 (setas estreitas) em ágar RCPBpH 5 (esquerda) e em ágar RCPB pH5 fortificado (direita). Colônias com halo azul de *L. bulgaricus* (setas largas).

4. Conclusão

Dentre os três meios de cultura avaliados para a contagem de *B. animalis* Bb 12 (RCPB pH5, MRS-LP e RCPB pH5 fortificado), todos apresentaram capacidade de contagem deste microrganismo. Entretanto, no ágar RCPB pH5, as colônias de *Bifidobacterium* se desenvolveram extremamente pequenas e a contagem só foi possível com o uso de um estereoscópio. O ágar MRS-LP apresentou boa seletividade para *Bifidobacterium*, mas apresentou inibição de apenas 1 ciclo logarítmico no número de células de *L. bulgaricus*. A fortificação do meio RCPB pH5 com 150mL/L de extrato de fígado desidratado resultou no aumento significativo do diâmetro das colônias de *Bifidobacterium*, tornando a sua contagem bastante fácil e confiável durante a estocagem refrigerada do iogurte.

5. Referências Bibliográficas

- (1) BOMBA, A., NEMCOVÁ, R., MUDRONOVÁ, D., & GUBA, P.: Trends in Food Science & technology **13**, 121-126, (2002).
- (2) DAVE, R.I. AND SHAH, N.P.: Journal of Dairy Science **79**, 1529-1536.
- (3) GHODUSSI, H.B. AND ROBINSON, R.K. (1996). : **63**, 151-158, (1996).
- (4) GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X.: Trends in Food Science & Technology **10**, 139-157, (1999).
- (5) LAPIERRE, L., UNDELAND, P. AND COX, L. J.: Journal of Dairy Science **75** (5), 1192-1196, (1992).
- (6) LAROA, S. AND MARTIN, J.H.: Cultured Dairy Products Journal, May, 32-33, (1991).
- (7) ONGGO, I. AND FLEET, G.H.: The Australian Journal of Dairy Technology **48**, 89-92 (1993).
- (8) PAYNE, J. F., MORRIS, A. E. J. AND BEERS, P.: Journal Applied Microbiology **86**, 353-358 (1999).
- (9) RYBKA, S. & KAILASAPATHY, K.: International Dairy Journal **6**, 839-850 (1996).
- (10) VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A.: International Dairy Journal **9** (8), 497-505 (1999).

CAPÍTULO III

ESTIMULAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 POR *Propionibacterium freudenreichii* PS-1

Artigo será submetido à publicação no “International Dairy Journal”.

Estimulação do desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 por *Propionibacterium freudenreichii* PS-1

Luciano Fachin; Walkiria Hanada Viotto*

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos -
UNICAMP - CP 6121 CEP 13083-970 Campinas SP - Brasil.

Resumo

Alguns trabalhos da literatura têm demonstrado que o gênero *Propionibacterium* spp. produz um estimulante para a bifidobactéria: o 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona. Este estimulador melhora a resistência de *Bifidobacterium* ao oxigênio. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 sobre o desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 em leite. A adição de células ativas de *P. freudenreichii* PS-1 em leite conjuntamente com células ativas de *B. animalis* Bb 12 conseguiu atuar como um bom promotor de desenvolvimento para a bifidobactéria quando o número inicial de células desta esteve entre 10^6 - 10^7 UFC/mL. Acima deste valor, as células de *B. animalis* Bb 12 apresentaram um bom desenvolvimento em leite quando em cultura pura, apresentando praticamente a mesma velocidade de desenvolvimento que quando em presença da propionibactéria. A adição de células ativas de *P. freudenreichii* PS-1 parece ter um bom potencial como promotor de desenvolvimento para a bifidobactéria em produtos lácteos como o iogurte.

* Autor para correspondência: Tel (55) (019) 3788 3988 and Fax number: (55) (019) 3289 3617. E-mail address: walkiria@fea.unicamp.br

1. Introdução

Nos últimos anos tem-se dado muita atenção à utilização do gênero *Bifidobacterium* em produtos lácteos, devido às suas excelentes propriedades terapêuticas e nutricionais, visando a produção dos chamados “iogurtes probióticos”. Segundo Gomes & Malcata (1999), probióticos “são microorganismos viáveis (bactérias lácticas ou extratos celulares aplicados como células desidratadas ou em um produto fermentado), que possuem um efeito benéfico após sua ingestão na saúde do hospedeiro pelo melhoramento da sua microbiota”. Entretanto, a sobrevivência de *Bifidobacterium* em iogurte é complicada pela sua alta exigência nutricional e pela sua susceptibilidade ao ácido e ao oxigênio, o que diminui a viabilidade das células durante o processamento e estocagem do produto. Conseqüentemente, um dos maiores problemas de produção de produtos lácteos com *Bifidobacterium* reside na falta de uma tecnologia de produção que assegure uma alta viabilidade deste microrganismo durante a estocagem do produto.

Vários estudos têm demonstrado (Kaneko, Mori, Iwata & Meguro, 1994; Yamazaki, Kano, Ikeda, Isawa & Kaneko, 1999; Warminska-Radiko, Laniewska-Moroz, Babuchowski, 2002) que a propionibactéria pode estimular o desenvolvimento de *Bifidobacterium*. Warminska-Radiko *et alii* (2002) estudaram a capacidade de 27 diferentes cepas de propionibactéria estimularem o desenvolvimento de 6 diferentes cepas de bifidobactéria. Das 27 propionibactérias estudadas, todas elas estimularam o desenvolvimento de no mínimo 3 das bifidobactérias. Entretanto, 15 propionibactérias também produziram metabólitos inibidores para algumas cepas de bifidobactéria. Os metabólitos que estimularam o desenvolvimento das bifidobactérias se mostraram característicos das cepas de propionibactéria usadas e se mostraram pouco influenciados pelos tipos de meios onde as propionibactérias se desenvolveram. Segundo Kaneko *et alii* (1994), o estimulador produzido pelo gênero *Propionibacterium* age minimizando os efeitos indesejáveis do oxigênio sobre a cultura de bifidus. Este estimulador se mostrou bastante específico para o gênero *Bifidobacterium*, não apresentando efeito sobre outras bactérias intestinais (Kaneko *et alii*, 1994). Além disso, este estimulador também apresentou-se bastante estável a vários tratamentos enzimáticos e térmicos numa ampla faixa de pH (Kaneko *et alii*, 1994). Posteriormente, Mori, Sato, Taketomo, Kamiyama,

Yoshiyama, Meguro & Sato (1997) identificaram a estrutura química do estimulador como sendo: 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona (C₁₁H₇NO₄). O composto foi codificado como ACNQ e revelou ter uma funcionalidade a partir de concentrações bastante baixas -0,1 ng/mL- (Mori *et alii*, 1997). Segundo Yamazaki *et alii* (1998, 1999), o ACNQ atua como mediador de transferência de elétrons entre o NADH ou o NAD(P)H e o oxigênio. Shimamura *et alii* (1992) demonstraram que a sensibilidade do gênero *Bifidobacterium* ao O₂ é inversamente proporcional à sua capacidade de apresentar atividade de NADH oxidase e peroxidase. As reações enzimáticas mediadas pelo NADH ou o NAD(P)H conduzem a formação de água ao invés de peróxido de hidrogênio, o qual age inibindo o desenvolvimento de *Bifidobacterium*.

Kaneko *et alii* (1994) também demonstraram que ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, o butirato e principalmente o propionato, são estimuladores de desenvolvimento para a espécie *Bifidobacterium*, enquanto inibem o desenvolvimento de outras bactérias. Portanto, há evidências que a associação da propionibactéria a bifidobactéria pode resultar na promoção do desenvolvimento da bifidobactéria, seja pelo efeito do ACNQ, de aumento da resistência ao O₂, ou pelo efeito estimulante da presença de ácidos graxos de cadeia curta produzidos pela propionibactéria. Contudo, nenhum estudo sobre o desenvolvimento conjunto destas culturas em leite tem sido relatado. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a ação de *P. freudenreichii* PS-1 sobre o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em leite.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Foram usadas culturas de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 e *Propionibacterium freudenreichii* PS-1, cedidas pela Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda.

2.2 Ativação das culturas

B. animalis Bb 12 foi ativado em leite em pó reconstituído a 12% de sólidos com a suplementação de 1% de extrato de levedura, 2% de glicose e 0,05% de L-cisteína. O leite reconstituído a 12% foi acrescido de 1% de extrato de levedura e esterilizado a 115°C por 10 minutos. A mistura de glicose e L-cisteína foi dissolvida em água (15% do volume inicial do meio) e esterilizada em filtro com diâmetro de poro de 0,2 µm, sendo posteriormente adicionada à solução de leite e extrato de levedura em capela de fluxo laminar. *B. animalis* Bb 12 foi então inoculado e incubado a 37°C por 6 horas.

O inóculo para *P. freudenreichii* PS-1 foi feito com leite reconstituído a 12% de sólidos, suplementado com 1% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C por 10 minutos. *P. freudenreichii* PS-1 foi então inoculado e incubado a 37°C por 14 horas.

2.3 Contagem do número de células de *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 em leite

O meio RCA (OXOID) acidificado a pH 5 foi usado para a contagem de *B. animalis* Bb 12 incubado a 37°C por 3 dias, em condição de anaerobiose. O meio SMA (meio comercial PCA + 10 % de leite a 11% de sólidos) foi usado para a contagem de *P. freudenreichii* PS-1, sendo incubado a 37°C por 3 dias em condição de aerobiose.

2.4 Desenvolvimento associado de *P. freudenreichii* PS-1 e *B. animalis* Bb 12 em leite

As células de *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 foram ativadas e inoculadas (2,5% do volume) em leite esterilizado (115°C/10 minutos). As culturas foram então incubadas a 37°C, por um período de 6 horas, com medidas a cada 2 horas do número de células de *P. freudenreichii* PS-1 e *B. animalis* Bb 12.

2.5 Promoção do desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 por *P. freudenreichii* PS-1 em função do número inicial de células de *Bifidobacterium*

As células de *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 foram ativadas e inoculadas em leite esterilizado (115°C/10 minutos). Para os valores iniciais do número de células de *B. animalis* Bb 12 acima de $6,0 \times 10^8$ UFC/mL, as inoculações foram feitas a 2,5 % do volume de inóculo de *Bifidobacterium*. Para os valores iniciais do número de células de *B. animalis* Bb 12 entre $1,0 \times 10^7$ e $3,0 \times 10^7$ UFC/mL, as inoculações foram feitas a 1 % do volume de inóculo de *Bifidobacterium*. Para os valores iniciais do número de células de *B. animalis* Bb 12 abaixo de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, o inóculo de *Bifidobacterium* foi diluído decimalmente e foram inoculados 1 % e 2,5 % do volume dessa diluição no leite. Para os experimentos onde *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* foram incubados juntos em leite, o inóculo da propionibactéria foi 2,5 % (~ $6,0$ a $10,0 \times 10^7$ UFC/mL) quando o inóculo de *Bifidobacterium* foi de 2,5 % e foi 1 % (~ $1,0 \times 10^7$ UFC/mL) quando o inóculo da bifidobactéria foi de 1 % ou quando este foi feito com as diluições decimais do inóculo (1 ou 2,5%).

A avaliação do desenvolvimento foi feita baseado no tempo de geração descrito por Stanier, Doudoroff & Adelberg (1965), através do cálculo do tempo para que o inóculo completasse uma divisão celular (TDC):

$$\text{TDC} = \frac{\text{tempo de fermentação (horas)}}{\text{número de divisões celulares}} \text{ [horas/1 divisão]}$$

sendo que:

$$\text{Número de divisões celulares} = nd = \frac{(\log N_f - \log N_i)}{0,301}$$

Onde: N_f e N_i são os valores do número de células no momento da inoculação (N_i , em UFC/mL) e quando o pH atinge 4,6 (N_f , em UFC/mL); 0,301 vem da correção da base do logaritmo de 10 para 2.

2.6 Efeito do tempo de ativação das células de *B. animalis* Bb 12 sobre a promoção de desenvolvimento

Visando a avaliação do efeito do tempo de ativação das células da bifidobactéria sobre a promoção de desenvolvimento na presença da propionibactéria, células de *B. animalis* Bb 12 foram ativadas em leite em pó reconstituído fortificado com extrato de levedura, glicose e L-cisteína por dois períodos de tempo: a) por 6 horas, que foi o tempo onde ocorreu a coagulação das proteínas do leite e b) por 18 horas. As culturas ativadas nestas diferentes condições foram inoculadas em leite esterilizado juntamente com a propionibactéria (2,5% de inóculo para ambas) e o TDC para a cultura de *B. animalis* Bb 12 foi medido após um período de 4 horas (tempo para atingir o pH 4,6).

3. Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento associado de *P. freudenreichii* PS-1 e *B. animalis* Bb 12 em leite

B. animalis Bb 12 se desenvolveu como colônias brancas de 1 a 2 mm de diâmetro no meio RCA acidificado a pH5 enquanto que *P. freudenreichii* PS-1 não se desenvolveu devido ao baixo pH do meio. *P. freudenreichii* PS-1 se desenvolveu como colônias brancas de cerca de 1mm de diâmetro no meio SMA, enquanto que *B. animalis* Bb 12 não se desenvolveu devido a condição de aerobiose.

A Figura 1 mostra o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em leite na ausência e presença de *P. freudenreichii* PS-1 (curvas A e B). Quando em cultura pura (curva A), *B. animalis* Bb 12 se desenvolveu lentamente em leite passando de 7,8 para 8,15 log UFC/mL após 4 horas de fermentação. O desenvolvimento da bifidobactéria na presença da propionibactéria foi ligeiramente superior, de 7,78 para 8,56 log UFC/mL ao final das 6 horas de fermentação. A maior taxa de desenvolvimento de *Bifidobacterium* ocorreu após 4 horas de fermentação, onde ocorreu o maior desenvolvimento da propionibactéria. Após este período, quando o desenvolvimento da propionibactéria começou a declinar, o desenvolvimento da bifidobactéria estacionou e o número de células permaneceu constante com o tempo até o final da fermentação após seis horas.

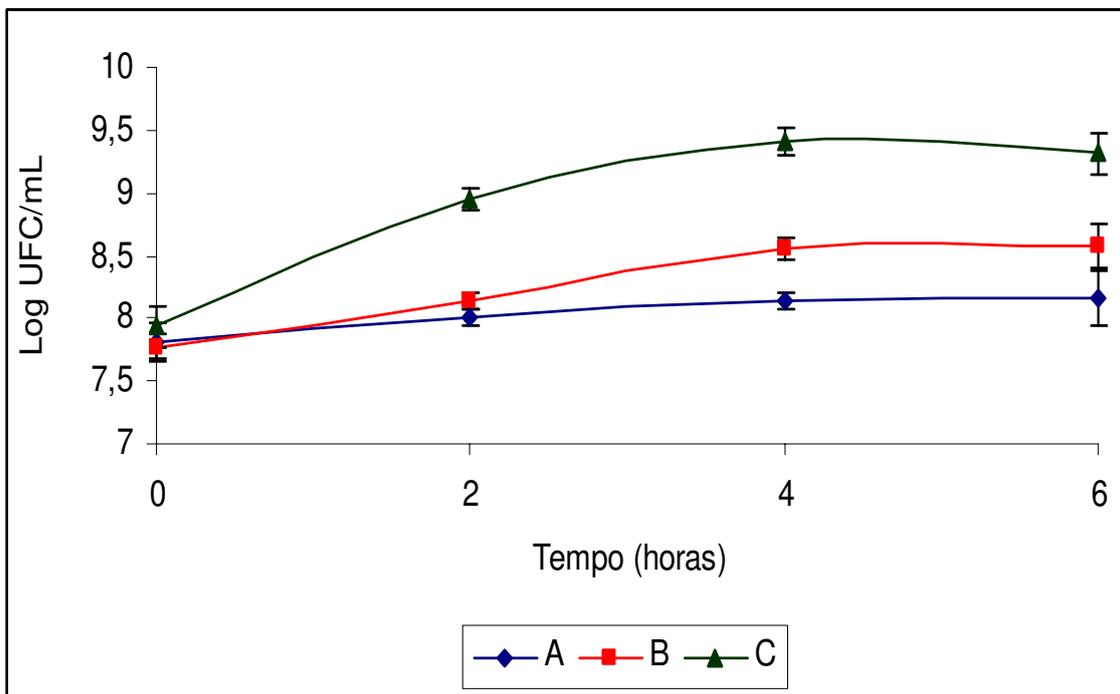


Figura 1. Curvas de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em cultura pura (A) e em cultura mista com *P. freudenreichii* PS-1 (B). (C) Curva de desenvolvimento de *P. freudenreichii* na cultura mista com *B. animalis* Bb 12. Os inóculos iniciais de *B. animalis* Bb 12 foram 7,81, 7,78 e 7,93 log UFC/mL para A, B e C, respectivamente (2,5% do volume do leite).

3.2 Promoção do desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 por *P. freudenreichii* PS-1 em função do número inicial de células de *Bifidobacterium*

A Figura 2 mostra o tempo de divisão celular (TDC) para *B. animalis* Bb 12 em cultura pura em leite (curva A) e em associação com a *P. freudenreichii* PS-1 (curva B). O desenvolvimento da bifidobactéria em leite apresentou uma grande dependência do seu número inicial de células (curva A). *B. animalis* Bb 12 apresentou um fraco desenvolvimento em leite quando o inóculo foi menor que 1×10^7 UFC/mL, com tempos de divisão celular maiores que 10 horas. À medida que o número inicial de células da bifidobactéria aumentou até aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL, o seu tempo de divisão celular diminuiu consideravelmente até cerca de 1,8 horas. Quando em presença da propiniobactéria, *B. animalis* Bb 12 apresentou um desenvolvimento independente do seu

número inicial de células, com um tempo de divisão celular constante em torno de $1,74 \pm 0,33$ horas. Portanto, a presença da propionibactéria funcionou como um bom promotor de desenvolvimento para a bifidobactéria quando o número inicial de células foi inferior a $1,0 \times 10^7$ UFC/mL. Com valores do número de células da bifidobactéria maiores que $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, esta conseguiu se desenvolver com um tempo de divisão celular semelhante ao que ocorreu na presença da propionibactéria. Kaneko *et alii* (1994) demonstraram que algumas espécies de *Propionibacterium* produzem um forte estimulante para a bifidobactéria. Posteriormente, Mori *et alii* (1997) identificaram a estrutura química do estimulante: 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona ($C_{11}H_7NO_4$) e Yamazaki *et alii* (1998, 1999) demonstraram que ele atua como mediador de transferência de elétrons entre o NADH ou o NAD(P)H e o oxigênio, minimizando os efeitos prejudiciais deste à bifidobactéria. Outro fator que pode ter influência na promoção de crescimento é a

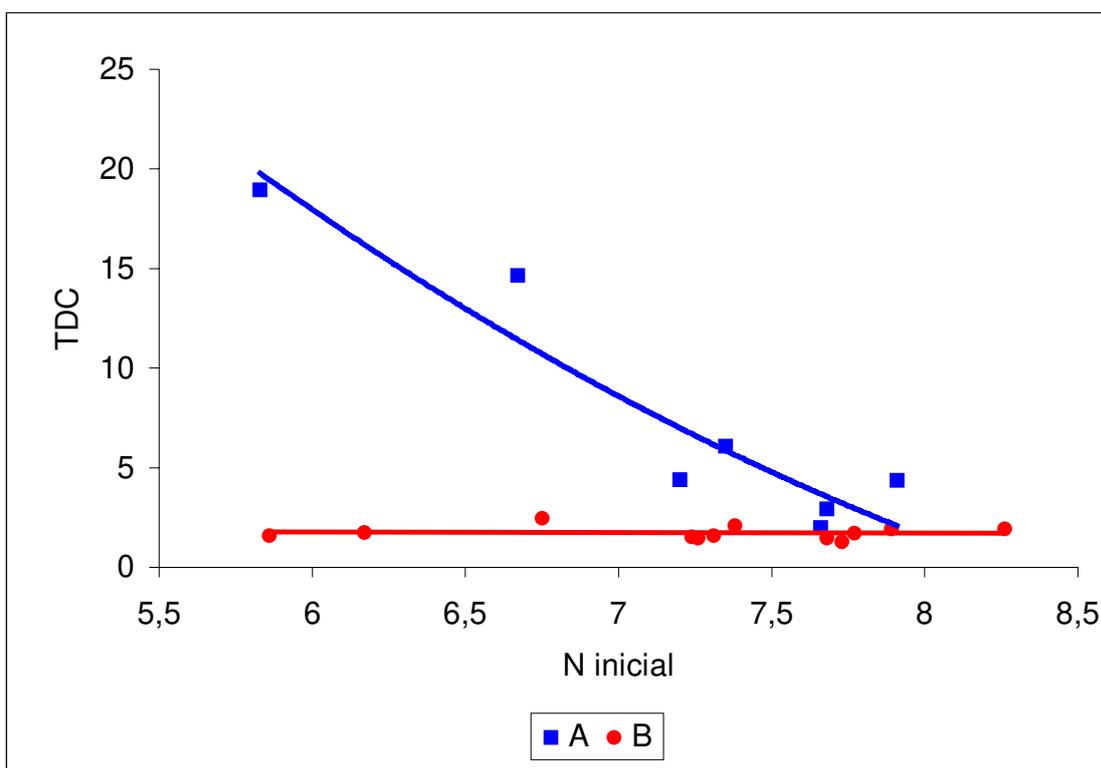


Figura 2. Tempo de divisão celular (TDC) em função do número inicial de células de bifidobactéria inoculadas em leite (N_{inicial}). A- Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 quando sozinho em leite; B - Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 junto com *P. freudenreichii* PS-1 em leite. O número de células iniciais de *P. freudenreichii* PS ficou entre $1,0$ a $10,0 \times 10^7$ UFC/mL.

produção de ácido propiônico pela propionibactéria durante a fermentação, visto que já se tem demonstrado que o propionato foi estimulador para *Bifidobacterium* em meios sintéticos (Kaneko *et alii*,1994).

3.3 Efeito do tempo de ativação das células de *B. animalis* Bb 12 sobre a promoção de desenvolvimento

O tempo de ativação das células de *Bifidobacterium* antes da inoculação também foi um fator importante para a promoção de desenvolvimento, sendo que a bifidobactéria apresentou uma maior velocidade de desenvolvimento quando foi ativada por apenas 6 horas, em relação a um tempo de ativação de 18 horas. O tempo de 6 horas foi o tempo em que a bifidobactéria conseguiu coagular as proteínas do leite. A exposição da bifidobactéria até um tempo de 18 horas provavelmente causou um maior “stress” celular nesta, devido ao meio ácido do inóculo (que após 6 horas já estava em torno do pH 4,6), fazendo com que esta não apresentasse a mesma velocidade de divisão celular durante a fermentação com a propionibactéria (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do tempo de ativação das células de *B. animalis* Bb 12 sobre a velocidade de desenvolvimento da bifidobactéria (TDC) na presença de *P. freudenreichii* PS-1.

Tempo de ativação (horas)	TDC (horas)
6	1,56 ± 0,04
18	2,41 ± 0,04

4. Conclusão

O desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em leite apresentou uma forte dependência do seu número inicial de células. Abaixo de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a bifidobactéria apresentou um fraco desenvolvimento com tempos de divisão celular maiores que 10 horas. Na presença da propionibactéria, *B. animalis* Bb 12 apresentou um desenvolvimento independente do seu número inicial de células, mostrando que a propionibactéria é um bom promotor de desenvolvimento para a bifidobactéria quando esta estiver em contagens menores que $1,0 \times$

10^7 UFC/mL. Na preparação do inóculo para a fermentação, *B. animalis* Bb 12 não deve ser ativado por um período superior ao necessário para a coagulação do leite.

5. Referências bibliográficas

- Gomes, A.M.P., Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 10, 139-157.
- Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., Meguro, S. (1994). Growth stimulator for *Bifidobacterium* produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77, 393-404.
- Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H., Kaneko, T. Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Dairy Science*, 80, 1959-1964, 1997.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., Araya, T., Tomita, M. (1992). Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *Journal of Dairy Science*, 75: 3296-3306.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, E.A. (1965). In *El mundo de los Microbios*, Editora Aguilar, Madrid, Espanha, 724p.
- Warminska-Radyko, I., Laniewska-Moroz, L., Babuchowski, A. (2002) Possibilities for stimulation of *Bifidobacterium* growth by propionibactéria. *Lait*, 82 (2002) 113-121.
- Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T. (1998). Mechanistic study on the roles of a bifidogenetic growth stimulator based on physicochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425 516-526.
- Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T. (1999). Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for *Bifidobacterium*, as an electron transfer mediator for NA(P)⁺ regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, Issues 2-3, 241-250.

CAPÍTULO IV

EFEITO DA ADIÇÃO DE *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis* Bb 12 EM IOGURTE E SOBRE A SUA VIABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA

Artigo será submetido para publicação no “International Dairy Journal”

Efeito da adição de *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 sobre o desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 em iogurte e sobre a sua viabilidade durante a estocagem

Luciano Fachin, Walkiria Hanada Viotto ^{a*}

^aFaculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos - UNICAMP - CP 6121 CEP 13083-970 Campinas SP - Brasil.

Resumo

A produção de iogurtes com *Bifidobacterium* spp. tem crescido muito nas últimas décadas visando a produção de alimentos funcionais. Entretanto, um dos maiores problemas para a produção de iogurtes com estes microrganismos é a dificuldade de manutenção de um número mínimo de células viáveis durante vida de prateleira do produto. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da adição da cultura *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 ao iogurte visando avaliar o seu efeito sobre o desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 durante a fermentação e sobre a sua resistência à estocagem refrigerada, bem como monitorar as possíveis mudanças na textura final do produto, na separação de soro e na pós-acidificação do iogurte. A adição de *P. freudenreichii* PS-1 ao iogurte reduziu o tempo de fermentação em aproximadamente 1,2 horas, aumentando a taxa de desenvolvimento da bifidobactéria durante a fermentação e diminuindo a tendência de redução no número de células viáveis durante a estocagem refrigerada. A presença da propionibactéria também alterou significativamente a textura final do iogurte, aumentando consideravelmente a gomosidade e adesividade do produto final, bem como resultou em um iogurte com menor separação de soro durante a estocagem e com menor tendência a pós-acidificação.

*Autor para correspondência: e-mail: walkiria@fea.unicamp.br

1. Introdução

O gênero *Bifidobacterium* spp. é geralmente empregado em produtos lácteos para a produção de iogurtes probióticos, devido às suas propriedades terapêuticas e nutricionais, seguindo a tendência de produção de alimentos funcionais. Entretanto, o ambiente do iogurte está longe de ser adequado para o desenvolvimento e a manutenção da viabilidade de culturas probióticas como as do gênero *Bifidobacterium*. Dentre os principais fatores que contribuem para o fraco desenvolvimento dessas culturas em iogurte podemos citar a acidez do iogurte (Vinderola, Bailo & Reinheimer, 2000), a sensibilidade dos probióticos ao oxigênio (Talwalkar & Kailasapathy, 2003), as interações (antagonismo) com as culturas do iogurte (Vinderola, Mocchiutti & Reinheimer, 2002, Dave & Shah, 1997), a baixa atividade proteolítica destas culturas em leite (Klaver, Kingma & Weerkamp, 1993, Shihata & Shah, 2000) e as condições de estocagem do iogurte (Vinderola *et alii*, 2000). Por conseqüência, vários são os estudos encontrados na literatura que mostram uma redução na viabilidade de *Bifidobacterium* spp. em leites acidificados ou iogurtes (Vinderola *et alii*, 2000; Dave & Shah, 1997; Rosenthal & Bernstein, 1998; Gilliland, Reilly, Kim & Kim 2002). O grau de redução na viabilidade durante a estocagem é bastante variável, podendo ser de uma leve diminuição no número de células (Dave & Sha, 1997; Gilliland *et alii*, 2002) até 4 ciclos logarítmicos no final da estocagem do produto (Vinderola *et alii*, 2000). Desta forma, várias técnicas foram estudadas nos últimos anos visando uma melhoria da viabilidade das culturas probióticas em iogurte: seleção de culturas resistentes ao meio ácido, uso de embalagens de vidro, pré-fermentação do leite com as culturas probióticas antes da inoculação das culturas do iogurte, microencapsulação, adaptação da cultura por “stress” celular à condição ácida, adição de ácido ascórbico, adição de cisteína e uso de células lisadas das culturas do iogurte visando a liberação da enzima β -galactosidase (Shah, 2000).

Em 1994, Kaneko, Mori, Iwata & Meguro demonstraram que o gênero *Propionibacterium* produz um forte estimulador para *Bifidobacterium* em meios sintéticos. Posteriormente, Mori, Sato, Taketomo, Kamiyama, Yoshiyama, Meguro & Sato, 1997 (1997) identificaram a estrutura química do estimulador 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona ($C_{11}H_7NO_4$). Em 1998, Yamazaki, Kano, Ikeda, Isawa & Kaneko propuseram que este estimulador agia como mediador de transferência de eletrons entre o

NADH e o oxigênio. Um ano depois, Yamazaki, Kano, Ikeda, Isawa & Kaneko (1999) demonstraram que esse estimulador realmente não funciona como substrato, e sim como mediador da reação de regeneração de NAD(P)⁺, a qual permite a utilização do O₂, aumentando assim a resistência do gênero *Bifidobacterium* a condição de aerobiose. Além disso, Kaneko *et alii* (1994) verificaram que ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, o butirato e principalmente o propionato, podem ser estimuladores de desenvolvimento para *Bifidobacterium*, enquanto inibem o desenvolvimento de outras bactérias. O gênero *Propionibacterium* também produz acetato e propionato (Taniguchi, Nakazawa, Takeda, Kaneko, Hoshino & Tanaka, 1998). Esses dados sugerem que possa ser alcançado um desenvolvimento associado entre *Propionibacterium* e *Bifidobacterium* em cultura mista, visto o possível aumento da resistência do gênero *Bifidobacterium* ao oxigênio pela presença do estimulador 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona, bem como pela presença de ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido acético e propiônico, provenientes do metabolismo da propioniobactéria. Nenhum trabalho com o uso de propionibactéria em conjunto com a cultura de bifidus, visando explorar um possível desenvolvimento associado entre estas duas culturas tem sido relatado em produtos lácteos. Além dos possíveis benefícios sobre a cultura de bifidus com a presença de *Propionibacterium*, esta cultura tem sido também considerada com um grande potencial probiótico, devido a algumas cepas serem tolerantes a digestão gástrica e pela sua capacidade de produção de alguns metabólitos importantes como o ácido propiônico, algumas bacteriocinas e vitaminas, especialmente a vitamina B₁₂. Vários estudos *in vitro* e *in vivo* visando a seleção de linhagens de *Propionibacterium* com base na sua resistência gástrica e a sua adesão às células epiteliais que possam ser usadas como probióticos têm sido relatados (Zarate, Morata, Chaia, Gonzalez, 2002, Huang, Kotula, Adams, 2003; Hung & Adams, 2004). Rinta-Koski, Beasley, Montonen & Mantere-alhonen (2001) isolaram duas espécies de *P. jensenii* e uma espécie de *P. freudenreichii* do intestino de bovinos como potenciais probióticos com base na sua resistência a acidez, aos sais biliares e a secreção pancreática e usaram estas espécies para a produção de um leite fermentado conjuntamente com *B. longum* Bb 46. Neste estudo, a contagem da bifidobactéria foi superior nos leites fermentados produzidos conjuntamente com as propionibactérias após um período de estocagem de 3 semanas à 6°C.

A adição de uma quarta cultura ao iogurte pode, entretanto, acarretar mudanças na textura final do produto. O perfil de textura instrumental (TPA), com o uso do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems), tem sido usado para monitorar os efeitos de diferentes cepas de microrganismos sobre a textura final dos géis do iogurte (Rawson & Marshall, 1997).

A separação de soro do iogurte também é um importante parâmetro para a aceitabilidade do produto final frente ao consumidor. Lucey, Munro & Singh (1998) usaram a medida de separação de soro de géis ácidos de leite produzidos com glucono- δ -lactona como uma avaliação rápida e eficiente da textura dos géis de iogurte frente a diferentes condições de processo como tratamentos térmicos do leite e temperaturas de geleificação.

O objetivo deste trabalho foi estudar a adição de *P. freudenreichii* PS-1 ao iogurte probiótico visando avaliar o seu efeito sobre o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação e sobre a sua resistência à estocagem refrigerada por 4 semanas, bem como monitorar as possíveis mudanças na textura dos iogurtes através do perfil de textura instrumental (TPA) e da avaliação da separação de soro.

2. Material e Métodos

2.1 Culturas

As culturas liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 e *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 foram cedidas pela Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda. e as culturas liofilizadas de *Streptococcus thermophilus* A e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 18 pela Wiesby Starter Cultures and Media.

2.2 Manutenção e ativação das culturas

Os inóculos de *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 foram preparados inoculando-se as culturas liofilizadas em leite em pó reconstituído a 12% de sólidos suplementados com 1% de extrato de levedura, previamente esterilizado a 115°C por 10 minutos. Os inóculos foram então incubados à 37°C até coagulação do leite (6 horas para *B. animalis* Bb

12 e 14-15 horas para *P. freudenreichii* PS-1). Os inóculos de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram preparados inoculando-se as culturas liofilizadas em leite em pó desnatado reconstituído à 11% de sólidos previamente esterilizado à 115°C por 10 minutos. As culturas do iogurte foram então incubadas à 37°C até coagulação do leite (6-7 horas para *S. thermophilus* e 14-15 horas para *L. bulgaricus*).

2.3 Sistemas modelo para avaliação do desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em iogurte com *P. freudenreichii* PS-1

Para a avaliação da capacidade de *P. freudenreichii* PS-1 em promover o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em iogurte o seguinte sistema modelo foi conduzido: células ativadas preparadas conforme item 2.2 foram inoculadas em 25 mL de leite pasteurizado comercial (marca Salute[®]), contido em tubos de vidro de 60 mL com tampa de rosca, e posteriormente incubados à 37°C até a fermentação do iogurte à pH 4,6. O número de células de *B. animalis* Bb 12 foi quantificado no início (inoculação) e após a fermentação. O volume de inóculo foi de 2,5% na proporção de 1:1:1:1. Foram produzidos: a) um iogurte controle com *Bifidobacterium* e as culturas do iogurte e b) um iogurte teste com *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e as culturas do iogurte. O iogurte teste e o iogurte controle sempre foram produzidos nos mesmos dias sob as mesmas condições de inóculo e incubação, para diminuir o erro experimental e aumentar a sensibilidade do teste. O meio RCPB pH5 (descrito no capítulo I) foi usado para a contagem de *B. animalis* Bb 12, com incubação a 37°C por 3 dias em condição de anaerobiose. A avaliação da velocidade de desenvolvimento da bifidobactéria foi feita baseado no tempo de geração descrito por Stanier, Doudoroff & Adelberg (1965), através do cálculo do tempo para que o inóculo completasse uma divisão celular (TDC):

$$\text{TDC} = \frac{\text{tempo de fermentação (horas)}}{\text{número de divisões celulares}} \quad [\text{horas/1 divisão}]$$

sendo que:

$$\text{Número de divisões celulares} = nd = \frac{\log N - \log N_{\text{inicial}}}{0,301}$$

Onde: N e N_{inicial} são os valores do número de células no momento da inoculação (N_{inicial} , em UFC/mL) e quando o pH atinge 4,6 (N, em UFC/mL); 0,301 vem da correção da base do logaritmo de 10 para 2. Os iogurtes foram feitos em quadruplicata. Os tempos de divisão celular (TDC) foram comparados por Análise de Variância (Anova) de fator único, utilizando o software Excell for Windows (Microsoft®).

2.4 Produção do iogurte

Leite cru integral (4 l) foi adicionado de 2% (p/v) de leite em pó integral e aquecido a 70°C. O leite foi então homogeneizado a 200 Bar em um homogeneizador Niro Soavi (tipo NS2006H) de duplo estágio. Após a homogeneização, o leite foi tratado termicamente a 90°C por 5 minutos em um banho de água aquecido com vapor. Após este aquecimento, o leite foi então resfriado a 20°C em um banho de água gelada. Dois litros do leite resfriado foram inoculados com 1% de cada uma das culturas ativas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. animalis* Bb 12 para o iogurte controle e de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 para o iogurte teste. Um iogurte com *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *P. freudenreichii* PS-1, sem a presença de *B. animalis* Bb 12 também foi produzido, como um branco para a avaliação dos ácidos orgânicos. Após a inoculação, os leites foram divididos em 7 copos plásticos de 200 ml cada um, sendo que o restante do leite foi descartado. Os copos foram selados e colocados em um banho de água a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, disposto em uma câmara de fluxo laminar para que as medidas de pH e as amostras destinadas às análises microbiológicas e cromatográficas pudessem ser coletadas de forma asséptica. Um dos potes plásticos de cada iogurte foi sempre usado para as medidas do pH durante a fermentação, enquanto um segundo foi sempre usado para a coleta das amostras para a avaliação microbiológica e as análises de HPLC durante a fermentação. Os iogurtes foram fermentados até que o pH atingisse o valor de 4,8. Os copos plásticos foram então retirados e resfriados em banho de gelo por 1 hora, até que a temperatura do iogurte atingisse aproximadamente 12°C e foram então transferidos e

mantidos em geladeira a 7°C, por um período de 4 semanas, para a avaliação do número de células viáveis dos microrganismos, do perfil de textura instrumental e da separação de soro e do pH do iogurte durante a estocagem refrigerada. O processo de produção do iogurte foi realizado em duplicata.

2.5 Medidas de pH

As medidas de pH do leite e dos iogurtes foram feitas em um pHmetro WTW modelo pH 320. O pH do leite antes da inoculação foi medido e considerado como o pH inicial do iogurte antes da fermentação. A cada hora, o mesmo pote plástico era retirado do banho e a medida de pH realizada em fluxo laminar. Após a determinação do pH, o pote plástico era novamente selado e recolocado no interior do banho de água. Ao final da fermentação, o pote usado para a construção da curva de pH era descartado. Análises do pH foram também realizadas após 24 horas e 30 dias de estocagem dos iogurtes.

2.6 Teor dos ácidos orgânicos durante a fermentação dos iogurtes

A preparação das amostras para a determinação dos ácidos (lático, acético e propiônico) por HPLC foi realizada pelo procedimento abaixo:

5 gramas de iogurte eram pesados em tubos de vidro e adicionados de 4,6 mL de fase móvel (ácido perclórico pH 1,9), 0,2 mL de carrez 1 (53,4 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ /100 mL água) e 0,2 mL de carrez 2 (17,2 g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ /100 mL água) para a precipitação da proteína, sendo que o peso total era anotado após a adição da fase móvel e do carrez 1 e 2. O tubo era agitado por 20 segundos manualmente e centrifugado a 617 x g por 15 minutos. O sobrenadante era filtrado em membranas de acetato de celulose de 0,45 μm (Millipore®) e as amostras injetadas no cromatógrafo SHIMADZU LC 10A, do Departamento de Ciência, de Alimentos da FEA-UNICAMP. O cromatógrafo era equipado com uma coluna SHIMADZU SHIM-PACK SCR101H e detector de ultravioleta SPD M10A para os testes de determinação dos ácidos orgânicos. As amostras filtradas eram injetadas na coluna a uma temperatura de 65°C, com fluxo de 0,7 mL /minuto e fase móvel de ácido perclórico a

pH 1,9. O volume de injeção das amostras era 20 µl. Os ácidos foram identificados pelos respectivos tempos de retenção dos seus padrões (marca Supelco-Sigma) e suas medidas foram feitas pelo método de padronização externa. O teor dos ácidos no tempo zero era estimado pela soma dos teores existentes nos inóculos de cada iogurte. As amostras eram retiradas nas primeiras três horas de fermentação (da mesma forma que as medidas de pH) e a última amostra era feita quando o iogurte atingiu o pH 4,8.

2.7 Análises microbiológicas

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 eram feitas nas primeiras três horas de fermentação e quando o iogurte atingia o pH 4,8. Os gráficos da enumeração dos microrganismos em função do tempo foram construídos usando-se a razão N/N_{inicial} em função do tempo (Figuras 2 e 3), onde N_{inicial} e N são os valores do número de células (em UFC/mL) no momento da inoculação e em cada tempo avaliado, respectivamente.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* foram enumerados em meio Skim Milk Agar (SMA) após incubação em condição de aerobiose a 37°C por 72 horas. Agar SMA foi preparado acrescentando ao meio comercial PCA (Difco) 100 mL de leite desnatado reconstituído a 10% para 1 litro de PCA. O leite reconstituído foi esterilizado a 115°C por 10 minutos e adicionado ao meio PCA comercial esterilizado a 121°C por 15 minutos em câmara de fluxo laminar. As colônias de *L. bulgaricus* foram melhores visualizadas contra luz transmitida em um estereoscópio (15-20 vezes de aumento). A esterilização do leite deve ser feita no máximo a 115°C por 10 minutos, pois tratamentos mais intensos provocam caramelização dificultando muito a visualização das colônias de *L. bulgaricus*.

O meio RCPB pH5-Liver foi preparado através da fortificação do meio RCPB pH5 com infusão de fígado desidratado (150 mL/L) para propiciar o aumento do diâmetro das colônias de *B. animalis* Bb 12 (ver Capítulo II). A infusão de fígado foi preparada segundo Laroia & Martin (1991) e esterilizada separadamente a 121°C/15 minutos (tanto o precipitado quanto o sobrenadante da extração foram esterilizados no mesmo frasco). Para a adição posterior no meio, o extrato foi deixado decantar a temperatura ambiente após a esterilização. A água do meio RCA (OXOID) e o sobrenadante da infusão de fígado

desidratado (150 mL/L) foram adicionados ao meio RCA em fluxo laminar sendo o pH do meio ajustado para 5 com HCl 6N. O meio foi então esterilizado a 121°C por 15 minutos. O corante Azul da Prússia foi pesado a 0,03% do volume final do meio e adicionado de água (12% do teor de água final do meio) e esterilizado a 121°C por 15 minutos. O volume de água em que o meio RCA foi dissolvido foi calculado diminuindo o respectivo volume da infusão de fígado desidratado (150 mL/L) e o volume de água necessário para dissolver o corante Azul da Prússia (cerca de 12% do volume do meio). Por exemplo: para 300 mL de RCPB pH5 fortificado, o meio RCA (pesado conforme orientação do fabricante para 300 mL) foi dissolvido em 219 mL de água Milli-Q (Milipore®) e misturados com a infusão de fígado (45 mL), sendo posteriormente ajustados para pH 5 e esterilizados a 121°C/15 minutos. Simultaneamente, o corante Azul da Prússia (0,03%) foi dissolvido em 36 mL de água e também esterilizado a 121°C/15 minutos. A mistura do corante e do meio foi feita em fluxo laminar. As placas foram mantidas à 37°C por 72 horas, em condições anaeróbicas (jarras de anaerobiose MERCK, com gerador de anaerobiose Anaerogen®, da OXOID). Após o período de incubação, as placas foram deixadas por 1 noite em exposição ao ar atmosférico e a temperatura ambiente para que se formasse o halo azul que diferencia as colônias de *L. bulgaricus* das colônias da bifidobactéria.

A contagem dos microrganismos foi realizada logo após a inoculação das culturas no iogurte (tempo zero) e depois de 1, 2 e 3 horas da fermentação do iogurte e ao atingir o pH 4,8. As mesmas análises foram realizadas a cada semana durante os 30 dias de estocagem refrigerada do iogurte a 7°C.

2.8 Análise de perfil de textura instrumental (TPA)

No décimo dia de estocagem do iogurte, um pote foi retirado da geladeira e analisado quanto ao perfil de textura instrumental (TPA), usando-se o texturômetro TA-XT2 da Stable Micro Systems. O iogurte foi agitado vinte vezes no sentido horário e vinte vezes no sentido anti-horário, para homogeneização da amostra e reincorporação do soro separado. 25 mL de iogurte foram vertidos no interior de um béquer de 100 mL de maneira que a altura final da amostra fosse de 1,27 cm, como padronizado por Friedman, Whitney,

Szczesniak, (1963) e armazenadas na geladeira por 1 noite para a estabilização da temperatura. No dia seguinte, cada béquer foi retirado da geladeira e a análise de TPA foi efetuada. Um probe cilíndrico de 35 mm de diâmetro foi usado com duas compressões sucessivas, com intervalo de 2 segundos cada uma, a uma velocidade de teste de 10 mm/s. As velocidades de pré-teste e pós-teste foram também de 10 mm/s. Seis replicatas foram realizadas para cada amostra. A diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$) foi calculada por Análise de Variância (Anova) de fator único, utilizando o software Excell for Windows (Microsoft®).

2.9 Avaliação da separação de soro do iogurte durante a estocagem

O método de avaliação da separação de soro foi baseado em Lucey, Munro, Singh (1998). A cada semana, o mesmo pote de cada iogurte foi aberto em condições assépticas (fluxo laminar) e a quantidade de soro da superfície do gel foi retirada com o auxílio de uma seringa estéril. O iogurte era então cuidadosamente inclinado dentro do fluxo laminar a um ângulo de mais ou menos 30° e deixado por cinco minutos nesta posição. Após este tempo, o soro adicional foi retirado e a quantidade total foi pesada. Este procedimento foi repetido a cada semana para se obter a quantidade total de soro. A separação de soro foi então estimada calculando-se a porcentagem final de soro separado em cada semana em relação ao peso inicial do iogurte (em torno de 200 g).

3. Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento de B. animalis Bb 12 em iogurte com P. freudenreichii PS-1 em testes modelo

A adição de células ativas de *P. freudenreichii* PS-1 aumentou a velocidade de divisão celular de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação do iogurte ($p < 0,05$), o que pode ser visto através do menor tempo de divisão celular apresentado na Tabela 1. O tempo para que a bifidobactéria apresentasse uma divisão celular foi aproximadamente a metade do tempo

necessário (cerca de 2,02 horas) para que uma divisão celular acontecesse no iogurte sem a presença da propionibactéria (cerca de 4,26 horas).

Tabela 1. Efeito da adição de *P. freudenreichii* PS-1 no tempo de divisão celular (TDC) de *B. animalis* Bb 12 em iogurte*.

	TDC sem propionibactéria	TDC com propionibactéria
<i>B. animalis</i> Bb 12	4,19 ± 0,21	2,02 TDC ± 0,38

*Iogurte produzido em sistema modelo com leite pasteurizado (25 mL) fermentado em tubos de vidro (inoculação a 2,5% em volume na proporção de (1:1:1:1)). Incubação a 37°C até a fermentação do iogurte a pH 4,6.

3.2 Curvas de pH

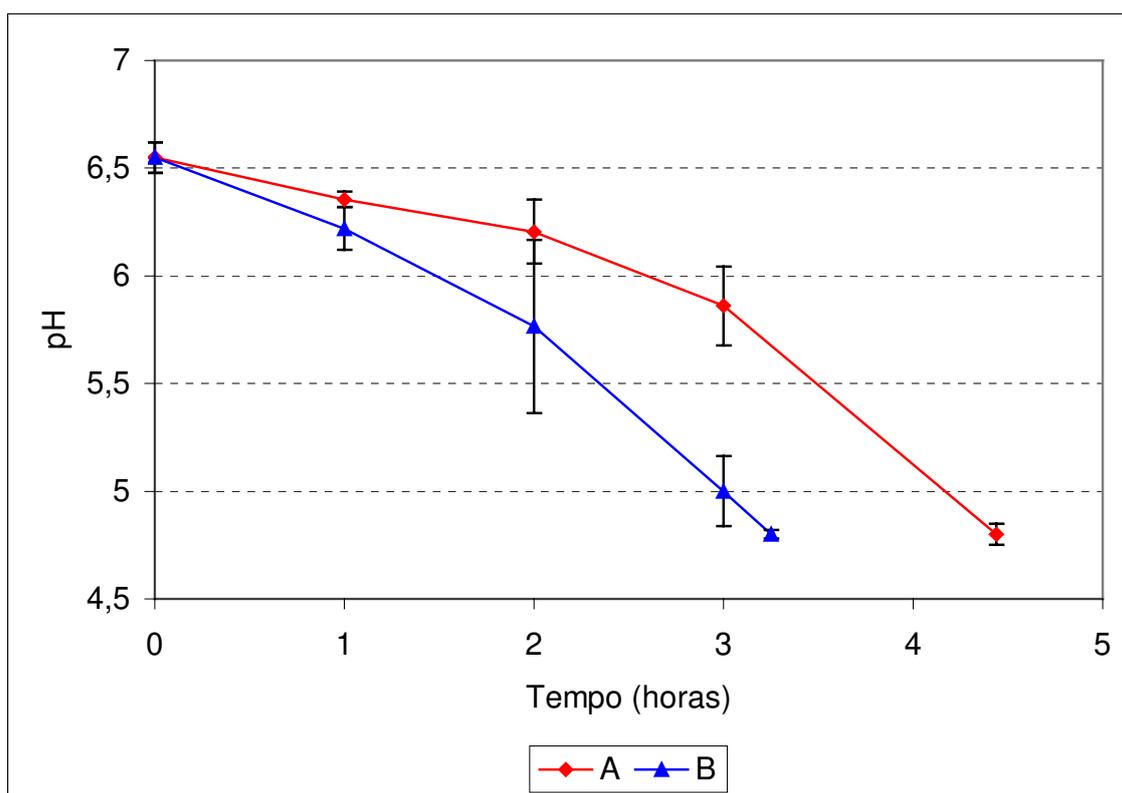


Figura 1. Evolução do pH durante a fermentação do iogurte. Iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1 (A) e com a presença de *P. freudenreichii* PS-1 (B).

A adição de *P. freudenreichii* PS-1 diminuiu significativamente o tempo de fermentação do iogurte como mostrado na Figura 1. O iogurte com *P. freudenreichii* PS-1 apresentou um tempo de fermentação de $3,25 \pm 0,25$ horas enquanto que o tempo de fermentação para o iogurte sem a propionibactéria foi $4,45 \pm 0,38$ horas. O menor tempo de fermentação do iogurte com a presença da propionibactéria está relacionado com a maior velocidade de produção de ácido láctico no iogurte com a presença da propionibactéria (Figura 4).

Tabela 2. Valores de pH dos iogurtes após 24 horas e 4 semanas de estocagem*.

Tempo de estocagem	Iogurte sem propionibactéria	Iogurte com propionibactéria
24 horas	$4,77 \pm 0,15$	$4,77 \pm 0,08$
4 semanas	$4,35 \pm 0,12$	$4,52 \pm 0,12$

A Tabela 2 mostra o valor de pH dos iogurtes após 24 horas e após 4 semanas de estocagem refrigerada. Os dois iogurtes permaneceram praticamente sem nenhuma queda no pH após 24 horas de estocagem refrigerada. O iogurte sem a propionibactéria apresentou um pH ligeiramente menor do que o iogurte com a propionibactéria, indicando uma pós-acidificação menos intensa no iogurte com a propionibactéria. Um importante ponto que pode ter influenciado a maior pós-acidificação do iogurte sem a propionibactéria foi a maior quantidade de *L. bulgaricus* ($4,68 \times 10^6$ UFC/mL., Figura 2) presente no início da fermentação em comparação ao iogurte com a propionibactéria ($2,40 \times 10^6$ UFC/mL., Figura 3). O desenvolvimento de *L. bulgaricus* também foi razoavelmente maior no iogurte sem a propionibactéria durante a fermentação (*L. bulgaricus* aumentou o seu número inicial de células em 148 vezes no iogurte padrão em comparação a 78 vezes no iogurte com a propionibactéria, Figuras 2 e 3), o que pode ter deixado as células de *L. bulgaricus* no iogurte padrão mais ativas resultando em uma maior pós-acidificação. Outro ponto que pode ter influenciado a menor pós-acidificação no iogurte com a propionibactéria foi o maior teor de ácido propiônico neste iogurte. Perez Chaia, De Saad, Holgado & Oliver (1995) mostraram que o teor de ácido propiônico pode ter um efeito inibitório ou estimulante em cepas de *Lactobacillus*, o que depende da sensibilidade de cada cepa ao

ácido. Na figura 6 podemos verificar que, durante toda a fermentação, o teor de ácido propiônico foi maior no iogurte com a propionibactéria.

3.3 Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante a fermentação do iogurte

A Figura 2 mostra a curva de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* para os iogurtes produzidos sem a presença da propionibactéria. *S. thermophilus* apresentou um aumento no seu número inicial de células em torno de 230 vezes ao final da fermentação do iogurte enquanto que *L. bulgaricus* apresentou um aumento de aproximadamente 150 vezes no seu número inicial de células. *S. thermophilus* começou a apresentar um desenvolvimento exponencial aproximadamente após 1 hora de fermentação enquanto que enquanto que *L. bulgaricus* começou a apresentar um desenvolvimento exponencial somente após 2 horas de fermentação. As células de *S. thermophilus* tenderam a diminuir a sua velocidade de desenvolvimento no final da fermentação (após 3 horas), o que não aconteceu com *L. bulgaricus*. Este comportamento concorda com o desenvolvimento associado existente entre estas duas linhagens em iogurte (Rasic & Kurmann, 1978), no qual *S. thermophilus* apresenta um maior desenvolvimento no início da fermentação com um maior desenvolvimento de *L. bulgaricus* quando o pH diminui. *S. thermophilus* apresenta um desenvolvimento mais acentuado no início da fermentação devido ao maior valor do pH e pela atividade proteolítica de *L. bulgaricus*. Conforme ocorre a diminuição do pH, as células *L. bulgaricus*, mais resistentes à acidificação do meio, se desenvolvem mais rapidamente podendo chegar a valores similares ou até maiores que o número de células de *S. thermophilus*.

B. animalis Bb 12 apresentou um lento desenvolvimento durante a fermentação do iogurte sem a propionibactéria (Figura 2), aumentando seu número de células em torno de apenas 4 vezes após a fermentação de 4,5 horas do iogurte.

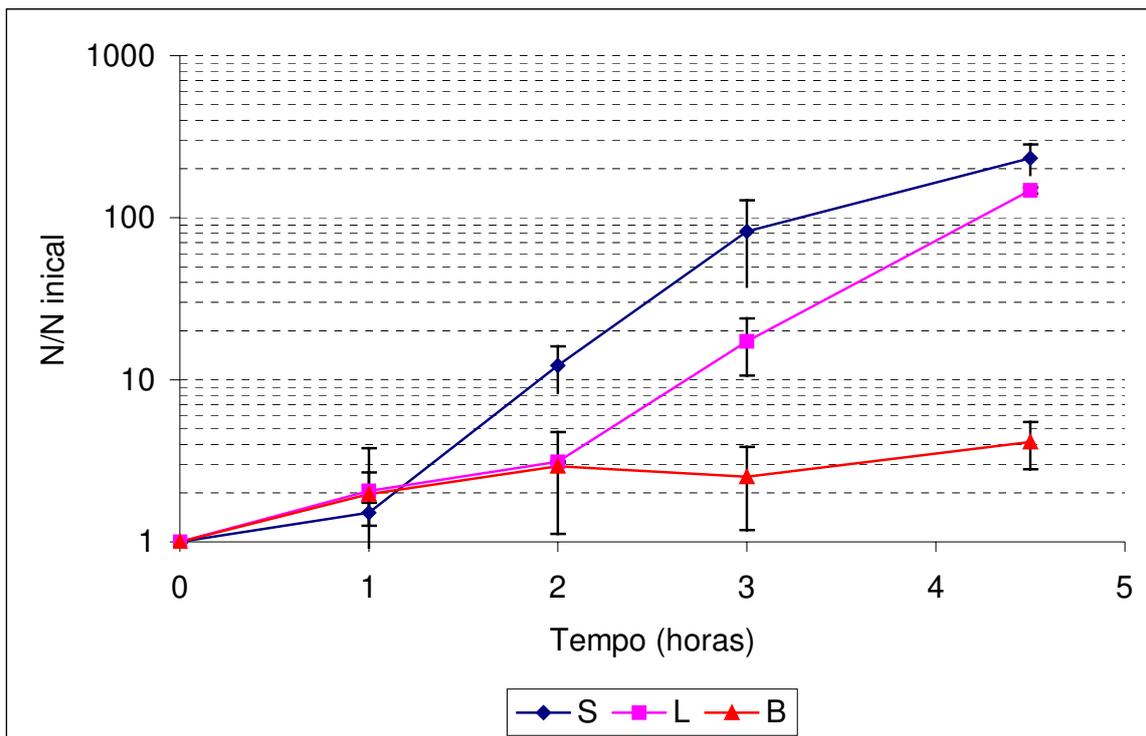


Figura 2. Razão de desenvolvimento (N/N_{inicial}) de *B. animalis* Bb 12 (B), *L. bulgaricus* (L) e *S. thermophilus* (S) durante a fermentação do iogurte. N_{inicial} para B, L e S foram $1,48 \times 10^7$, $2,33 \times 10^6$ e $4,68 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Ordenada em escala logarítmica.

A Figura 3 mostra as curvas de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, de *L. bulgaricus* e da contagem total de *P. freudenreichii* PS-1 mais *S. thermophilus* no iogurte produzido com a presença da propionibactéria. Não foi possível contar individualmente *P. freudenreichii* PS-1 e *S. thermophilus*, cujas colônias não apresentaram diferenças visuais no meio SMA. A contagem total de *P. freudenreichii* PS-1 e de *S. thermophilus* apresentou um desenvolvimento bastante rápido sem praticamente nenhuma fase de adaptação. *P. freudenreichii* PS-1 quando adicionado em leite juntamente com *B. animalis* Bb 12 (Capítulo 3) também praticamente não apresentou fase de adaptação de desenvolvimento. *L. bulgaricus* começou a apresentar um desenvolvimento exponencial logo após uma hora, o que só ocorreu após 2 horas no iogurte sem a propionibactéria (Figura 2).

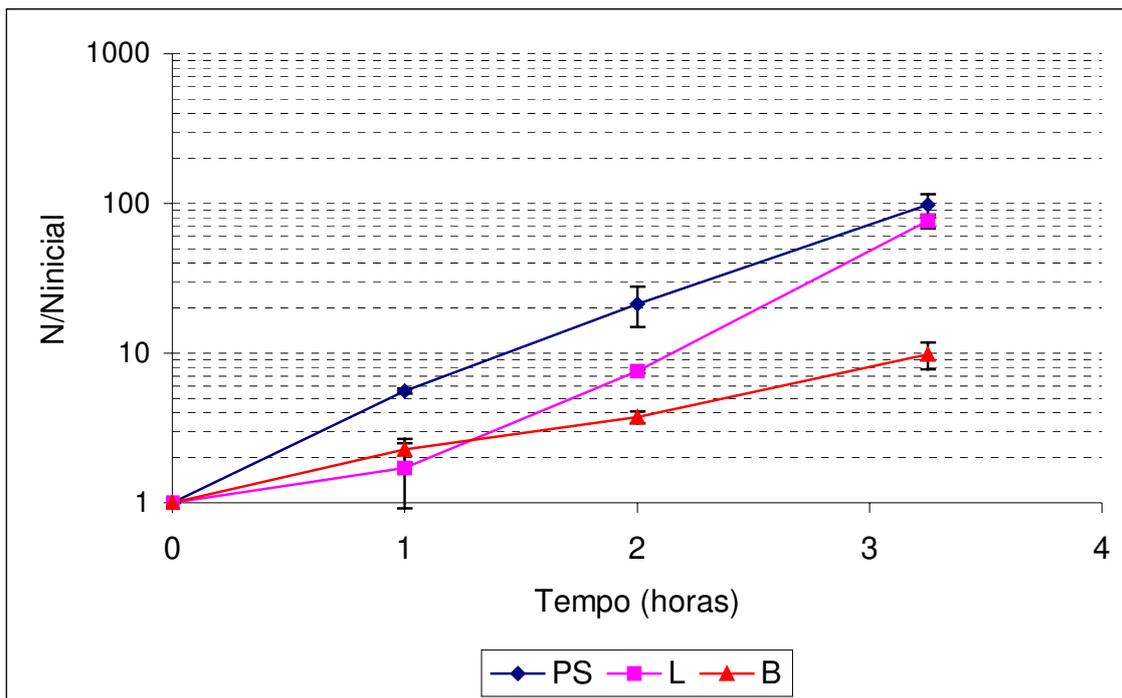


Figura 3. Razão de desenvolvimento (N/N_{inicial}) de *B. animalis* Bb 12 (B), *L. bulgaricus* (L) e da contagem total de *S. thermophilus* e *P. freudenreichii* PS-1 (PS) durante a fermentação do iogurte. N_{inicial} para B, PS e L foram $1,40 \times 10^7$, $1,82 \times 10^7$ e $2,64 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Ordenada em escala logarítmica.

B. animalis Bb 12 apresentou um aumento de cerca de 10 vezes o seu número inicial de células após um período de fermentação de cerca de 3,25 horas, contra um aumento de 4 vezes no seu número inicial de células em 4,45 horas de fermentação no iogurte sem a presença da propionibactéria. A presença de células ativadas de *P. freudenreichii* PS-1 revelou-se um bom promotor de desenvolvimento para *B. animalis* Bb 12 em iogurte pois além de aumentar o número final de células da bifidobactéria também diminuiu em cerca de 1,20 horas o tempo de fermentação do iogurte.

3.4 Teor dos ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico)

A quantidade dos ácidos lático, acético e propiônico produzidos por *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 nos inóculos usados para a produção dos iogurtes se encontra na Tabela 3. *S. thermophilus* produziu cerca de 6,91 mg de ácido

Tabela 3. Teor dos ácidos orgânicos produzidos pelas culturas do iogurte, *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 nos inóculos usados para a fermentação dos iogurtes.

	Ácido Láctico (mg/g)	Ácido Acético (mg/g)	Ácido Propiônico (mg/g)
<i>S. thermophilus</i>	6,91 ± 1,70	-	-
<i>L. bulgaricus</i>	5,95 ± 1,51	-	-
<i>B. animalis</i> Bb 12	2,36 ± 0,47	3,23 ± 0,13	2,73 ± 0,57
<i>P. freudenreichii</i> PS-1	5,15 ± 1,00	1,29 ± 0,04	5,49 ± 0,81

/g de iogurte nas 6-7 horas de fermentação do inóculo enquanto que *L. bulgaricus* produziu cerca de 5,95 mg/g em aproximadamente 14-15 horas. *B. animalis* Bb 12 e *P. freudenreichii* PS-1 produziram ácido láctico, acético e propiônico durante a fermentação dos inóculos. *B. animalis* Bb 12 produziu os três ácidos praticamente em proporções similares (2,36, 3,23 e 2,73 mg/g de ácido láctico, acético e propiônico, respectivamente). *P. freudenreichii* PS-1 produziu mais ácido propiônico e láctico (5,49 e 5,15 mg/g) com uma menor produção de ácido acético (1,29 mg/g).

A Figura 4 mostra uma produção de ácido láctico muito mais acentuada nos iogurtes produzidos com *P. freudenreichii* PS-1 (curvas B e C). Para estes iogurtes, a concentração de ácido láctico já se encontrava em 15 mg/g após a primeira hora da fermentação, aumentando rapidamente até um valor próximo a 7,10 mg de ácido láctico por grama de iogurte ao final da fermentação em 3,25 horas. Para o iogurte sem a propionibactéria (curva A), o teor de ácido láctico aumentou lentamente chegando a um valor de 1 mg/g somente após as duas primeiras horas da fermentação. Após este período, a produção de ácido láctico aumentou exponencialmente até o final da fermentação chegando a um valor de 7,23 mg/g.

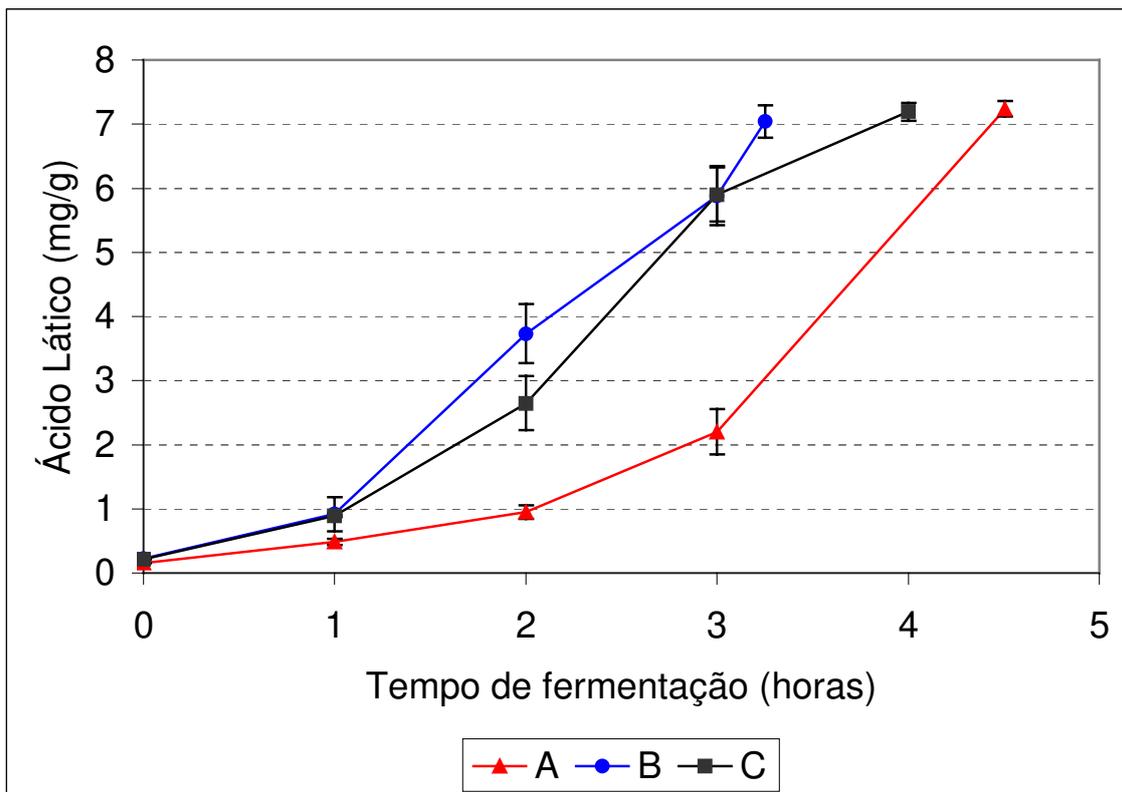


Figura 4. Produção de ácido láctico nos vários iogurtes estudados. A- iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1; B - iogurte com *P. freudenreichii* PS-1; C - iogurte com as culturas do iogurte e *P. freudenreichii* PS-1 sem a presença de *B. animalis* Bb 12.

A Figura 5 mostra um aumento no teor de ácido acético muito similar entre o iogurte produzido com e sem a presença de *P. freudenreichii* PS-1 (curvas E e D, respectivamente). O teor de ácido acético aumentou de 31,44 $\mu\text{g/g}$ no tempo zero (inoculação) para cerca de 244,24 $\mu\text{g/g}$ ao final das 4,45 horas de fermentação do iogurte sem a propionibactéria e de 44,52 $\mu\text{g/g}$ para 186,81 $\mu\text{g/g}$ ao final das 3,25 horas de fermentação do iogurte com a propionibactéria. A curva F mostra a produção de ácido acético no iogurte produzido com as culturas do iogurte e a propionibactéria, sendo que o teor de ácido acético aumentou continuamente de 13,89 até 125,53 $\mu\text{g/g}$ durante as 4 horas de fermentação.

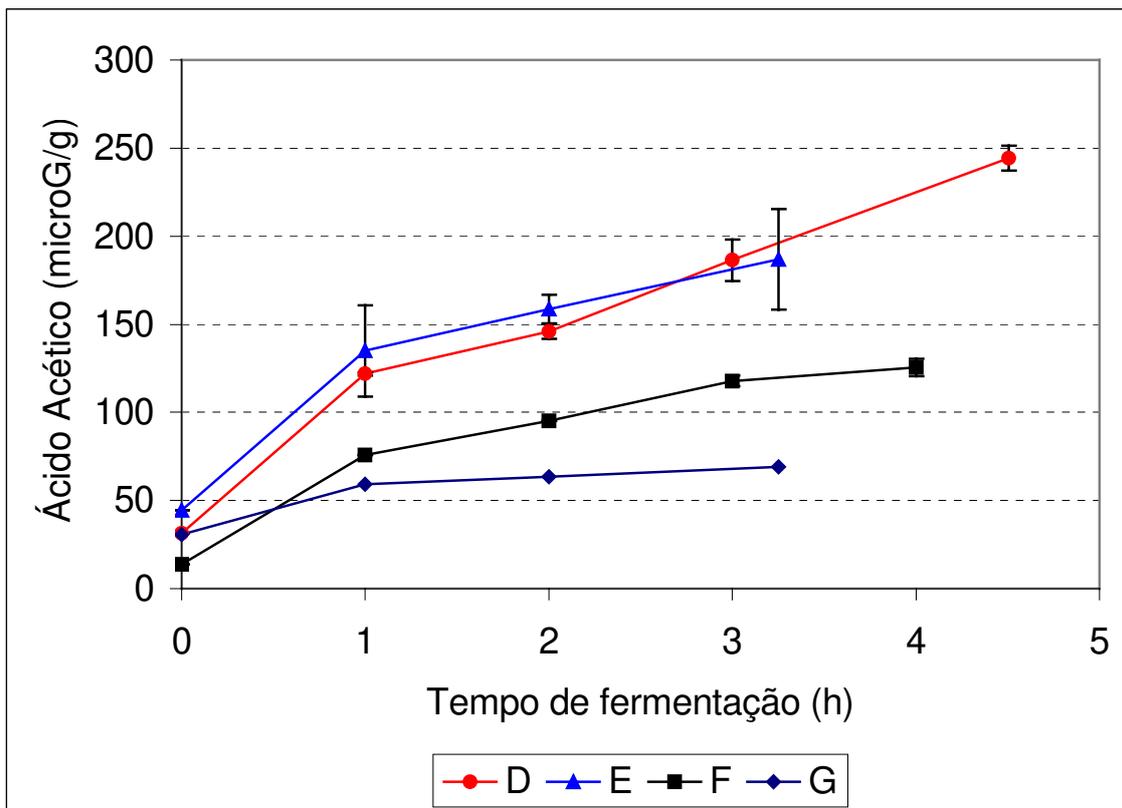


Figura 5. Produção de ácido acético nos vários iogurtes estudados. D- iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1; E - iogurte com *P. freudenreichii* PS-1; F - iogurte com as culturas do iogurte e *P. freudenreichii* PS-1 sem a presença de *B. animalis* Bb 12 e G – Diferença matemática entre a curva E e F.

Podemos calcular aproximadamente o teor de ácido acético produzido pela bifidobactéria no iogurte com os quatro microrganismos diminuindo o teor de ácido acético mostrado na curva E do teor de ácido acético mostrado na curva F. Apesar da bifidobactéria ter apresentado um maior desenvolvimento no número de células no iogurte com a presença da propionibactéria, a produção de ácido acético pela bifidobactéria (curva G) neste iogurte foi bastante inferior ao teor de ácido acético produzido pela bifidobactéria no iogurte sem a propionibactéria (curva D), onde o desenvolvimento da bifidobactéria foi menor. O teor de ácido acético produzido pela bifidobactéria no iogurte produzido com *P. freudenreichii* PS-1 (curva G) aumentou de 30,64 $\mu\text{g/g}$ no tempo zero (inoculação) para um teor de 68,99 $\mu\text{g/g}$ ao final da fermentação em 3,25 horas. Samona, Robinson & Marakis (1996) mostraram que o gênero *Bifidobacterium* geralmente apresenta o seu desenvolvimento desvinculado da produção de ácido. Através da comparação da curva F com a curva G,

podemos notar que o aumento no teor de ácido acético no iogurte produzido com *P. freudenreichii* PS-1 foi quase todo decorrente do metabolismo da propionibactéria com pouca influência do metabolismo da bifidobactéria.

A Figura 6 apresenta a produção de ácido propiônico durante a fermentação dos iogurtes. O teor de ácido propiônico no iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1 (curva H) aumentou de 31,45 µg/g até 89,58 µg/g ao final das 4,5 horas de fermentação. O iogurte com *P. freudenreichii* PS-1 (curva I) apresentou uma leve tendência de aumento na produção de ácido propiônico, passando de 82,61 µg/g para 105,33 µg/g ao final das 3,25 horas da fermentação. O iogurte produzido com as culturas do iogurte e *P. freudenreichii* PS-1 (curva J) apresentou o maior aumento no teor de ácido propiônico, passando de 51,16 µg/g para 174,45 µg/g ao final das 4 horas de fermentação do iogurte.

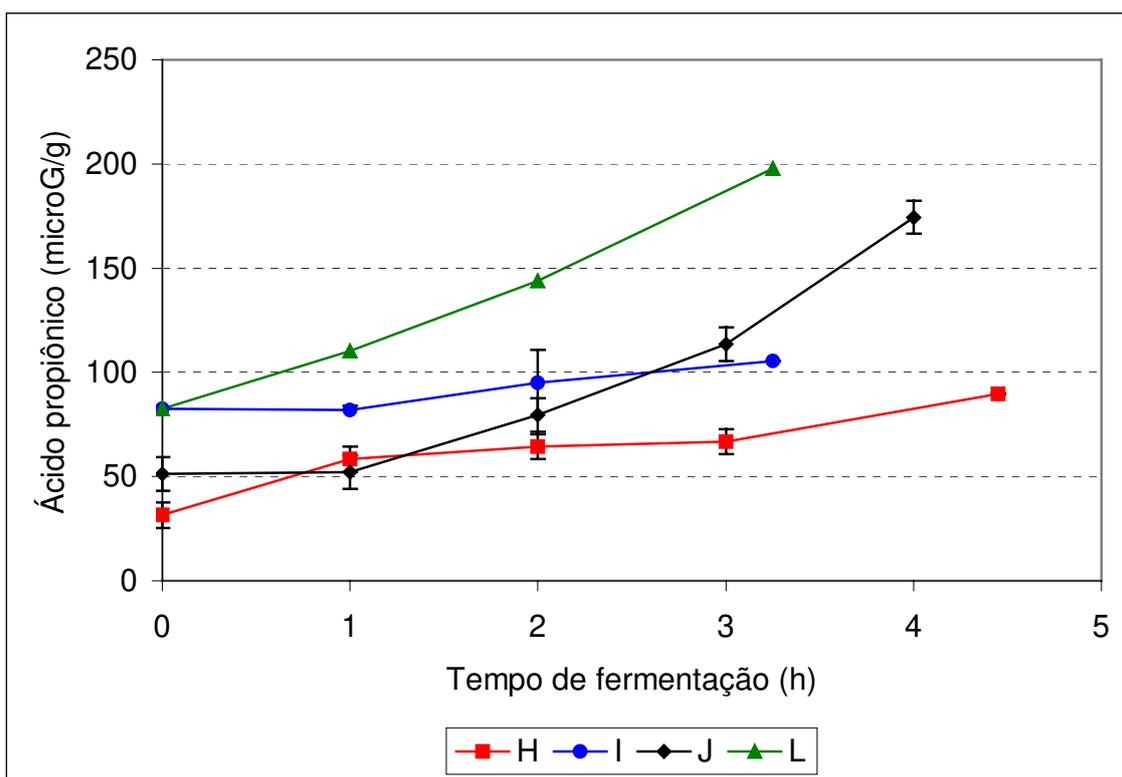


Figura 6 - Produção de ácido propiônico nos vários iogurtes estudados. H- iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1; I - iogurte com *P. freudenreichii* PS-1; J - iogurte com as culturas do iogurte e *P. freudenreichii* PS-1 sem a presença de *B. animalis* Bb 12 e L – Soma matemática entre a curva H e J.

Como a propionibactéria e a bifidobactéria são as únicas cepas produtoras de ácido propiônico, caso não tenha ocorrido nenhum antagonismo específico para a produção deste ácido entre a bifidobactéria e a propionibactéria no iogurte produzido com os quatro microrganismos, o teor final de ácido propiônico em um iogurte com estas quatro culturas deveria ser semelhante a soma dos ácidos mostrados nas curvas H e J. A curva L mostra a soma do ácido propiônico produzido no iogurte sem a propionibactéria (curva H) com o ácido propiônico produzido no iogurte sem a bifidobactéria (curva J). Entretanto, a produção de ácido propiônico obtida experimentalmente na curva I foi relativamente menor do que a concentração esperada na curva L. Este fato sugere que o ácido propiônico produzido pela propionibactéria possa ter sido consumido durante a fermentação do iogurte pela bifidobactéria, e este pode ter sido um dos fatores responsáveis pelo aumento na sua contagem final de células. Kaneko *et alii* (1994) demonstraram que ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, o butirato e principalmente o propionato, podem ser estimuladores de desenvolvimento para *Bifidobacterium*.

3.5 Viabilidade de *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* durante a estocagem refrigerada

A Figura 7 mostra a viabilidade das culturas do iogurte durante a estocagem refrigerada. A viabilidade de *S. thermophilus* no iogurte sem a presença da propionibactéria (curva A), apresentou um valor constante no número de células em torno de log 9 UFC/mL durante todo o período de estocagem. A contagem total de *S. thermophilus* e *P. freudenreichii* PS-1 também praticamente não apresentou queda no número de células, ficando em torno de log 9,1-9,2 UFC/mL durante toda a estocagem do iogurte. Surpreendentemente, a contagem de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* apresentou uma queda de aproximadamente 1 ciclo logarítmico após as duas primeiras semanas de estocagem para ambos os iogurtes produzidos com ou sem a presença da propionibactéria (curvas C e D, respectivamente). *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* é reconhecidamente mais resistente ao meio ácido que *S. thermophilus*. É provável que o teor de ácido acético e propiônico do meio produzidos tanto pela propionibactéria como pela bifidobactéria tenha sido responsável pela

diminuição da viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* durante a estocagem refrigerada. Samona *et alii* (1996) sugeriram que a pós-acidificação mais lenta em iogurtes probióticos com *Bifidobacterium* poderia estar relacionada ao efeito inibitório do ácido acético sobre as culturas do iogurte. Parker & Moon (1982) mostraram que dentre 16 misturas de *Lactobacillus* e *Propionibacterium*, apenas 1 delas não apresentou uma inibição no desenvolvimento ou na produção de ácido e CO₂. Perez Chaia *et alii* (1995) mostraram que, tanto em uma cultura mista ou em cultura pura de *Lactobacillus*, a medida que a concentração de ácido propiônico aumenta no meio, ocorreu uma inibição no desenvolvimento e um aumento na atividade fermentativa da cultura.

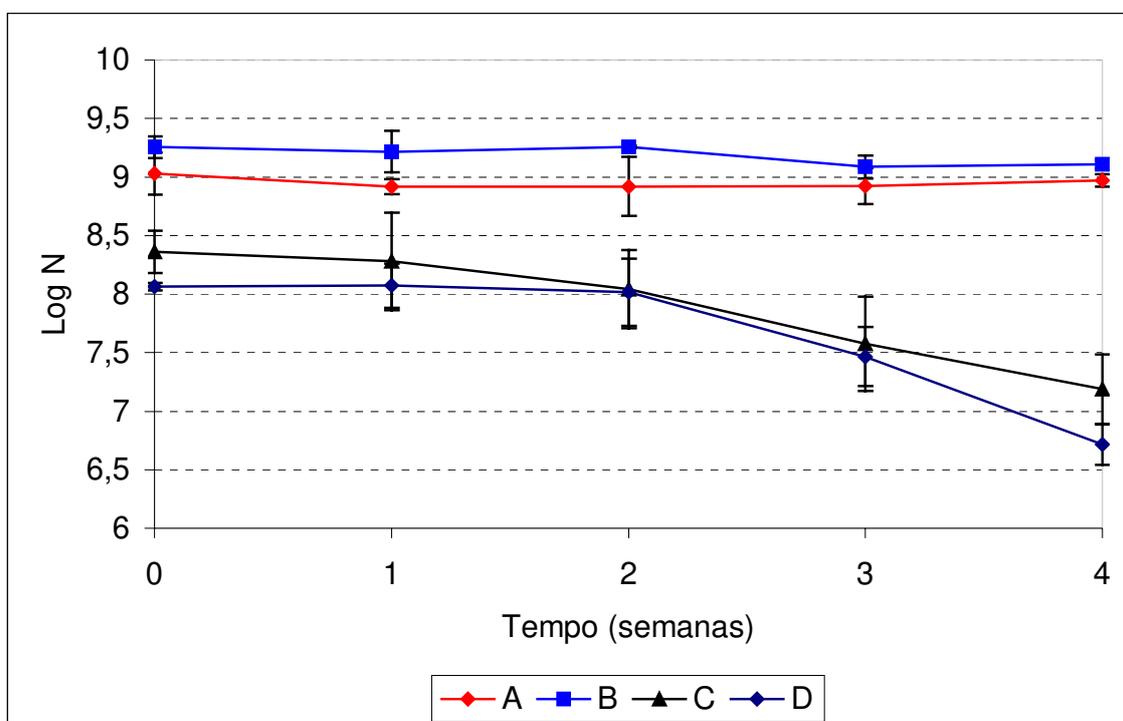


Figura 7. Contagem das culturas do iogurte durante a estocagem refrigerada. A - *S. thermophilus* em iogurte sem a presença da propionibactéria; B - Contagem total de *S. thermophilus* e *P. freudenreichii* PS-1 no iogurte com a propionibactéria; C - *L. bulgaricus* em iogurte sem a presença da propionibactéria e D - *L. bulgaricus* em iogurte com a presença da propionibactéria.

A Figura 8 apresenta a viabilidade de *B. animalis* Bb 12 durante a estocagem refrigerada do iogurte. A contagem de *B. animalis* Bb 12 apresentou uma menor redução no número de células viáveis no iogurte produzido com a propionibactéria (cerca de 0,3 ciclos

logarítmicos), enquanto que no iogurte sem a propionibactéria a queda foi aproximadamente 0,8 ciclos logarítmicos durante as quatro semanas de estocagem refrigerada. Kaneko *et alii* (1994) demonstraram que o gênero *Propionibacterium* produz um forte estimulador para *Bifidobacterium* em meios sintéticos: o 2-amino-3-carboxi-1,4-naftoquinona ($C_{11}H_7NO_4$). Yamazaki *et alii* (1999) demonstraram que esse estimulador funciona como mediador da reação de regeneração de $NAD(P)^+$, a qual permite a utilização do O_2 , aumentando a resistência do gênero *Bifidobacterium* a condição de aerobiose.

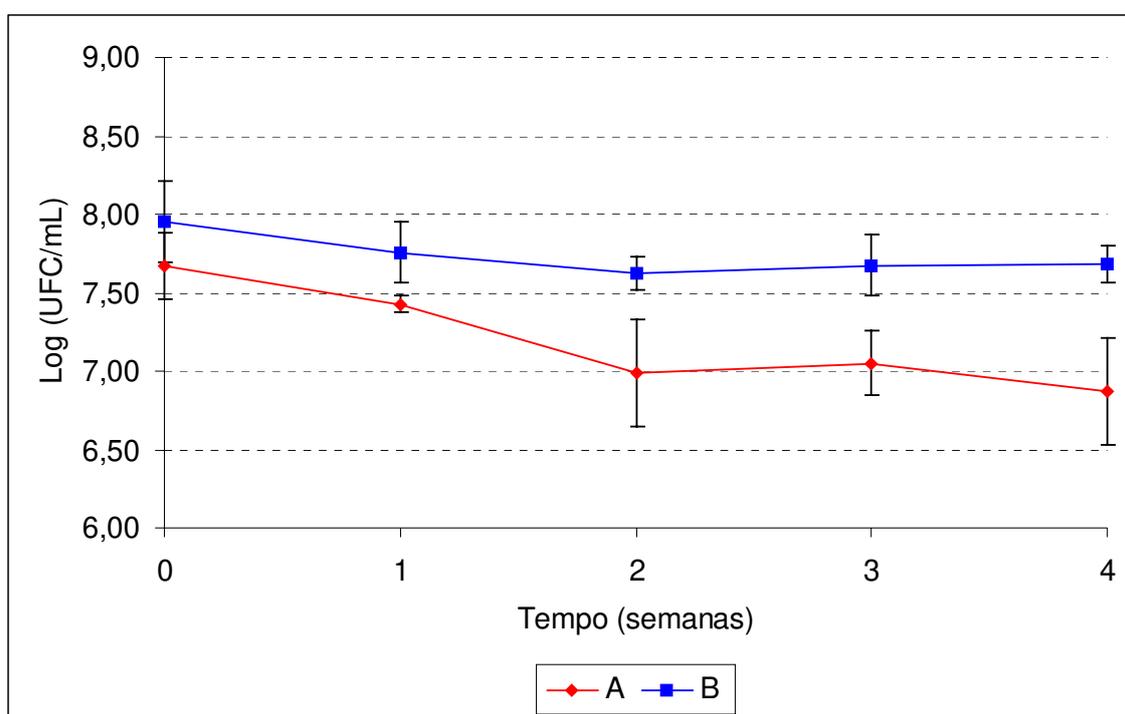


Figura 8. Contagem de *B. animalis* Bb 12 durante a estocagem refrigerada do iogurte. Iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1 (A) e com *P. freudenreichii* PS-1 (B).

3.6 Perfil de textura instrumental

A Tabela 4 apresenta os valores do perfil de textura instrumental para cada amostra de iogurte. O parâmetro fraturabilidade não foi avaliado pois a amostra se mostrou bastante adesiva e os dois parâmetros são mutuamente exclusivos (Szczesniak, Brandt & Friedman, 1963). O termo mastigabilidade não foi usado pela amostra ser semi-sólida. Os termos coesividade e elasticidade não apresentaram diferença significativa a $p < 0,05$ enquanto que

os termos dureza, adesividade e gomosidade apresentaram diferença significativa. O termo dureza pode ser avaliado conjuntamente com o parâmetro secundário gomosidade, que é bastante importante no caso do iogurte e é produto da dureza pela coesividade. A gomosidade do iogurte com *P. freudenreichii* PS-1 (B) apresentou um valor 31% maior do que a gomosidade do iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1. Apesar de não termos realizado nenhum teste sensorial entre as amostras, a gomosidade do iogurte com a propionibactéria foi visualmente maior, possuindo uma característica gomosa de culturas que produzem exopolissacarídeos (EPS). O gênero *Propionibacterium* pode ser produtor de exopolissacarídeos (de Vuyst & Degeest, 1999).

Podemos usar os gráficos sensoriais produzidos por Szczesniak *et alii* (1963) para termos uma idéia do que significam em termos sensoriais as unidades do texturômetro, transformando estas unidades instrumentais em unidades sensoriais facilitando assim a nossa interpretação dos resultados. Entretanto, é muito importante ressaltar que a discussão abaixo é ilustrativa, e visa dar uma idéia do que significam as unidades do texturômetro em termos sensoriais com o auxílio dos gráficos gerados por Szczesniak *et alii* (1963). A correlação exata dos parâmetros encontrados neste estudo não pode ser feita com os gráficos sensoriais de Szczesniak *et alii* (1963) pois não sabemos exatamente em quais condições foram feitas as medidas do texturômetro naquele trabalho e por isso não há como garantir que foram usadas as mesmas condições de análise no texturômetro, tanto de preparo de amostra como da padronização das velocidades de teste do equipamento. Pelas curvas de calibração de Szczesniak *et alii* (1963), uma diferença entre 79 e 115 no parâmetro gomosidade do texturômetro equivale aproximadamente a 0,5 unidades sensoriais em uma escala de 5 pontos onde os extremos da escala são: 1) pasta de farinha em uma solução a 40% em peso e 5) pasta de farinha em uma solução a 60% em peso. Uma medida de 79 unidades instrumentais estaria entre o valor 2 (pasta de farinha a 45% em peso) e o valor 3 (pasta de farinha a 50% em peso), enquanto que um valor instrumental de 115 estaria entre o valor 3 da escala sensorial (pasta de farinha a 50% em peso) e o valor 4 (pasta de farinha a 55% em peso). Essa relação nos dá uma idéia muito mais clara da grande diferença encontrada entre as duas amostras para o item gomosidade.

A adesividade é outro fator muito importante para a descrição da textura do iogurte, e a adição da propionibactéria aumentou significativamente este parâmetro. O iogurte com a

adição da propionibactéria apresentou uma adesividade de cerca de – 120 unidades do texturômetro contra um valor de – 80 unidades no iogurte sem a propionibactéria (Tabela 4). Fazendo o mesmo raciocínio anterior, esta diferença equivale aproximadamente 1 unidade sensorial em uma escala de 5 pontos onde os extremos são: 1) gordura vegetal hidrogenada e 5) manteiga de amendoim. Um valor de –80 estaria entre a escala 1 (gordura vegetal hidrogenada) e a escala 2 (massa de biscoito), enquanto que a adesividade de –120 estaria entre a unidade sensorial 2 (massa de biscoito) e a unidade sensorial 3 (“cream cheese”, marca “Philadelphia”).

Tabela 4. Perfil de textura instrumental (TPA) dos iogurtes produzidos sem a presença de *P. freudenreichii* PS-1 (A) e com *P. freudenreichii* PS-1 (B).

Parâmetros	A	B
Dureza*	103,23 ± 13,46	186,91 ± 60,71
Adesividade*	-80,02 ± 28,31	-121,43 ± 1,62
Elasticidade	0,96 ± 0,06	0,81 ± 0,36
Coesividade	0,78 ± 0,02	0,65 ± 0,16
Gomosidade*	79,75 ± 12,78	115,98 ± 9,07

* Parâmetros que apresentaram uma diferença significativa a $p > 0,05$. Iogurte padrão sem *P. freudenreichii* PS-1 (A) e iogurte teste com *P. freudenreichii* PS-1 (B).

3.7 Separação de soro

A adição da propionibactéria diminuiu significativamente a sinerese do iogurte (Figura 9). Ao final da primeira semana, a separação de soro do iogurte sem a propionibactéria já estava entre 2 e 3% do peso total do iogurte, sendo que para o iogurte com a propionibactéria este valor foi aproximadamente 1 % e só chegou a ficar entre 2 e 3% na última semana de estocagem. A menor separação de soro no iogurte com a propionibactéria pode ter sido também resultado da produção de EPS por parte da propionibactéria, produzindo uma matriz mais densa com menor tendência de expulsão do soro. Em decorrência dessa diferença na separação de soro, o iogurte com a presença da

propionibactéria se mostrou visualmente muito mais adequado do que o iogurte sem a propionibactéria.

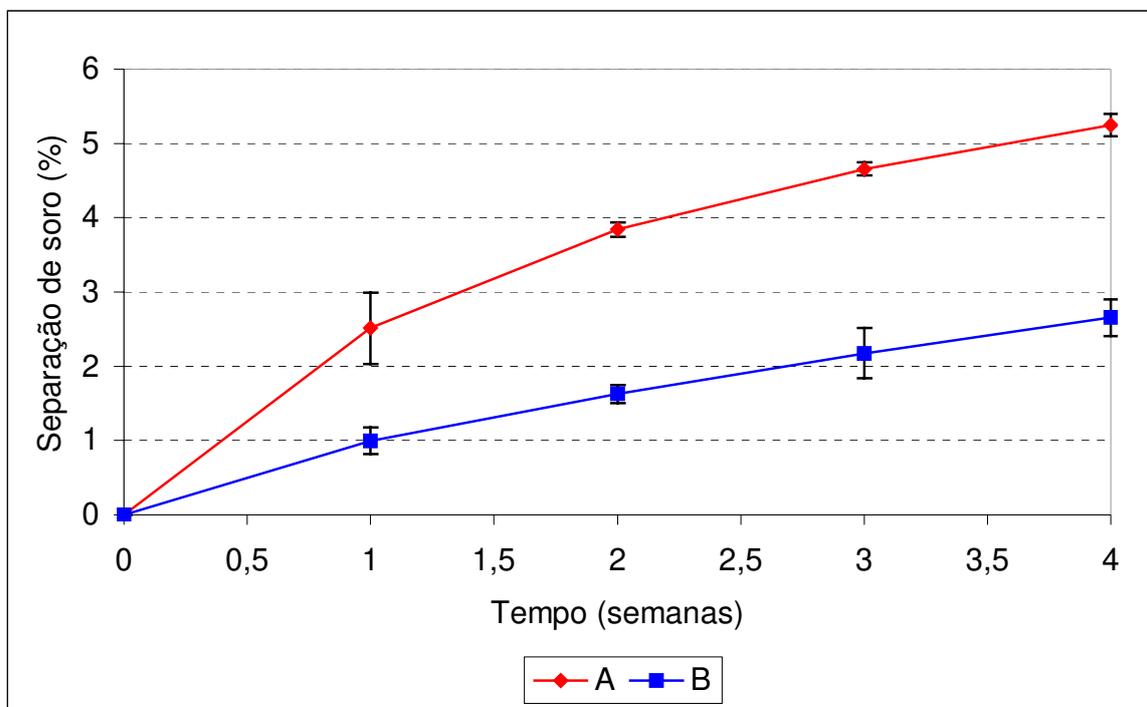


Figura 9. Separação de soro (em porcentagem) dos iogurtes durante a estocagem refrigerada. Iogurte sem *P. freudenreichii* PS-1 (A) e com *P. freudenreichii* PS-1 (B).

4. Conclusão

A adição de células ativas de *P. freudenreichii* PS-1 apresentou-se como um bom promotor de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação do iogurte, aumentando em duas vezes o seu número final de células viáveis, além de reduzir o tempo de fermentação em aproximadamente 1,2 horas. A presença da propionibactéria também aumentou a resistência da bifidobactéria à estocagem refrigerada, o que foi evidenciado pela menor redução no número de células viáveis no iogurte com a propionibactéria quando comparado ao iogurte sem a propionibactéria. A presença da propionibactéria também alterou significativamente a textura final do iogurte, aumentando consideravelmente a gomosidade e adesividade do produto final. O iogurte produzido com a propionibactéria também apresentou uma menor separação de soro durante a estocagem e uma menor tendência a pós-acidificação.

5. Referências bibliográficas

- Dave, R.I., Shah, N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E., Szczesniak, A.S. (1963). The texturometer – a new instrument for objective texture measurement. *Journal of Food Science* 28: 390-396.
- Gilliland, S.E., Reilly, S.S., Kim, G.B, Kim, H.S. (2002). Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobactéria in a yogurt-like product. *Food Microbiology and Safety*, 67 (8) 3091-3095.
- Huang, Y., Adams M.C. , (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibactéria, *International Journal of Food Microbiology*, 15, 91(3) 253-260.
- Huang, Y., Kotula, L., Adams, M.C. (2003). The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. *Food and Chemical Toxicology* 41, 1781-1787.
- Kaneko, T., Mori, H., Iwata, M., Meguro, S. (1994). Growth stimulator for *Bifidobacterium* produced by *Propionibacterium freudenreichii* and several intestinal bacteria. *Journal of Dairy Science*, 77, 393-404.
- Klaver, F.A., Kingma, F., Weerkamp, H. (1993). Growth and survival of bifidobactéria in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal* 47, 151-164.
- Laroia, S., Martin, J.H. (1991). Methods for enumerating and Propagating Bifidobactéria. *Cultured Dairy Products Journal*, May, 32-33.
- Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H. (1998). Whey separation in acid skim milk gels made with glucono-delta-lactone: Effects of heat treatment and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 29 (4) 413-426.
- Mori, H., Sato, Y., Taketomo, N., Kamiyama, T., Yoshiyama, Y., Meguro, S., Sato, H., Kaneko, T. (1997). Isolation and structural identification of bifidogenic growth stimulator produced by *Propionibacterium freudenreichii*. *Journal of Dairy Science*, 80, 1959-1964.
- Parker, J.A., Moon, N.J. (1982). Interactions of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* in mixed culture. *Journal of Food Protection*, 45, (4) 326-330.

- Perez Chaia, A., De Saad, A.M.S., Holgado, A.P.R., Oliver, G. (1995). Short-chain fatty acids modulate growth of lactobacilli in mixed culture fermentations with propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology* 26, 365-374.
- Rasic, J. L., Kurmann, J. A. (1978). *Yoghurt: Scientific grounds, technology, manufacture and preparations*. Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, 466 p.
- Rawson, H.L., Marshall, V.M. (1997). Effect of “ropy” strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 32, 213-220.
- Rinta-Koski, M., Beasley, S., Montonen, L., Mantere-alhonen, S. (2001). Propionibacteria isolated from rumen used as possible probiotics together with bifidobacteria. *Milchwissenschaft* 56 (1) 11-13.
- Rosenthal, I., Bernstein, S. (1998). The survival of a commercial culture of bifidobacteria in milk products. *Milchwissenschaft* 53 (8), 441-443.
- Salminen, S., Wright, A., Decker, M. (1993). *Lactic Acid Bacteria*. Editora Marcell Dekker Inc., New York, USA, 442p.
- Samona, A., Robinson, R.K., Marakis, S. (1996). Acid production by bifidobacteria and yogurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13, 275-280.
- Shah, D. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.
- Shihata, A., Shah, N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10, 401-408.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, E.A. (1965). In *El mundo de los Microbios*, Editora Aguilar, Madrid, Espanha, 724p.
- Szczesniak, A.S., Brandt, M.A., Friedman, H.H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, 28, 397-403.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2003). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 117-124.

- Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, O., Kaneko, T., Hoshino, K., Tanaka, T. (1998). Production of a mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co-culture of *Bifidobacterium longum* and *Propionibacterium freudenreichii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (8) 1522-1527.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Vinderola, C.G., Mocchiutti, P., Reinheimer, J.A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85, 721-729.
- de Vuyst, L., Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 23, 153-177.
- Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T. (1998). Mechanistic study on the roles of a bifidogenetic growth stimulator based on physicochemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1425, 516-526.
- Yamazaki, S., Kano, K., Ikeda, T., Isawa, K., Kaneko, T. (1999). Role of 2-amino-3-carboxy-1,4-naphthoquinone, a strong growth stimulator for *Bifidobacterium*, as an electron transfer mediator for NA(P)⁺ regeneration in *Bifidobacterium longum*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428, Issues2-3, 241-250.
- Zarate, G., Morata, D., Chaia, A.P., Gonzalez, S.N. (2002). Adhesion of dairy propionibacteria to intestinal epithelial tissue in vitro and in vivo, *Journal of Food Protection* 65, Mar (63) 534-539.

CAPÍTULO V

EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO DO LEITE SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Bifidobacterium animalis Bb 12* EM IOGURTE E SOBRE A SUA VIABILIDADE DURANTE A ESTOCAGEM REFRIGERADA

Artigo será submetido para publicação no “International Dairy Journal”

Efeito do tratamento térmico do leite sobre o desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 em iogurte e sobre a sua viabilidade durante a estocagem refrigerada

Luciano Fachin; Walkiria Viotto*

Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos -
UNICAMP - CP 6121 CEP 13083-970 Campinas SP - Brasil.

Resumo

A produção de iogurtes com *Bifidobacterium* spp. tem crescido muito nas últimas décadas. Um dos maiores problemas para a produção de iogurtes com bifidobactérias é a dificuldade de manutenção de um número mínimo de células viáveis durante toda a estocagem refrigerada do produto. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento térmico do leite sobre o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação e sobre a sua resistência à estocagem refrigerada, bem como monitorar as possíveis alterações na textura final do produto, na sinerese e na pós-acidificação do iogurte. O tratamento térmico de 142°C/15 s do leite não afetou o tempo de fermentação do iogurte e o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação, também não influenciou o número de células viáveis de *B. animalis* Bb 12 durante a estocagem refrigerada, além de não ter afetado a pós-acidificação do iogurte. Entretanto, este tratamento alterou significativamente a textura, diminuindo consideravelmente a dureza, gomosidade e adesividade do iogurte, bem como resultou em um produto com menor separação de soro durante a estocagem.

* Autor para correspondência: (55) (019) 3788 3988 e Fax (55) (019) 3289 3617. E-mail: walkiria@fea.unicamp.br

1. Introdução

O gênero *Bifidobacterium* spp. tem sido usado em iogurtes devido as suas propriedades terapêuticas e nutricionais. Entretanto, o ambiente do iogurte não é adequado para o desenvolvimento e a manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium*. Alguns dos principais fatores que contribuem para o fraco desenvolvimento dessas culturas em iogurte são a acidez do iogurte, (Vinderola, Bailo & Reinheimer, 2000), a sensibilidade dos probióticos ao oxigênio (Talwalkar & Kailasapathy, 2003), as interações (antagonismo) com as culturas do iogurte (Vinderola, Mocchiutti & Reinheimer, 2002, Dave & Shah, 1997), a fraca atividade proteolítica destas culturas em leite (Klaver, Kingma & Weerkamp, 1993, Shihata & Shah, 2000) e as condições de estocagem do iogurte (Vinderola *et alii*, 2000). Por conseqüência, vários são os estudos que podem ser encontrados na literatura que mostram uma queda na viabilidade de *Bifidobacterium* em leites acidificados ou iogurtes com o tempo de estocagem refrigerada (Vinderola *et alii*, 2000; Dave & Shah, 1997; Rosenthal & Bernstein, 1998; Gilliland, Reilly, Kim & Kim, 2002). O grau de queda no número de células viáveis durante a estocagem é bastante variável, podendo ser de uma leve diminuição (Dave & Shah, 1997; Gilliland *et alii*, 2002) até uma queda de 4 ciclos logarítmicos no final da estocagem do produto (Vinderola *et alii*, 2000).

A lactulose é um dissacarídeo onde o resíduo glicose da lactose foi isomerizado à frutose e o seu papel como fator de desenvolvimento do gênero *Bifidobacterium* tem sido demonstrado por alguns pesquisadores (Mizota, 1996; Tamura, Mizota, Shimamura & Tomita, 1993). A isomerização da lactose a lactulose é induzida em tratamentos térmicos intensos (Andrews, 1986; Martinez-Castro & Olano, 1980). A lactulose não é encontrada em leite cru ou em leite pasteurizado e, no leite esterilizado, aparece na forma livre ou ligada a aminogrupos das proteínas do leite. A isomerização também é grandemente afetada pelo pH, sendo que a neutralização a pH 7-7,5 aumenta o grau de isomerização a até 13,7% (Martinez-Castro & Olano, 1980). Assim, a possibilidade de se produzir iogurtes probióticos com leites processados com tratamentos térmicos intensos visando o aumento do teor de lactulose para a melhorar a sobrevivência e manutenção de *Bifidobacterium* durante o período de estocagem refrigerada representa um tema muito interessante a ser investigado.

Por outro lado, o tratamento térmico intenso necessário à produção da lactulose também pode afetar grandemente a estrutura do iogurte, devido à interação que ocorre entre as proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactalbumina) com a k-caseína das micelas (Lucey, Tamehana, Singh & Munro, 1998; Corredig & Dalgleish, 1996; Mottar, Bassier, Joniau & Baert, 1989). O tratamento térmico é geralmente usado pela indústria para aumentar a capacidade de retenção de água das proteínas e melhorar a textura final do iogurte. A interação entre as proteínas do leite depende da intensidade e tempo do tratamento térmico. Formam-se prolongamentos a partir da superfície da micela de caseína, que atuam como pontes que aumentam as ligações cruzadas entre as proteínas (Mottar *et alii*, 1989; Lucey *et alii*, 1998). Essa interação determina a estrutura final dos iogurtes produzidos com leites tratados termicamente, e conseqüentemente sua textura e aceitabilidade. Portanto, é provável que o uso de um tratamento térmico intenso diferente do tradicional provoque mudanças na textura final do produto.

O perfil de textura instrumental (TPA), com o uso do texturômetro TA-XT2 (Stable Micro Systems), tem sido usado para monitorar a textura final dos géis do iogurte (Rawson & Marshall, 1997). O perfil de textura instrumental possui os seguintes termos comumente usados: dureza, elasticidade, adesividade, coesividade, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade. A viscosidade também pode ser medida com o texturômetro e está incluída no perfil de textura original descrito por Szczesniak, Brandt & Friedman (1963), mas geralmente não é incluída dentro do perfil de textura instrumental (Rosenthal, 1999). A sinerese do iogurte também é um importante parâmetro para a aceitabilidade do produto final frente ao consumidor. Lucey *et alii* (1998) usou a medida de separação de soro de géis ácidos de leite produzidos com glucono- δ -lactona como uma avaliação rápida e eficiente da textura dos géis de iogurte frente a diferentes condições de processo como diferentes tratamentos térmicos do leite e diferentes temperaturas de geleificação.

O objetivo deste trabalho foi estudar o uso de um tratamento térmico UHT de 142°C/12 segundos comparado ao tratamento térmico tradicional de 90°C/5 minutos visando avaliar o seu efeito sobre o desenvolvimento de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 durante a fermentação e sobre a sua resistência à estocagem refrigerada por 4 semanas, bem como monitorar as possíveis mudanças na textura e separação de soro dos iogurtes.

2. Matériel e Métodos

2.1 Culturas

A cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* Bb 12 foi cedida pela Chr. Hansen Indústria e Comércio Ltda (Valinhos-SP/Brasil) e as culturas liofilizadas de *Streptococcus thermophilus* A e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 18 pela Wiesby Starter Cultures and Media.

2.2 Manutenção e ativação das culturas

O inóculo de *B. animalis* Bb 12 foi preparado com leite em pó reconstituído a 12% de sólidos, suplementado com 1% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C por 10 minutos. A ativação da cultura liofilizada de *B. animalis* Bb 12 foi feita até a coagulação do leite (37°C por 6 horas). O inóculo das culturas do iogurte foi preparado com leite em pó desnatado reconstituído (11% de sólidos) e esterilizado 115°C por 10 minutos. As culturas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram ativadas à 37°C até coagulação do leite (6-7 horas para *S. thermophilus* e 14-15 horas para *L. bulgaricus*).

2.3 Sistema modelo para avaliação do desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em iogurte com lactulose

Para a avaliação da capacidade da lactulose de promover o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em iogurte, o seguinte sistema modelo foi conduzido: células ativas foram inoculadas em leite pasteurizado (25 mL) contido em tubos de vidro na proporção de 1:1:1. O volume de inóculo foi 2,5% e as amostras foram incubadas a 37°C até a fermentação do iogurte a pH 4,6. O número de células viáveis de *B. animalis* Bb 12 foi quantificado no início (inoculação) e após a fermentação do iogurte até pH 4,6. Foram produzidos: um iogurte padrão com *Bifidobacterium* e as culturas do iogurte e o iogurte teste com *Bifidobacterium* e as culturas do iogurte com a adição de 2% de lactulose. O iogurte teste e o iogurte padrão sempre foram produzidos nos mesmos dias sob as mesmas condições de inóculo e incubação para diminuir o erro experimental e aumentar a sensibilidade do teste.

O meio RCPB pH5 (Capítulo I) foi usado para a contagem de *B. animalis* Bb 12, sendo incubado a 37°C, por 3 dias, em condição de anaerobiose. A avaliação da velocidade de desenvolvimento da bifidobactéria foi feita (baseado no tempo de geração descrito por Stanier, Doudoroff & Adelberg (1965), através do cálculo do tempo (em horas) para que o inóculo completasse uma divisão celular (TDC):

$$\text{TDC} = \frac{\text{tempo de fermentação (horas)}}{\text{número de divisões celulares}} \text{ [horas/1 divisão]}$$

sendo que:

$$\text{Número de divisões celulares} = nd = \frac{(\log N - \log N_{\text{inicial}})}{0,301}$$

Onde: N e N_{inicial} são os valores do número de células no momento da inoculação (N_{inicial} , em UFC/mL) e quando o pH atinge 4,6 (N, em UFC/mL); 0,301 vem da correção da base do logaritmo de 10 para 2. Os iogurtes foram feitos em quadruplicata. Os tempos de divisão celular (TDC) foram comparados por Análise de Variância (Anova) de fator único, utilizando o software Excell for Windows (Microsoft®).

2.4 Produção do iogurte

Iogurte controle: leite cru integral (4 L) foi adicionado de 2% de leite em pó integral e aquecido a 70°C. O leite foi então homogeneizado a 200 Bar em um homogeneizador Niro Soavi TYPE NS 2006H de duplo estágio. Após a homogeneização, o leite foi tratado termicamente a 90°C por 5 minutos em um banho de água aquecido com vapor. Após este aquecimento, o leite foi resfriado até 20°C em um banho gelado e armazenado em geladeira (7°C) por 1 noite. Dois litros do leite resfriado foram inoculados com 1% de cada uma das culturas ativas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. animalis* Bb 12. Após a inoculação, o leite foi dividido em 7 copos plásticos de 200 mL cada um, sendo que o restante do leite foi descartado. Os copos foram selados e colocados em um banho de água a 37±1°C. O banho de água foi colocado no interior de uma capela de fluxo laminar para que as medidas de pH e as amostras para microbiologia e HPLC pudessem ser coletadas de forma asséptica. Um

dos potes plásticos de cada iogurte foi sempre usado para as medidas do pH durante a fermentação. Um segundo pote foi sempre usado para a coleta das amostras para as medidas de microbiologia e de HPLC durante a fermentação. O iogurte foi fermentado até que o pH atingisse o valor de 4,8. Os copos plásticos foram então retirados e resfriados em banho de gelo por 1 hora até que a temperatura do interior dos frascos atingisse cerca de 12°C e foram então transferidos e mantidos em geladeira (7°C) por um período de 4 semanas para a avaliação do iogurte durante a estocagem refrigerada. O processo de produção do iogurte foi feito em duplicata.

Iogurte teste: leite cru integral (15 litros) foi adicionado de 2% de leite em pó integral e tratado termicamente a 142°C por 15 segundos em uma planta piloto de UHT da GEA Tuchenhagen do Brasil, com aquecimento tubular indireto e homogeneização não-asséptica de 200 Bars a 70°C. O leite foi envasado em uma capela de fluxo laminar em garrafas PET e armazenado em geladeira por 1 noite até a produção dos iogurtes, que foi feita da mesma forma descrita para o iogurte tradicional.

2.5 Medidas de pH

As medidas de pH do leite e do iogurte foram feitas em um pHmetro WTW modelo pH 320. O pH do leite antes da inoculação foi medido e considerado como o pH inicial do iogurte antes da fermentação. A cada uma hora, o mesmo pote plástico foi retirado do banho e a medida de pH foi realizada em fluxo laminar. Após a medida ser realizada, o pote plástico foi novamente selado e recolocado no interior do banho de água. O pH foi também medido após 24 horas e 30 dias de estocagem dos iogurtes.

2.6 Teor dos ácidos orgânicos durante a fermentação dos iogurtes

A preparação das amostras para a determinação dos ácidos (lático, acético e propiônico) por HPLC foi realizada pelo procedimento abaixo:

5 gramas de iogurte foram pesados em tubos de vidro e adicionados de 4,6 mL de fase móvel (ácido perclórico pH 1,9), 0,2 mL de Carrez 1 (53,4 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ /100 mL água) e 0,2 mL de Carrez 2 (17,2 g de $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ /100 mL de água) para a precipitação

da proteína, sendo que o peso total foi anotado após a adição da fase móvel e do carrez 1 e 2. O tubo de rosca foi agitado por 20 segundos manualmente e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado com membranas de acetato de celulose de 0,45 µm (Millipore®) e as amostras injetadas no cromatógrafo.

Foi usado um cromatógrafo SHIMADZU LC 10A, do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA-UNICAMP. O cromatógrafo foi equipado com uma coluna SHIMADZU SHIM-PACK SCR101H e detector de ultravioleta SPD M 10A para os testes de determinação dos ácidos orgânicos. As amostras filtradas foram injetadas na coluna a uma temperatura de 65°C, com fluxo de 0,7 mL /minuto e fase móvel de ácido perclórico a pH 1,9. O volume de injeção das amostras foi 20 µl. Os ácidos foram identificados pelos respectivos tempos de retenção dos seus padrões (marca Supelco-Sigma) e suas medidas foram feitas pelo método de padronização externa. O teor dos ácidos no tempo zero foi estimado pela soma dos teores existentes nos inóculos de cada iogurte. As amostras foram retiradas nas primeiras três horas de fermentação (da mesma forma que as medidas de pH) e a última amostra foi feita quando o iogurte atingiu o pH 4,8.

2.7 Contagem microbiológica

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. animalis* Bb 12 foram feitas nas primeiras três horas de fermentação e quando o iogurte atingiu o pH 4,8. Os gráficos da enumeração dos microrganismos em função do tempo foram construídos usando-se a razão N/N_{inicial} em função do tempo (Figuras 2 e 3), onde N_{inicial} e N são os valores do número de células (em UFC/mL) no momento da inoculação e em cada tempo avaliado.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* foram contados em meio Skim Milk Agar (SMA) após incubação em condição de aerobiose a 37°C por 72 horas. SMA foi produzido acrescentando ao meio comercial PCA (Difco) 100 mL de leite desnatado reconstituído a 10% para 1 litro de PCA. O leite reconstituído foi esterilizado a 115°C por 10 minutos e adicionado ao meio PCA comercial esterilizado a 121°C por 15 minutos em câmara de fluxo laminar. As colônias de *L. bulgaricus* foram melhores visualizadas contra luz transmitida em um estereoscópio (15-20 vezes de aumento). A esterilização do leite deve

ser feita no máximo a 115°C por 10 minutos, pois tratamentos mais intensos provocam uma caramelização do leite, dificultando muito a visualização das colônias de *L. bulgaricus*.

O meio RCPB pH5-Liver foi produzido através da fortificação do meio RCPB pH5 com infusão de fígado desidratado (150 mL/L) para propiciar o aumento do diâmetro das colônias de *B. animalis* Bb 12 (ver Capítulo II). A infusão de fígado foi preparada segundo Laroia & Martin (1991) e esterilizada separadamente a 121°C/15 minutos (tanto o precipitado quanto o sobrenadante da extração foram esterilizados no mesmo frasco). Para a adição posterior no meio, o extrato foi deixado a decantar a temperatura ambiente após a esterilização. A água do meio RCA (OXOID) e o sobrenadante da infusão de fígado desidratado (150 mL/L) foram adicionados ao meio RCA em fluxo laminar sendo o pH do meio ajustado para 5. O meio foi então esterilizado a 121°C por 15 minutos. O corante Azul da Prússia foi pesado a 0,03% do volume final do meio e adicionado de água (12% do teor de água final do meio) e esterilizado a 121°C por 15 minutos. O volume de água em que o meio RCA foi dissolvido foi calculado diminuindo o respectivo volume da infusão de fígado desidratado (150mL/L) e o volume de água necessário para dissolver o corante Azul da Prússia (cerca de 12% do volume do meio). Por exemplo: para 300 mL de RCPB pH5 fortificado, o meio RCA (pesado conforme orientação do fabricante para 300 mL) foi dissolvido em 219 mL de água Milli-Q (Milipore®) e misturados com a infusão de fígado (45 mL), sendo posteriormente ajustados ao pH 5 e esterilizados a 121°C/15 minutos. Simultaneamente, o corante Azul da Prússia (0,03%) foi dissolvido em 36 mL de água e também esterilizado a 121°C/15 minutos. A mistura do corante e do meio foi feita em fluxo laminar. As placas foram mantidas à 37°C por 72 horas, em condições anaeróbias (jarras de anaerobiose MERCK, com gerador de anaerobiose Anaerogen® (OXOID)). Após o período de incubação, as placas foram deixadas por 1 noite em exposição ao ar atmosférico e a temperatura ambiente para que se formasse o halo azul que diferencia as colônias de *L. bulgaricus* das colônias da bifidobactéria.

A contagem dos microrganismos foi realizada logo após a inoculação das culturas no iogurte (tempo zero) e às 1, 2 e 3 horas da fermentação do iogurte e ao atingir o pH 4,8. As mesmas análises foram realizadas a cada semana durante os 30 dias de refrigerada do iogurte a 7°C.

2.8 Análise do perfil de textura instrumental (TPA)

No décimo dia de estocagem do iogurte, um pote foi retirado da geladeira e analisado quanto ao perfil de textura instrumental (TPA), usando-se o texturômetro TA-XT2 da Stable Micro Systems. O iogurte foi agitado vinte vezes no sentido horário e vinte vezes no sentido anti-horário, para homogeneização da amostra e reincorporação do soro separado. 25 mL de iogurte foram vertidos para um béquer de 100 mL, de maneira que a altura final da amostra fosse 1,27 cm, como padronizado por Friedman, Whitney, Szczesniak (1963) e armazenadas em geladeira por 1 noite para a estabilização da temperatura. No dia seguinte, cada béquer foi retirado da geladeira e a análise de TPA foi efetuada. Um probe cilíndrico de 35 mm de diâmetro foi usado com duas compressões sucessivas, com intervalo de 2 segundos cada uma, a uma velocidade de teste de 10 mm/s. As velocidades de pré-teste e pós-teste foram também de 10 mm/s. Seis replicatas foram realizadas para cada amostra. A diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$) foi calculada por Análise de Variância (Anova) de fator único, utilizando o software Excell for Windows (Microsoft®).

2.9 Avaliação da sinerese do iogurte durante a estocagem

A cada semana, o mesmo pote de cada iogurte foi aberto em condições assépticas (fluxo laminar) e a quantidade de soro da superfície do gel foi retirada com o auxílio de uma seringa estéril. O iogurte foi então cuidadosamente inclinado dentro do fluxo laminar a um ângulo de mais ou menos 30° e deixado por cinco minutos nesta posição. Após este tempo, uma quantidade de soro adicional foi retirada e a quantidade total de soro foi pesada. A cada semana, a quantidade de soro retirada foi pesada e somada a quantidade de soro retirada na semana anterior. A separação de soro foi então estimada calculando-se a porcentagem final de soro separado em cada semana em relação ao peso inicial do iogurte (em torno de 200 g).

3. Resultados e Discussão

*3.1 Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 em iogurte com lactulose em testes modelo*

Tabela 1. Efeito da adição de lactulose sobre o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em iogurte*.

	TDC sem lactulose (h)	TDC com 2% de lactulose (h)
<i>S. thermophilus</i>	0,66 ± 0,05	0,68 ± 0,13
<i>L. bulgaricus</i>	0,92 ± 0,15	0,95 ± 0,02
<i>B. animalis</i> Bb 12	4,26 ± 0,24	2,36 ± 0,57

*Iogurte produzido em sistema modelo com leite pasteurizado (25 mL) fermentado em tubos de vidro (inoculação a 2,5% em volume na proporção de 1:1:1). Incubação a 37°C até a fermentação do iogurte a pH 4,6.

A adição de lactulose em um teor de 2% aumentou a velocidade de divisão celular de *B. animalis* Bb 12 ($p < 0,05$) durante a fermentação do iogurte, o que pode ser visto pelo menor tempo de divisão celular apresentado na Tabela 1. O tempo para que a bifidobactéria apresentasse uma divisão celular foi aproximadamente a metade do tempo necessário (cerca de 2,36 horas) para que uma divisão celular acontecesse no iogurte sem lactulose (cerca de 4,26 horas). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os valores dos tempos de divisão celular (TDC) para ambas às culturas do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) com 0 e 2% de lactulose, mostrando que com a presença da lactulose no leite, as culturas do iogurte não aumentaram a sua capacidade de divisão celular. Estes resultados indicam que a presença de lactulose no leite pode ser usada para melhorar o desenvolvimento da bifidobactéria sem afetar o desenvolvimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a fermentação do iogurte. Além disso, a adição de lactulose pode contribuir para as características de um produto simbiótico, isto é, conter tanto um prebiótico (lactulose) quanto um probiótico (bifidobactéria).

3.2 Curvas de pH

O tratamento UHT praticamente não afetou o tempo de fermentação do iogurte como mostrado na Figura 1, com um perfil de acidificação praticamente igual para os dois iogurtes durante toda a fermentação. O iogurte tradicional apresentou um tempo final de

fermentação de $4,44 \pm 0,38$ horas contra $4,25 \pm 0,25$ horas do iogurte produzido com leite UHT.

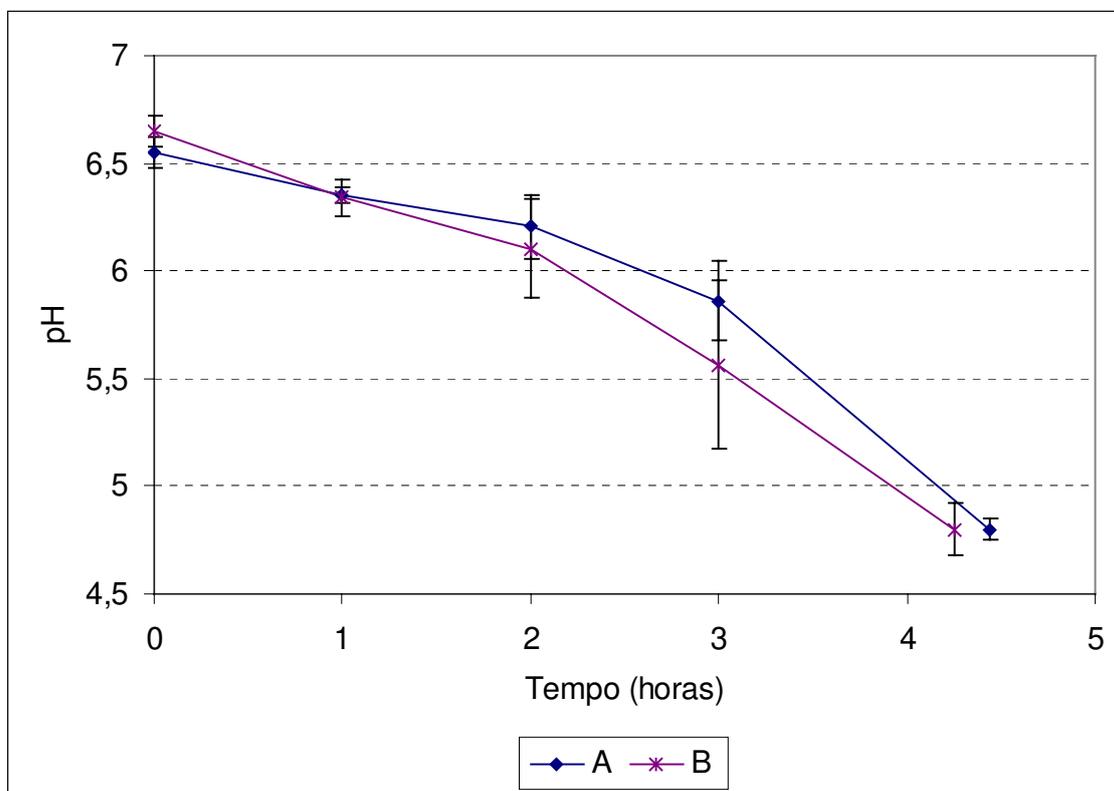


Figura 1 – pH durante a fermentação do iogurte. Iogurte controle com tratamento de 90°C por 5 minutos (A) e iogurte teste com tratamento térmico de 142°C por 15 segundos (B).

A Tabela 2 mostra o valor de pH dos iogurtes após 24 horas e após 4 semanas de estocagem refrigerada. Os dois iogurtes permaneceram praticamente sem nenhuma mudança no pH após 24 horas de estocagem refrigerada e apresentaram praticamente a mesma queda de pH durante a estocagem refrigerada (em torno de 0,4 unidades). Um importante ponto que pode explicar a queda similar do pH nos dois iogurtes pode ser vista nas Figuras 2 e 3, que mostra praticamente a mesma quantidade de *L. bulgaricus* nos dois iogurtes no início da fermentação ($4,68 \times 10^6$ UFC/mL no iogurte padrão e $5,75 \times 10^6$ UFC/mL no iogurte teste), além de apresentarem praticamente a mesma taxa de crescimento. *L. bulgaricus* é reconhecidamente o microrganismo que mais influencia a pós-acidificação do iogurte.

Tabela 2. Valores de pH dos iogurtes após 24 horas e 4 semanas de estocagem*.

Tempo de estocagem	Iogurte Tradicional	Iogurte UHT
24 horas	4,77 ± 0,15	4,86 ± 0,04
4 semanas	4,35 ± 0,12	4,47 ± 0,14

3.3 Desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a fermentação do iogurte

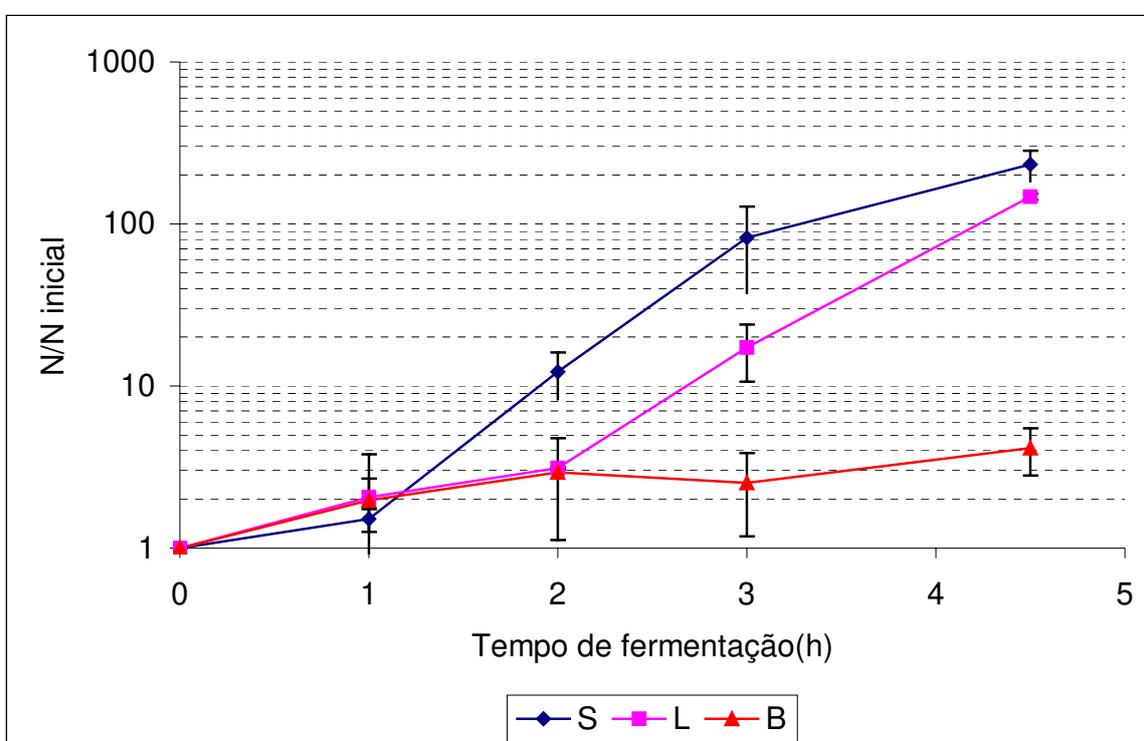


Figura 2 – Razão de desenvolvimento (N/N_{inicial}) de *B. animalis* Bb 12 (B), *L. bulgaricus* (L) e *S. thermophilus* (S) durante a fermentação do iogurte. N_{inicial} para B, L e S foram $1,48 \times 10^7$, $2,33 \times 10^6$ e $4,68 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Ordenada em escala logarítmica.

A Figura 2 mostra a curva de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* para o iogurte tradicional. *S. thermophilus* apresentou um aumento do número inicial de células em torno de 230 vezes ao final da fermentação do iogurte enquanto que *L. bulgaricus* apresentou um aumento de aproximadamente 150 vezes no seu número inicial de células. Este desenvolvimento está de acordo com o já bastante

conhecido desenvolvimento associado entre as culturas do iogurte (Rasic & Kurmann, 1978). *B. animalis* Bb 12 apresentou um lento desenvolvimento durante a fermentação do iogurte, aumentando seu número de células em torno de apenas 4 vezes após a fermentação de 4,5 horas.

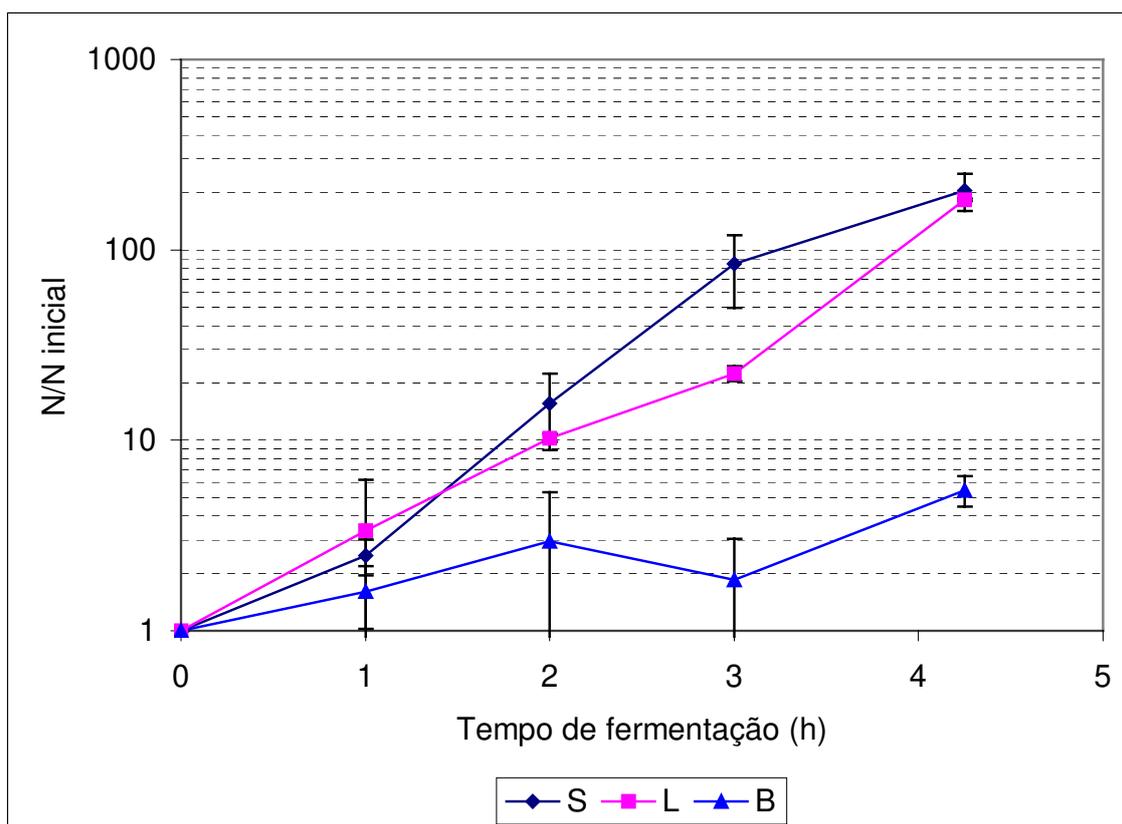


Figura 3. Razão de desenvolvimento (N/N_{inicial}) de *B. animalis* Bb 12 (B), *L. bulgaricus* (L) e de *S. thermophilus* durante a fermentação do iogurte produzido com leite UHT. N_{inicial} para B, S e L foram $2,75 \times 10^7$, $4,15 \times 10^6$ e $5,75 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Ordenada em escala logarítmica.

A Figura 3 mostra as curvas de desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12, de *L. bulgaricus* e de *S. thermophilus* no iogurte produzido com leite UHT. A contagem de *S. thermophilus* apresentou um desenvolvimento de aproximadamente 200 vezes o seu número inicial de células enquanto que *L. bulgaricus* apresentou um desenvolvimento de aproximadamente 180 vezes o seu número inicial de células. Neste caso, *L. bulgaricus* não apresentou uma fase de adaptação, diferentemente do que aconteceu no caso do iogurte tradicional, começando o seu desenvolvimento logo após o início da fermentação do iogurte (Tabela

3). No iogurte tradicional, *L. bulgaricus* apenas começou o seu desenvolvimento exponencial após duas horas do início da fermentação. Tratamentos térmicos severos podem produzir grandes quantidades de ácido fórmico, que é um estimulante para o desenvolvimento de *L. bulgaricus* (Rasic and Kurmann, 1978).

O desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 também praticamente não foi afetado pelo tratamento UHT do leite, pois este apresentou um aumento de cerca de 5,5 vezes o seu número inicial de células após um período de fermentação de cerca de 4,25 horas, contra um aumento de 4 vezes no seu número inicial de células em 4,45 horas de fermentação no iogurte tradicional.

3.4 Medidas dos ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico) durante a fermentação do iogurte

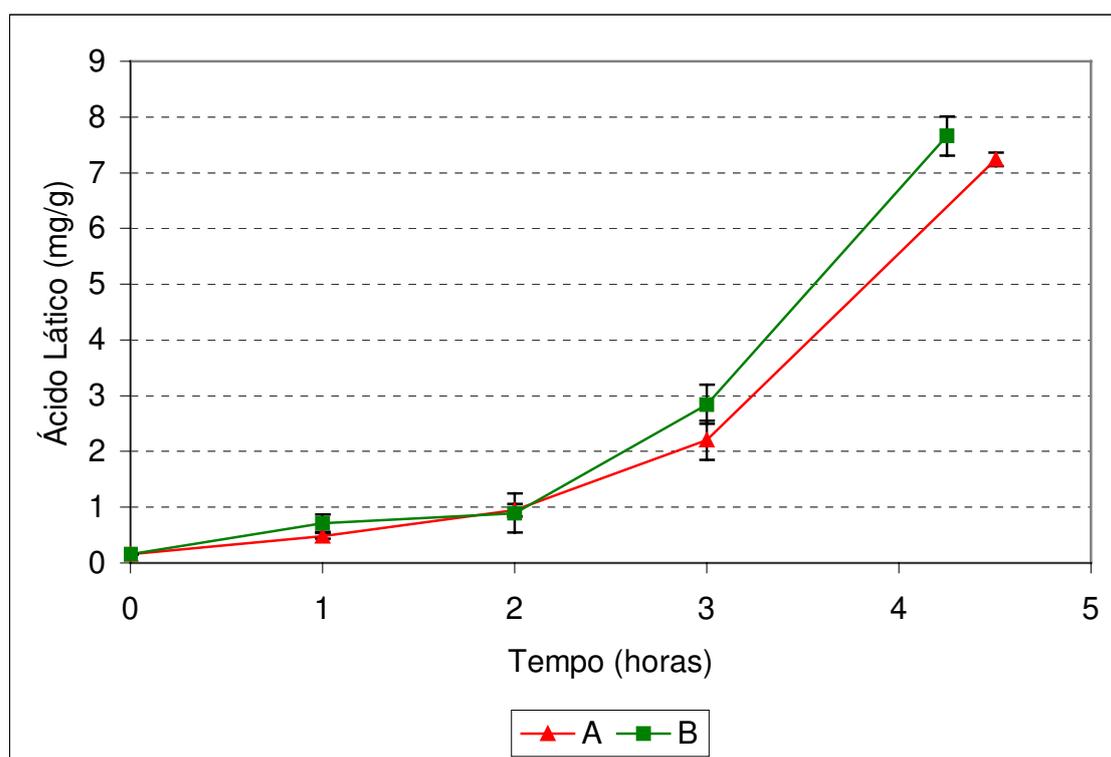


Figura 4. Produção de ácido láctico nos vários iogurtes estudados. Iogurte controle com tratamento de 90°C por 5 minutos (A) e iogurte teste com tratamento térmico de 142°C por 15 segundos (B).

A Figura 4 mostra praticamente a mesma produção de ácido láctico para os dois iogurtes (curvas A e B). A produção de ácido láctico atingiu 7,66 mg de ácido/g de iogurte no iogurte produzido com leite UHT e 7,24 mg de ácido/g de iogurte no iogurte tradicional.

A Figura 5 mostra um aumento no teor de ácido acético no iogurte produzido com o leite UHT (curva D) em relação a produção de ácido acético no iogurte tradicional (curva C). O teor de ácido acético aumentou de 31,44 $\mu\text{g/g}$ no tempo zero (inoculação) para cerca de 244,24 $\mu\text{g/g}$ ao final das 4,45 horas de fermentação do iogurte tradicional e de 31,44 $\mu\text{g/g}$ para 353,94 $\mu\text{g/g}$ ao final das 4,25 horas de fermentação do iogurte produzido com leite UHT.

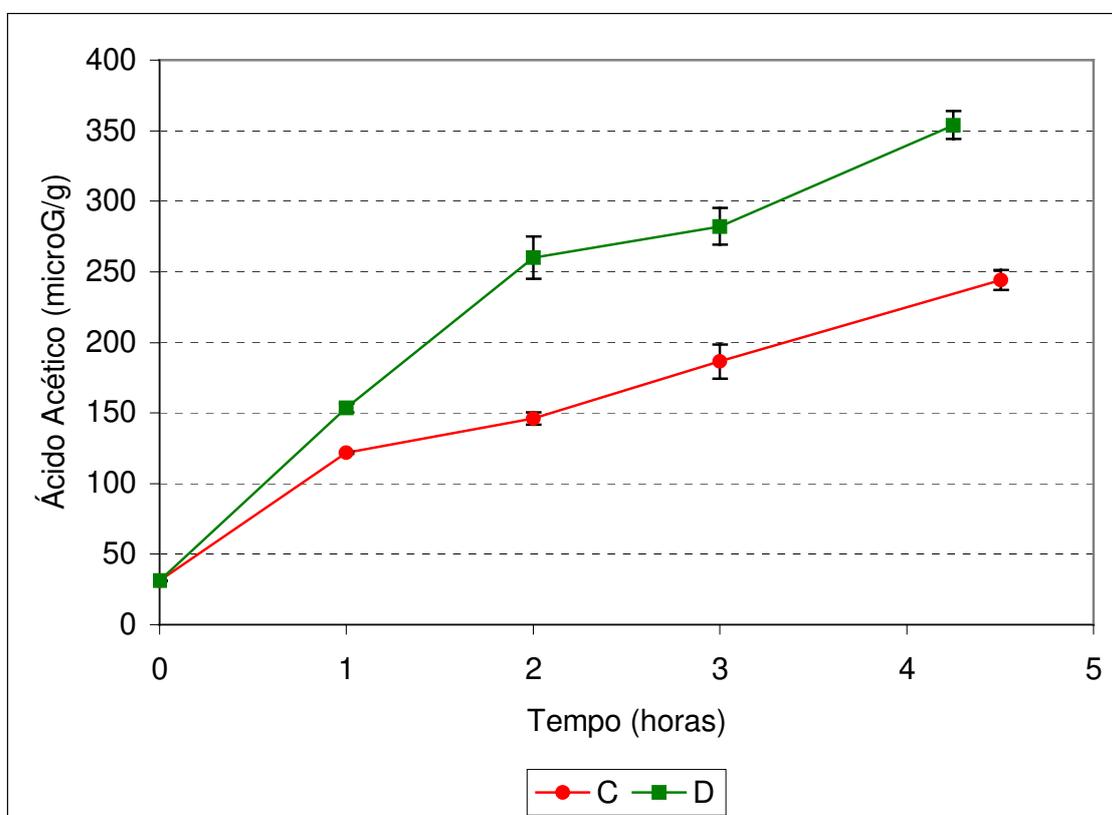


Figura 5 - Produção de ácido acético nos vários iogurtes estudados. Iogurte controle com tratamento de 90°C por 5 minutos (C) e iogurte teste com tratamento térmico de 142°C por 15 segundos (D).

A Figura 6 apresenta a produção de ácido propiônico durante a fermentação dos iogurtes. O teor de ácido propiônico no iogurte tradicional (curva E) aumentou de 31,45 $\mu\text{g/g}$ até 89,58 $\mu\text{g/g}$ ao final das 4,5 horas de fermentação, enquanto que no iogurte UHT o

seu aumento foi 31,45 $\mu\text{g/g}$ até 137,12 $\mu\text{g/g}$ ao final das 4,25 horas da fermentação. O tratamento UHT do leite aumentou tanto a produção de ácido acético quanto a produção de ácido propiônico pela bifidobactéria, entretanto, este fato não se relacionou com um aumento no número de células da bifidobactéria (Figura 3 comparada a Figura 2). Samona *et alii* (1996) mostraram que o gênero *Bifidobacterium* geralmente apresenta o seu desenvolvimento desvinculado da produção de ácido.

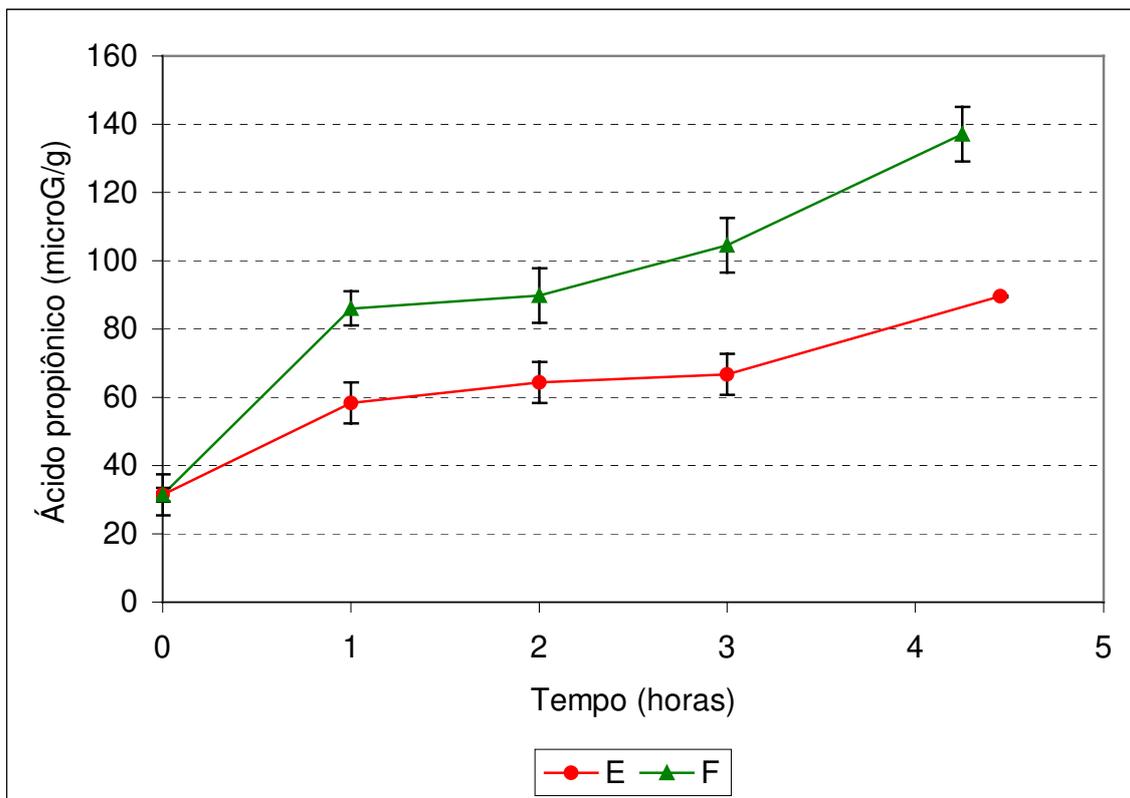


Figura 6 - Produção de ácido propiônico nos vários iogurtes estudados. Iogurte controle com tratamento de 90°C por 5 minutos (E) e iogurte teste com tratamento térmico de 142°C por 15 segundos (F).

3.5 Viabilidade de *B. animalis* Bb 12, *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* durante a estocagem refrigerada

A Figura 7 mostra a viabilidade das culturas do iogurte durante a estocagem refrigerada. *S. thermophilus* (curvas A e B), apresentou um valor constante no número de células em torno de log 9 UFC/mL durante todo o período de estocagem, para os dois iogurtes

estudados. Surpreendentemente, a contagem de *L. bulgaricus* apresentou uma queda de aproximadamente 1 ciclo logarítmico após as duas primeiras semanas de estocagem para ambos os iogurtes, tratados a 90°C por 5 minutos e 142°C por 15 segundos (curvas C e D, respectivamente). *L. bulgaricus* é reconhecidamente mais resistente ao meio ácido que *S. thermophilus*. É provável que o teor de ácido acético e propiônico produzido pela bifidobactéria tenha sido responsável pela diminuição da viabilidade de *L. bulgaricus* durante a estocagem refrigerada. Samona, Robinson, Marakis (1996) sugeriram que a pós-acidificação mais lenta em iogurtes probióticos com *Bifidobacterium* poderia estar relacionada ao efeito inibitório do ácido acético sobre as culturas do iogurte. Perez Chaia, De Saad, Holgado & Oliver, (1995) mostraram uma inibição do desenvolvimento de *Lactobacillus* devido ao aumento da concentração de ácido propiônico em meios sintéticos.

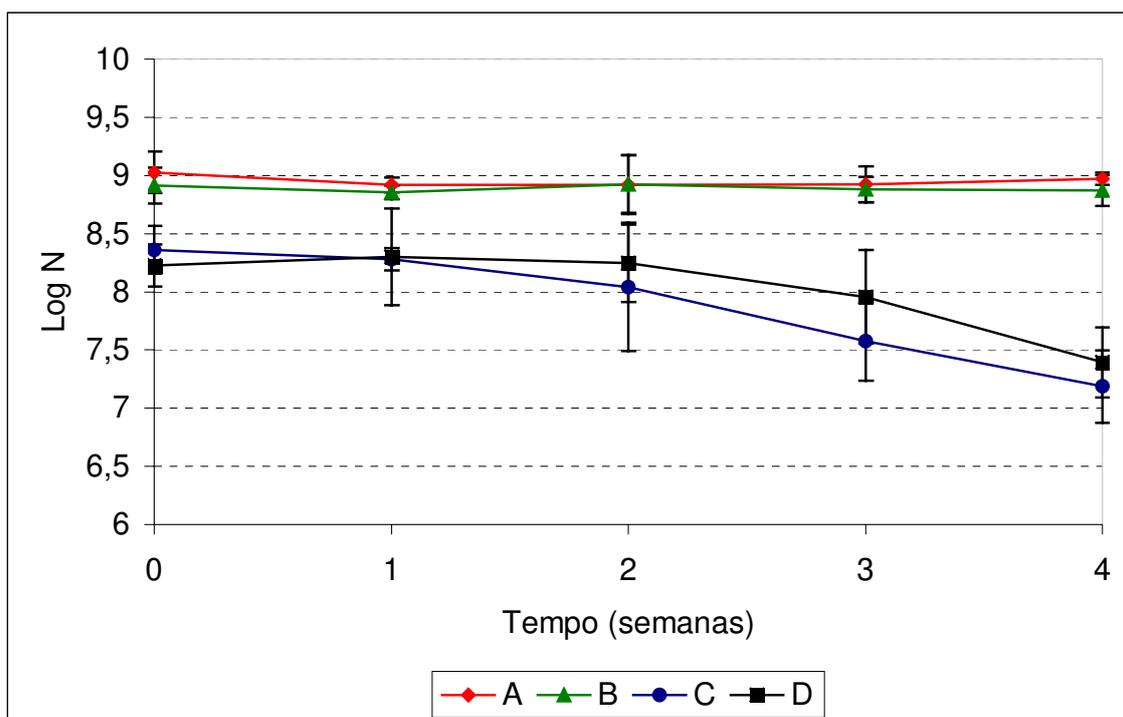


Figura 7. Contagem das culturas do iogurte durante a estocagem refrigerada. *S. thermophilus* em iogurte tradicional (A); *S. thermophilus* em iogurte produzido com leite UHT (B); *L. bulgaricus* em iogurte tradicional (C) e *L. bulgaricus* em iogurte produzido com leite UHT (D).

A Figura 8 apresenta a contagem do número de células viáveis de *B. animalis* Bb 12 durante a estocagem refrigerada do iogurte. Não houve diferença significativa entre a contagem de *B. animalis* Bb 12 nos dois iogurtes estudados. O iogurte tradicional

apresentou uma redução do número de células durante a estocagem de 0,8 ciclos logarítmicos enquanto o iogurte produzido com leite UHT sofreu uma redução de 1,25 ciclos logarítmicos.

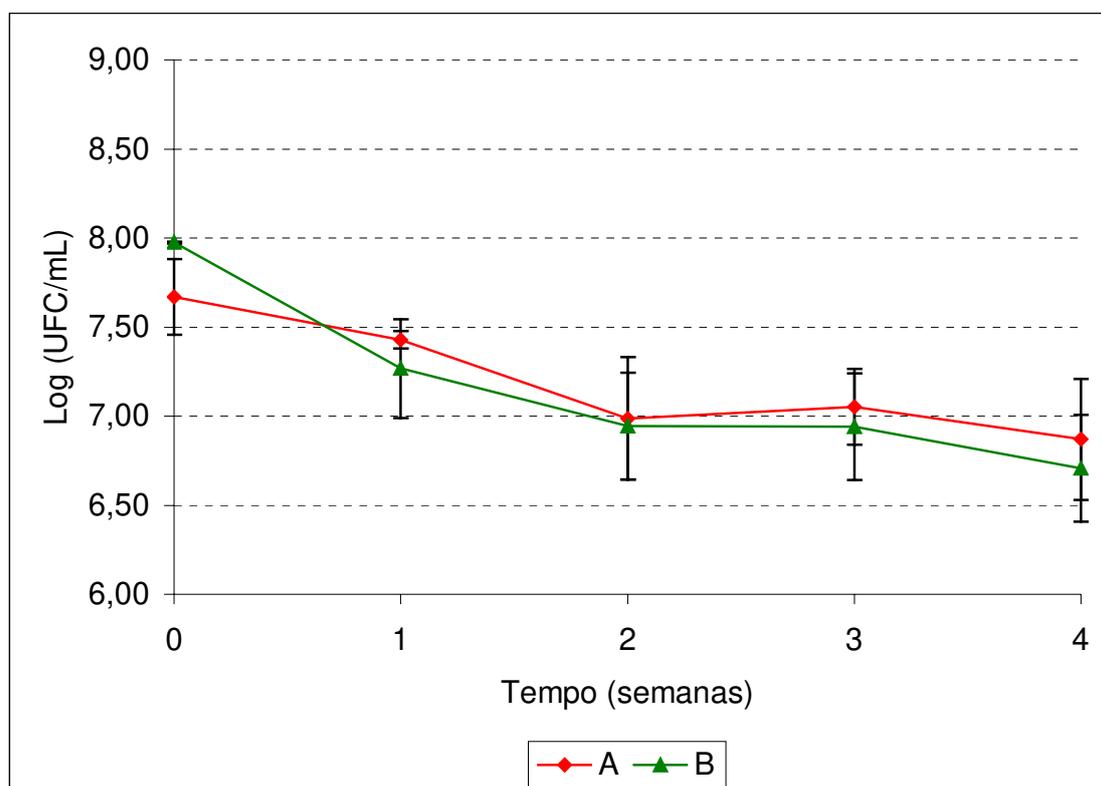


Figura 8. Contagem de *B. animalis* Bb 12 durante a estocagem refrigerada do iogurte. Iogurte controle com tratamento de 90°C por 5 minutos (A) e iogurte teste com tratamento térmico de 142°C por 15 segundos (B).

3.6 Perfil de textura instrumental

A Tabela 4 apresenta os valores do perfil de textura instrumental para cada um dos iogurtes estudados. O parâmetro fraturabilidade não foi avaliado, pois a amostra se mostrou bastante adesiva e os dois parâmetros são mutuamente exclusivos (Szczesniak *et alii*, 1963). O termo mastigabilidade não foi usado pela amostra ser semi-sólida.

Os termos coesividade e elasticidade não apresentaram diferença significativa a $p < 0,05$ enquanto que os termos dureza, adesividade e gomosidade apresentaram diferença

significativa ($p < 0,05$). O termo dureza pode ser avaliado conjuntamente com o parâmetro secundário gomosidade, que é bastante importante no caso do iogurte e é produto da dureza pela coesividade.

O iogurte tradicional apresentou uma dureza muito maior que o iogurte produzido com leite UHT (Tabela 4). A maior dureza do iogurte está relacionada com a estrutura final da sua matriz protéica (Rawson & Marshall, 1997). O tratamento térmico intenso necessário à produção da lactulose também afetou grandemente a estrutura do iogurte provavelmente devido à interação que ocorre entre as proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactalbumina) com a k-caseína das micelas. A interação entre as proteínas do leite depende da intensidade e tempo do tratamento térmico. Formam-se prolongamentos a partir da superfície da micela de caseína, que atuam como pontes que aumentam as ligações cruzadas entre as proteínas (Corredig & Dalgleish, 1996; Lucey *et alii*, 1998; Mottar *et alii*, 1989). Os dados da Tabela 4 mostram que o iogurte produzido com leite tratado a 90°C por 5 minutos apresentou uma maior dureza que o iogurte produzido com leite tratado a 142°C por 15 segundos. Isso parece indicar que o tratamento de 90°C por 5 minutos resultou em uma maior interação proteína-proteína e, conseqüentemente, uma matriz protéica mais densa e firme que o iogurte tratado a 142°C por 15 segundos.

Tabela 4 – Perfil de textura instrumental (TPA) do iogurte tradicional e do iogurte produzido com leite UHT.

Parâmetros	90°C por 5 minutos	142°C por 15 segundos
Dureza*	103,23 ± 13,46	62,03 ± 10,72
Fraturabilidade	14,61 ± 6,97	11,11 ± 1,39
Adesividade*	-80,02 ± 28,31	-13,22 ± 9,72
Elasticidade	0,96 ± 0,06	1,1 ± 0,11
Coesividade	0,78 ± 0,02	0,85 ± 0,06
Gomosidade*	79,75 ± 12,78	51,92 ± 5,03

* Parâmetros que apresentaram uma diferença significativa à $p > 0,05$. Iogurte tradicional (A) e iogurte produzido com leite UHT (B).

A maior dureza do iogurte se refletiu em uma maior gomosidade do iogurte controle em comparação com o iogurte produzido com leite UHT (Tabela 4). O iogurte tradicional também apresentou uma adesividade muito maior que o iogurte produzido com leite UHT.

O iogurte produzido com leite UHT praticamente não apresentou adesividade, que é uma característica de produtos bastante fluídos. Portanto, o tratamento térmico do leite a 142°C por 15 segundos resultou em um iogurte menos firme e com uma característica mais fluida, evidenciada pela menor gomosidade e principalmente pela ausência de adesividade.

3.7 Separação de soro

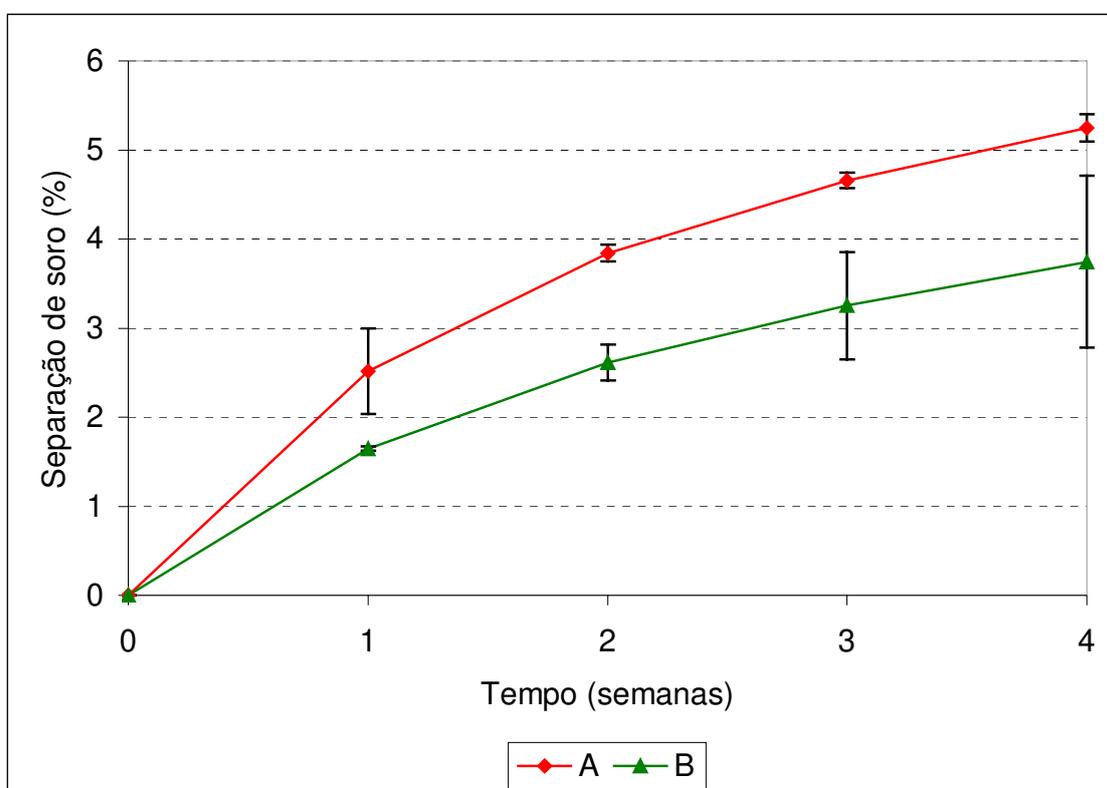


Figura 9 – Separação de soro (em porcentagem) dos iogurtes durante a estocagem refrigerada. Iogurte tradicional (A) e iogurte produzido com leite UHT (B).

O tratamento térmico do leite na temperatura de UHT resultou em um iogurte com uma menor tendência a sinérese em relação ao iogurte tradicional (Figura 9). Esse fato está provavelmente também relacionado com a formação da matriz protéica do iogurte. Uma matriz protéica menos densa proporciona uma menor interação proteína-proteína conduzindo a uma menor tendência de contração do gel com o tempo, resultando em uma menor tendência de expulsão do soro.

4. Conclusão

O tratamento térmico de 142°C/15 segundos não foi eficaz para aumentar o desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação do iogurte e não melhorou a resistência da bifidobactéria à estocagem refrigerada em comparação ao iogurte produzido com o tratamento térmico convencional de 90°C por 5 minutos. Entretanto, este tratamento aumentou a produção de ácido acético e propiônico da bifidobactéria durante a fermentação do iogurte. O tratamento térmico teve um impacto negativo na textura final do iogurte, com a produção de um iogurte menos firme, menos gomoso e menos adesivo do que aquele obtido com o leite que sofreu tratamento térmico convencional. A adição de lactulose ao leite aumentou a velocidade de divisão celular da bifidobactéria, não afetando as culturas do iogurte, mostrando que a adição deste produto ao leite pode, além de produzir um iogurte simbiótico, aumentar a divisão celular da bifidobactéria durante a fermentação.

5. Referências bibliográficas

- Corredig, M., Dalglish, D. G. (1996). Effect of temperature and pH on the interactions of whey proteins with casein micelles in skim milk. *Food Research International*, 29 (1) 49-55.
- Dave, R.I., Shah, N.P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal* 7, 31-41.
- Friedman, H.H., Whitney, J.E., Szczesniak, A.S. (1963). The texturometer – a new instrument for objective texture measurement, *Journal of Food Science* 28: 390-396.
- Gilliland, S.E., Reilly, S.S., Kim, G.B., Kim, H.S. (2002). Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobactéria in a yogurt-like product. *Food Microbiology and Safety*, 67,(8), 3091-3095.
- Klaver, F.A., Kingma, F., Weerkamp, H. (1993). Growth and survival of bifidobactéria in milk. *Netherlands Milk Dairy Journal* 47, 151-164.

- Laroia, S., Martin, J.H. (1991). Methods for enumerating and Propagating Bifidobactéria. *Cultured Dairy Products Journal*, May, 32-33.
- Lucey, J.A., Munro, P.A., Singh, H. (1998). Whey separation in acid skim milk gels made with glucono-delta-lactone: Effects of heat treatment and gelation temperature. *Journal of Texture Studies*, 29 (4) 413-426.
- Lucey, J.A., Tamehana, M., Singh, H., Munro, P. A. (1998). Effect of interactions between denatured whey proteins and casein micelles on the formation and rheological properties of acid skim milk gels. *Journal of Dairy Research*, 65, 555-567.
- Martinez-Castro, I., Olano, A. (1980). Influence of thermal processing on carbohydrate composition of milk. Formation of epilactose. *Milchwissenschaft*, 35 (1) 5-8.
- Mizota, T. (1996). Lactulose as a growth promoting factor for bifidobacterium and its physiological aspects. *Bulletin of the IDF* 313, 43-48.
- Mottar, J.; Bassier, A., Joniau, M.; Baert, J. (1989). Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science*, 72, 2247-2256.
- Perez Chaia, A., De Saad, A.M.S., Holgado, A.P.R., Oliver, G. (1995). Short-chain fatty acids modulate growth of lactobacilli in mixed culture fermentations with propionibactéria. *International Journal of Food Microbiology* 26, 365-374.
- Rasic, J. L., Kurmann, J. A. (1978). *Yoghurt: Scientific grounds, technology, manufacture and preparations*. Dairy Publishing House, Copenhagen, Denmark, 466 p.
- Rawson, H.L., Marshall, V.M. (1997). Effect of “ropy” strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *International Journal of Food Science and Technology* 32, 213-220.
- Rosenthal, A.J. (1999). *Relationship between instrumental and sensory measures of food texture*. In: *Food texture measurement and perception*. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland.
- Rosenthal, I., Bernstein, S. (1998). The survival of a commercial culture of bifidobactéria in milk products. *Milchwissenschaft* 53 (8), 441-443.
- Samona, A., Robinson, R.K., Marakis, S. (1996). Acid production by bifidobactéria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13, 275-280.

- Shah, D. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83: 894-907.
- Shihata, A., Shah, N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 10, 401-408.
- Stanier, R.Y., Doudoroff, M., Adelberg, E.A. (1965). In *El mundo de los Microbios*, Editora Aguilar, Madrid, Espanha, 724p.
- Szczesniak, A.S., Brandt, M.A., Friedman, H.H. (1963). Development of standard rating scales for mechanical parameters of texture and correlation between the objective and the sensory methods of texture evaluation. *Journal of Food Science*, 28, 397-403.
- Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2003). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 117-124.
- Tamura, Y., Mizota, T., Shimamura, S., Tomita, M. (1993). Lactulose and its application to the food and pharmaceutical industries. *Bulletin of the International Dairy Federation* 289, 43-53.
- Vinderola, C.G., Bailo, N., Reinheimer, J.A. (2000). Survival of probiotic microflora in argentinian yoghurts during refrigerated storage. *Food Research International*, 33, 97-102.
- Vinderola, C.G., Mocchiutti, P., Reinheimer, J.A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85, 721-729.

Conclusão Geral

Dentre os meios de cultura avaliados para a contagem de *B. animalis* Bb 12 (M-MRS, MRS-NNLP, RCPB pH5, MRS-LP e RCPB pH5 fortificado) em iogurte, o meio RCPB pH5 fortificado com 150 mL/L de extrato de fígado desidratado foi o mais indicado pois conseguiu aumentar significativamente o diâmetro das colônias de *Bifidobacterium* tornando a sua contagem bastante fácil e confiável durante a estocagem refrigerada do iogurte. O meio M-MRS não apresentou seletividade para *Bifidobacterium*, pois houve o desenvolvimento de *L. bulgaricus*. O meio MRS-NNLP apresentou uma excelente seletividade para *B. animalis* Bb12 em iogurte não havendo crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. O meio MRS-NNLP mostrou uma leve diminuição no número de células da bifidobactéria quando em comparação ao meio padrão MRS. Levando em conta que esta medida foi feita logo após a fermentação do leite, isto é, na situação de menor “stress” celular da bifidobactéria em relação ao meio ácido, é provável que a queda na recuperação de células da bifidobactéria aumente após a estocagem refrigerada, quando o “stress” da bifidobactéria é bem mais acentuado. Por este motivo, quando a contagem de bifidobactéria é feita logo após a fermentação do iogurte, o meio MRS-NNLP pode ser uma opção, mas o seu emprego durante a estocagem refrigerada do iogurte não é aconselhado. O meio RCPB pH5 apresentou uma boa diferenciação de *B. animalis* Bb12 em iogurte, entretanto, o seu uso também é restrito a contagem de *Bifidobacterium* tão somente após a fermentação do iogurte, pois este meio apresentou as colônias da bifidobactéria na superfície do ágar extremamente pequenas quando a contagem foi feita durante a estocagem refrigerada do iogurte. Isso demonstra que o meio RCPB pH5 não tem a capacidade de desenvolver apropriadamente as células de *Bifidobacterium* que sofreram o “stress” devido ao meio ácido. O meio MRS-LP apresentou uma excelente seletividade para *Bifidobacterium* em iogurte e também apresentou a mesma recuperação de células que o meio padrão MRS em cultura pura. Este meio também se mostrou eficaz para a contagem da bifidobactéria após a estocagem refrigerada do iogurte e, portanto, foi um dos meios indicados neste estudo para a contagem de *Bifidobacterium* não só após a fermentação, mas também durante a estocagem refrigerada do iogurte. O meio RCPB pH5 fortificado com extrato de fígado desidratado também apresentou uma excelente diferenciação de

Bifidobacterium em iogurte e é também indicado para a sua contagem durante a estocagem refrigerada do iogurte, juntamente com o meio MRS-LP.

A adição de células ativas de *P. freudenreichii* PS-1 promoveu maior desenvolvimento de *B. animalis* Bb 12 durante a fermentação do iogurte enquanto que o tratamento térmico do leite a 142°C/15 segundos não resultou em diferenças no desenvolvimento da bifidobactéria no iogurte quando comparado ao iogurte padrão feito com leite tratado a 90°C por 5 minutos. *P. freudenreichii* PS-1 também diminuiu a queda no número de células da bifidobactéria durante a estocagem refrigerada apesar do tratamento térmico não ter influência na resistência da bifidobactéria à estocagem refrigerada. Entretanto, o tratamento térmico aumentou a produção de ácido acético e propiônico da bifidobactéria durante a fermentação do iogurte. Tanto a adição de *P. freudenreichii* PS-1 quanto o tratamento térmico tiveram grande efeito sobre a textura do iogurte. O iogurte adicionado de propionibactéria apresentou uma textura muito mais gomosa do que o iogurte padrão, com uma provável produção de EPS, o que resultou em um iogurte também com uma menor tendência a sinerese. Já o iogurte produzido no tratamento UHT apresentou textura muito menos gomosa e menos firme do que o iogurte tradicional. O iogurte produzido com leite UHT também apresentou menor sinerese do que o iogurte tradicional. O iogurte com propionibactéria apresentou uma menor pós-acidificação, provavelmente devido ao menor número inicial de células de *L. bulgaricus*. Diferenças no tratamento térmico não influenciaram a pós-acidificação do iogurte.