



CAPTAR

ciência e ambiente para todos

volume 2 • número 1 • p 29-41

Estudo microbiológico e bioquímico do efeito de compostos prebióticos em matrizes lácteas probióticas

Os prebióticos inulina e frutooligossacarídeo foram estudados de forma a analisar o seu potencial efeito sobre o crescimento/sobrevivência de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei*-01 e *Bifidobacterium lactis* B94) e ao mesmo tempo analisar o seu potencial tecnológico através da caracterização da proteólise e da lipólise em matrizes de leite coagulado, com o objectivo de se avaliar a possibilidade do fabrico de queijos probióticos ou simbióticos. Os compostos prebióticos não afectaram significativamente o crescimento/viabilidade das estirpes em estudo, excepto no caso de *L. acidophilus* La-5. Os índices de proteólise por sua vez revelaram uma considerável degradação da caseína em matrizes probióticas e simbióticas inoculadas com *B. lactis* B94 e *L. casei*-01; tendo-se obtido menores valores nas matrizes inoculadas com *L. acidophilus* La-5, porém o efeito simbiótico foi pronunciado no caso da fracção azotada não proteica. A lipólise não foi muito intensa ao longo do tempo de maturação das matrizes independentemente do tipo de matriz, no entanto diferenças interessantes em termos qualitativos no perfil de AGL foram observados. Isómeros de ácido linoleico conjugado e ácidos α -linolénico e γ -linolénico foram detectados após 15 dias de maturação em todas as matrizes inoculadas. Deste modo, pode-se afirmar que os parâmetros microbiológicos e bioquímicos analisados demonstraram um enorme potencial tecnológico, especialmente no caso de *B. lactis* B94 e *L. casei*-01 para a produção de novos tipos de queijo com benefícios associados.

Palavras-chave

bactérias probióticas
prebióticos
alimentos simbióticos

Dina Rodrigues¹

Teresa AP Rocha-Santos¹

Cláudia I Pereira²

Ana M Gomes²

Ana C Freitas^{1*}

¹ ISEIT/Viseu, Instituto Piaget, Viseu.

² Escola Superior de Tecnologia,
Universidade Católica Portuguesa, Porto.

*afreitas@viseu.ipiaget.org

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

A alimentação tem um papel fundamental na saúde de cada indivíduo. Actualmente o consumidor procura cada vez mais uma alimentação saudável e equilibrada e que essa alimentação possa ajudar na prevenção de determinadas doenças. Esta tendência tem aumentado o interesse na pesquisa de alimentos funcionais ao longo dos tempos (Agrawal, 2005).

Os alimentos funcionais são aqueles que para além das suas funções nutricionais no âmbito de uma dieta normal produzem efeitos benéficos na saúde (Macedo et al., 2008; Ramírez et al., 2007; Kiliç et al., 2009). Os probióticos e prebióticos são substâncias biologicamente activas que se podem encontrar nos alimentos funcionais (Ramirez et al., 2007). Os probióticos são microrganismos, principalmente bactérias e leveduras (Oliveira-Sequeira et al., 2008) que ao serem ingeridos sobrevivem à passagem do intestino delgado e se estabelecem temporariamente no intestino grosso produzindo um efeito benéfico para a saúde (Patel et al., 2008) (Figura 1). Alguns dos benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos ao consumo de probióticos são: i) promover um equilíbrio benéfico da população de microrganismos residente no tracto gastrointestinal¹ (Holzapfel et al., 2001); ii) aumento da resistência gastrointestinal à colonização por microrganismos patogénicos (Saulnier et al., 2009); iii) a promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose (açúcar do leite) (Casiraghi et al., 2007).

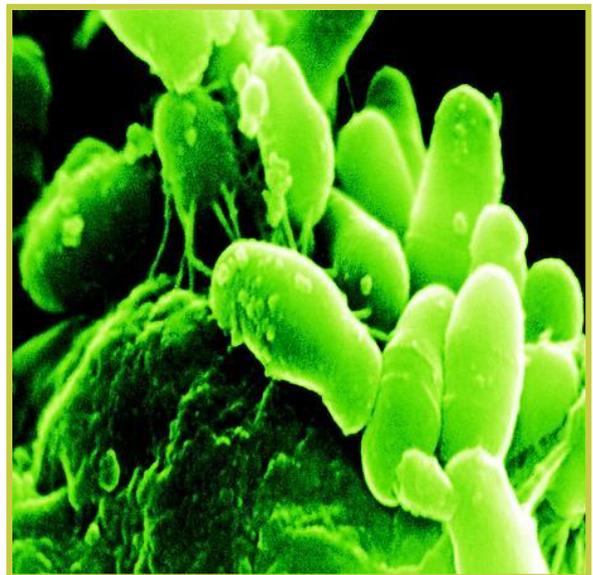


FIGURA 1: Células de *Bifidobacterium* no epitélio do cólon.
[<http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>].

Os prebióticos são hidratos de carbono que não são digeridos nem absorvidos ao longo do sistema digestivo uma vez que possuem uma configuração molecular que os torna resistentes à acção de enzimas. Desta forma servem de substrato e energia para as bactérias benéficas como as bifidobactérias e os lactobacilos (Cardarelli et al., 2007; Kiliç et al., 2009). Os prebióticos ajudam na manutenção da flora intestinal ao estimular o crescimento de bifidobactérias, bloqueando alguns locais de aderência de bactérias patogénicas reduzindo desta forma a sua concentração na flora intestinal e promovendo a absorção de determinados minerais (Saulnier et al., 2009; Macfarlane et al., 2007). A designação de alimentos simbióticos é conferida aos alimentos que na sua composição incluem os microrganismos probióticos e os compostos prebióticos (Patel et al., 2008).

A inclusão e sobrevivência de microrganismos probióticos nos alimentos continua, no entanto, a ser um desafio tecnológico, pois depende não só das características do produto alimentar como também da maior ou menor sensibilidade do microrganismo ao ambiente que o rodeia (Douglas et al., 2008). Deste modo, o objectivo principal deste trabalho foi analisar o efeito potencial de uma mistura de ingredientes prébióticos,

¹ Trato gastrointestinal – O aparelho digestivo é constituído pelo trato gastrointestinal superior que inclui a boca, faringe, esófago e estômago e pelo trato gastrointestinal inferior que é composto pelo intestino delgado e intestino grosso.

inulina e frutooligossacarídeos (FOS), numa proporção de 50% cada, no crescimento e sobrevivência de bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus* La-5, *L. casei*-01 e *Bifidobacterium lactis* B94) e avaliar o seu potencial para aplicações futuras através da caracterização da sua capacidade de promover a proteólise² e lipólise³ em matrizes probióticas ou simbióticas de leite coagulado, simuladoras de matriz de queijo fresco.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Inóculo Probiótico

Procedeu-se ao pré-crescimento de cada bactéria probiótica através da inoculação em tubos de ensaio com 9 mL de água peptona⁴ estéril a 0,1 % (m/v) (Hi MEDIA[®] Laboratories, Índia), com 1 g de células liofilizadas. As estirpes probióticas utilizadas neste estudo foram; *Lactobacillus casei*-01 (Nu-trish[®] CHR-Hansen, Dinamarca), *L. acidophilus* La-5 (Nu-trish[®] CHR-Hansen, Dinamarca) e *Bifidobacterium lactis* LAFTI[®] B94 (DELVO-PRO[®] DSM, Austrália).

De cada inóculo homogeneizado foi retirado 1 mL para frascos de colo longo com 50 mL de MRS broth (meio de cultura para contagem de bactérias lácticas; do inglês: de Man Rogosa broth, Biokar Diagnostics, France) suplementado com 0,5 g L⁻¹ de cisteína hidrocloreada (Riedel-de Haën[®], Alemanha) no crescimento de *L. acidophilus* La-5 e de *B. lactis* B94 (Figura 2). A adição de cisteína hidrocloreada permite baixar o potencial redox⁵ e desta forma promover o crescimento das bactérias anaeróbias. De seguida os frascos de colo longo foram incubados a 37 °C, durante 24 h.



FIGURA 2: Inoculação de frascos de colo longo.

2. Matrizes à base de leite coagulado

Para este estudo seleccionou-se leite de vaca gordo HTST disponível no mercado. De modo a garantir a sua esterilidade procedeu-se a novo tratamento térmico no laboratório em autoclave⁶ a 110-112 °C, durante 10 minutos.

Efectuaram-se 3 ensaios diferentes, um para cada bactéria probiótica: *L. casei*-01, *L. acidophilus* La-5 ou *B. lactis* B94. Em cada ensaio procedeu-se ao estudo de (i) **Matrizes controlo** à base de leite coagulado sem adição de probiótico nem mistura de FOS:Inulina, (ii) **Matrizes probióticas** à base de leite coagulado, inoculadas com uma das estirpes probióticas seleccionadas mas sem adição de FOS: inulina e (iii) **Matrizes simbióticas** à base de leite coagulado, inoculadas com a mesma estirpe probiótica e com adição de FOS: Inulina. Para cada bactéria prepararam-se 48 porções de leite coagulado de acordo com o que está no esquema da Figura 3.

² Proteólise – Processo de degradação de proteínas por enzimas (proteases).

³ Lipólise – Processo pelo qual os lípidos são degradados em ácidos gordos e glicerol.

⁴ Água peptona – Água com suplemento nutritivo. A peptona é um produto da digestão enzimática da carne, solúvel em água e formada por polipeptídeos, água, oligossacarídeos e fontes de azoto necessários ao crescimento bacteriano

⁵ Potencial redox – O termo potencial redox vem de oxidação-redução em que o seu valor influencia funções como a respiração. Se existe um teor elevado de oxigénio, o valor do potencial redox é elevado sendo reduzido na ausência ou baixa concentração de oxigénio.

⁶ Autoclave – É um aparelho utilizado para esterilizar meios de cultura ou materiais através do calor húmido sob pressão.

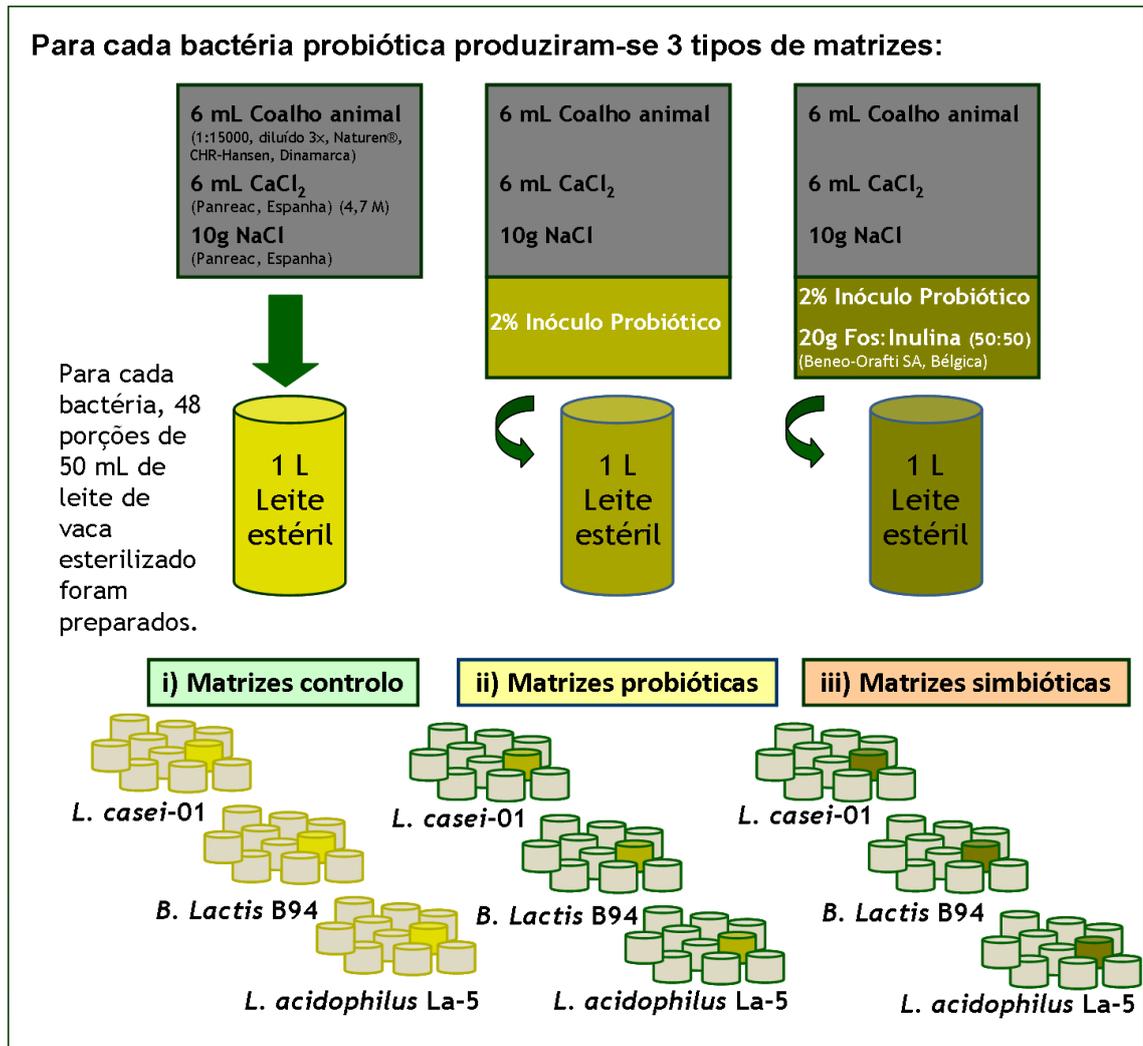


FIGURA 3: Esquema da produção das matrizes lácteas coaguladas⁷ controlo, probióticas e simbióticas.

A coagulação do leite foi realizada durante 5 horas a 30 °C (Figura 4), após a qual, duplicados de cada tipo de matriz (controlo, probiótica e simbiótica) foram retirados aleatoriamente⁸ para análises microbiológicas e químicas (tempo 0). O mesmo procedimento foi seguido ao longo de 60 dias de incubação a 12° C.



FIGURA 4: Foto dos frascos com as porções de matrizes após coagulação.

3. Análises microbiológicas e químicas

⁷ Matrizes lácteas coaguladas por acção do coalho animal (extraído do estômago do bezerro) através da acção de duas enzimas, a quimosina e a pepsina. Além da propriedade coagulante, o coalho possui ainda propriedades proteolíticas, que actuam durante a maturação do queijo.

⁸ Amostras retiradas de forma aleatória quer dizer que foram retiradas ao acaso (sem serem escolhidas), de forma a garantir que todas têm a mesma probabilidade de serem retiradas do conjunto.

Para determinar o número de células viáveis em cada momento de amostragem e em cada amostra foram retiradas 4 g de matriz láctea que foram homogeneizadas em 40 mL de uma solução de 2% citrato de sódio estéril (m/v) (Fisher Scientific[®], Reino Unido) durante 3 min, a 230 rpm, num liquidificador Stomacher (Seward[®], Reino Unido) (Figura 5). De seguida, a partir deste homogeneizado procedeu-se a diluições decimais com água peptona estéril a 0,1% (m/v) (Himedia[®], Índia). A partir das diluições das matrizes homogeneizadas inocularam-se placas de Petri, em duplicado, com MRS agar (Biokar Diagnostics[®], França) suplementado com 0,5 g L⁻¹ de cisteína hidroclorada para a contagem das bactérias *L. acidophilus* La-5 e de *B. lactis* B94 e em placas com meio PCA (meio de cultura para contagem em placa; do inglês: plate count agar; Biokar Diagnostics[®], França) para se avaliar a presença ou ausência de contaminação ao longo da experiência.



FIGURA 5: Foto do liquidificador Stomacher onde se efectua a homogeneização de alimentos sólidos.

As placas de MRS e PCA foram divididas ao meio e inoculadas com 100 µl de inóculo em cada uma das partes, após o qual foram incubadas a 37° C, durante 48 h, sob condições de anaerobiose⁹ em jarras com redutores de oxigénio (BioMerieux[®] SA, France) no caso das placas inoculadas com amostras com *L. acidophilus* La-5 e de *B. lactis* B94. As placas de petri com PCA e MRS inoculadas com *L. casei*-01 foram incubadas em condições aeróbias¹⁰, durante 48 h. Em cada amostra foi avaliado o pH com um medidor de pH (Crison, Espanha).

4. Estudo da evolução da degradação das proteínas - Proteólise

Com o objectivo de se avaliar a evolução da degradação das proteínas nas amostras de leite coagulado, procedeu-se à avaliação do azoto solúvel em água (ASA), azoto não proteico (ANP) e azoto total (AT) que foram determinados pelo método Kjeldahl. A fracção de azoto solúvel em água indica a fracção de péptidos de grande dimensão solúveis em água resultantes da degradação das proteínas lácteas (caseínas) pelas enzimas do coalho e bacterianas. O azoto não proteico permite avaliar o teor de péptidos de menor dimensão e aminoácidos livres resultantes da acção de enzimas bacterianas (Freitas et al., 1997, 1998).

A fracção de ASA foi obtida de acordo com as indicações de Kuchroo e Fox (1982a,b), tendo-se pesado 20 g de amostra à qual se acrescentou 40 g de água desionizada. Esta solução foi de seguida homogeneizada a 230 rpm durante 5 minutos e colocada num banho de água a 40 °C, durante 1h. Após filtração, com papel de filtro Whatman nº1, uma porção de amostra foi congelada para posterior análise de azoto solúvel em água. Para a extracção de ANP, a 22,5 mL de extracto de azoto solúvel, extraído anteriormente, adicionou-

⁹ Condições de anaerobiose – Atmosfera com ausência de oxigénio para que possa ocorrer o crescimento de microrganismos anaeróbios.

¹⁰ Condições aeróbias – Na presença de oxigénio para o crescimento de microrganismos aeróbios.

se 7,5 mL de ácido tricloroacético (TCA, Panreac[®], Espanha) a 48 % (m/v). De seguida agitou-se e deixou-se repousar à temperatura ambiente, durante 30 minutos, após o qual foi colocada no frigorífico durante a noite e filtrada no dia seguinte com filtros Whatman n^o42.

As análises de ASA e de ANP foram efectuadas de acordo com método de Kjeldahl tendo-se procedido em cada amostra à sua digestão¹¹, destilação¹² e titulação¹³. Cada amostra (5 mL) foi inicialmente digerida após a adição de 2 pastilhas de 3,5 g de K₂SO₄ com selénio, 7 mL de ácido sulfúrico a 98%, 5 mL de peróxido de hidrogénio a 30% e 3 pedaços de porcelana. Esta digestão foi efectuada em tubos de vidro no digestor (Velp Scientifica[®], Itália) a 420 °C, durante 30 minutos. Depois da digestão, procedeu-se à destilação de cada amostra no destilador (Velp Scientifica[®], Itália) (Figura 6) em que o produto resultante da destilação foi recolhido num erlenmeyer com 25 mL de ácido bórico a 4% com 5 gotas de corante azul de metileno/vermelho de metilo. Por fim procedeu-se à titulação da amostra com HCl 0,01 M a 0,1M para a determinação do AT, ASA e de ANP.



FIGURA 6: Destilador para análise de azoto pelo método de Kjeldahl.

5. Estudo da evolução da degradação dos lípidos - Lipólise

A lipólise é um processo pelo qual ocorre a degradação de lípidos em ácidos gordos livres (AGL) e glicerol que é promovido por enzimas lipolíticas. Para cada ensaio efectuou-se a avaliação do teor de AGL ao longo do tempo que foi efectuada de acordo com a metodologia indicada por Alonso et al. (2003), com algumas modificações. No esquema da Figura 7, encontram-se descritos todos os passos executados para a determinação dos AGL nas matrizes de leite coagulado.

6. Análise Estatística

Com o objectivo de se avaliar se as bactérias probióticas testadas (*L. casei* -01, *L. acidophilus* La-5 ou *B. lactis* B94), o tipo de matriz coagulada (controlo, probiótica ou simbiótica) e o tempo de maturação foram responsáveis por variações significativas no número de células viáveis presentes nas matrizes lácteas como na evolução dos parâmetros químicos estudados, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) a três dimensões. No entanto a utilização da ANOVA só é válida se os erros experimentais se revelarem independentes e normalmente distribuídos, e com uma variância constante. Como os dados experimentais não cumpriam estes requisitos recorreu-se a testes não-paramétricos. Deste modo as diferenças entre as bactérias probióticas ou entre os tipos de matriz foram analisados através do teste de Mann-Whitney, que avalia se duas observações de amostras vêm da mesma de distribuição. Por sua vez, as diferenças entre

¹¹ Digestão - Etapa que converte os compostos azotados (proteínas, amins, compostos orgânicos) em amónia.

¹² Destilação - Método de separação de substâncias através de aquecimento. A unidade de destilação faz automaticamente a diluição da amostra com água ultra-pura, alcaliniza-a com solução de NaOH e procede à destilação, sendo o destilado recolhido num recipiente para posterior titulação.

¹³ Titulação - É uma técnica analítica que tem como objectivo determinar a quantidade de substância de uma solução pelo confronto com uma outra espécie química, de concentração e natureza conhecidas.

as três bactérias probióticas ou entre as três matrizes foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis para cada tempo de armazenamento. Uma vez que foram detectadas diferenças estatísticas, a influência do tempo de armazenamento foi avaliada através de teste de Wilcoxon; Este teste envolve comparações diferentes entre medições, por isso, requer que os dados sejam medidos em um nível intermediário de medição (tempo de armazenamento). Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%, e utilizando o software SPSS (v 15,0, da SPSS, Chicago, IL, E.U.A.).

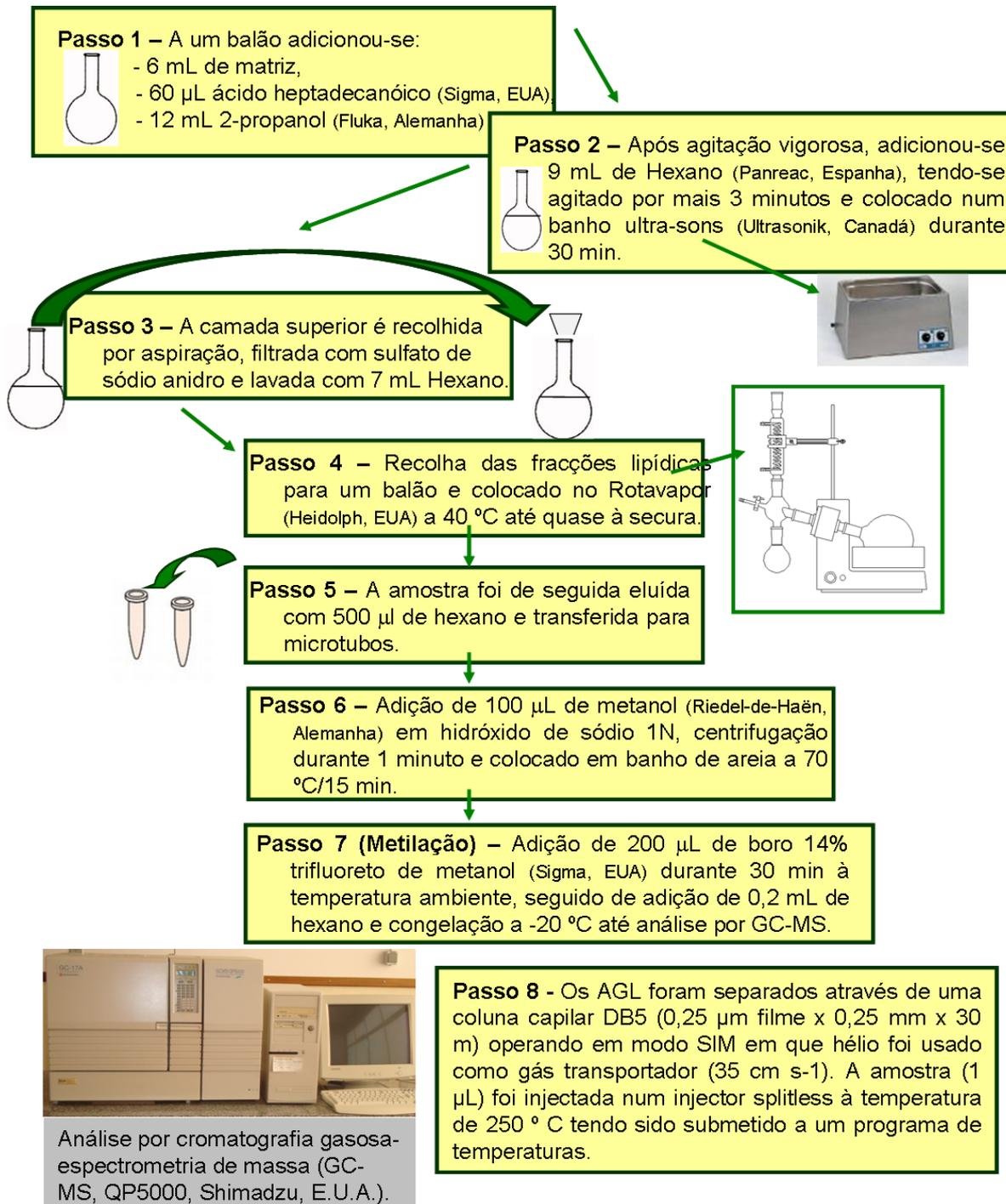


FIGURA 7: Esquema dos passos executados na determinação dos AGL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Viabilidade das bactérias probióticas nas matrizes de leite coagulado

Tanto nas matrizes probióticas como simbióticas inoculadas com *B. lactis* B94 e *L. casei*-01 se registaram valores elevados de células viáveis, cujos valores máximos foram observados entre os 5 e 30 dias de armazenamento na ordem do 10^9 - 10^{10} unidades formadoras de colônias (ufc) g^{-1} . Após 30 dias de incubação observou-se uma diminuição da densidade celular em ambas as matrizes inoculadas com todas as bactérias probióticas (Figura 8a, b) tendo sido o decréscimo de *B. lactis* B94 mais acentuado do que *L. casei*-01.

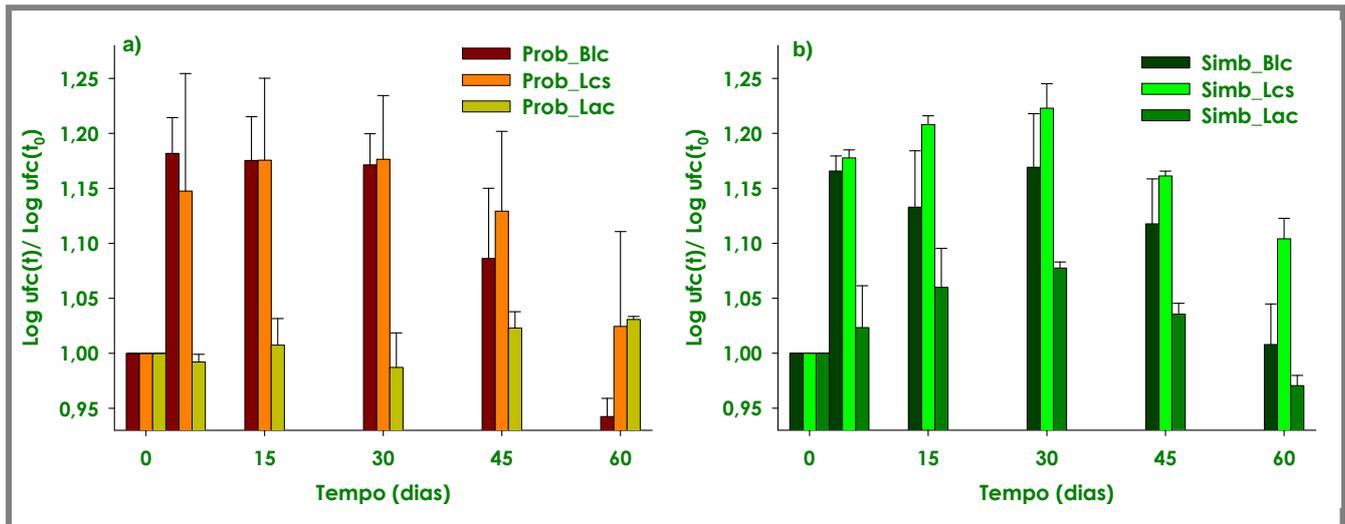


FIGURA 8. Rácio de células viáveis de *B. lactis* B94, *L. casei*-01 e *L. acidophilus* La-5 em matrizes probióticas (a) e simbióticas (b) ao longo de 60 dias de maturação a 12 °C.

Das três estirpes bacterianas, a *L. acidophilus* La-5 foi a que demonstrou maior dificuldade de crescimento e sobrevivência neste tipo de matriz de leite coagulado. *Lactobacillus acidophilus* La-5 não apresentou um crescimento significativo na matriz probiótica à semelhança do que ocorreu com *B. lactis* B94 e com *L. casei*-01 nos primeiros 30 dias de maturação, no entanto, a adição de FOS:Inulina 50:50 resultou num aumento contínuo de células viáveis *L. acidophilus* La-5 neste mesmo período de tempo (Figura 8b). Segundo Cardarelli et al. (2007), o queijo cremoso pode ser um vector potencial probiótico, em particular para estirpes de *L. acidophilus*.

O ensaio realizado com *L. casei*-01 parece ter sido o que apresentou resultados mais constantes ou seja com menos variações de crescimento; os valores registados tanto na matriz probiótica como na simbiótica são muito próximos distanciando-se apenas um pouco mais aos 60 dias. No entanto os valores de células viáveis nas matrizes simbióticas foram, no geral, superiores aos registados nas matrizes probióticas.

Apesar da diminuição do número de células viáveis observado nos últimos 15 dias do período de maturação em todas as matrizes, os níveis de cada bactéria probiótica nas diferentes matrizes mantiveram-se acima dos valores mínimos indicados para proporcionar benefícios à saúde, que de acordo com Shah (2000) devem-se situar acima de 10^6 ufc por mL ou g de produto durante o tempo de armazenamento.

De acordo com as análises estatísticas, o teste de Wilcoxon revelou que as diferenças de viabilidade microbiológica são apenas estatisticamente significativas entre 0 e 5 dias ($p < 0,01$) e entre 30 e 60 dias ($p < 0,01$) de maturação. Essas diferenças são bem correlacionadas com o crescimento inicial de bactérias probióticas observado em todas as matrizes inoculadas, embora menos evidente para *L. acidophilus* La-5, e com a tendência de diminuição da densidade celular acima dos 30 dias de maturação. Além disso, não foram observadas diferenças significativas na viabilidade microbiológica entre as três bactérias probióticas ou entre matrizes probióticas e simbióticas ($p > 0,05$) ao longo da maturação. Diferenças estatisticamente significativas só foram observadas entre as matrizes inoculadas e as respectivas matrizes de controlo ($p = 0,002$). Nenhuma contaminação foi registada nas matrizes de leite coagulado.

Nas matrizes probióticas e simbióticas foi registada uma diminuição dos valores de pH ao longo tempo. As matrizes inoculadas com *L. casei* e *B. lactis* apresentaram valores bastante próximos, o ensaio com *L. acidophilus* foi aquele onde se notou maiores diferenças entre a matriz probiótica e a matriz simbiótica. Na matriz simbiótica inoculada com *L. acidophilus*, a variação de pH foi semelhante à ocorrida nas matrizes inoculadas com as outras estirpes probióticas.

2. Proteólise em matrizes de leite coaguladas

Ambas as fracções de ASA e ANP aumentaram ao longo do tempo em relação às matrizes controlo (Figura 10), evidenciando o papel das enzimas

probióticas na degradação das caseínas além das do coalho de origem animal, tendo ocorrido diferenças estatisticamente significativas entre as matrizes inoculadas e as respectivas matrizes de controlo ($p < 0,05$). Pequenas variações de ASA foram observadas nas matrizes de controlo ao longo dos 60 dias de incubação nos três ensaios. Por sua vez, uma variação maior foi registada nos valores de ANP, especialmente no

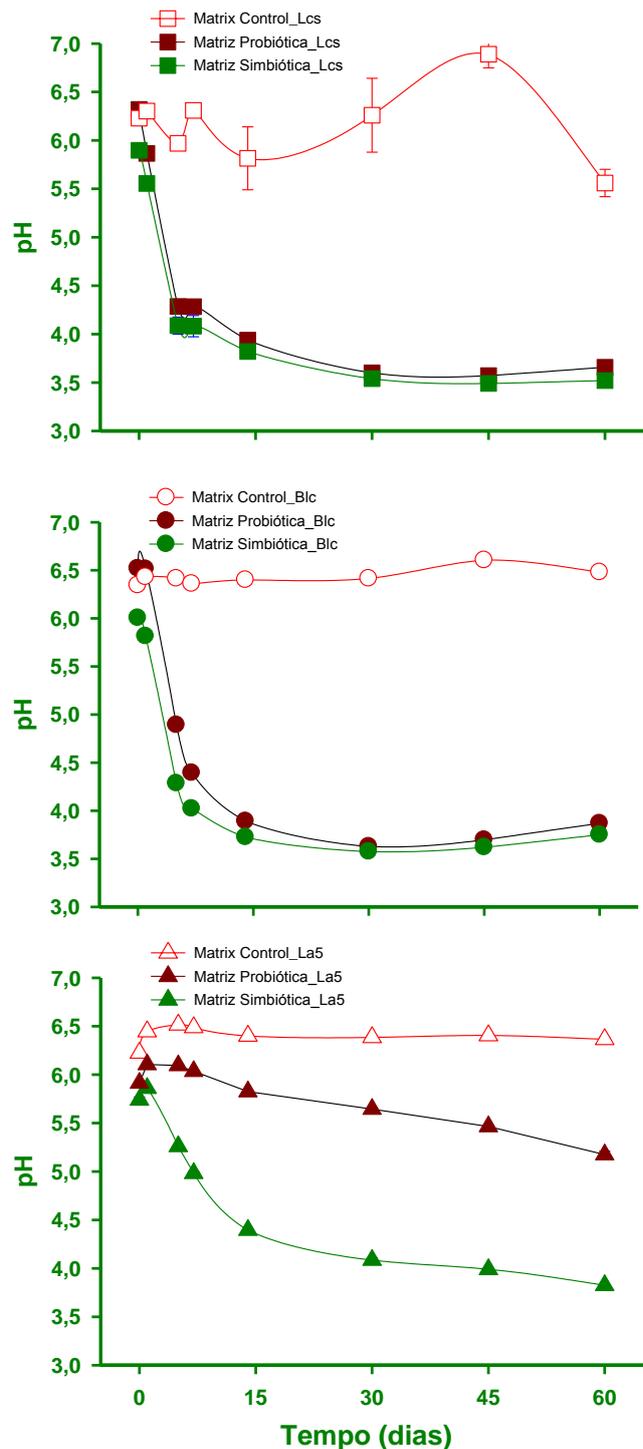


FIGURA 9: Acidez titulável (mL NaOH g⁻¹ matriz coagulada) e pH nas matrizes control, probiótica ou simbiótica inoculadas com a) *B. lactis* B94, b) *L. casei*-01 (Lcs) and c) *L. acidophilus* La-5 (La5) ao longo de 60 dias de maturação a 12 °C.

ensaio com *L. casei*-01. No entanto, os valores registados no tempo zero poderão de alguma forma estar relacionados com o aquecimento do leite, que já o mesmo pode contribuir para degradar as proteínas.

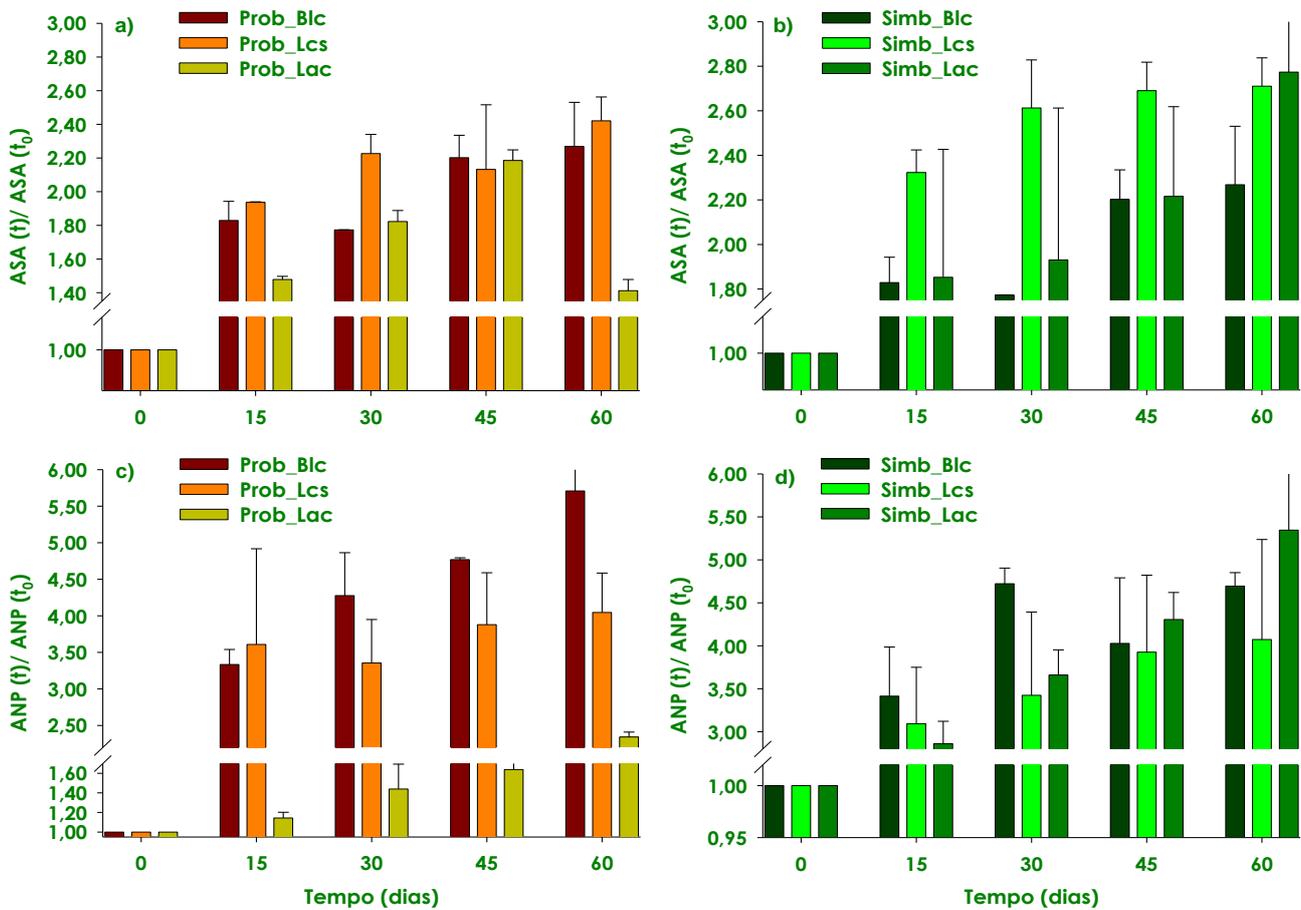


FIGURA 10: Rácio de azoto solúvel em água (ASA) e de azoto não proteico (ANP) em matrizes probióticas (a,c) e simbióticas (b,d) inoculadas com *B. lactis* B94, *L. casei*-01 e *L. acidophilus* La-5 ao longo de 60 dias de maturação a 12 °C.

Nas matrizes inoculadas, *L. casei*-01 foi a estirpe probiótica responsável por valores ligeiramente superiores em ambas as fracções azotadas nos dois tipos de matrizes coaguladas após 15 dias a 12 °C.

As matrizes probióticas e simbióticas inoculadas com *B. lactis* B94 apresentaram também um nível significativo de proteólise, especialmente após 60 dias a 12 °C. No entanto, em comparação com as amostras inoculadas com *L. casei*-01, este fenómeno foi mais gradual nos primeiros 30 dias de maturação. Estes resultados parecem confirmar os publicados por Ong et al. (2007) que indicam uma maior degradação de caseína em queijo Cheddar com *L. casei* e *L. paracasei*, bem como maiores concentrações de aminoácidos livres em todos os queijos probióticos, mas contrastam com os valores de NSA registados nas matrizes probióticas e simbióticas inoculadas com *B. lactis* B94. De acordo com Ong et al. (2007) *Bifidobacterium* sp. são bactérias com pouco potencial proteolítico em comparação com o potencial das estirpes de *Lactobacillus*.

Os valores mais baixos para as fracções ASA e ANP em ambos os tipos de matrizes inoculadas com *L. acidophilus* La-5, revelam uma vez mais o potencial proteolítico das enzimas microbiológicas. De realçar

que as contagens de células viáveis de *L. acidophilus* La-5 foram menores em comparação com as de *L. casei*-01 ou *B. lactis* B94, resultando numa menor actividade enzimática microbiana nas proteínas ou peptídeos do leite. No entanto, e embora em menor ordem de grandeza, é interessante observar o efeito simbiótico que foi pronunciado nas matrizes inoculadas com *L. acidophilus* La-5, resultando num aumento progressivo de ANP ao longo do tempo. De acordo com o teste de Mann-Whitney, ocorreram diferenças significativas nas matrizes com *L. casei*-01 e *L. acidophilus* La-5 para todos os pontos de amostragem ($p < 0,05$), excepto para 60 dias de armazenamento, facto não corroborado com os resultados do teste Kruskal-Wallis que indicou diferenças não significativas entre as matrizes inoculadas com cada uma das bactérias probióticas. No que diz respeito à evolução das fracções azotadas ao longo do tempo de maturação, o teste de Wilcoxon indicou diferenças significativas entre 0 e 45 dias de armazenamento ($p < 0,02$), mas não entre 45 e 60 dias de armazenamento ($p > 0,05$). Vários autores têm indicado que a incorporação de bactérias probióticas em queijo geralmente não afecta a proteólise primária, promovida essencialmente pelo agente coagulante ou eventual presença de plasmina no leite (Gomes et al., 1995, 1998; Cruz et al., 2009), mas afecta a proteólise secundária, aumentando o teor total de aminoácidos livres, que podem contribuir para o sabor/ aroma do queijo (Cruz et al., 2009).

Lipólise em matrizes de leite coaguladas

Não se registou uma lipólise muito acentuada ao longo do tempo de maturação independentemente do tipo de matriz coagulada como pode ser observado na Figura 11. O total de ácidos gordos livres (AGLT) aumentou de 4,41 para 5,15 mg g⁻¹ matriz coagulada na matrizes probióticas ou simbióticas ao longo dos 60 dias do período de maturação, o que representa um aumento de 17%, revelando um aumento significativamente estatístico em relação com os valores de AGL registados nas matrizes controlo ($p < 0,02$).

Sabe-se que as bactérias lácticas não são caracterizadas pelo seu potencial lipolítico, quando comparadas com outras bactérias (Grattepanche et al., 2008). No entanto, vários queijos probióticos curados têm sido desenvolvidos, onde baixos índices de maturação lipolítica contribuíram para uma qualidade positiva global do queijo (Gomes et al., 1998; Ong et al., 2007).

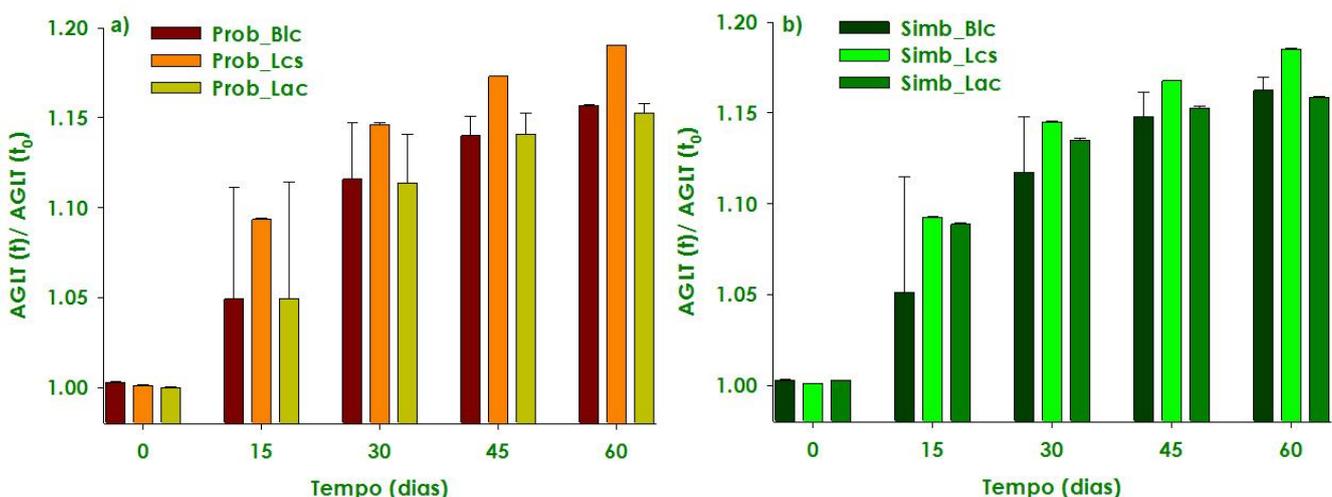


FIGURA 11. Rácio de ácidos gordos livres totais (AGLT) em matrizes probióticas (a) e simbióticas (b) inoculadas com *B. lactis* B94, *L. casei*-01 e *L. acidophilus* La-5 ao longo de 60 dias de maturação a 12 °C.

Neste trabalho, não foram registadas diferenças estatisticamente significativas entre o teor de AGL totais em matrizes de probióticos ou simbióticos, tendo-se registado valores ligeiramente mais elevados de AGLT nas matrizes inoculadas com *L. casei*-01, uma observação que pode corroborar a maior actividade lipolítica destacada por Ong et al. (2007).

CONCLUSÃO

No que diz respeito ao crescimento e viabilidade das três espécies em estudo em amostras de leite coagulado pode concluir-se que foi nas amostras inoculadas com *B. lactis* B94 que observaram os valores mais elevados de células viáveis, seguindo-se a *L. casei*-01 e a *L. acidophilus* La5. A adição de prebiótico teve um efeito positivo na evolução do número de células viáveis nas matrizes inoculadas com *B. lactis* B94 e *L. casei*-01, dado que originou valores de células viáveis ligeiramente superiores ao longo do tempo, ao contrário do observado nas matrizes inoculadas com *L. acidophilus* La5 onde a adição de prebiótico não se revelou estimuladora. No entanto, em todas as matrizes de leite coagulado e ao longo dos 60 dias de maturação a 12 °C, o número de células viáveis ao longo do tempo foi sempre superior a 10⁶ cfu/g revelando que esta matriz, semelhante ao queijo fresco, pode ser veículo de bactérias probióticas e como tal ser considerado um potencial produto alimentar probiótico. No que respeita aos valores de acidez, verificou-se, no geral, um perfil decrescente de pH resultante da actividade metabólica (fermentação) das bactérias em estudo nas matrizes probióticas e simbióticas – um comportamento que pode ter algumas implicações organolépticas¹⁴.

No que concerne a evolução da actividade proteolítica, através da análise da variação de ASA e de ANP ao longo do tempo, verificam-se diferentes perfis de evolução das duas fracções azotadas nas diferentes matrizes lácteas inoculadas com as três estirpes probióticas. Nas matrizes probióticas e simbióticas inoculadas com *L. casei*-01, observou-se um aumento progressivo nos primeiros 30 dias de incubação em ambas as fracções azotadas analisadas atingindo valores de 65 e 40% de ASA e ANP, respectivamente. Após este período de incubação, os valores mantiveram-se aproximadamente constantes o que comprova o potencial proteolítico desta bactéria probiótica. Uma variação menos acentuada nas duas fracções azotadas ao longo do tempo de maturação foi observada nas matrizes inoculadas com *B. lactis* B94, evidenciando uma menor expressão de enzimas proteolíticas capazes de degradar caseína e polipéptideos na matriz láctea coagulada. A adição de 50% FOS:Inulina não foi sinónimo de potenciação de actividade enzimática responsável pela degradação de proteínas lácteas tanto nas matrizes inoculadas com *L. casei* como nas inoculadas com *B. lactis* B94. De acordo com os resultados da análise estatística, a adição de prebiótico não se revelou um factor estatisticamente significativo para ambas as fracções de azoto solúvel. Por sua vez, nas matrizes lácteas inoculadas com *L. acidophilus* La5, a variação de ASA foi mais pronunciada ao longo do tempo do que a ocorrida para a fracção de ANP. Este facto evidencia uma maior expressão de enzimas capazes de degradar caseína mas não tanto de enzimas capazes de actuar em polipeptídeos resultantes da quebra de ligações peptídicas na caseína. Os índices de proteólise e os parâmetros lipolíticos, após 15 dias de maturação nas matrizes probióticas e simbióticas, podem indicar um potencial

¹⁴ Características organolépticas – Características que podem ser percebidas pelos sentidos humanos, como o sabor, o odor, a cor e a textura dos alimentos.

tecnológico promissor, especialmente para as estirpes *B. lactis* B94 e *L. casei*-01 para produzir novos tipos de queijo com benefícios associados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal R (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology* 19: 227-246.
- Alonso L, Cuesta EP & Gilliland SE (2003). Production of free conjugated linoléico acid by *L. acidophilus* and *L. casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science* 86: 1941-1946.
- Cardarelli HR, Saad SMI, Gibson GR, Vulevic J (2007). Functional *petit suisse* cheese: Measure of the prebiotic effect. *Anaerobe* 13: 200-207.
- Casiraghi MC, Canzi E, Zanchi R, Donati R, Villa L (2007). Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. *Journal of Applied Microbiology* 103: 499-506.
- Cruz AG, Buriti FCA, Souza CHB, Faria JAF, Saad SMI (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology* 20: 344-354.
- Douglas LC, Sanders ME (2008). Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association* 108: 510-521.
- Freitas AC, Fresno JB, Prieto B, Carballo FJ, Malcata FX (1997). Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* 60: 219-229.
- Freitas AC, Fresno JB, Prieto B, Carballo FJ, Malcata FX (1998). Influence of milk source and ripening time on free amino acid profile of Picante cheese. *Food Control* 9: 187-194.
- Gomes AMP, Madalena MV, Malcata FX (1998). Survival of probiotic microbial strains in a cheese matrix during ripening: Simulation of rates of salt diffusion and microorganism survival. *Journal of Food Engineering* 36: 281-301.
- Gomes AMP, Malcata FX, Klaver FAM, Grande HJ (1995). Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Bo and *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 49: 71-95.
- Grattepanche F, Miescher-Schwenninger S, Meile L, Lacroix C (2008). Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. *Dairy Science and Technology* 88(4-5): 421-444.
- Holzappel WH, Haberer P, Geison R, Björkroth J, Schillinger U (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American journal of Clinical Nutrition* 73: 365S-373S.
- Kılıç GB, Kuleaşan H, Eralp İ, Karahan AG (2009). Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. *LWT – Food Science and technology* 42: 1003-1008.
- Kuchroo CN, Fox PF (1982a). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37: 331-335.
- Kuchroo CN, Fox PF (1982b). Fractionation of the water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: Chemical methods. *Milchwissenschaft* 37: 651-553.
- Macedo LN, Luchese RH, Guerra AF, Barbosa CG (2008). Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 28(4): 935-942.
- Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S (2007). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology* 104: 305-344.
- Oliveira-Sequeira TCG, Ribeiro CM, Gomes MIFV (2008). Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. *Ciência Rural, Santa Maria* 38(9): 2670-2679.
- Ong L, Henriksson A, Shah NP (2007). Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal* 17: 67-78.
- Patel P, Parekh T, Sublash H (2008). Development of Probiotic and Synbiotic Chocolate Mousse: A Functional Food. *Biotechnology* 7(4): 769-774.
- Ramírez LAG, Ospina AJG, Jaramillo LMA, Patiño BT (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema*. *Revista Lasallista de Investigación* 4(2): 37-42.
- Saulnier DMA, Spinler JK, Gibson GR, Versalovic J (2009). Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 1-7.
- Shah P (2000). Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83: 894-907.