

VIABILIDADE DE *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 PROBIÓTICO EM SORVETE FUNCIONAL

Nathasha Noronha Arechavaleta¹
Amanda Souza da Motta²

RESUMO

Bactérias ácido-láticas (BAL) são microrganismos com diversas aplicações na indústria de alimentos, considerando o potencial tecnológico, o incremento nas características sensoriais dos produtos e a capacidade probiótica de alguns isolados. Alimentos funcionais, além de aplicação nutricional, possuem efeito benéfico à saúde. O objetivo do presente estudo foi selecionar bactérias lácticas isoladas de leite cru de búfala quanto a propriedades tecnológicas e desenvolver sorvete enriquecido com bactéria probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5. Para tanto, BALs foram selecionadas quanto a capacidade proteolítica, capacidade de coexistência com bactérias lácticas, atividade antimicrobiana e antilisteria, estabilidade com conservantes alimentares e viabilidade em sorvete. A proteólise foi avaliada inoculando-se as BAL em ágar leite. A coexistência entre as bactérias lácticas foi avaliada pelo método da picada. A atividade antimicrobiana de BALs frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi avaliada pelo método de sobrecamada. As espécies de *L. innocua*, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* também foram empregadas como indicadoras. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados mensurados pelo halo de inibição de crescimento. *Lact. rhamnosus* LB 1.5 e *Lact. paracasei* LB 6.4 foram expostos a nisina, pediocina e conservante sorbato de potássio, através de ensaio de difusão em ágar leite. Por fim, a viabilidade de *Lact. rhamnosus* LB1.5 em sorvete foi avaliada por 210 dias. Dentre os onze isolados estudados, apenas *Lacticaseibacillus* sp. M1A3 não apresentou atividade proteolítica. *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. paracasei* LB6.4 demonstraram capacidade de associação com *Lact. paracasei* LB1.4, *Lactococcus lactis* (L4A8, L4AN1 e L4AN17) e *Leuconostoc mesenteroides* LB5.5, o que possibilita a aplicação simbiótica destes isolados. Quanto à atividade antimicrobiana, *Lact. paracasei* LB 6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 inibiram as espécies de *Listeria* spp., sugerindo potencial bioprotetor. Os resultados evidenciaram sensibilidade de ambas BALs selecionadas à nisina, com halos de inibição de crescimento com diâmetro médio igual ou superior a 11 mm e 18 mm. Porém, pediocina e sorbato de potássio não inibiram o crescimento dos *Lactobacillus* selecionados, podendo atuar como conservantes associados a estes isolados. *Lact. rhamnosus* LB1.5 manteve-se viável em sorvete durante os 210 dias de experimento, com valores médios superiores a 10⁷ UFC/mL, possibilitando sua aplicação em sorvetes, além de oferecer benefícios bioprotetores e funcionais ao produto.

Palavras-chave: alimentos funcionais, bioprotetor, *Lacticaseibacillus*, *Listeria* sp., probiótico

VIABILITY OF *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 PROBIOTIC IN FUNCTIONAL ICE CREAM

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms with diverse applications in the food industry, considering the technological potential, the increase in the sensorial characteristics of products

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 00192806@ufrgs.br

² Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*Correspondência: amanda.motta@ufrgs.br

and the probiotic capacity of some isolates. Functional foods, in addition to their nutritional application, have a beneficial effect on health. The objective of the present study was to select lactic acid bacteria isolated from raw buffalo milk for technological properties and to develop ice cream enriched with the probiotic bacteria *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5. To this end, LABs were selected for their proteolytic capacity, ability to coexist with lactic acid bacteria, antimicrobial and antilisteria activity, stability with food preservatives and viability in ice cream. Proteolysis was evaluated by inoculating the BAL with milk agar. The coexistence between lactic acid bacteria was assessed using the bite method. The antimicrobial activity of LABs against *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was evaluated by the overlay method. The species of *L. innocua*, *L. monocytogenes* and *L. seeligeri* were also used as indicators. The experiments were carried out in triplicate and the results were measured by the growth inhibition halo. *Lact. rhamnosus* LB 1.5 and *Lact. paracasei* LB 6.4 were exposed to nisin, pediocin and potassium sorbate preservative, through a milk agar diffusion test. Finally, the viability of *Lact. rhamnosus* LB1.5 in ice cream was evaluated for 210 days. Among the eleven isolates studied, only *Lacticaseibacillus* sp. M1A3 did not show proteolytic activity. *Lact. rhamnosus* LB1.5 and *Lact. paracasei* LB6.4 demonstrated the ability to associate with *Lact. paracasei* LB1.4, *Lactococcus lactis* (L4A8, L4AN1 and L4AN17) and *Leuconostoc mesenteroides* LB5.5, which allows the symbiotic application of these isolates. Regarding antimicrobial activity, *Lact. paracasei* LB 6.4 and *Lact. rhamnosus* LB1.5 inhibited *Listeria* spp. species, suggesting bioprotective potential. The results showed sensitivity of both selected BALs to nisin, with growth inhibition halos with an average diameter equal to or greater than 11 mm and 18 mm. However, pediocin and potassium sorbate did not inhibit the growth of the selected *Lactobacillus*, and may act as preservatives associated with these isolates. *Lact. rhamnosus* LB1.5 remained viable in ice cream during the 210 days of the experiment, with average values greater than 10^7 CFU/mL, enabling its application in products such as ice cream, in addition to offering bioprotective and functional benefits to the product.

Keywords: bioprotective, functional foods, *Lacticaseibacillus*, *Listeria* sp., probiotic

VIABILIDAD DEL PROBIÓTICO *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 EN HELADO FUNCIONAL

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos con diversas aplicaciones en la industria alimentaria, considerando el potencial tecnológico, el aumento de las características sensoriales de los productos y la capacidad probiótica de algunos aislados. Los alimentos funcionales, además de su aplicación nutricional, tienen un efecto beneficioso para la salud. El objetivo del presente estudio fue seleccionar bacterias de ácido láctico aisladas de leche cruda de búfala por sus propiedades tecnológicas y desarrollar helado enriquecido con la bacteria probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5. Para ello, se seleccionaron BAL por su capacidad proteolítica, capacidad de coexistir con bacterias del ácido láctico, actividad antimicrobiana y antilisteria, estabilidad con conservantes alimentarios y viabilidad en helados. La proteólisis se evaluó inoculando el BAL con agar con leche. La coexistencia entre bacterias lácticas se evaluó mediante el método de la mordida. La actividad antimicrobiana de las BAL contra *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se evaluó mediante el método de superposición. También se utilizaron como indicadores las especies de *L. innocua*, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri*. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se midieron

mediante el halo de inhibición del crecimiento. *Lacto. rhamnosus* LB 1.5 y *Lact. paracasei* LB 6.4 fueron expuestos a nisina, pediocina y conservante sorbato de potasio, mediante una prueba de difusión en agar leche. Finalmente, la viabilidad de *Lact. rhamnosus* LB1.5 en helado se evaluó durante 210 días. Entre los once aislados estudiados, sólo *Lacticaseibacillus* sp. M1A3 no mostró actividad proteolítica. *Lacto. rhamnosus* LB1.5 y *Lact. paracasei* LB6.4 demostró la capacidad de asociarse con *Lact. paracasei* LB1.4, *Lactococcus lactis* (L4A8, L4AN1 y L4AN17) y *Leuconostoc mesenteroides* LB5.5, lo que permite la aplicación simbiótica de estos aislados. En cuanto a la actividad antimicrobiana, *Lact. paracasei* LB 6.4 y *Lact. rhamnosus* LB1.5 inhibió las especies de *Listeria* spp., lo que sugiere un potencial bioprotector. Los resultados mostraron sensibilidad de ambos BAL seleccionados a la nisina, con halos de inhibición del crecimiento con un diámetro promedio igual o mayor a 11 mm y 18 mm. Sin embargo, la pediocina y el sorbato de potasio no inhibieron el crecimiento de los *Lactobacillus* seleccionados y pueden actuar como conservantes asociados con estos aislados. *Lacto. rhamnosus* LB1.5 se mantuvo viable en helados durante los 210 días que duró el experimento, con valores promedio superiores a 10^7 UFC/mL, lo que permitió su aplicación en productos como helados, además de ofrecer beneficios bioprotectores y funcionales al producto.

Palabras clave: alimentos funcionales, bioprotectores, *Lacticaseibacillus*, *Listeria* sp., probióticos

INTRODUÇÃO

O leite de búfala apresenta propriedades vantajosas para o desenvolvimento de alimentos funcionais, que visam atender ao público que prioriza a alimentação saudável e produtos com alto valor nutricional, uma vez que, além de proporcionar maior rendimento na produção de derivados, possui elevada quantidade de proteína, lactose, vitaminas, minerais, gordura (1). Além disso, bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de leite bubalino têm demonstrado capacidade probiótica, conforme estudo publicado por Breyer et al. (2).

Por definição, probióticos são microrganismos vivos que, ao serem administrados ou consumidos em quantidades adequadas, conferem efeito benéfico à saúde do consumidor (3). Atualmente, *Lactobacillus* e bifidobactérias são os mais empregados em produtos alimentares por exercerem tal característica (4).

Bactérias ácido-láticas são amplamente empregadas em alimentos, uma vez que apresentam características tecnológicas, tais como fermentação de lactose, atividade proteolítica e capacidade de acidificação do meio. Além disso, as espécies que apresentam capacidade probiótica auxiliam no desenvolvimento de novos produtos alimentícios funcionais podendo ser empregadas de forma associada com outras espécies de bactérias láticas com potencial tecnológico, promovendo segurança microbiológica (5).

Quando presentes em alimentos, microrganismos do gênero *Lacticaseibacillus* podem exercer efeito antimicrobiano frente a espécies de bactérias patogênicas indesejáveis (6-9). Sabe-se que algumas bactérias ácido-láticas possuem efeitos inibidores sobre *Listeria* spp. promovidos pela produção de bacteriocinas (10). Tal capacidade inibitória é importante, uma vez que espécies patogênicas, como *Listeria monocytogenes*, podem contaminar alimentos, haja vista a capacidade de persistência e de formação de biofilme, quando as condições de higienização de ambientes de processamento não são adequadas (11).

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas antimicrobianas sintetizadas nos ribossomos das células bacterianas, que apresentam ação bacteriostática ou bactericida sobre microrganismos indesejáveis, não promovendo alterações sensoriais ao produto. A utilização destes compostos é uma alternativa de conservação que possibilita segurança microbiológica à população e pode estender a vida de prateleira de produtos alimentares, exercendo ação inibitória sobre

microrganismos indesejáveis (12, 13).

A produção de derivados lácteos visa atender ao público que prioriza alimentação saudável e nutritiva. Dentre estes, as sobremesas geladas são muito populares pela alta palatabilidade e possibilidade de incremento funcional (14). Sendo assim, pesquisas de novos alimentos funcionais estão sendo desenvolvidas para elaboração de produtos não convencionais, uma vez que, tradicionalmente, o maior consumo de derivados se aplica a lácteos fermentados, como iogurte e bebidas lácteas (15). O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano de duas bactérias lácticas candidatas a probióticos e prospectar a aplicação da cultura probiótica *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 em sorvete funcional.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de cultivo

Bactérias lácticas foram isoladas de leite cru de búfala, proveniente de tanque de refrigeração de laticínio localizado no município de Cassino/RS, Brasil, entre os anos de 2007 e 2011. *Lacticaseibacillus paracasei* LB6.4 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* LB1.5 foram selecionadas quanto à inocuidade e ao potencial probiótico (2). Estes isolados foram reativados em caldo de *Man Rogosa Sharpe* (MRS; Merck, Alemanha), suplementado com Tween 80, a 37 °C por 24 h e semeados em ágar MRS. Outras culturas isoladas de leite bubalino como *Lacticaseibacillus* sp. (M1A3, L3A7), *Lactococcus lactis* (L4AN1, L4A8, L4AN17, LB10.3), *Leuconostoc mesenteroides* (LB10.4, LB5.5), *Lacticaseibacillus paracasei* (LB1.4) foram empregadas neste estudo. *Lacticaseibacillus rhamnosus* FAGRON™ foi utilizada como cultura comercial controle e cultivada nas mesmas condições.

Espécies de *Listeria* spp. isoladas de alimentos, foram empregadas como culturas indicadoras: *Listeria innocua* (6B, L07, L10 e L13), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644, 4C, 4L carcaça e QF Oxford) e *Listeria seeligeri* (BP Oxford, BP Palcam, MP Oxford e PF Oxford). Estes isolados foram reativados em *Tryptone Soya Broth* (TSB; Oxoid, Inglaterra) acrescido de extrato de levedura (0,6%) e incubados a 37 °C por 24 h. As culturas indicadoras *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI; Oxoid, Inglaterra) e incubadas a 37 °C por 24 h.

Atividade proteolítica das bactérias lácticas

A atividade proteolítica das bactérias lácticas foi avaliada em meio de cultura ágar leite pelo método da picada, com incubação a 37 °C por 24 h. A cultura indicadora *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle positivo. O ensaio foi realizado em quadruplicada, sendo os resultados expressos pela mensuração do diâmetro dos halos observados, em milímetros (mm) (16).

Coexistência entre as bactérias lácticas selecionadas

Para a avaliação de coexistência entre as bactérias lácticas *Lacticaseibacillus* sp. (M1A3, L3A7), *Lactococcus lactis* (L4AN1, L4A8, L4AN17, LB10.3), *Leuconostoc mesenteroides* (LB10.4, LB5.5), *Lact. paracasei* (LB1.4), elas foram inoculadas em solução salina 0,85% NaCl, para a obtenção de suspensões bacterianas padronizadas com densidade ótica (DO) de 0,5 OD medida em escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Com auxílio de suabe estéril, cada suspensão foi semeada em superfície, individualmente, em placas de ágar MRS. Posteriormente, *Lact. paracasei* LB6.4, *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. rhamnosus* (comercial)

foram inoculadas por picada. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e a capacidade de coexistência foi avaliada pela mensuração do diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) (17). O experimento foi realizado em triplicata.

Atividade antimicrobiana das bactérias lácticas probióticas

A atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi avaliada pelo método de sobrecamada (18). As bactérias indicadoras foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, uma alíquota de 500 µL destes cultivos foram transferidos para 100 mL de BHI semi-sólido (ágar 0,75%) (10^5 UFC/mL). Assim, o preparado semi-sólido foi acrescido em sobrecamada às placas de Müller Hinton (MH; Kasvi, Brasil) que continham 2 µL de cultivo de cada BAL (*Lacticaseibacillus rhamnosus* LB 1.5 e *Lacticaseibacillus paracasei* LB6.4) previamente inoculadas. Após incubação a 37 °C por 24 h, o diâmetro (mm) dos halos de inibição de crescimento do microrganismo indicador foi mensurado. O experimento foi realizado em triplicata.

Avaliação de atividade antilisteria das bactérias probióticas

A ação antilisteria de *Lact. paracasei* LB6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 foi avaliada frente a 12 espécies de *Listeria* spp. pelo Método da Gota, descrito por Motta *et al.*, (19). As culturas indicadoras foram incubadas em ágar BHI, a 37 °C por 48 h. A partir deste cultivo, obteve-se solução padronizada em DO 0,5 de acordo com a escala de McFarland que, posteriormente, foi inoculada em superfície de ágar leite, em três direções. As culturas probióticas foram cultivadas em caldo MRS e o sobrenadante livre de células (SLC) foi obtido por meio de centrifugação a 10.000 rpm por 15 min. Alíquotas de 10 µL de cada SLC foram inoculadas em placas de ágar leite contendo as culturas indicadoras. As zonas de inibição foram medidas (mm) após incubação a 37 °C por 24 h. O experimento foi realizado em triplicata.

Estabilidade das bactérias lácticas frente a bacteriocinas e conservantes alimentares

Alíquotas de 20 µL de nisina 2,5%, pediocina 1% e sorbato de potássio 0,1% foram acrescidas em placas de ágar leite previamente inoculadas com um suabe estéril com as suspensões de *Lact. paracasei* LB6.4, *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. rhamnosus* comercial (Escala McFarland 0,5 OD – 10^8 UFC/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e as zonas de inibição foram expressas em milímetros (mm). O experimento foi realizado em triplicata.

Desenvolvimento de sorvete probiótico

O sorvete probiótico foi preparado a partir de uma formulação comercial liofilizada reconstituída em 400 mL de leite semidesnatado *Ultra High Temperature* (UHT) refrigerado, conforme instruções do fabricante. As bactérias ácido-láticas selecionadas (*Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. rhamnosus* comercial) foram inoculadas em caldo MRS a 37 °C por 24 h. As suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min, e lavadas com água peptonada 0,1% para a obtenção de *pellets*, que foram adicionados a 20 mL de sorvete, em concentração final correspondente a 10^8 UFC/mL. O mesmo volume do sorvete reconstituído, sem adição de BAL, foi reservado como amostra controle. Assim, foram separados três grupos de amostras para análise: G1 (sorvete controle), G2 (sorvete com probiótico comercial) e G3

(sorvete e *Lact. rhamnosus* LB1.5). As amostras de sorvete foram submetidas a congelamento lento e armazenadas por 210 dias, a -18 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

Avaliação da viabilidade das bactérias lácticas em sorvete funcional

A viabilidade das culturas probióticas foi determinada durante a vida de prateleira do produto, com coletas de amostras de sorvete antes do congelamento e nos tempos 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias, estocados a -18 °C. A análise foi feita através da contagem das células viáveis pela técnica de microdiluição em *Plate Count Agar* (PCA; Kasvi, Itália) e MRS, conforme descrito por Miles et al. (20). O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia (UFC/mL) após incubação a 37 °C por 48 h. O pH foi avaliado por papel indicador de pH (escala 0-14, Merck®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade proteolítica

Dentre as BALs estudadas, apenas o isolado *Lacticaseibacillus* sp. M1A3 não demonstrou atividade proteolítica nas condições experimentais avaliadas. Os demais isolados demonstraram atividade proteolítica com formação de halo médio superior a 11 mm de diâmetro, quando cultivadas em ágar leite. *Lactococcus lactis* L4A8 apresentou halo médio de 19 mm de diâmetro, sendo o maior valor observado. O controle positivo, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, apresentou halo médio de 17 mm.

A proteólise é uma capacidade tecnológica desejável na produção de queijos, uma vez que promove o processo de maturação e características organolépticas (21, 22). Corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, Mechai et al. (23) observou maior atividade proteolítica em isolados do gênero *Lactococcus*. Conforme Balthazar et al. (22), a adição de bactéria starter com alto potencial proteolítico para a produção de iogurte, faz-se necessária para a redução do tempo no processo de fermentação do leite.

Coexistência entre as bactérias lácticas selecionadas

No desenvolvimento de derivados lácteos, a associação entre bactérias lácticas é empregada como uma alternativa de incremento tecnológico, como a associação de culturas iniciadoras (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) para o processo fermentativo do iogurte, podendo ser acrescida ou não de probióticos, desde que a viabilidade destes microrganismos seja mantida nos produtos derivados (21, 24).

Os isolados *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. paracasei* LB6.4, selecionados quanto ao seu potencial probiótico, demonstraram capacidade de associação com *Lact. paracasei* LB1.4, *Lactococcus lactis* (L4A8, L4AN1 e L4AN17) e *Leuconostoc mesenteroides* LB5.5, uma vez que não apresentaram inibição de crescimento, conforme observado na Tabela 1.

Em contrapartida, *Lact. rhamnosus* FAGRON™ apresentou capacidade de coexistência apenas com os isolados *Lact. paracasei* LB1.4, *Lactococcus lactis* (L4A8, L4AN1, L4AN17 e LB10.4) e *Leuconostoc mesenteroides* LB5.5.

Tabela 1. Avaliação da capacidade de coexistência entre as bactérias ácido-láticas isoladas de leite de búfala, pelo método da picada.

Bactéria ácido-lática	Halo de inibição (mm)		
	<i>Lact. rhamnosus</i> LB1.5	<i>Lact. paracasei</i> LB6.4	<i>Lact. rhamnosus</i> FAGRON™
<i>Lact. paracasei</i> LB1.4	NO	NO	NO
<i>Lact. paracasei</i> LB6.4	6	NO	8
<i>Lact. paracasei</i> M1A3	NO	NO	7,3
<i>Lact. rhamnosus</i> LB1.5	NO	11	12,7
<i>Lact. rhamnosus</i> FAGRON	NO	5	NO
<i>Lacticaseibacillus</i> sp. L3A7	10,7	8	10,3
<i>Lactococcus lactis</i> L4A8	NO	NO	NO
<i>Lactococcus lactis</i> L4AN1	NO	NO	NO
<i>Lactococcus lactis</i> L4AN17	NO	NO	NO
<i>Lactococcus lactis</i> LB10.3	NO	7	NO
<i>Leuc. mesenteroides</i> LB10.4	7,3	8,7	13,7
<i>Leuc. mesenteroides</i> LB5.5	NO	NO	NO

NO: halo não observado.

Atividade antimicrobiana das bactérias lácticas

A capacidade antagonista sobre patógenos, amplamente investigada, é uma das principais propriedades desejáveis para linhagens probióticas (18, 25, 26, 27).

O efeito antimicrobiano dos isolados selecionados demonstrou que *Lact. paracasei* LB6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 apresentaram atividade inibitória frente à linhagem patogênica *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, com formação de halo de inibição de crescimento superior a 6 mm de diâmetro. Entretanto, tal atividade não foi observada frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, já que não houve formação de halo de inibição.

Em seus estudos sobre produção de *Lactolisterina*, Mirkovic et al. (28) demonstraram a potencialidade antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1-4 frente a dois isolados patogênicos, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Nos estudos de Salehizadeh et al. (26) com bactérias lácticas isoladas de fezes de frangos de corte, todas as cepas de *Lactobacillus* estudadas apresentaram halos médios de inibição superiores a 10 mm frente às bactérias indicadoras *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Atividade antilisteria de BAL selecionadas

A ação antimicrobiana de *Lact. paracasei* LB6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 frente a espécies de *Listeria* spp. foi observada pela formação de halo de inibição de crescimento, conforme apresentado em Tabela 2. *Lact. paracasei* LB6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 apresentaram halo de inibição de crescimento médio superior a 8 mm de diâmetro para a maioria das espécies empregadas. Apenas para os isolados *L. innocua* 6B e *L. monocytogenes* 4L, foram observados valores médios de halos de inibição de crescimento iguais a 7,5 e 6,7 mm de diâmetro, respectivamente. Em estudos similares, demonstrou-se que a adição de isolados de BAL em alimentos pode inibir o crescimento de *L. monocytogenes* (29, 30), semelhante ao potencial bioprotetor dos isolados *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. paracasei* LB6.4 exercido sobre as diferentes espécies de *Listeria* spp. empregadas neste estudo.

Tabela2. Atividade antilisteria das bactérias lácticas selecionadas frente a espécies de *Listeria* spp., pelo método da gota.

Isolado	Origem	Halo de inibição (mm)	
		<i>Lact. paracasei</i> LB 6.4	<i>Lact. rhamnosus</i> LB 1.5
<i>L. innocua</i> 6B	Queijo artesanal	7,5	7,5
<i>L. innocua</i> L07	Leite de búfala cru	8,5	8,7
<i>L. innocua</i> L10	Leite de búfala cru	9,6	9
<i>L. innocua</i> L13	Leite de búfala cru	9,8	9,8
<i>L. monocytogenes</i> 4C	Carcaça de frango	8,7	8
<i>L. monocytogenes</i> 4L	Carcaça de frango	7,5	6,7
<i>L. monocytogenes</i> ATCC	ATCC 7644	9,7	9,7
<i>L. monocytogenes</i> QF Oxford	Queijo fatiado	8,5	8,5
<i>L. seeligeri</i> BP Oxford	Bancada de presunto	8,8	8,8
<i>L. seeligeri</i> BP Palcam	Bancada de queijo	8,8	8,8
<i>L. seeligeri</i> MP Oxford	Mãos de manipulador	9	9
<i>L. seeligeri</i> PF Oxford	Presunto fatiado	9,7	8,9

Efeito de bacteriocinas e conservante sobre as bactérias lácticas

Os isolados selecionado, *Lact. paracasei* LB 6.4 e *Lact. rhamnosus* LB1.5 demonstraram sensibilidade à nisina 2,5%, com formação de halo de inibição de crescimento com diâmetros médios de 11 mm e 18 mm, respectivamente. Pediocina 1% e sorbato de potássio 0,1%, não inibiram o crescimento dos *Lacticaseibacillus* selecionados. Não foi observado formação de halo de inibição frente a *Lact. rhamnosus* FAGRON™ para nenhum dos conservantes estudados.

A atividade antimicrobiana exercida por BAL pode ser atribuída à produção de metabólitos como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas (10). O emprego de bacteriocinas é uma alternativa para a conservação de alimentos, uma vez que apresentam propriedades como baixa toxicidade e efeitos bacteriostáticos e bactericidas frente a microrganismos patogênicos ou deteriorantes de alimentos (30, 31, 32). Ressalta-se que algumas bacteriocinas possuem efeitos antimicrobianos frente a espécies de patógenos, como alta atividade antilisterial (30, 33). No presente estudo, as bactérias ácido-lácticas selecionadas não demonstraram sensibilidade à pediocina e ao sorbato de potássio, o que possibilita a associação destes conservantes como alternativa para inibição de bactérias indesejáveis e aumento do tempo de validade dos alimentos.

Viabilidade celular dos *Lacticaseibacillus* no sorvete funcional

A cultura probiótica selecionada, *Lact. rhamnosus* LB1.5, demonstrou estabilidade durante o tempo de vida de prateleira do sorvete, com contagens celulares superiores a 10^7 UFC/mL até o último mês avaliado. Comparativamente, a amostra contendo o probiótico comercial *Lact. rhamnosus* manteve valores médios semelhantes, acima de 10^7 UFC/mL, ao longo do período de experimento, conforme observado na Tabela 3. Ambas BALs estudadas demonstraram viabilidade satisfatória, uma vez que mantiveram valores médios compatíveis com a concentração mínima diária de probióticos recomendada pela legislação brasileira entre 10^6 e 10^9 UFC/mL (34).

Tabela 3. Viabilidade celular de *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. rhamnosus* comercial, em sorvete comercial, a 18 °C, por 210 dias.

Isolados selecionados	Tempo (dias)	Valores médios (UFC/mL)	
		MRS	PCA
<i>Lact. rhamnosus</i> LB1.5	0	2,27 x 10 ⁸	2,83 x 10 ⁸
	30	3,83 x 10 ⁸	3,56 x 10 ⁸
	60	1,35 x 10 ⁷	1,18 x 10 ⁷
	90	1,97 x 10 ⁶	1,23 x 10 ⁶
	120	7,00 x 10 ⁷	7,25 x 10 ⁶
	150	1,21 x 10 ⁷	2,03 x 10 ⁷
	180	5,58 x 10 ⁷	3,75 x 10 ⁷
	210	5,00 x 10 ⁷	5,92 x 10 ⁶
<i>Lact. rhamnosus</i> FAGRON	0	3,08 x 10 ⁸	1,50 x 10 ⁸
	30	5,88 x 10 ⁷	8,00 x 10 ⁷
	60	2,30 x 10 ⁸	1,49 x 10 ⁸
	90	7,46 x 10 ⁷	3,33 x 10 ⁷
	120	5,50 x 10 ⁸	3,10 x 10 ⁸
	150	8,96 x 10 ⁷	9,50 x 10 ⁷
	180	4,17 x 10 ⁸	3,83 x 10 ⁸
	210	2,42 x 10 ⁷	2,39 x 10 ⁷

MRS: ágar De Man, Rogosa and Sharpe; PCA: Plate Count Agar.

Na avaliação da acidificação do sorvete, observou-se que, antes do congelamento, o pH foi aproximadamente 7 para todos os grupos. A acidificação do meio foi demonstrada nos meses seguintes (Figura 1). Aos 180 dias, foi observada redução de pH, para 5,5, na amostra controle, sem presença de isolados.

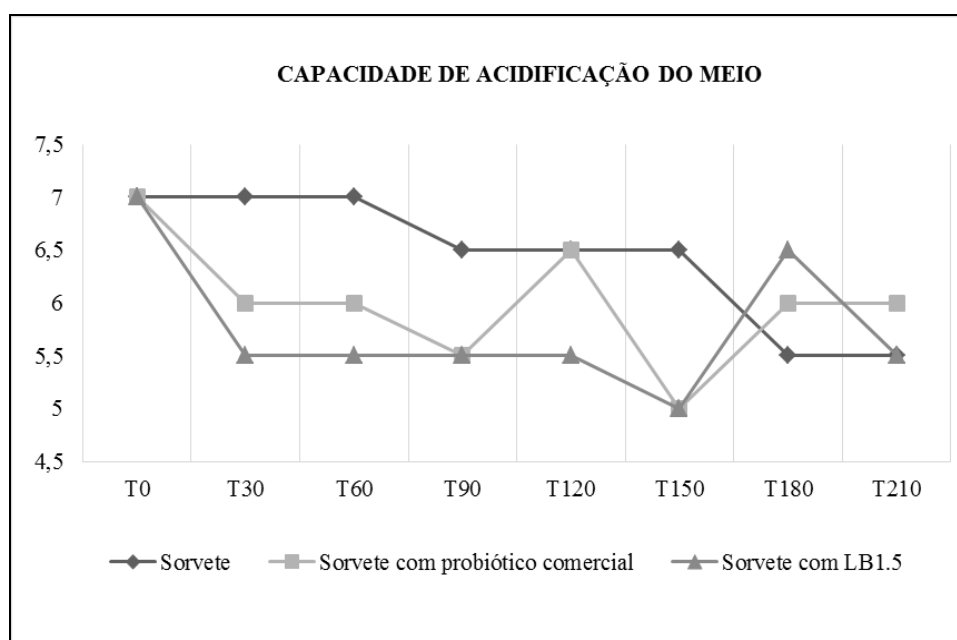


Figura 1. pH de sorvete funcional acrescido de *Lact. rhamnosus* LB1.5 e *Lact. rhamnosus* FRAGON (comercial), durante 210 dias, a -18 °C.

A técnica de conservação conhecida como crioconservação é amplamente utilizada em produtos alimentícios devido a sua capacidade de reduzir a atividade microbiana. Porém, a viabilidade celular de isolados probióticos pode variar conforme o microrganismo e o processo

tecnológico empregados. Especificamente, quando acrescidas a sorvetes, as bactérias lácticas podem promover a fermentação de açúcares presentes no leite e beneficiar o processo de degradação do derivado láctico (35). Sendo assim, para produtos probióticos submetidos a congelamento, a avaliação da viabilidade celular e de acidificação do meio tornam-se essenciais para manutenção da funcionalidade do produto.

CONCLUSÃO

Sorvete enriquecido com bactérias probióticas, não apenas torna-se uma alternativa saudável como alimento funcional, mas também oferece benefícios adicionais como culturas acidificantes e atividade antimicrobiana. Estudos como este possibilitam o desenvolvimento de produtos alimentares inovadores que promovem saúde intestinal e combatem microrganismos indesejados. Investir em pesquisas com bactérias ácido lácticas, portanto, contribui para a promoção da saúde e do bem-estar da população.

REFERÊNCIAS

1. Bailone RL, Borra RC, Roça RO, Aguiar LD, Harris M. Qualidade do leite cru refrigerado de búfalas (*Bubalus bubalis bubalis*) em diferentes fazendas e estações do ano no Brasil. *Cienc Anim Bras.* 2017;18:e-41815. doi: 10.1590/1089-6891v18e-41815.
2. Breyer GM, Arechavaleta NN, Siqueira FM, Motta AS. Characterization of lactic acid bacteria in raw buffalo milk: a screening for novel probiotic candidates and their transcriptional response to acid stress. *Probiotics Antimicro Proteins.* 2021;13:468-83. doi: 10.1007/s12602-020-09700-4.
3. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London: FAO/WHO; 2002.
4. Alameri F, Tarique M, Osaili T, Obaid R, Abdalla A, Masad R, et al. Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects. *Microorganisms.* 2022;10(2):389. doi: 10.3390/microorganisms10020389.
5. Albuquerque AP, Rodrigues TJA, Cavalcante Neto JL, Rocha APT. Utilization of powdered fruit pulp probiotic loaders as a functional food: general aspects and perspectives. *Braz J Food Technol.* 2021;24:e2019310. doi: 10.1590/1981-6723.31019.
6. Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Pal NK, Mandal S. Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines.* 2017;5(2):31. doi: 10.3390/biomedicines5020031.
7. Castilho NPA, Nero LA, Todorov SD. Molecular screening of beneficial and safety determinants from bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal calabresa. *Lett Appl Microbiol.* 2019;69(3):204-11. doi: 10.1111/lam.13194.
8. Coman MM, Mazzotti L, Silvi S, Scalise A, Orpianesi C, Cresci A, et al. Antimicrobial activity of SYN BIO[®] probiotic formulation in pathogens isolated from chronic ulcerative lesions: in vitro studies. *J Appl Microbiol.* 2020;128(2):584-97. doi: 10.1111/jam.14482.

9. Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, et al. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods*. 2021;10(12):3131. doi: 10.3390/foods10123131.
10. Aragon-Alegro LC, Lima EMF, Palcich G, Nunes TP, Souza KLO, Martins CG, et al. *Listeria monocytogenes* inhibition by lactic acid bacteria and coliforms in Brazilian fresh white cheese. *Braz J Microbiol*. 2021;52(2):847-58. doi: 10.1007/s42770-021-00431-4.
11. Duarte MC, Cortez N, Cortez MA, Franco R. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpe patogênica. *EnciBio* [Internet]. 2013 [citado 22 Jun 2024];9(16):25-36. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/3337> [30 Jul 2024].
12. Hassan MU, Nayab H, Shafique F, Williamson MP, Almansouri TS, Asim N, et al. Probiotic properties of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from traditional Pakistani yoghurt. *BioMed Res Int*. 2020;2020:8889198. doi: 10.1155/2020/8889198.
13. Hernández-González JC, Martínez-Tapia A, Lazcano Hernández G, García-Pérez BE, Castrejón-Jiménez NS. Bacteriocins from lactic acid bacteria. A powerful alternative as antimicrobials, probiotics, and immunomodulators in veterinary medicine. *Animals*. 2021;11(4):979. doi: 10.3390/ani11040979.
14. Afzaal M, Saeed F, Arshad MU, Nadeem MT, Saeed M, Tufail T. The effect of encapsulation on the stability of probiotic bacteria in ice cream and simulated gastrointestinal conditions. *Probiotics Antimicrob Protein*. 2019;11:1348-54. doi: 10.1007/s12602-018-9485-9.
15. Bernal-Castro CA, Díaz-Moreno C, Gutiérrez-Cortés C. Inclusion of prebiotics on the viability of a commercial *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* culture in a tropical fruit beverage. *J Food Sci Technol*. 2019;56(2):987-94. doi: 10.1007/s13197-018-03565-w.
16. Londoño-Zapata AF, Durango-Zuleta MM, Sepúlveda-Valencia JU, Herrera CXM. Characterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian cheese: double cream cheese. *LWT Food Sci Technol*. 2017;82:39-48. doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.058.
17. Sabo SS, Mendes MA, Araujo ES, Muradian LBA, Makiyama EN, LeBlanc JG, et al. Bioprospecting of probiotics with antimicrobial activities against *Salmonella* Heidelberg and that produce B-complex vitamins as potential supplements in poultry nutrition. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-14. doi: 10.1038/s41598-020-64038-9.
18. Rotta IS, Matta MF, Santos CTB, Paiva AD, Machado ABF. Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes*. 2020;75(3):178-89. doi: 10.14295/2238-6416.v75i3.820.
19. Motta AS, Flores FS, Souto AA, Brandelli A. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008;93(3):275-84 doi: 10.1007/s10482-007-9202-2.

20. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)*. 1938;38(6):732-49. doi: 10.1017/S002217240001158X.
21. Rolim FRL, Freitas Neto OC, Oliveira MEG, Oliveira CJB, Queiroga RCRE. Cheeses as food matrixes for probiotics: in vitro and in vivo tests. *Trends Food Sci Technol*. 2020;100:138-54. doi: 10.1016/j.tifs.2020.04.008.
22. Balthazar CF, Pimentel TC, Ferrão LL, Almada CN, Santillo A, Al-Benzio M, et al. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(2):247-62. doi: 10.1111/1541-4337.12250.
23. Mechai A, Debabza M, Kirane D. Screening of technological and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk products. *Int Food Res J*. 2014;21(6):2451-7.
24. Casarotti SN, Penna ALB. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. *Int Dairy J*. 2015;41:1-6. doi: 10.1016/j.idairyj.2014.08.021.
25. Leclercq S, Mian FM, Stanisz AM, Bindels LB, Cambier E, Ben-Amram H, et al. Low-dose penicillin in early life induces long term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat Commun*. 2017;8(1):1-12. doi: 10.1038/ncomms15062.
26. Salehizadeh M, Modarressi MH, Mousavi SN, Ebrahimi MT. Evaluation of lactic acid bacteria isolated from poultry feces as potential probiotic and its in vitro competitive activity against *Salmonella typhimurium*. *Vet Res Forum*. 2020;11(1):67-75. doi: 10.30466/vrf.2018.84395.2110.
27. Costa GN, Miglioranza LHS. Probiotics: the effects on human health and current prospects. In: Rigobelo EC, organizador. *Probiotics: InTech*. London: IntechOpen Limited; 2012. cap. 158.
28. Mirkovic N, Kulas J, Miloradovic Z, Miljkovic M, Tucovic D, Miocinovic J, et al. Lactolisterin BU producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1-4: Bio-control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh soft cheese and effect on immunological response of rats. *Food Control*. 2020;111:107076. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107076.
29. Nájera-Domínguez C, Gutiérrez-Méndez N. Autolytic and proteolytic properties of strains of *Lactococcus lactis* isolated from different vegetables, rawmilk cheeses and commercial starter cultures. *Food Nutr Sci*. 2013;4:21-6. doi: 10.4236/fns.2013.411A004.
30. Vitola HRS, Gandra EA, Frazzon APG, Dannenberg GS, Motta AS. Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaça de frango. *Rev Bras Biocienc*. 2018;16(1):21-7.
31. Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2013;11:95-105. doi: 10.1038/nrmicro2937.

32. Pattanayaiying R, H-Kittikun A, Cutter CN. Incorporation of nisin Z and lauric arginate into pullulan films to inhibit foodborne pathogens associated with fresh and ready-to-eat - muscle foods. *Int J Food Microbiol.* 2015;207:77-82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.045.
33. Kaur G, Singh TP, Malik RK. Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Braz J Microbiol.* 2013;44(1):63-71. doi: 10.1590/S1517-83822013005000025.
34. Brasil. Instrução Normativa nº 28, de 26 de Julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. *Diário Oficial da União.* 27 Jul 2018; Sec. 1, p. 141-54.
35. Shori AB, Aljohani GS, Al-Zahrani AJ, Al-Sulbi OS, Baba AS. Viability of probiotics and antioxidant activity of cashew milk-based yogurt fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT Food Sci Technol.* 2022;153:112482. doi: 10.1016/j.lwt.2021.112482.

Recebido em: 01/04/2024

Aceito em: 30/07/2024