

PRODUÇÃO DE QUEIJO TIPO COTTAGE SIMBIÓTICO E ESTUDO DE SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS PROBIÓTICAS QUANDO EXPOSTAS A DIFERENTES ESTRESSES¹

Emiliane Andrade Araújo², Antônio Fernandes de Carvalho²,
Eliana dos Santos Leandro², Mauro Mansur Furtado², Célia Alencar de Moraes²

ABSTRACT

PRODUCTION OF COTTAGE-LIKE SYMBIOTIC
CHEESE AND STUDY OF PROBIOTIC CELLS SURVIVAL
WHEN EXPOSED TO DIFFERENT STRESS LEVELS

Probiotics are microorganisms which promote beneficial effects on the health of their host, when ingested with food in adequate amounts. Prebiotics, on the other hand, are no digestible ingredients, which selectively stimulate the growth or metabolic activity of beneficial bacteria in the colon. A product is called symbiotic when it contains probiotic cells and prebiotic substances. The objectives of this work were: 1) to develop cottage-like symbiotic cheese with the addition of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 and inulin (BENEO Raftiline GR); 2) to follow the viability of the probiotic microorganism *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20, during the shelf life of cottage-like cheese, stored at 5°C; 3) to evaluate the survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 strain present in cottage-like cheese, when exposed to typical gastrointestinal tract conditions. Throughout the shelf life period, the cheese, which was stored at 5°C, maintained a microorganism count above the level recommended for food considered to be probiotic: 10⁸ CUF.g⁻¹. The inulin content of the cheese amounted to 5.0%, amount also considered as sufficient for beneficial effects on individuals. High resistance of the microorganism to low pH and high concentrations of bile salts were observed, suggesting that the *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20 strain would survive under normal digestive gastric tract conditions, when added to cottage-like symbiotic cheese.

KEYWORDS: Cheese; probiotics; *Lactobacillus*; inulin; gastrointestinal tract.

INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos, presentes em certas concentrações nos alimentos, que, quando ingeridos, exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (Madureira et al. 2005). Alguns estudos científicos propõem uma dose de 10⁸-10⁹ UFC para exercer os efeitos benéficos,

RESUMO

Probióticos são micro-organismos que, quando ingeridos no alimento, em quantidades adequadas, promovem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Prebióticos são ingredientes não digeríveis, que atuam estimulando, seletivamente, o crescimento ou atividade metabólica de bactérias benéficas, no cólon. Simbiótico é um produto alimentício, que contém células probióticas e substâncias prebióticas. Este trabalho teve como objetivos: 1) desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico, adicionado de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e de inulina (BENEO Raftiline GR); 2) acompanhar a viabilidade do micro-organismo probiótico *Lactobacillus delbrueckii* UFV, ao longo da vida de prateleira do queijo tipo Cottage, estocado a 5°C; 3) avaliar a sobrevivência da estirpe *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, presente no queijo tipo Cottage, exposta a condições típicas, encontradas no trato gastrointestinal. Após análise dos resultados, observou-se que, durante toda a vida de prateleira do queijo estocado a 5°C, o número de células viáveis manteve contagem sempre acima do nível recomendado para que o produto seja considerado probiótico: 10⁸ UFC.g⁻¹. O teor de inulina determinada no queijo foi de 5,0% (p/p), quantidade também suficiente para exercer efeitos benéficos no indivíduo. Observou-se que o micro-organismo apresentou boa resistência a baixos valores de pH e a concentrações elevadas de sais biliares. A estirpe *L. delbrueckii* UFVH2b20 sobreviveria às condições normais do trato gastrointestinal, quando adicionada em queijo tipo Cottage simbiótico.

PALAVRAS-CHAVE: Queijo; probióticos; *Lactobacillus*; inulina; trato gastrointestinal.

que correspondem à ingestão diária de 100 g de um alimento probiótico contendo de 10⁶ a 10⁷ UFC.g⁻¹ (Blanchette et al. 1996).

As bactérias lácticas são submetidas a desafios, quando expostas ao suco gástrico, enzimas digestivas e sais biliares. O baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina são conhecidos por proporcionar efeito barreira contra a entrada de bactérias no trato intestinal.

1. Trabalho recebido em jul./2008 e aceito para publicação em maio/2009 (n° registro: PAT 4285).
2. Universidade Federal de Viçosa, Av. PH Rolfs s/n, Campus Universitário, CEP 36.571-000, Viçosa, MG.
E-mails: emilianeandrade@yahoo.com.br, antoniofernandes@ufv.br, elisanleandro@yahoo.com.br,
mmansur@ufv.br, camoares@ufv.br.

O pH do estômago, em geral, encontra-se entre 2,5 e 3,5 (Holzapfel et al. 1998). Não existem regras combinadas para análise de tolerância ácida, para estirpes probióticas. Valores de pH de 1 a 5 têm sido usados para análise *in vitro* de tolerância ácida de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Charteris et al. 1998).

O duodeno, no início do intestino delgado, também apresenta condições adversas às bactérias probióticas, em virtude da presença de sais biliares (Begley et al. 2005). A concentração de 0,15-0,3% de sais biliares tem sido recomendada como adequada para seleção de bactéria probiótica, para uso em humanos (Yang & Adams 2004).

As propriedades físico-químicas dos alimentos, como a capacidade tamponante e o pH, influenciam a sobrevivência de estirpes probióticas, durante o trânsito intestinal. Há, também, outros fatores que, possivelmente, poderiam estar envolvidos na sobrevivência do probiótico, como polissacarídeos extracelulares, teor de gordura e a matriz densa de queijos (Gardiner et al. 1998).

O *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi isolado na Universidade Federal de Viçosa (Santos 1984) e alguns estudos têm demonstrado seu potencial probiótico. A estirpe apresenta resistência a condições semelhantes às do trato gastrointestinal, como altas concentrações de sais biliares, ácido clorídrico e presença de lisozima (Agostinho 1988), e capacidade de produção de peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e outros inibidores capazes de exercer atividade antagonística a uma variedade de micro-organismos patogênicos (Ribeiro 1995). Além dessas características, o *L. delbrueckii* UFV H2b20 mostrou-se capaz de colonizar o trato gastrointestinal e estimular a resposta imune não específica, em camundongos livres de germe (Neumann et al. 1998).

Em virtude dos efeitos benéficos também produzidos pelas substâncias prebióticas, tem havido considerável interesse, por parte das indústrias de alimentos, em desenvolver produtos alimentícios que contenham, além das células probióticas, os ingredientes prebióticos.

Inulina e oligossacarídeos destacam-se entre os prebióticos que têm recebido maior atenção em estudos científicos. Têm, também, sido amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, como substitutos de gorduras e açúcares, reduzindo, assim, o teor calórico. As ligações β (1-2) entre as moléculas de frutose tornam estas substâncias não digeríveis

por enzimas intestinais humanas e os ingredientes prebióticos passam pelo trato gastrointestinal sem serem metabolizados. Estudos indicam que a inulina e oligofruktoses são completamente fermentadas no cólon e produzem ácidos graxos de cadeias curtas e lactatos que são metabolizados (Roberfroid 2007).

Simbióticos referem-se à combinação de bactérias probióticas e substâncias prebióticas, que afeta, beneficemente, o hospedeiro, por melhorar a sobrevivência e implantação de micro-organismos vivos no trato gastrointestinal e por selecionar o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon (Gibson & Roberfroid 1995).

O queijo tipo Cottage, por permitir ao micro-organismo conservação na sua forma viável, apresenta características desejáveis para incorporação de uma estirpe probiótica. As células probióticas podem ser adicionadas ao *dressing*, líquido cremoso que envolve os grânulos do queijo. Além disso, ao *dressing* também pode ser adicionada a substância prebiótica, tornando o produto um alimento simbiótico. A produção do queijo tipo Cottage simbiótico oferece grandes oportunidades de mercado, em virtude do apelo de alimento funcional e do baixo teor de gordura, sendo, assim, um queijo mais saudável.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou desenvolver um queijo tipo Cottage simbiótico, adicionado de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e inulina, e analisar a sobrevivência da estirpe probiótica, em condições de simulação do trato gastrointestinal.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas. O processo de produção do queijo tipo Cottage simbiótico foi realizado no Laticínio-Escola Funarbe/UFV e a padronização das células e todas as análises microbiológicas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – Bioagro, ambos situados na Universidade Federal de Viçosa.

Produção do concentrado de células viáveis de L. delbrueckii UFV H2b20

A alíquota do estoque da cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20, congelada a -80°C , foi ativada em leite em pó desnatado, reconstituído a 10% (LDR 10%) e

em soro de leite, respectivamente, e incubada a 37°C, por 24 horas. Em seguida, três transferências foram realizadas para volumes graduais de soro, até se obter o volume final necessário para a condução dos experimentos, e a incubação procedeu-se, a 37°C, por 12 horas. Após a incubação, alíquotas foram distribuídas em tubos GSA de 250 mL, para concentração das células, em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C (St. Louis, MO, USA), a 5000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O centrifugado foi ressuspensionado em soro estéril.

Produção do queijo tipo Cottage simbiótico

O queijo tipo Cottage simbiótico foi fabricado no Laticínio-Escola Funarbe/UFV, por meio de tecnologia patenteada (PI0701749-9). Para a fermentação do leite, adicionou-se ao leite desnatado e pasteurizado o fermento láctico mesofílico, composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Streptococcus thermophilus* RA 073 (Rhodia Food, Cranbury, New Jersey, EUA). Após a formação da coalhada, a massa foi cortada e a acidez determinada (58-65°D). Em seguida, procedeu-se ao aquecimento lento da massa, até temperatura final de 50°C, para a obtenção de grãos firmes e textura compacta. Na etapa seguinte, realizaram-se o dessoramento, três lavagens consecutivas da massa e adição do *dressing* preparado e pasteurizado anteriormente. Em geral, adicionam-se, em relação ao volume inicial de leite, 7% de *dressing*, composto de 18% de gordura, 4% de sal e de leite desnatado. Na produção do queijo tipo Cottage simbiótico, o *dressing* foi submetido a uma redução parcial de gordura (1/3), por adição da substância prebiótica inulina Beneo™ (Raftiline®; Orafiti, Tienen, Bélgica). Foram adicionados ao *dressing* 8% da substância prebiótica, conforme recomendações do fabricante, para se obter o benefício funcional. Após este processo, no queijo tipo Cottage, o concentrado de células probióticas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi adicionado à mistura. Após a produção do queijo, procedeu-se ao acondicionamento, em potes de polipropileno de 250g, previamente sanitizados, e à estocagem sob refrigeração, à temperatura de 5°C, durante 20 dias. As análises foram realizadas após 5 e 15 dias, por representarem início de vida de prateleira e final de vida de prateleira do queijo tipo Cottage simbiótico, respectivamente.

Viabilidade de L. delbrueckii UFV H2b20 durante a vida de prateleira de queijo tipo Cottage simbiótico

Alíquotas representativas do queijo tipo Cottage simbiótico foram analisadas a cada 5 dias, durante 20 dias de estocagem do produto. Diluições adequadas do homogenato das amostras foram transferidas, utilizando-se a técnica *spread plate* para placa, contendo ágar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha), suplementado com 30 µg mL⁻¹ de ácido nalidíxico (98% de pureza, Sigma Aldrich, New York, EUA). As placas foram incubadas sob anaerobiose, a 37°C, por 48 horas. Após este período, foi determinado o número de unidades formadoras de colônias por grama de queijo e os resultados foram expressos em Log₁₀.

Quantificação de inulina no queijo tipo Cottage simbiótico

A concentração de inulina no produto foi determinada no início e no final da estocagem, pelo método de cromatografia por troca iônica (AOAC 1997), no laboratório da Orafiti (Tienen, Bélgica).

Simulação das condições do trato gastrointestinal

Alíquotas de 1 g de queijo tipo Cottage simbiótico foram adicionadas a tubos contendo 9 mL de solução estéril de tampão fosfato de sódio 0,05 M. O tampão fosfato de sódio 0,05 M continha HCl 0,1 mol.L⁻¹, para obtenção dos valores de pH 7,0; 3,5; e 2,5, utilizados na exposição das células ao estresse ácido. Os valores de pH ácidos foram escolhidos com base em condições normais do estômago, enquanto o pH 7,0 foi selecionado como controle. As amostras contendo as bactérias probióticas foram submetidas às condições ácidas, por 240 minutos, sendo que, a cada 60 minutos, as células eram coletadas por centrifugação (centrífuga Sorvall Instruments modelo RC5C), a 6000 x g, por 6 minutos. O centrifugado foi ressuspensionado em 9 mL de tampão fosfato de sódio 0,05M e a suspensão foi diluída e transferida para placas contendo ágar MRS, suplementado com ácido nalidíxico, e incubada sob condições anaeróbicas, a 37°C, por 48 horas. O método microgotas (Herigstad 2001) foi empregado para enumeração das células sobreviventes ao estresse ácido. Placas que continham 20-80 colônias por gota foram selecionadas, as

unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹) foram contadas e os resultados expressos em Log₁₀.

O efeito de sais biliares (Difco, Detroit, MI, EUA), nas concentrações 0%; 0,5%; e 1,0% (p/p), sobre as células probióticas presentes no queijo tipo Cottage simbiótico, foi avaliado de acordo com a mesma metodologia apresentada para o estresse ácido, exceto para o intervalo de tempo em que ocorria a centrifugação da amostra. Na exposição a sais biliares, as células foram coletadas a cada 30 minutos, durante 240 minutos de incubação na presença de sais biliares.

Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em esquema fatorial, com delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os tempos de exposição a cada estresse e os estresses aplicados (condições ácidas e sais biliares) foram os fatores estudados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS® Institute Inc., Cary, NC, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quantificação de L. delbrueckii UFV H2b20 em queijo tipo Cottage simbiótico

Observou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) na contagem de células viáveis, durante 20 dias de estocagem, a 5°C, do queijo tipo Cottage simbiótico. A média da contagem de bactérias no produto foi de 8,20 Log₁₀ CFU g⁻¹. No presente estudo, a contagem de células probióticas condiz com os relatos de vários artigos científicos, que recomendam 10⁶ UFC.g⁻¹ no produto, no momento de consumo e ingestão diária de 10⁸-10⁹ UFC.

Quantificação de inulina no queijo tipo Cottage simbiótico

A porcentagem média de inulina no queijo foi de 5,0% (p/p), permanecendo constante durante os 20 dias de estocagem do produto. Com base na porção média de 50 g, definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, para o queijo tipo Cottage (Anvisa 2003), o queijo simbiótico produzido continha uma

média de 2,5 g de inulina por porção, que está de acordo com o nível de 2 g por porção, recomendado pela Orafiti.

É importante mencionar que a inulina adicionada ao queijo tipo Cottage simbiótico não influenciou o crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20, uma vez que a contagem de células probióticas manteve-se constante, durante toda a estocagem do produto. O teor de inulina presente no queijo também não variou durante a vida de prateleira do queijo, confirmando a não utilização da substância prebiótica pelo micro-organismo.

Sobrevivência de L. delbrueckii UFV H2b20 sob condições ácidas

Na seleção de estirpes bacterianas, para uso como adjunto dietético, os micro-organismos devem sobreviver ao baixo pH do suco gástrico e à bile, entre outros fatores encontrados durante sua passagem pelo trato gastrointestinal.

Neste trabalho, houve diferença ($p < 0,05$) pelo teste F, na sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20, quando exposto aos diferentes valores de pH (7,0; 3,5; e 2,5), após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico, a 5°C. A média final da sobrevivência para *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi de 8,26 log UFC.g⁻¹; 8,08 log UFC.g⁻¹; e 7,20 log UFC.g⁻¹, para pH 7,0; 3,5; e 2,5, respectivamente, após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage. As células, quando expostas ao pH 2,5, sofreram maior redução decimal, quando comparadas às outras condições ácidas (Tabela 1).

Na análise de sobrevivência de células probióticas, realizada no queijo após 15 dias de estocagem, observou-se interação ($p < 0,05$), pelo teste F, entre os valores de pH aplicados (7,0; 3,5; e 2,5) e tempo

Tabela 1. Teste Tukey para sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, quando exposto sob condições ácidas, após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

pH	Médias
7,0	8,26 + 0,23 a ¹
3,5	8,08 + 0,36 a
2,5	7,20 + 0,85 b

¹ Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

de exposição ao estresse (60 minutos, 120 minutos, 180 minutos e 240 minutos). A Figura 1 apresenta o gráfico do log do número de células sobreviventes após o estresse ácido, em função do tempo de exposição ao estresse. Verificou-se, para o pH 2,5, que o tempo de exposição acarretou maior redução no número de bactérias probióticas, pois, à medida que se aumentava o tempo de exposição à condição ácida, menor era o número de células sobreviventes a esse estresse. O tempo máximo de 240 minutos de estresse provocou redução de viabilidade de 4 ciclos logarítmicos no pH 2,5.

Agostinho (1998) estudou a sensibilidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao ácido clorídrico, durante uma, duas e três horas de exposição, a 37°C, em leite acidificado, em diversas faixas de pH. A concentração inicial de células foi de 10^6 UFC.mL⁻¹ e foi observado decréscimo de, aproximadamente, 1 ciclo logarítmico, após uma, duas e três horas, nas faixas de pH de 3,21-3,00 e 2,90-2,73. Em faixa de pH 2,60-2,40, o número de unidades viáveis decresceu para 10^5 UFC.mL⁻¹, até uma hora, sendo que, após este período, não foi detectada sobrevivência. Em faixa de pH 2,30-2,00, também não foram encontradas células viáveis.

Furtado (2001) observou o efeito do choque ácido de pH 3,5, por 30 minutos, e o tratamento em pH 2,5, por 2 horas e 30 minutos, a 37°C, em *L. delbrueckii* UFV H2b20. Percebeu-se que o controle, não submetido a nenhum pré-tratamento, não sobreviveu a este tratamento. No entanto, as células submetidas previamente ao choque ácido demonstra-

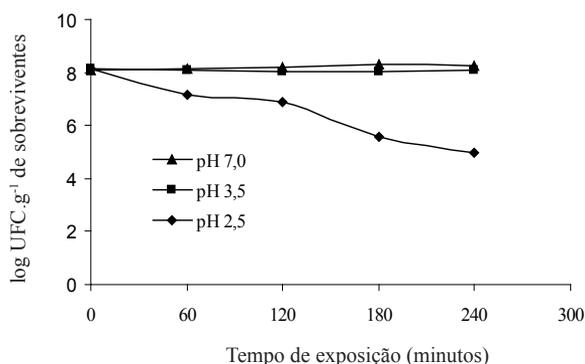


Figura 1. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, quando exposto, por 4 horas, sob condições ácidas, após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

ram sobrevivência em, aproximadamente, dois ciclos logarítmicos, quando comparadas ao controle.

Neste estudo, o pH do queijo tipo Cottage simbiótico, que encontra-se na faixa de 4,5-5,0, pode ter provocado uma adaptação ácida do microorganismo, contribuindo para maior sobrevivência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 no alimento, durante toda a vida de prateleira do produto. Há relatos na literatura de que formulações de alimentos com pH entre 3,5 e 5,0, como é o caso de iogurtes, queijos e leites fermentados, têm alta capacidade tamponante e poderiam aumentar o pH do trato gástrico e, assim, aumentar a estabilidade da estirpe probiótica.

Kos et al. (2000) estudaram o efeito do concentrado protéico de soro na viabilidade de *L. acidophilus* M92 e perceberam que a adição do concentrado protegeu as células do baixo pH do suco gástrico simulado e até aumentou a tolerância a altas concentrações de sais biliares.

Atualmente, há grande demanda por novas tecnologias capazes de garantir a estabilidade das células probióticas, na produção de um alimento probiótico. O queijo tipo Cottage apresenta características desejáveis para incorporação das células probióticas, pois seu processo de produção permite que a bactéria probiótica seja adicionada, no final do processo, tornando o queijo apenas carreador de células probióticas.

No presente trabalho, quando se compararam os resultados obtidos após 5 dias e 15 dias de estocagem do queijo, observou-se que não houve diferença ($p > 0,05$), pelo teste F, entre os tempos de vida de prateleira avaliados, em relação à sobrevivência das células após exposição a diferentes valores de pH.

Sobrevivência de L. delbrueckii UFV H2b20, exposto a diferentes concentrações de sais biliares

Neste estudo, não foi observada diferença ($p > 0,05$), pelo teste Tukey, entre as concentrações de 0,5% de sais biliares e 1,0% de sais, quando as células foram expostas ao estresse, após 5 dias de fabricação do queijo tipo Cottage simbiótico (Tabela 2). A média final da sobrevivência, em log UFC.g⁻¹, foi de 6,01; 6,32; e 8,19, para 1,0%; 0,5%; e 0% de sais, respectivamente, após 5 dias de estocagem.

Quando as células foram expostas às concentrações de sais biliares, após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico, foi observada

Tabela 2. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, exposto a diferentes concentrações de sais biliares, após 5 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

Concentração de sais biliares	Médias*	Redução percentual de células
0,0 %	8,19 ± 0,19 a	0
0,5 %	6,32 ± 0,56 b	22,83
1,0 %	6,01 ± 0,61 b	26,62

* Médias de 3 repetições, seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5 % de probabilidade.

interação ($p < 0,05$), pelo teste F, entre os intervalos de tempo de exposição ao estresse avaliados (0; 30; 60; 90; 120; 150; 180; 210; e 240 minutos) e as concentrações de sais biliares. A Figura 2 apresenta o comportamento das células, após 4 horas de exposição ao estresse. O tempo de exposição ao estresse influenciou a resistência das células, diminuindo o número de sobreviventes.

A redução provocada pela presença de sais biliares, durante os 240 minutos de exposição, foi de, no máximo, 3 ciclos logarítmicos. No presente estudo, a composição do queijo tipo Cottage simbiótico pode ter contribuído para a boa sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20, durante toda a vida de prateleira. O queijo, além de sua capacidade tamponante, que contribui para o efeito protetor na viabilidade das células, possui quantidade considerável de inulina, que também pode influenciar, positivamente, a viabilidade das células probióticas e a sobrevivência após exposição aos estresses aplicados.

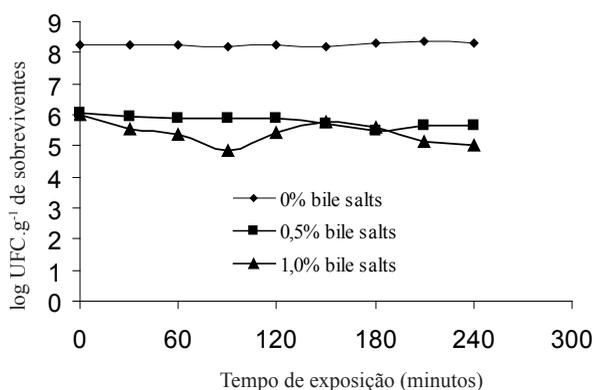


Figura 2. Sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, posterior à exposição, por 240 minutos, a sais biliares, após 15 dias de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico.

Michida et al. (2006) investigaram o efeito de extratos de cereais e de fibras de cereais na viabilidade do *Lactobacillus plantarum*, sob condições simuladas do trato gastrointestinal. Os resultados indicaram que células imobilizadas com as fibras de cereais, malte e cevada mostraram maior tolerância que as células livres. As adições de extratos de malte e cevada produziram maior efeito estabilizador nas células imobilizadas que nas células livres. Alguns fatores contribuíram para a melhoria da tolerância ao suco gástrico e aos sais biliares, como a imobilização com as fibras de cereais e a composição dos extratos de cereais, principalmente em termos de açúcares solúveis em água. O açúcar tem efeito estabilizante e as células imobilizadas contribuem para a estabilidade do micro-organismo, em condições simuladas do trato gastrointestinal.

Lian et al. (2003) estudaram a sobrevivência de *Bifidobacterium longum* B6 e *Bifidobacterium infantis* CCRC 14633, em condições simuladas do trato gastrointestinal. As células foram microencapsuladas com gelatina, leite desnatado e goma arábica. Bifidobactérias microencapsuladas exibiram maior sobrevivência que as células puras, quando expostas ao suco gástrico (pH 2,0), ou a 2,0% de bile. Estas substâncias carreadoras podem aumentar a sobrevivência de bifidobactérias, durante a passagem através do estômago, e facilitar a colonização do intestino.

A análise de variância, comparando os resultados obtidos após 5 dias e após 15 dias da produção, demonstrou que houve diferença ($p < 0,05$), pelo teste F, entre os tempos de vida de prateleira avaliados, em relação à sobrevivência das células após exposição a diferentes concentrações de sais biliares. O tempo de estocagem do queijo tipo Cottage simbiótico influenciou a sobrevivência das células na presença de sais biliares. Observando-se a Tabela 3, percebe-se que, na concentração de 0,5% de sais biliares, houve maior sobrevivência de células no tempo 5, ou seja, no início da vida de prateleira do alimento. O mesmo foi observado para a concentração de 1,0% de sais biliares. Não houve diferença ($p > 0,05$) de sobrevivência de células do queijo controle (células não submetidas ao estresse), estocado em tempos diferentes. Portanto, as diferenças são de resistência ao tratamento com sais biliares. Mesmo havendo, estatisticamente, diferença entre as médias dos log, na sobrevivên-

Tabela 3. Médias do número de células sobreviventes de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, quando exposto a 0,5% e 1,0% de sais biliares, após 5 e 15 dias de vida de prateleira do queijo tipo Cottage simbiótico.

Tempo (dias)	0,5 % de sais	1,0 % de sais	Controle*
5	6,32 ± 0,56	6,01 ± 0,61	8,19 ± 0,19
15	5,79 ± 0,24	5,41 ± 0,40	8,26 ± 0,08

* Controle: células não submetidas a sais biliares.

cia das células nos dois tempos de estocagem, esta diferença é menor que 1 ciclo logarítmico. As características do queijo tipo Cottage simbiótico podem ter proporcionado uma certa resistência às células. O alimento e/ou seus constituintes têm demonstrado exercer efeito protetor em bactérias, de forma a diminuir a toxicidade dos sais biliares. Shimakawa et al. (2003) verificaram que a inibição de *Bifidobacterium breve*, presente em leite fermentado, devido à ação de ácidos biliares, foi parcialmente aliviada, quando adicionou-se proteína de soja ao meio, pois tem sido demonstrado que esta proteína liga-se aos ácidos biliares, diminuindo a sua ação antimicrobiana. O encapsulamento de estirpes probióticas tem, também, aumentado a tolerância à ação dos sais biliares.

CONCLUSÃO

O queijo tipo Cottage apresentou características ideais para ser utilizado como alimento carreador de células probióticas e de substâncias prebióticas, uma vez que o número de bactérias probióticas presentes e o teor de inulina, durante toda a vida de prateleira do produto, estavam em acordo com as recomendações propostas. Os resultados do presente trabalho também indicam que a estirpe *L. delbrueckii* UFV H2b20 exibiu resistência satisfatória a baixos valores de pH e a altas concentrações de sais biliares, apresentando, portanto, características adequadas para a sua utilização como adjuvante dietético.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, S. M. M. *Comportamento do Lactobacillus acidophilus UFV H2b20 sob condições do trato digestivo in vitro e efeito de métodos de preservação em sua atividade*. 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

BEGLEY, M. C. G. M.; GAHAN, C. G.; HILL, C. *The interaction between bacteria and bile*. *FEMS Microbiology Reviews*, Delft, v. 29, n. 4, p. 625-651, set. 2005.

BLANCHETTE, L. et al. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, Stanford, v. 79, n. 1, p. 8-15, 1996.

CHARTERIS, W. P. et al. Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

FURTADO, W. C. A. *Efeito de choques térmico e ácido na resistência de Lactobacillus UFV H2b20*. 2001. 35 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

GARDINER, G. et al. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Oxford, v. 64, n. 6, p. 2192-2199, 1998.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, Columbia, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, Turin, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

KOS, B. et al. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, Zagreb, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2000.

LIAN, W.; HSIAO, H.; CHOU, C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*, Turin, v. 86, n. 3, p. 293-301, 2003.

- MADUREIRA, A. R. et al. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, Alberta, v. 15, n. 6-9, p. 921-927, jun./set. 2005.
- MICHIDA, H. et al. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 73-78, 2006.
- NEUMANN, E. et al. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 31, n. 12, p. 1565-1573, dez. 1998.
- RIBEIRO, M. A. *Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por Lactobacillus acidophilus UFV H2b20*. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 137, n. 11, p. 2493S-2502S, nov. 2007.
- SANTOS, N. S. *Isolamento de Lactobacillus acidophilus de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando à sua utilização como adjunto dietético*. 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.
- SHIMAKAWA, Y. et al. Evaluation of *Bifidobacterium breve* Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *International Journal of Food Microbiology*, Turin, v. 81, n. 2, p.131-136, 2003.
- YANG, H.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Turin, v. 91, n. 3, p. 253-260, 2004.