

Artigo Técnico

EFEITO DE PROTETORES E TRATAMENTOS DE ESTRESSE NA SOBREVIVÊNCIA DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP *LACTIS* AO CONGELAMENTO

Effect of protective and stress treatment on survival of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* to freezing

Eliana dos Santos LEANDRO^{1*}
Lisiane Lopes da CONCEIÇÃO²
Antônio Fernandes de CARVALHO³
Maurício Dutra COSTA⁴
Célia Alencar de MORAES⁵

RESUMO

O efeito de substâncias crioprotetoras e de tratamentos subletais de estresse foi avaliado no aumento da tolerância ao congelamento em *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9. Todas as substâncias crioprotetoras avaliadas aumentaram a sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 a estocagem de 15 dias a - 20 °C. Entretanto, o leite desnatado reconstituído a 10 % foi o que conferiu maior proteção. Quanto à exposição da suspensão de células a tratamentos subletais de estresse, a exposição a 10 °C por 4 horas foi capaz de manter a sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 estável durante 70 dias de estocagem a - 20 °C. O tratamento a 40 °C por 30 minutos conferiu proteção durante 70 dias de estocagem a - 20 °C quando comparado com a suspensão de células que não recebeu nenhum tratamento antes do congelamento. A aplicação desses tratamentos é importante para assegurar a viabilidade de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 no decorrer do período de estocagem, e também de assegurar a qualidade sensorial e microbiológica de alimentos obtidos por processos de fermentação.

Palavras-chave: bactéria do ácido láctico; substâncias crioprotetoras; estresse subletal; *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9.

ABSTRACT

The effect of cryoprotectant substances and sublethal stress treatment was measured in increased tolerance to freezing in the *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9. All cryoprotectant

- 1 Mestre em Microbiologia Agrícola, Doutoranda- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: elisanleandro@yahoo.com.br
 - 2 Mestre em Microbiologia Agrícola, Bolsista do Departamento de Nutrição- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lisianelopes@yahoo.com.br
 - 3 Pós-Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos; Professor adjunto do Departamento de Tecnologia de Alimentos- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: antoniofernandes@ufv.br
 - 4 Pós-Doutor em Microbiologia; Professor do Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: mdcosta@ufv.br
 - 5 Doutora em Ciência de Alimentos; Professora do Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: camoraes@ufv.br
- * Autor para correspondência: Universidade Federal de Viçosa- Departamento de Microbiologia – BIOAGRO, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. E-mail: elisanleandro@yahoo.com.br
Suporte Financeiro: CAPES

Recebido / Received: 31/07/2012

Aprovado / Approved: 04/10/2012

substances evaluated increased survival of *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 during storage at - 20 °C to 15 days. However, the reconstituted skim milk at 10 % given more protection. The exposure of cell suspension to 10 °C for 4 hours was able to maintain the survival of *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 stable for 70 days of storage at - 20 °C compared with the suspension of cells that received no treatment before freezing. The application of these treatments is important to ensure the viability of *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 during the storage and also to ensure the microbiological and sensory quality of food obtained by fermentation processes.

Keywords: acid lactic bacteria; cryoprotectant substances; sublethal stress; *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9.

1 INTRODUÇÃO

Lactococcus lactis é uma bactéria do ácido láctico, Gram positiva, catalase negativa, com baixo conteúdo G+C em seu genoma, sendo de grande importância como cultura *starter* na produção de alimentos fermentados (TEUBER; GEIS 2006). A estirpe *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9 foi isolada de salame tipo italiano produzido artesanalmente (MACIEL, 1998), sendo caracterizada como homofermentativa, catalase negativa, Gram-positiva, com temperatura de crescimento entre 15 °C e 37 °C. Para a sua aplicação como cultura *starter* para produção de alimentos fermentados é interessante avaliar pré-tratamentos que possam ser aplicados à cultura antes da liofilização ou congelamento para manter a sua estabilidade durante a estocagem.

No Brasil, as culturas lácticas utilizadas na produção de queijos e iogurtes são fornecidas às indústrias de laticínios na forma liofilizada. Embora este processo seja utilizado para conservação da viabilidade, os danos causados as células são mais acentuados que no congelamento rápido (MENG et al., 2008). Para aumentar a sobrevivência das bactérias do ácido láctico durante a liofilização ou congelamento, alguns tratamentos podem ser adotados, entre eles, a utilização de substâncias crioprotetoras e a aplicação de tratamentos de estresses subletais (CARMO, 2006).

As substâncias crioprotetoras são empregadas para diminuir os danos ocasionados às células durante o congelamento ou liofilização (PYAR; PEH, 2011). A aplicação de tratamentos subletais de estresse as células, como por exemplo, o choque térmico, tem demonstrado ocasionar alterações na composição de ácidos graxos da membrana citoplasmática e na indução de algumas proteínas de estresse. Essas alterações na célula estão associadas ao aumento da tolerância ao congelamento e liofilização (ZHANG et al., 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de substâncias crioprotetoras e a aplicação de tratamentos subletais de estresse (temperatura acima e abaixo da temperatura ótima de crescimento) na sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 ao processo de congelamento e estocagem.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

A cultura estoque de *L. lactis* subsp. *lactis* PD 6.9 foi obtida após o crescimento em meio D-MRS (HAMMES et al., 1992) a 30 °C por 12 horas. O concentrado de células obtido foi adicionado de glicerol 20 % (v/v) e em seguida congelado em nitrogênio líquido e estocado a - 80 °C. Todos os experimentos foram realizados a partir desta cultura estoque.

Produção do concentrado de células

L. lactis subsp *lactis* PD 6.9 foi cultivado em 60 mL de caldo D-MRS, e incubada a 30 °C por 12 horas. A suspensão de células foi coletada no início da fase estacionária, determinada pela curva de crescimento e também por plaqueamento em ágar D-MRS, e em seguida a cultura foi padronizada para 10⁹ Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹). A cultura foi coletada por centrifugação a 10.000 gpor 10 minutos a 4 °C (Centrífuga Sorvall Instruments Dupont RC5C) e o sedimento obtido foi ressuspendido em 20 mL de caldo D-MRS.

Substâncias crioprotetoras

As suspensões de células foram divididas em 20 alíquotas de 150 µL e diluídas com 150 µL dos seguintes crioprotetores nas respectivas concentrações finais: sacarose 32 % (p/v) (Merck®), glutamato monossódico (GMS) (Merck®) a 10 % (p/v) e leite desnatado reconstituído (LDR) (Nestlé®) a 10 % (p/v). A água destilada foi utilizada como controle do experimento para avaliar o efeito protetor de cada solução. As misturas foram congeladas em nitrogênio líquido por 1 minuto, e logo em seguida estocadas em freezer horizontal a - 20 °C por 15 dias.

Adaptação ao choque térmico

Alíquotas de 300 µL da suspensão de células foram expostas ao tratamento de resfriamento a temperatura de 10 °C por 4 horas (LEE, 2004) e ao tratamento de aquecimento a temperatura de 40 °C por 30 minutos (MONTEIRO, 1999) em seguida

congelados em nitrogênio líquido por 1 minuto e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O controle foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Determinação da sobrevivência

O número de células viáveis de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 na presença de substâncias crioprotetoras foi determinado após 15 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Já com as células adaptadas a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ o número de células viáveis foi determinado no decorrer de 70 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O plaqueamento em microgotas em ágar D-MRS foi utilizado para determinar o número de células viáveis após 24 horas de incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MORTON, 2001).

Análise estatística

O delineamento adotado para a condução do experimento, realizado em dias diferentes, foi o inteiramente casualizado (DIC), realizado com três repetições, em duplicata, para cada tratamento. Os dados da sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 ao congelamento na presença de substâncias crioprotetoras foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e o teste Tukey a 5 % de significância foi aplicado. Quanto ao efeito do tempo de estocagem sobre a sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 exposto a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi utilizada a análise de regressão para os fatores quantitativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito de substâncias crioprotetoras na sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 ao congelamento foi avaliado (Figura 1).

A viabilidade de *L. lactis* subsp *lactis* se manteve estável após 15 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ somente na presença de LDR 10 %, enquanto perda de viabilidade de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9, nesse mesmo período, foi afetada significativamente ($p > 0,05$) de acordo com o teste Tukey nos demais tratamentos. A perda de viabilidade durante a estocagem de bactérias do ácido láctico submetidas ao congelamento ou liofilização tem sido observada (STRASSER et al., 2009; COULIBALY et al., 2010). Essa maior proteção alcançada com o uso de LDR 10 % pode ser devido à atuação dos diferentes componentes do leite na estrutura da célula. Uma alta taxa de sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* GG ao congelamento é observada quando LDR 20 % é utilizado como crioprotetor (VOLKERT et al., 2008). Embora a sacarose e o glutamato monossódico não conferiram a mesma proteção que o LDR 10 %, essa redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico observada com 15 dias pode ser considerada pequena, já que na ausência de substância crioprotetora essa redução alcançou uma redução de 2 ciclos logarítmicos.

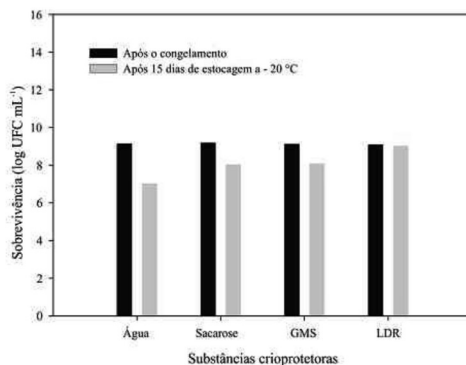


Figura 1 – Efeito de substâncias crioprotetoras na sobrevivência de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* PD 6.9 após 15 dias de estocagem a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O efeito da adaptação a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi avaliado na sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 ao congelamento (Figura 2).

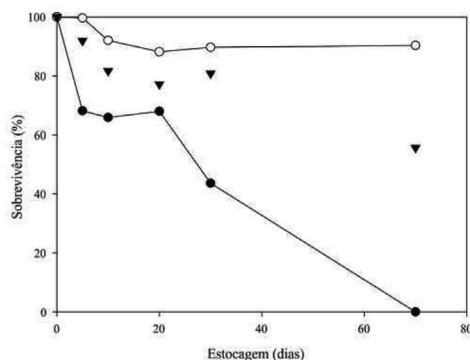


Figura 2 – Sobrevivência de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 exposto a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas (○), a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos (▼) e sem tratamento (●) durante a estocagem de 70 dias a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A estabilidade da viabilidade durante a estocagem somente foi alcançada com as células que foram adaptadas a temperatura de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas antes do congelamento. A indução de proteínas do choque frio (CSPs) é fortemente induzida em *L. lactis* em resposta a um rápido decréscimo de temperatura, e essa alteração fisiológica na célula tem demonstrado ser responsável pelo aumento de tolerância ao congelamento (WOUTERS et al., 2001; YINQHUA et al., 2008). Além dessa alteração na célula, a composição de ácidos graxos da membrana também é alterada, aumentando a proporção de ácidos graxos

insaturados que conferem maior fluidez à membrana citoplasmática (BROADBENT; LIN, 1999). Apesar da adaptação a 40 °C aplicada antes do congelamento não tenha permitido a manutenção da estabilidade durante a estocagem, esse tratamento demonstrou conferir maior proteção à célula do que quando a suspensão de células não recebe nenhum tipo de tratamento. A exposição de *Lactococcus lactis* a temperatura acima da ótima tem demonstrado conferir proteção ao processo de liofilização (ZIADI et al., 2005).

4 CONCLUSÕES

A utilização de substâncias crioprotetoras e a aplicação de tratamentos subtletais de estresse foram capazes de conferir proteção à suspensão de células de *L. lactis* subsp *lactis* PD 6.9 ao congelamento e durante a estocagem. A escolha dos tratamentos aplicados à cultura *starter* antes do congelamento ou liofilização é importante para assegurar a viabilidade no decorrer do período de estocagem, e também de assegurar a qualidade sensorial e microbiológica de alimentos obtidos por processos de fermentação

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROADBENT, J. R.; LIN, C. Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization. **Cryobiology**, Oxford v.39, n.1, p. 88 - 102, 1999.

CARMO, A. P. **Desenvolvimento de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo Minas Frescal**. 2006. 66 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

COULIBALY, I. et al. The resistance to freeze-drying and to storage was determined as the cellular ability to recover its survival rate and acidification activity. **International Journal of Microbiology**, New York, v. 2010, p. 1 - 9, 2010. doi: [10.1155/2010/625239](https://doi.org/10.1155/2010/625239)

HAMMES, W. P., WEISS, N., HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A., TRUPER, H. G., DWORKIN, M. **The prokaryotes**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 1992. v. 2, p. 1535 - 1594.

LEE, K. Cold shock response in *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*: a comparison of the protection generated by brief pre-treatment at less severe temperatures. **Process Biochemistry**, New York, v. 39, n. 12, p. 2233-2239, 2004.

MACIEL, J. F. **Atividade antibacteriana de culturas lácticas isoladas de salame tipo italiano processado por fermentação natural**. 1998. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

MENG, X. C. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, Oxford, v.106, n.4, p. 1406 -1416, 2008.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse térmico em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999. 59 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. cap. 7, p. 66 – 67.

PYAR, H.; PEH, K. Effect of cryoprotective agents on survival and stability of *Lactobacillus acidophilus* cultured in food-grade medium. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 64, n. 4, p. 578 -584, 2011.

STRASSER, S. et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 167 - 177, 2009.

TEUBER, M.; GEIS, A. **The genus *Lactococcus***. In: DWORKIN et al. **The prokaryotes**. New York: Springer, 2006. v. 4, p. 205-208.

VOLKERT, M. et al. Effect of air freezing, spray freezing, and pressure shift freezing on membrane integrity and viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v. 87, n. 4, p. 532-540, 2008.

YINQHUA, Z., YUTING, L., GUICHENG, H. Expression of cold-shock-protein genes from *Lactococcus lactis* and analysis of the cryoprotection function. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, Beijing, v. 48, n.9, p. 1203-1207, 2008.

WOUTERS, J. A. et al. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5171-5178, 2001.

ZIADI, M. et al. The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus*. **Biochemical Engineering Journal**, Oxford, v. 24, n.2, 141-145, 2005.

ZHANG, G. et al. The effect of cold, acid and ethanol shocks on synthesis of membrane fatty acid, freeze-drying survival and malolactic activity of *Oenococcus oeni*. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 62, n.2, p. 1-9, 2012. doi: 10.1007/s13213-012-0492-x Online First™