

Fortaleza, CE / Março, 2025

Metodologia de cultivo de bactérias lácticas probióticas para aplicação em alimentos

Laura Maria Bruno⁽¹⁾, Terezinha Feitosa Machado⁽¹⁾, Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros⁽²⁾ e Bruno Silva Caldas⁽²⁾⁽¹⁾ Pesquisadoras, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE. ⁽²⁾ Estudante de graduação, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

Introdução

Bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo amplo e heterogêneo de micro-organismos Gram-positivos, ácido-tolerantes, na forma de cocos ou bastões não esporulantes, anaeróbios facultativos ou microaerófilos e geralmente reconhecidos como seguros, do inglês “Generally Recognize as Safe” – GRAS (Chavez et al., 2024).

Durante o seu crescimento, as BAL promovem a acidificação do meio pela produção de ácidos orgânicos, controlando o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e, conseqüentemente, atuando na conservação do alimento. A acidificação também pode promover uma mudança da estrutura e do aroma do alimento, mostrando a importância das BAL no desenvolvimento de suas características sensoriais, como, por exemplo, no caso da fermentação do leite para a produção de iogurte ou queijo. Quando as BAL são adicionadas a uma matriz alimentar para promover a sua acidificação, elas são chamadas de culturas “starter” ou iniciadoras.

Mas a importância das BAL vai além de seu potencial acidificante. Elas também são produtoras de enzimas, de exopolissacarídeos e de substâncias bioprotetoras, como as bacteriocinas. Outras BAL, ainda, podem integrar o rol de micro-organismos probióticos.

Probióticos são micro-organismos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (Hill et al., 2014). Para um micro-organismo ser considerado probiótico, ele tem que necessariamente possuir as seguintes características: identificação comprovada de gênero, espécie, subespécie e cepa; estudos e documentos que comprovem que o micro-organismo é seguro para o uso pretendido e consumo; permanecer vivo desde o momento em que é inoculado no alimento até o momento do consumo; e ter pelo menos um estudo clínico que comprove a eficácia do benefício do micro-organismo à saúde (Anvisa, 2021)

Muitas culturas probióticas estão disponíveis comercialmente e podem ser aplicadas em matrizes alimentares com o objetivo de desenvolver alimentos com propriedades funcionais (Campos et al., 2022; Goktas et al., 2022).

Embora o leite e seus derivados sejam o veículo mais comum para entregar probióticos para o consumo, atualmente existe uma demanda por matrizes não lácticas que possam atender às necessidades da população que não pode ou não deseja alimentar-se de produtos lácteos (Bruno et al., 2020; Alexandre, 2023; Aires, 2024).

O presente trabalho tem como objetivo apresentar uma metodologia baseada no congelamento

para preparar culturas de BAL probióticas, de forma que elas possam ser diretamente inoculadas em diversas matrizes alimentares e, conseqüentemente, empregadas no desenvolvimento de novos alimentos com potencial probiótico.

Cultivo da cultura de BAL para aplicação em matriz alimentar

A partir de uma cultura pura de BAL, transferir uma alçada, uma colônia ou uma alíquota (0,2 mL) para 10 mL de caldo *Man, Rogosa e Sharp* (MRS) (Figura 1) para ativar as bactérias. Se o micro-organismo probiótico pertencer ao gênero *Bifidobacterium*, adicionar cisteína ao caldo MRS para uma concentração final de 0,1% de cisteína. Incubar a 37 °C por 24 horas. Vale salientar que, quando bactérias do gênero *Bifidobacterium* são cultivadas, é necessário diminuir o potencial redox do meio de cultivo, o que é obtido com adição de cisteína, uma vez que ela é um agente redutor de baixa toxicidade (Fukushima et al., 2003).

Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros

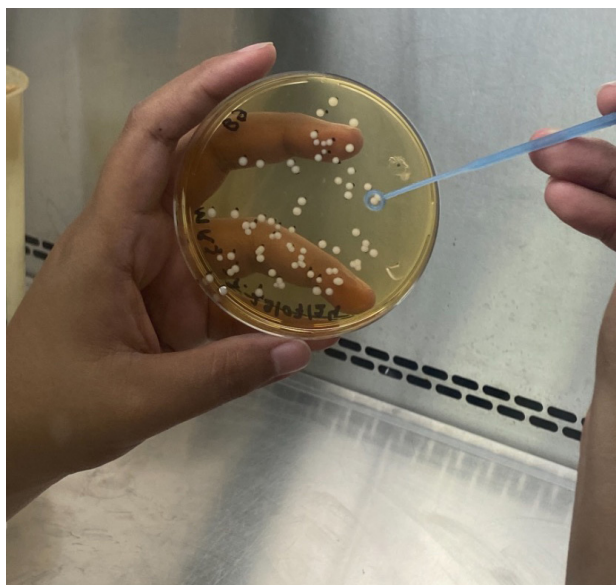


Figura 1. Colônia isolada em ágar da cultura-mãe que será transferida para ativação em meio de cultura líquido.

Após o período de 24 horas, retirar uma alíquota da cultura e inocular novamente em 10 mL de caldo MRS, ou de caldo MRS + cisteína 0,1%, de acordo com o gênero da BAL, e incubar a 37 °C por 16 horas, dando continuidade ao processo de ativação das bactérias.

Decorrido o tempo de incubação, retirar uma alíquota de 0,1 mL da cultura e transferir para 400 mL de caldo MRS, ou de caldo MRS + cisteína 0,1%, e incubar a 37 °C por 16 horas (Figura 2).



Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros

Figura 2. Inoculação da cultura ativada para aumento das células bacterianas.

Em seguida, todo o volume da cultura deve ser centrifugado assepticamente (12.395 g, 15 min, 5 °C) (Figura 3). Descartar o sobrenadante e ressuspende a massa bacteriana em tampão fosfato salino 1 M, pH 7,0. Então, lavar as células duas vezes nessa mesma solução-tampão (12.395 g, 15 min, 5 °C).



Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros

Figura 3. Centrifugação das bactérias lácticas probióticas.

Após a segunda lavagem, ressuspender a massa celular em 20 mL de uma solução de maltodextrina 10% e lactose 10% (Figura 4). Por fim, distribuir alíquotas de 1 mL em microtubos estéreis tipo eppendorf de 1,5 ou 2 mL de capacidade e congelar a -20 °C até o momento do uso (Figura 5).

Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros



Figura 4. Ressuspensão do micro-organismo em solução de maltodextrina e lactose.

Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros

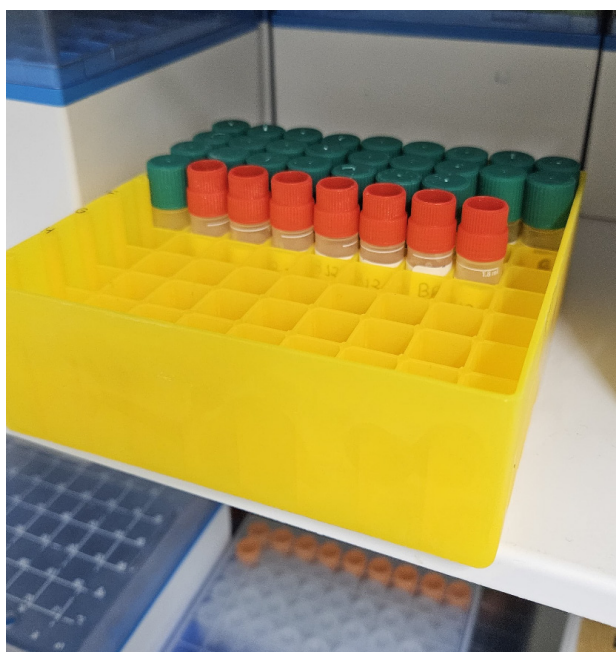


Figura 5. Congelamento dos microtubos contendo as células bacterianas.

Reservar um microtubo para fazer a contagem de células viáveis. A determinação do número de células viáveis em MRS (Figura 6) no final do processo é fundamental para que, no momento da inoculação da cultura probiótica na matriz do alimento, seja possível estimar a quantidade total de células por mililitro ou grama inoculada no produto.



Foto: Marcelo Conde Custódio Viana Medeiros

Figura 6. Contagem das bactérias para determinação da concentração celular.

Considerações finais

A técnica descrita anteriormente tem sido utilizada para cultivar culturas comerciais probióticas, entre as quais *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*. Os estoques de trabalho das culturas são obtidos em um tempo relativamente curto e são mantidos congelados até o momento do uso. Como a concentração de células viáveis do estoque é conhecida, é possível estimar a quantidade final de micro-organismos do produto que será elaborado. As células podem ser aplicadas diretamente na matriz alimentar, possibilitando o desenvolvimento de bebidas e alimentos probióticos ou simbióticos.

Referências

AIRES, M. L. P. **Análogo de queijo cremoso com potencial simbiótico à base de amêndoas de castanha-de-caju: desenvolvimento tecnológico e aplicação na gastronomia.** 2024. 103 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ALEXANDRE, J. B. **Encapsulação por gelificação iônica de extrato aquoso de beterraba e de probiótico *Bifidobacterium animalis* BB-12**. 2023. 89 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.

ANVISA. **Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos**. Guia nº 21/2021 – Versão 2, 5 maio 2021. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>. Acesso em: 22 maio 2022.

BRUNO, L. M.; LIMA, J. R.; WURLITZER, N. J.; RODRIGUES, T. C. Non-dairy cashew nut milk as a matrix to deliver probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 604-607, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.14219>.

CAMPOS, T. A. F.; MARINS, A. R.; SILVA, N. M.; MATIUCCI, M. A.; SANTOS, I. C.; ALCALDE, C. R.; SOUZA, M. L. R.; GOMES, R. G.; FEIHRMANN, A. C. Effect of the addition of the probiotic *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) in free and microencapsulated form and the prebiotic inulin to synbiotic dry coppa. **Food Research International**, v. 158, article 111544, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111544>.

CHAVEZ, M.; VISCARDI, S.; RUIZ, M. J.; SANS-SERRAMITJANA, E.; DURÁN, P. CLI: A new protocol for the isolation of Lactic Acid Bacteria from complex plant samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 221, p. 1-10, 2024.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2024.106937>.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 22-26, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000100006>.

GOKTAS, H.; DIKMEN, H.; BEKIROGLU, H.; CEBI, N.; DERTLI, E.; SAGDIC, O. Characteristics of functional ice cream produced with probiotic *Saccharomyces boulardii* in combination with *Lactobacillus rhamnosus* GG. **LWT - Food Science and Technology**, v. 153, article 112489, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112489>.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Pernambuco, 2.270, Pici
60511-110 Fortaleza, CE
www.embrapa.br/agroindustria-tropical
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente: *José Roberto Vieira Junior*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Membros: *Afrânio Arley Teles Montenegro, Aline Saraiva Teixeira, Eveline de Castro Menezes, Francisco Nelsieudes Sombra Oliveira, Helenira Ellery Marinho Vasconcelos, Kirley Marques Canuto, Laura Maria Bruno, Marlon Vagner Valentim Martins, Pablo Busatto Figueiredo, Roselayne Ferro Furtado e Sandra Maria Morais Rodrigues*

Comunicado Técnico 289

ISSN 1679-6535

Março, 2025

Edição executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Revisão de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Normalização bibliográfica: *Rita de Cassia Costa Cid* (CRB-3/624)

Projeto gráfico: *Leandro Sousa Fazio*

Diagramação: *José Cesamildo Cruz Magalhães*

Publicação digital: PDF



**Ministério da
Agricultura e Pecuária**

Todos os direitos reservados à Embrapa.