

ELABORAÇÃO DO SUCO PROBIÓTICO DE ACEROLA (*Malpighia emarginata*) FERMENTADO POR *Lacticaseibacillus casei* b-442

RESUMO

Nos últimos anos, sucos probióticos fermentados à base de frutas têm recebido considerável atenção de consumidores preocupados com a saúde. Logo, este estudo otimizou as condições de cultivo de *Lacticaseibacillus casei* b-442 em suco de acerola, bem como determinou a quantidade adequada de inóculo, sacarose adicionada e pH adequado. As condições ótimas para produção de suco de acerola probiótico foram: pH inicial 5,5, inóculo inicial de 3% (v/v) e sacarose inicial 50 g/L à temperatura de fermentação de 37 °C e 18 h de fermentação. Observou-se que as contagens de células viáveis de *L. casei* foram superiores a 15,00 Log UFC/mL e a concentração de ácido láctico chegou a 17,18 g/L ao final da fermentação. O suco fermentado por *L. casei* é uma boa e saudável alternativa de alimento funcional contendo probióticos. O suco de acerola mostrou-se eficiente para o crescimento de *L. casei*.

Palavras chaves: Acerola (*Malpighia emarginata*); *Lacticaseibacillus casei* b-442; Suco probiótico

INTRODUÇÃO

Os probióticos estão entre os ingredientes alimentares funcionais amplamente estudados e aplicados. Sendo definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2020). Eles têm sido investigados por sua capacidade de melhorar o funcionamento intestinal, aliviar a intolerância à lactose, melhorar a função imunológica, ações anticarcinogênicas, antidiabéticas, antioxidantes, antienvhecimento, antimicrobianas e antibiofilme (TERPOU *et al.*, 2019).

Os gêneros de microrganismo mais comuns que têm sido empregados como probióticos na fermentação são as bactérias ácido lácticas, *Lacticaseibacillus* e *Bifidobacterium*. *Lacticaseibacillus* é um gênero de bactérias anaeróbicas facultativas gram-positivas. Na natureza, existem pelo menos 60 espécies, constituindo a maioria do grupo de bactérias lácticas, e assim definidas por sua capacidade de converter lactose e outros açúcares em ácido láctico pela fermentação láctica. Em humanos estão presentes no trato gastrointestinal e constituem uma pequena parte da microbiota humana (CICENIA *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, sucos fermentados à base de frutas têm recebido considerável atenção de consumidores preocupados com a saúde. Dentre as diversas opções de frutas para a preparação de um suco probiótico, a acerola (*Malpighia emarginata*) é conhecida por ser uma das fontes naturais mais ricas de ácido ascórbico do mundo. Ela também contém vários fitonutrientes como carotenoides, fenólicos, flavonóides e antocianinas, além de possuir inúmeras propriedades biofuncionais (BELWAL *et al.*, 2018). No entanto, devido ao seu pH ácido e baixa concentração de açúcares, a acerola é pouco estudada e/ou utilizada em pesquisas envolvendo probióticos vivos.

OBJETIVO (LETRA MAIÚSCULA NEGRITO)

O objetivo principal deste trabalho será o desenvolvimento de um suco probiótico de acerola fermentado por *Lacticaseibacillus casei* b-442. Outros objetivos serão: otimizar a produção de ácido lático e a manutenção do teor de ácido ascórbico encontrado no suco.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o delineamento experimental realizado para avaliar o efeito do pH inicial, concentração de açúcar inicial e o inoculo de *L. casei* na contagem de células viáveis e na produção de ácido lático após 18 h de fermentação.

Tabela 1. Resultados obtidos pelo planejamento experimental.

	Sacarose inicial (g/L)	pH	Inoculo (%)	Ácido lático (g/L)	<i>Lacticaseibacillus casei</i> (log CFU/mL)	Sacarose consumida (g/L)
1	50	5,5	1	14,14 ± 0,026	13,38 ± 0,036	21,58 ± 0,026
2	50	5,5	3	17,18 ± 0,028	15,36 ± 0,038	28,47 ± 0,028
3	50	7,5	1	14,2 ± 0,021	13,59 ± 0,011	22,26 ± 0,021
4	50	7,5	3	17,29 ± 0,011	15,48 ± 0,051	28,42 ± 0,011
5	100	5,5	1	13,92 ± 0,027	13,48 ± 0,067	22,51 ± 0,027
6	100	5,5	3	17,92 ± 0,028	15,34 ± 0,058	28,93 ± 0,028
7	100	7,5	1	14,35 ± 0,034	13,08 ± 0,084	22,55 ± 0,034
8	100	7,5	3	17,97 ± 0,029	15,30 ± 0,029	28,82 ± 0,029
9	50	6,5	2	16,83 ± 0,034	14,37 ± 0,024	25,20 ± 0,034
10	100	6,5	2	16,78 ± 0,024	14,48 ± 0,034	25,97 ± 0,024
11	75	5,5	2	16,22 ± 0,022	14,48 ± 0,032	25,06 ± 0,022
12	75	7,5	2	16,12 ± 0,030	14,05 ± 0,030	25,52 ± 0,030
13	75	6,5	1	14,19 ± 0,033	13,35 ± 0,043	22,12 ± 0,033
14	75	6,5	3	17,55 ± 0,028	15,48 ± 0,058	28,79 ± 0,028
15	75	6,5	2	16,2 ± 0,038	14,48 ± 0,038	25,54 ± 0,038
16	75	6,5	2	16,14 ± 0,048	14,48 ± 0,048	25,57 ± 0,048
17	75	6,5	2	16,29 ± 0,028	14,48 ± 0,068	25,82 ± 0,028

De acordo com os efeitos estimados, o efeito do inoculo foi estatisticamente significativo, a 95% de nível de confiança, nas contagens de células viáveis e na produção de ácido lático. A concentração de sacarose foi apenas significativa na produção de ácido lático. Por outro lado, o pH inicial não foi significativo estatisticamente neste estudo considerando um intervalo de confiança de 95% (Tabela 2).

Um dos parâmetros mais pesquisados é o número de células iniciais, que influencia diretamente nas taxas de crescimento celular. De acordo com os resultados, os ensaios que iniciaram a fermentação com 3% de inoculo de *L. casei* apresentaram maiores contagens de células viáveis e maior produção de ácido lático. Para esses ensaios, os valores chegaram a 15,48 log UFC/mL e 17,89 g/L, respectivamente, após 18 h de fermentação. Isso pode ser devido a uma fase lag curta, passando rapidamente para a fase de crescimento exponencial e seguindo-se para fase estacionária (CUI; QU, 2021).

Já a sacarose inicial pode ter influenciado a produção de ácido láctico devido a presença de concentrações maiores de sacarose disponível em alguns ensaios ao longo da fermentação. A sacarose não foi consumida completamente em nenhum dos ensaios. O consumo máximo de açúcar pelo *L. casei* foi de 28,93 g/L no ensaio 6 (100 g/L de sacarose) e o menor consumo foi de 21,58 g/L no ensaio 1 (50 g/L) após 18 h de fermentação

No caso do pH, já foi observado que bactérias LAB podem crescer e produzir ácido láctico em uma ampla faixa de pH, variando entre 5 até 8,5, dependendo do meio, fonte de carbono disponível, número inicial de células e/ou temperaturas de incubação escolhidas (YANG *et al.*, 2018). Ao final das 18 h de fermentação com o *L. casei*, os pH em todos os ensaios ficaram abaixo de 4, próximos do pH inicial da acerola.

Tabela 2. Efeitos estimados do pH inicial, concentração de açúcar inicial e o inoculo de *L. casei* na produção de ácido láctico. Em **vermelho** com *, temos os efeitos que foram estatisticamente significantes, a 95% de nível de confiança.

Parâmetros	<i>Lacticaseibacillus casei</i> B-442		Ácido láctico	
	Efeito	EP	Efeito	EP
Fator				
Média	14,4278	0,0613	16,33	0,0772
(1) Sacarose (L)	-0,1	0,0906	0,26	0,1141
Sacarose (Q)	0,0723	0,1751	0,75*	0,2206*
(2) pH (L)	-0,108	0,0906	0,11	0,1141
pH (Q)	-0,2476	0,1751	-0,51	0,2206
(3) Inoculo (L)	2,016*	0,0906*	3,422*	0,1141*
Inoculo (Q)	0,0523	0,1751	-1,116*	0,22061*
1L x 2L	-0,1925	0,1013	0,0775	0,1276
1L x 3L	0,0525	0,1013	0,3725*	0,1276*
2L x 3L	0,0675	0,1013	-0,0825	0,1276

Os dados apresentados na Tabela 2 foram ajustados aos modelos quadráticos apresentados nas Eqs. (1) e (2) para contagem de células viáveis e concentração de ácido láctico, respectivamente. O teste F e a análise ANOVA foram utilizados como critérios de significância para os modelos ajustados. Todos os modelos foram estatisticamente significativos a 95% de nível de confiança, uma vez que os valores de F calculados (55,94 para a Eq. (1) e 106,43 para a Eq. (2)) foram superiores ao valor de F listado (F 9,7 = 3,667). Bons coeficientes de correlação também foram obtidos ($R^2 = 0,98$ para a Eq. (1) e $R^2 = 0,99$ para a Eq. (2)).

$$L. casei \log \text{ UFC/mL} = 6,83 + 0,012 * x + 0,000057 * x^2 + 0,605 * y + 0,026 * y^2 - 0,00385 * 6,5 * x + 0,001 * x * y + 0,03375 * 6,5 * y + 6,317 \quad (1)$$

$$\text{Ácido láctico} = 3,741 - 0,110 * x + 0,0006 * x^2 + 3,653 * y - 0,558 * y^2 + 0,0015 * 6,5 * x + 0,00745 * x * y - 0,04125 * 6,5 * y + 11,054 \quad (2)$$

Onde,

x = sacarose (g/L) e y = *Lacticaseibacillus casei* (log CFU/mL)

A Fig. 1 são os gráficos de superfície construídos usando as Eqs. (1) e (2), respectivamente. O pH inicial não influenciou significativamente na contagem de células viáveis ou na produção de ácido lático. O aumento do volume inicial de inoculo causou um aumento nos dois parâmetros avaliados, enquanto que a concentração de sacarose adicionada ao suco só influenciou de forma significativa a produção de ácido lático. Portanto, o inoculo de 3% (v/v) foi o melhor para o metabolismo *do L. casei* em suco de acerola. Altas contagens de células viáveis e produção de ácido lático foram observadas em todos os ensaios, sendo os valores máximos 15,48 log UFC/mL (ensaio 4 – 50 g/L de sacarose; pH 7,5; inoculo 3%) e 17,92/17,97 g/L (ensaio 6 – 100 g/L de sacarose; pH 5,5; inoculo 3%; e ensaio 8 – 100 g/L de sacarose; pH 7,5; inoculo 3%) respectivamente.

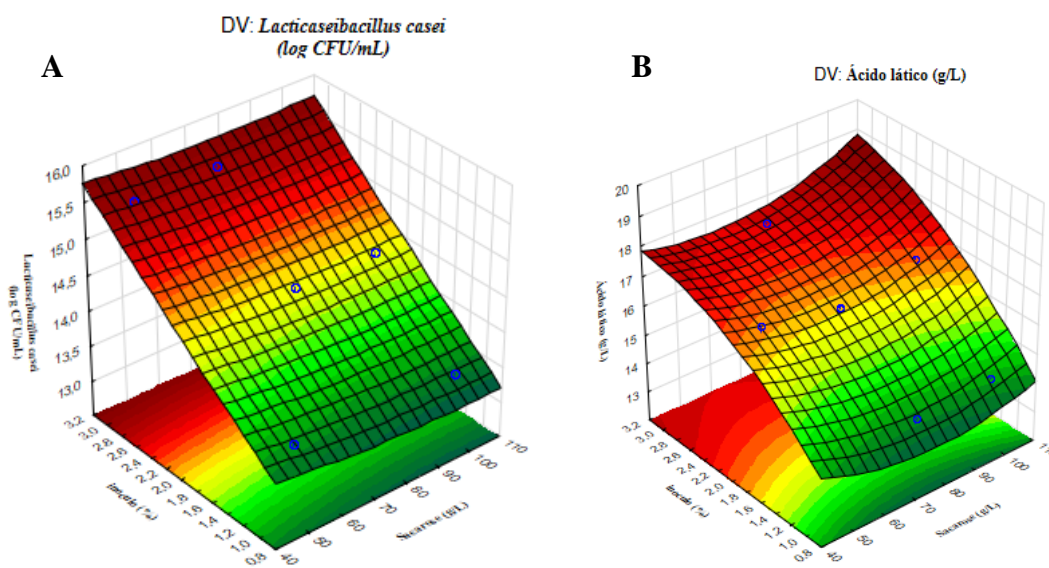


Figura 1. Gráficos de superfície da contagem de células viáveis (Log UFC/mL) de *Lactocaseibacillus casei* B-442 e concentração de ácido lático (g/L) em suco de acerola em função do volume do inoculo (%) e concentração de sacarose (g/L) iniciais.

Nossos resultados estão de acordo com os relatados anteriormente para suco de vegetais. PEREIRA *et al.* (2013) relataram que após 24 h de fermentação com o *L. casei* (pH inicial 6,4 e temperatura de 30 °C), as contagens de células viáveis dos sucos de caju inoculados com 7,00, 7,30 e 7,48 Log UFC/mL foram $8,44 \pm 0,07$, $8,45 \pm 0,06$ e $8,49 \pm 0,02$ Log UFC/mL, respectivamente.

DIMITROVSKI *et al.* (2021) relataram o desenvolvimento de um suco probiótico de abobora fermentado pelo *L. casei* 431. O crescimento probiótico atingiu cerca de 10^{10} UFC/mL em 24 horas. Aproximadamente 9,6 g/L de ácido lático foi produzido, baixando o pH de 6,5 para 3,6 no final da fermentação.

É importante ressaltar que no presente estudo não foi necessário nenhum tratamento térmico e não houve evidência de contaminação. Assim, a *L. casei* sobrepôs e controlou outros crescimentos microbianos e deterioração do suco.

Apesar do grande potencial do uso de sucos de frutas como carreadores probióticos, poucos trabalhos têm sido realizados na fermentação do suco de acerola, devido ao seu baixo pH e baixa concentração de açúcares. Aqui, foi demonstrado que o uso do suco de acerola adicionado de sacarose como substrato para o crescimento probiótico é uma boa alternativa.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que o uso do suco de acerola adicionado de sacarose como substrato para a fermentação por *Lacticaseibacillus casei b-442* é uma alternativa boa e eficiente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. SHARMA, Ranjana *et al.* Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. **Fermentation** 2020, Vol. 6, Page 106 v. 6, n. 4, p. 106 , 6 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2311-5637/6/4/106/htm>>. Acesso em: 22 abr. 2022.
2. TERPOU, Antonia *et al.* Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients** 2019, Vol. 11, Page 1591 v. 11, n. 7, p. 1591 , 13 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591/htm>>. Acesso em: 22 abr. 2022.
3. CICENIA, Alessia *et al.* Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. **Journal of Clinical Gastroenterology** v. 48, n. December, p. S18–S22 , 2014.
4. BELWAL, Tarun *et al.* Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. **Trends in Food Science & Technology** v. 74, p. 99–106 , 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417306805>>. Acesso em: 13 set. 2019.
5. CUI, Yanhua; QU, Xiaojun. Genetic mechanisms of prebiotic carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria: Emphasis on *Lacticaseibacillus casei* and *Lacticaseibacillus paracasei* as flexible, diverse and outstanding prebiotic carbohydrate starters. **Trends in Food Science & Technology** v. 115, p. 486–499 , 1 set. 2021.
6. YANG, En *et al.* Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. **AMB Express** v. 8, n. 1 , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>>.
7. PEREIRA, Ana Lúcia Fernandes *et al.* Storage Stability and Acceptance of Probiotic Beverage from Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology** v. 6, n. 11, p. 3155–3165 , 2013.1194701210321.
8. DIMITROVSKI, Darko *et al.* Developing probiotic pumpkin juice by fermentation with commercial probiotic strain *Lactobacillus casei* 431. **Journal of Food Processing and Preservation** v. 45, n. 3, p. 1–9 , 2021.