

# Desenvolvimento de uma bebida probiótica produzida com soro de leite de vaca

Dissertação de Mestrado

Daniela Silva da Cunha

Mestrado em

**TECNOLOGIA E SEGURANÇA  
ALIMENTAR**



# Desenvolvimento de uma bebida probiótica produzida com soro de leite de vaca

Dissertação de Mestrado

Daniela Silva da Cunha

## Orientador

Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização da presente dissertação:

À minha orientadora Doutora Célia Silva pela orientação, disponibilidade, paciência, conhecimento e experiência transmitidos ao longo de todo o trabalho.

À Márcia Coelho pela disponibilização dos isolados utilizados neste trabalho, pelo seu acompanhamento, ajuda e dedicação.

À Cristiana Maduro Dias pela determinação da proteína.

À empresa Quinta dos Açores pela cedência do soro de leite e preparados de fruta incorporados nas bebidas produzidas.

Ao IITAA - Instituto de Investigação e Tecnologia Agrária e do Ambiente pelo apoio recebido para aquisição dos reagentes

Às minhas colegas de curso, Mariana e Raquel, por todo o companheirismo e amizade, desde o primeiro dia.

À minha família, especialmente ao meu marido, pela paciência, ajuda e incentivo demonstrados ao longo de todo o mestrado.

## RESUMO

A alimentação saudável e a proteção do ambiente são dois temas muito atuais. Cada vez mais, o consumidor procura alternativas benéficas para a saúde e que sejam, ao mesmo tempo, sustentáveis. Vários investigadores têm-se dedicado ao estudo do ácido gama-aminobutírico (GABA), um dos principais neurotransmissores inibidores do sistema nervoso central com funções fisiológicas e efeitos positivos em múltiplos distúrbios metabólicos, nomeadamente no controlo da hipertensão. A procura por produtos naturalmente enriquecidos em GABA tem aumentado, havendo uma preocupação crescente em evitar o recurso a produtos sintéticos. Por outro lado, o excedente de soro é um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias de laticínios, principalmente as de pequena e média dimensão, dado ao elevado custo do seu tratamento. O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma bebida probiótica com soro de leite de vaca, utilizando uma cultura de bactérias do ácido láctico (BAL) com potencial de produção de GABA, contribuindo com benefícios para a saúde do consumidor, e em simultâneo, para a redução dos desperdícios da indústria de laticínios.

Foi realizado um *screening* das BAL produtoras de GABA através de cromatografia em camada fina (TLC) e a confirmação da capacidade produtora de GABA através de cromatografia de alta eficiência (HPLC). Foram identificados 3 isolados *Enterococcus maladoratus* com uma percentagem elevada de conversão do ácido glutâmico em GABA. Procedeu-se então à preparação de uma bebida utilizando o soro pasteurizado como principal matéria-prima para a fermentação com um isolado produtor de GABA. Ao produto final foi adicionado preparado de fruta, tendo em vista a melhoria do ponto de vista sensorial. As bebidas foram ainda submetidas a análises químicas e microbiológicas.

Do nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho a relatar a espécie *Enterococcus maladoratus* como potencial produtor de GABA, com elevadas percentagens de conversão do ácido glutâmico em GABA. Foram obtidas percentagens de conversão entre 50% a 71% nas bebidas produzidas com sabor a ananás e maracujá. A bebida com sabor a ananás obteve concentrações de GABA entre 2,319 g L<sup>-1</sup> e 3,117 g L<sup>-1</sup> e a bebida com sabor a maracujá entre 2,636 g L<sup>-1</sup> e 3,272 g L<sup>-1</sup>. A ingestão diária de 100ml de uma das bebidas produzidas corresponde a uma ingestão aproximada de 250 mg a 300 mg de GABA, podendo o seu consumo exercer efeitos benéficos para o consumidor, nomeadamente a nível do controlo da pressão arterial.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias do ácido láctico, *Enterococcus maladoratus*, probiótico, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), soro do leite, bebida láctea fermentada.

## ABSTRACT

Healthy eating and environmental protection are two very current issues. Increasingly, consumers are looking for alternative foods with benefits to health and, at the same time, sustainable. Several researchers have focused on the study of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), a major neurotransmitter inhibitor of the central nervous system with physiological functions and positive effects on multiple metabolic disorders, such as the hypertension control. The demand for naturally enriched products in GABA has increased and there is a growing concern about avoiding the use of synthetic products. On the other hand, the surplus of whey is one of the biggest problems faced by the dairy industries, especially the small and medium-sized ones, given the high cost of its treatment. The main objective of the present work is the development of a probiotic drink made with cow's milk whey and the use of a culture of lactic acid bacteria (LAB) with potential for GABA production. This probiotic drink will have benefits for the consumer's health, and at the same time, for the reduction of waste from the dairy industry. LAB was screened for the production of GABA by thin layer chromatography (TLC). The confirmation of the GABA production capacity was done by high performance liquid chromatography (HPLC). Three isolates were identified as *Enterococcus maladoratus* with a high percentage of conversion of glutamic acid to GABA. The beverage was prepared using the pasteurized whey as the main raw material for fermentation with a GABA-producer. A fruit preparation was added to the final product, in order to improve the sensorial features. The beverages were also subjected to chemical and microbiological analysis. To our knowledge, this was the first study to report the species *Enterococcus maladoratus* as a potential producer of GABA, with high percentages of conversion of glutamic acid to GABA. Conversion percentages between 50% and 71% were obtained in beverages produced with pineapple and passion fruit flavor. The pineapple-flavored drink achieved GABA concentrations between 2,319 g L<sup>-1</sup> and 3,117 g L<sup>-1</sup>, and the passion fruit-flavored beverage between 2,636 g L<sup>-1</sup> and 3,272 g L<sup>-1</sup>. The daily intake of 100 ml of one of the beverages produced corresponds to an approximate intake of 250 mg to 300 mg of GABA. Therefore, the consumption of these beverages may have beneficial effects for the consumer, namely in the control of blood pressure.

**KEYWORDS:** Lactic acid bacteria, *Enterococcus maladoratus*, probiotic,  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), whey, fermented dairy beverage.

## ÍNDICE

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | INTRODUÇÃO .....   | 1  |
| 2.       | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                              | 3  |
| 2.1.     | Bactérias do Ácido Lático (BAL) .....                    | 3  |
| 2.1.1.   | Caracterização .....                                     | 3  |
| 2.1.2.   | Género <i>Enterococcus</i> .....                         | 4  |
| 2.1.2.1. | Perspetiva histórica .....                               | 4  |
| 2.1.2.2. | Caracterização .....                                     | 5  |
| 2.1.2.3. | Fatores de virulência e Resistência a antibióticos ..... | 6  |
| 2.1.2.4. | Aplicação na área alimentar .....                        | 7  |
| 2.1.2.5. | <i>Enterococcus malodoratus</i> .....                    | 9  |
| 2.1.3.   | Queijo de São Jorge .....                                | 9  |
| 2.2.     | Probióticos .....  | 10 |
| 2.2.1.   | Caracterização .....                                     | 10 |
| 2.2.2.   | Benefícios para a saúde .....                            | 11 |
| 2.3.     | Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA) .....               | 12 |
| 2.3.1.   | Caracterização .....                                     | 12 |
| 2.3.2.   | Funções e benefícios para a saúde .....                  | 13 |
| 2.3.3.   | Produtores de GABA .....                                 | 15 |
| 2.4.     | Soro do leite .....                                      | 18 |
| 2.4.1.   | Composição .....   | 18 |
| 2.4.2.   | Benefícios para a saúde .....                            | 19 |
| 2.4.3.   | Agente poluente .....                                    | 20 |
| 2.5.     | Bebidas lácteas fermentadas .....                        | 20 |
| 3.       | MATERIAIS E MÉTODOS .....                                | 23 |
| 3.1.     | Preparação dos inóculos .....                            | 23 |
| 3.2.     | Avaliação da produção de GABA por TLC .....              | 23 |
| 3.3.     | Doseamento de GABA e ácido glutâmico por HPLC .....      | 23 |
| 3.4.     | Preparação da bebida .....                               | 26 |
| 3.4.1.   | Matérias-primas/Ingredientes .....                       | 26 |
| 3.4.2.   | Procedimento .....                                       | 26 |
| 3.5.     | Análises microbiológicas .....                           | 29 |
| 3.6.     | Análises químicas .....                                  | 29 |
| 3.6.1.   | Determinação de GABA e ácido glutâmico .....             | 29 |
| 3.6.2.   | Determinação da humidade .....                           | 29 |
| 3.6.3.   | Acidez titulável .....                                   | 29 |
| 3.6.4.   | pH .....   | 30 |
| 3.6.5.   | Determinação dos açúcares totais .....                   | 30 |
| 3.6.6.   | Determinação da gordura .....                            | 31 |
| 3.6.7.   | Determinação da proteína .....                           | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                | 32 |
| 4.1. <i>Screening</i> das BAL produtoras de GABA por TLC ..... | 32 |
| 4.2. Quantificação do GABA por HPLC .....                      | 33 |
| 4.2.1. Produção de GABA em meio de cultura .....               | 37 |
| 4.2.2. Produção de GABA nas bebidas produzidas .....           | 39 |
| 4.3. Análises microbiológicas .....                            | 41 |
| 4.4. Caracterização química das bebidas produzidas .....       | 42 |
| 5. CONCLUSÕES .....  | 45 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                            | 46 |

## 1. INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde e o interesse por alimentos saudáveis tem aumentado mundialmente, motivando as indústrias a inovar e a desenvolver novos produtos de forma a ir ao encontro das expectativas dos consumidores (Thamer & Penna, 2006).

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é considerado um importante composto bioativo, que tem sido investigado devido às inúmeras funções fisiológicas e efeitos positivos em muitos distúrbios metabólicos, sendo o efeito hipotensor o que mais se destaca, já demonstrado em ensaios com animais e humanos (Diana, Quílez, & Rafecas, 2014). A procura por produtos naturalmente enriquecidos em GABA tem aumentado expressivamente, pelo que a produção de GABA através da utilização de BAL em alimentos fermentados representa uma alternativa de eleição para dar resposta a esta procura (Dhakal, Bajpai, & Baek, 2012).

Por outro lado, o soro produzido como subproduto da produção de queijos pode atuar como agente de poluição ambiental (Magalhães et al., 2011). O excedente desse subproduto é um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias de laticínios, principalmente as de pequena e média dimensão, dado ao elevado custo do seu tratamento (Almeida, Bonassi, & Roça, 2001; Serpa et al., 2009; Siqueira, Machado, & Stamford, 2013; Souza & Brandi, 2016).

As bebidas lácteas fermentadas a partir de soro e com culturas probióticas surgem como uma excelente alternativa inovadora por apresentarem propriedades funcionais e permitirem o aproveitamento do soro, minimizando o impacto ambiental negativo, sem a necessidade de grandes investimentos ou de mudanças significativas na rotina de produção (Thamer & Penna, 2006; Pelegriane & Carrasqueira, 2008; Siqueira, Machado, & Stamford, 2013). Estudos que relatam o desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas a partir de soro demonstram uma elevada aceitabilidade do ponto de vista sensorial (Gianetti Thamer, Lúcia, & Penna, 2006; Frutuoso, 2012; Pelegriane & Carrasqueira, 2008).

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma bebida probiótica com soro de leite de vaca, utilizando uma cultura de bactérias do ácido láctico (BAL) com potencial de produção de GABA, contribuindo com benefícios para a saúde do consumidor, e em simultâneo, para a redução dos desperdícios da indústria de laticínios.

Os objetivos consistiram na identificação e seleção de uma cultura de BAL com capacidade elevada de produção de GABA para utilização na fermentação do soro de leite de vaca, com adição de fruta para melhoria das propriedades sensoriais. Teve ainda como objetivos, a análise química e microbiológica.

Tendo como pressuposto a grande aceitabilidade das bebidas preparadas a partir do soro do leite e considerando os efeitos probióticos da cultura selecionada através da produção de GABA,

conclui-se que o desenvolvimento desta bebida poderá ser alvo de grande interesse para os consumidores na sequência dos benefícios que advêm do seu consumo.

O trabalho encontra-se dividido em 5 capítulos. No primeiro capítulo é apresentada uma introdução e contextualização do tema, apresentação dos objetivos e descrição da estrutura organizacional da tese.

O segundo capítulo corresponde a uma revisão bibliográfica sobre os principais temas relacionados com os objetivos do trabalho, nomeadamente as BAL, probióticos, GABA, bebidas lácteas fermentadas e soro do leite.

O terceiro capítulo refere-se aos materiais e métodos utilizados, nomeadamente a preparação dos inóculos, *screening* das BAL produtoras de GABA através de cromatografia de camada fina (*Thin Layer Chromatography - TLC*), confirmação da capacidade produtora de GABA através de cromatografia de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography - HPLC*), processo de preparação da bebida, métodos de análise química e microbiológica.

No quarto capítulo, são apresentados os resultados obtidos bem como a respetiva discussão, com base na bibliografia já desenvolvida sobre o tema.

O quinto capítulo encerra o trabalho com as conclusões do trabalho, concretização dos objetivos e reflexão sobre necessidades de investigação em relação ao tema tratado.