

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

PRODUÇÃO DE IOGURTE CONTENDO *Lactobacillus casei* CSL3 POTENCIALMENTE PROBIÓTICO IMOBILIZADO EM AVEIA

H.R.S. Vitola¹, C.W. Ames², K.F. Cunha², C.E.S. Cruxen², W.P. da Silva², Â.M. Fiorentini²

1- Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 32759031 – e-mail: (helena_rsv@hotmail.com)

2- Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – CEP: 96010-900 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 3275-7378 – Fax: (53) 32759031

RESUMO – O presente estudo teve por objetivo avaliar a viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia com aplicação na produção de iogurte. A elaboração do iogurte consistiu na mistura de leite integral UHT, sacarose, culturas iniciadoras e *L. casei* imobilizado em aveia. Foram realizadas análises de pH, acidez titulável e viabilidade do probiótico nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias. O iogurte produzido apresentou decréscimo do pH ao longo do tempo bem como aumento da acidez durante o armazenamento do produto. *Lactobacillus casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia manteve sua viabilidade quando inserido em iogurte nas concentrações referentes a 8,78 log UFC.g⁻¹ durante 25 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). Portanto, *L. casei* CSL3 quando imobilizada em aveia possui potencial como cultura probiótica na produção de iogurte.

ABSTRACT – The present study aimed to produce yogurt containing *Lactobacillus casei* CSL3, potentially probiotic, immobilized in oat flakes. The production of yogurt consisted of a mixture of UHT whole milk, sucrose, starter cultures and *L. casei* immobilized in oats. Analyzes of pH, titratable acidity and viability of the probiotic at times 0, 5, 10, 15, 20 and 25 days. The yogurt produced showed a decrease in pH over time as well as an increase in acidity during product storage. *Lactobacillus casei* CSL3 immobilized on oat flakes maintained its viability when inserted in yogurt at concentrations referring to 8.78log UFC.g⁻¹ during 25 days of cold storage (4 °C). Therefore, *L. casei* CSL3 when immobilized in oat has potential as a probiotic culture in the production of yogurt.

PALAVRAS-CHAVE: bactéria ácido-láctica, probiótico, iogurte, biocatalisador, cereal

KEYWORDS: lactic acid bacteria, probiotic, yogurt, biocatalyst, cereal

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida da população, observa-se transformações na incidência e prevalência das doenças crônicas. Diante disso, o consumidor tem buscado, cada vez mais, produtos que além de propriedades nutricionais, ofereçam benefícios à sua saúde (Brown et al., 2018; Terpou et al., 2016). Produtos lácteos representam um dos maiores segmentos de mercado entre os alimentos funcionais, sendo propostos como os veículos mais promissores para a entrega de ingredientes funcionais, como probióticos, prebióticos, proteínas, vitaminas e minerais (Akin & Ozcan, 2017).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Estes microrganismos devem atender a requisitos básicos para assim serem caracterizados como probióticos, como resistir às condições do trato gastrointestinal; possuir capacidade de adesão e colonização às células intestinais; produzir substâncias antimicrobianas e serem metabolicamente ativos no intestino (Markowiak & Slizewska, 2017). Além disso, é importante que, o produto probiótico apresente um número de microrganismos viáveis de, no mínimo, 10^6 a 10^7 UFC.mL⁻¹ ou g⁻¹ até o momento do consumo (FAO/WHO, 2002).

Do ponto de vista tecnológico, a adição de bactérias probióticas em diferentes matrizes alimentares apresentam desafios, enfrentar as condições adversas frequentemente empregadas durante o processamento e armazenamento dos alimentos, o que pode levar a perdas na viabilidade do microrganismo. Para superar estas condições, técnicas de imobilização são aplicadas com intuito de auxiliar na viabilidade e funcionalidade celular (Kourkoutas et al., 2005; Mattila-Sandholm et al., 2002; Sidira et al., 2013).

A imobilização celular consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual suas atividades catalíticas são mantidas (Krasňan et al., 2016). Diferentes tipos de materiais utilizados como suporte na imobilização celular foram relatados, como proteína de soro de leite (Sidira et al., 2017), grãos de soja (Vitola et al., 2018), pedaços de abacaxi (Vitola et al., 2020). De acordo com alguns autores (Mitropoulou et al., 2013; Sidira et al., 2015) os cereais contêm carboidratos não digeríveis que formam a base da imobilização celular, além de poderem ser utilizados como substratos fermentáveis para o desenvolvimento de microrganismos probióticos.

Portanto, o uso de flocos de aveia (*Avena sativa* L.) como suporte à imobilização celular de *L. casei* CSL3 torna-se uma alternativa promissora, pois possuem alta qualidade proteica, componentes com propriedades antioxidantes e alta proporção de fibras alimentares, principalmente β -glucanas, além de ser um cereal amplamente consumido pela população (Hu et al., 2014; Kouřimská et al., 2018; Sterna et al., 2016; Zhang et al., 2017).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia com aplicação na produção de iogurte.

2. MATERIAL E METODOS

2.1 Material

Como matéria-prima para a elaboração de iogurte e para a imobilização celular foram utilizados leite integral ultrapasteurizado (Santa Clara), sacarose (União) e aveia em flocos (Nestlé). Todos os produtos foram adquiridos no comércio local em Pelotas/RS, Brasil.

2.2 Culturas bacterianas

O isolado *Lactobacillus casei* CSL3 utilizado é proveniente de silagem de colostro bovino e foi previamente caracterizado com potencial probiótico por Vitola et al. (2018). As culturas iniciadoras para elaboração do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) foram adquiridas na empresa Chr. Hansen e armazenadas em -70 °C no Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA), pertencente ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI).

2.3 Imobilização celular

A imobilização de *L. casei* CSL3 seguiu a metodologia proposta por Bosnea et al. (2009), com adaptações de Vitola et al. (2018). O isolado foi cultivado a 37 °C durante 24 h em caldo De Man Rogosa and Sharpe (MRS, Acumedia), sob condições de anaerobiose. As células foram centrifugadas a 4.165 g durante 10 min a 4 °C e lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS).

Os flocos de aveia que foram utilizados como suportes para as células passaram pela luz ultravioleta para completa esterilização. A imobilização foi realizada através da inoculação de 300 g de flocos de aveia e 2,4 g (peso úmido) de *L. casei* CSL3 em 600 mL de caldo MRS. A mistura foi incubada a 37 °C por 48 h. Posteriormente, a solução fermentada foi decantada e o biocatalisador foi lavado três vezes com PBS, com a finalidade de remoção de células livres.

2.4 Produção de iogurte

A elaboração do iogurte consistiu de na mistura de 1L de leite integral ultrapasteurizado (UHT), 10% (p/v) de sacarose, culturas iniciadoras (0,1% v/v) e *L. casei* imobilizado em aveia (35% p/p) (Bosnea et al, 2016), denominado de YCLI. Após, a formulação foi fermentada em iogurteira (Fun Kitchen) e incubada a 37 °C até atingir pH 4,6. O iogurte foi resfriado, adicionados dos flocos de aveia contendo *L. casei* CSL3, envasado e mantido sob refrigeração (4 °C) até a execução das análises. Três repetições foram realizadas para o tratamento.

2.5 pH e acidez

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) foi realizada em pHmêtro digital AK151-AKSO e através de titulometria foi possível determinar a acidez (% ácido lático) do produto. As análises foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento do iogurte (AOAC, 2005).

2.6 Viabilidade da cultura potencialmente probiótica

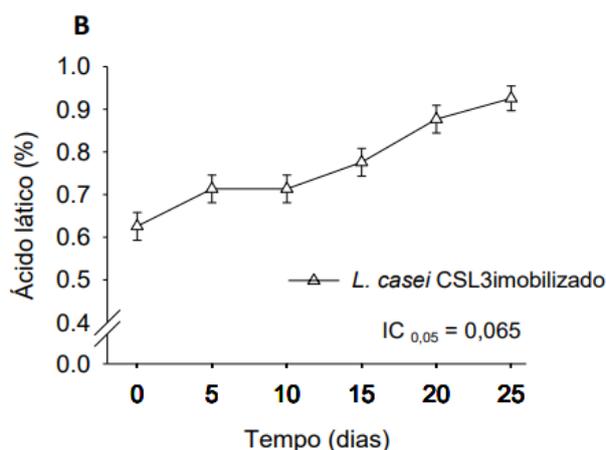
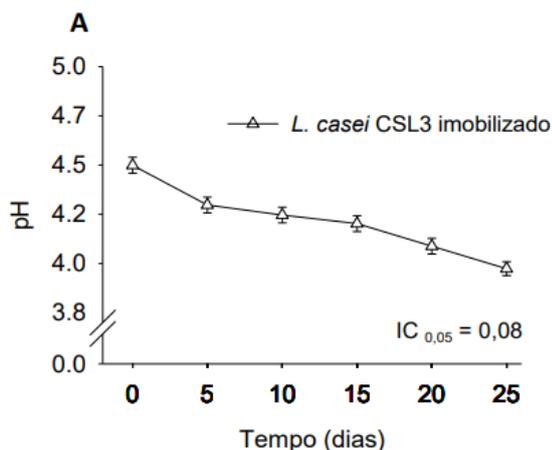
A determinação da viabilidade de *L. casei* CSL3 imobilizada foi realizada através da contagem de células viáveis da amostra de iogurte realizada nos dias 0, 5, 10, 15, 20 e 25 de armazenamento do produto. Para determinação 10 g de amostra foram homogeneizadas em 90 mL de água peptonada (AP) 0,1% (g/v), seguida de diluições decimais seriadas. Após, 0,1 mL da suspensão foram inoculadas ágar MRS suplementado com 0,3% de bile bovina (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas em condições de anaerobiose por 48 h a 37 °C (Vinderola & Reinheimer, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 pH e acidez

Os valores de pH e acidez do iogurte contendo *L. casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia apresentaram efeito significativo para o tempo ($p < 0,001$), que pode ser visualizado na Figura 1 A e B.

Figura 1 – Valores de pH (A) e acidez titulável (B) de iogurte adicionado de *L. casei* CSL3, potencialmente probiótico, imobilizado em aveia, durante o período de armazenamento. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade, sendo consideradas diferenças significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.

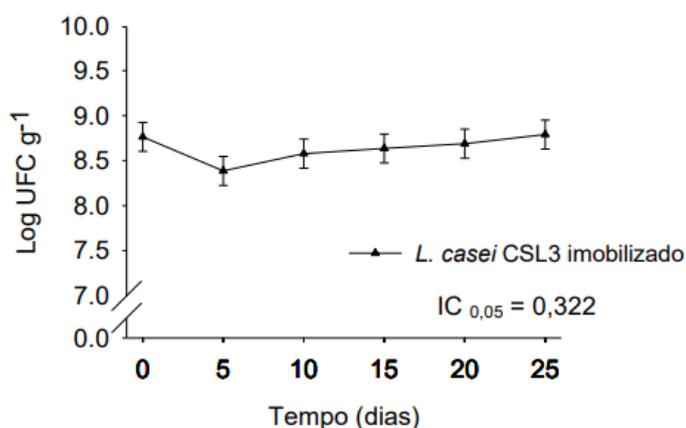


Pode ser verificado que houve decréscimo significativo do pH, assim como produção de ácido láctico ao longo do tempo de armazenamento do produto refrigerado a 4 °C. De acordo com Terpou et al. (2017) e Vitola et al. (2020), geralmente observa-se uma maior produção de ácido, em produtos lácteos contendo culturas probióticas adjuntas em comparação com produtos lácteos comerciais. Deve ser levado em consideração que a técnica de imobilização celular permite aumentar a multiplicação microbiana na superfície do suporte, resultando no maior consumo de carboidratos e, conseqüentemente, maior produção de ácidos e redução do potencial de hidrogênio

3.2 Viabilidade da cultura potencialmente probiótica em iogurte

O efeito do tempo sobre a viabilidade da bactéria probiótica imobilizada foi significativo ($p=0,0134$) (Figura 2).

Figura 2 - Viabilidade de *L. casei* CSL3 imobilizado em flocos aveia adicionado a iogurte, durante o período de armazenamento. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade, sendo consideradas diferenças significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.



É possível notar que, com o decorrer do tempo de armazenamento YLCI teve um pequeno aumento na concentração de *L. casei* CSL3, indicando uma possível multiplicação da bactéria nesse período. Em pesquisa realizada por Vitola et al. (2018), foi possível comprovar a capacidade da bactéria estudada (*L. casei* CSL3) de se multiplicar sob temperatura de refrigeração.



Durante todo o período de armazenamento, o iogurte com células probióticas imobilizadas apresentou altas taxas de sobrevivência (contagens $>8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) até o 25º dia de armazenamento, mantendo-se dentro dos níveis recomendados para probióticos ($\geq 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) (FAO/WHO, 2002).

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com o de Sidira et al. (2017), onde contagens de *Lactobacillus plantarum* 2035 imobilizada em *whey protein* foram detectadas em iogurtes probióticos em níveis requeridos para conferir efeito probiótico ($\geq 6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$), durante o armazenamento a 4 °C.

4. CONCLUSÕES

O isolado *L. casei* CSL3, imobilizado em flocos de aveia, na produção de iogurte, manteve a viabilidade de $8,78 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ durante o período de armazenamento refrigerado, indicando potencial para uso como cultura probiótica em iogurte.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo financiamento do estudo. Código Financeiro 001.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akin, Z., & Ozcan, T. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. (2016). *LWT Food Science and Technology*, 86, 25-30.
- Bosnea, L.A., Kopsahelis, N., Kokkali, V., Terpou, A., & Kanellaki, M. (2016). Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains. *Food and Bioprocess Technology*, 102, 62-71.
- Bosnea, L.A., Kourkoutas, Y., Albantaki, N., Tzia, C., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. (2009). Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. *LWT Food Science and Technology*, 42, 1696-1702.
- Brown, L., Caligiuri, S.P.B., Brown, D., & Pierce, G.N. (2018). Clinical trials using functional foods provide unique challenges. *Journal of Functional Foods*, 45, 233-238.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO/WHO). (2002). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario.
- Food and Agricultural Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO/WHO). (2001). *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, Argentina.
- Horwitz, W. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18 ed.). Gaithersburg, Md.
- Hu, X. Z., Zheng, J. M., Li, X. ping, Xu, C., & Zhao, Q. (2014). Chemical composition and sensory characteristics of oat flakes: A comparative study of naked oat flakes from China and hulled oat flakes from western countries. *Journal of Cereal Science*, 60(2), 297-301.
- Kouřimská, L., Sabolová, M., Horčíčka, P., Rys, S., & Božik, M. (2018). Lipid content, fatty acid profile, and nutritional value of new oat cultivars. *Journal of Cereal Science*, 84, 44-48.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411-416.
- Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., & Rebroš, M. (2016). Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (6), 2535-2553.
- Markowiak, P., & Slizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, And Synbiotics On Human Health. *Nutrients*, 9.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12, 173-182.

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

- Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013, 1-16.
- Sidira, M., Kourkoutas, Y., Kanellaki, M., & Charalampopoulos, D. (2015). *In vitro* study on the cell adhesion ability of immobilized lactobacilli on natural supports. *Food Research International*, 76, 532–539.
- Sidira, M., Santarmaki, V., Kiourtzidis, M., Argyri, A. A., Papadopoulou, O. S., Chorianopoulos, N., Tassou, C., Kaloutsas, A. G. & Kourkoutas, Y. (2017). Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum* 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production. *LWT Food Science and Technology*, 75, 137-146.
- Sidira, M., Saxami, G., Dimitrellou, D., Santarmaki, V., Galanis, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Monitoring survival of *Lactobacillus casei* ATCC 393 in probiotic yogurts using an efficient molecular tool. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 3369–3377.
- Sterna, V., Zute, S., & Brunava, L. (2016). Oat Grain Composition and its Nutrition Benefice. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 252–256.
- Terpou, A., Gialleli, A.-I., Bekatorou, A., Dimitrellou, D., Ganatsios, V., Barouni, E., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. (2017). Sour milk production by wheat bran supported probiotic biocatalyst as starter culture. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 184- 192.
- Terpou, A., Gialleli, A.I., Bosnea, L., Kanellaki, M., Koutinas, A.A., & Castro, G.R. (2016). Novel cheese production by incorporation of sea buckthorn berries (*Hippophae rhamnoides* L.) supported probiotic cells. *LWT Food Science and Technology*, 1-9.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9(8), 497–505.
- Vitola, H. R. S., Cruxen, C. E. dos S., Tavares, F., Thiel, P. R., Marques, J. de L., Da Silva, W. P., & Fiorentini, Â. M. (2020). *Lactobacillus casei* CSL3: Evaluation of supports for cell immobilization, viability during storage in *Petit Suisse* cheese and passage through gastrointestinal transit *in vitro*. *LWT Food Science and Technology*, 127, 109381.
- Vitola, H. S. R., Dannenberg, G. S., Marques, J. L., Lopez, G. V., Silva, W. P. & Fiorentini, A. M. (2018). Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*, 73, 1-7.
- Zhang, J., Luo, K., & Zhang, G. (2017). Impact of native form oat β -glucan on starch digestion and postprandial glycemia. *Journal of Cereal Science*, 73, 84–90.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br