

IMOBILIZAÇÃO DE *Lactobacillus casei* CSL3, POTENCIALMENTE PROBIÓTICO, UTILIZANDO COMO SUPORTE FLOCOS DE AVEIA

CAMILA WASCHBURGER AMES¹; HELENA REISSIG SOARES VITOLA²;
KAMILA FURTADO DA CUNHA²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³; ÂNGELA
MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas– camilaames@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – helena_rsv@hotmail.com; kamilafurtado1@hotmail.com

³¹Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com; angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a busca por alimentos que proporcionam benefícios à saúde dos indivíduos, vem sendo demonstrada por grande parte dos consumidores. Os alimentos com alegação de propriedade funcional são caracterizados por conterem componentes, que além de suas funções nutritivas básicas, fornecem melhorias fisiológicas ou reduzem o risco de doenças crônicas (BRASIL, 2008).

Pertencentes a categoria de alimentos funcionais, estão os alimentos probióticos. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO, 2001), probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, são exemplos *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus casei*.

Porém, um obstáculo no que diz respeito à aplicação de bactérias probióticas em produtos alimentícios é manter sua viabilidade, nas devidas concentrações (superior a 10⁶ UFC/g ou mL), até o consumo. Em virtude desse problema, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, a fim de buscar uma solução, sendo eleita como uma alternativa viável a imobilização celular.

Essa técnica possibilita o aumento da estabilidade, pois o confinamento das células além da proteção, eleva sua atividade fermentativa, devido a contínua produção de enzimas pelos micro-organismos. Diversos são os métodos para imobilização como: auto-agregação, ligação à superfície, aprisionamento em matriz porosa e contenção por barreira (PILKINGTON et al., 1998), da mesma forma inúmeros tipos de suportes podem ser utilizados para esse processo, sendo os materiais mais estudados alginatos e carragena, bem como, grãos (ALMEIDA et al., 2003; SIDIRA et al., 2014; VITOLA, 2017) ou pedaços de frutas (KOURKOUTAS et al., 2001; KOURKOUTAS et al., 2006). A escolha do material de suporte é dependente do micro-organismo a se imobilizar, assim como o produto em que se pretende aplicar.

Por ser um cereal consumido diariamente pela população, a aveia (*Avena sativa* L.) torna-se uma opção como suporte para a imobilização de bactérias probióticas, pois além de possuir qualidade proteica, conteúdo lipídico com predominância de ácidos graxos insaturados e componentes com propriedades antioxidantes, a mesma é caracterizada por sua alta proporção de fibras alimentares (7,1 a 12,1%) responsáveis por efeitos benéficos à saúde humana (CRESTANI et al., 2010; DAOU e ZHANG, 2012;), dando destaque a fração solúvel maior quando comparada aos demais cereais (FUJITA e FIGUEROA, 2003; WOOD, 2007).

Esse trabalho teve por objetivo imobilizar *Lactobacillus casei* CSL3, potencialmente probiótico, utilizando como suporte flocos de aveia.

2. METODOLOGIA

A bactéria *Lactobacillus casei* CSL3, foi isolada de silagem de colostro bovino e caracterizada em estudos anteriores por VITOLA (2017)

Para induzir a adesão da bactéria em estudo ao suporte sólido, seguiu-se a metodologia proposta por BOSNEA et al. (2009) com modificações realizadas por VITOLA (2017). Os flocos de aveia branca (Prinat Produtos Integrals Naturais®) foram dispostos em placas de petri deixadas sob luz ultravioleta pelo período de 15 minutos, para esterelização. O isolado CSL3 foi cultivado em 300 mL de caldo De Man, Rogosa & Sharper (MRS) por 24 horas a 37 °C. Após esse período submeteu-se o caldo à centrifugação nas condições de 4165 g, 10 minutos, 20 °C. O *pellet* obtido foi lavado quatro vezes com tampão fosfato-salino (PBS).

Realizou-se contagens de CSL3 da aveia e do *pellet* em placas com ágar MRS antes do processo de imobilização.

Em frascos do tipo erlenmeyer, previamente esterelizados, adicionou-se 25 g de flocos de aveia branca, 0,4 g de células úmidas de CSL3 e 100 mL de caldo MRS. A mistura foi submetida a 37 °C por 48 horas, sem agitação, para ocorrer a multiplicação de *L. casei* CSL3 e consequentemente sua adsorção ao suporte.

Ao final, os flocos foram lavados, quatro vezes, com tampão PBS e armazenados sob temperatura de refrigeração (6 °C). Procedeu-se com as contagens de *L. casei* CSL3 nos tempos 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. As contagens foram realizadas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de células aplicada na etapa de imobilização de *L. casei* CSL3 foi de 10 log UFC.g⁻¹. A lavagem dos flocos permitiu a remoção das células não aderidas e/ou fracamente aderidas, permanecendo para as contagens durante o transcorrer do período de armazenamento, apenas as bactérias imobilizadas nos flocos de aveia.

Observou-se que a partir do sétimo dia de armazenamento as concentrações de *L. casei* CSL3 se mantiveram acima do valor de 6,6 log UFC.g⁻¹. Do sétimo ao vigésimo primeiro dia há um aumento na concentração da bactéria, esse fato pode ser decorrente da capacidade desta de se multiplicar sob temperatura de refrigeração (VITOLA, 2017).

BOSNEA et al. (2009) avaliaram a viabilidade de células de *L. casei* ATCC 393 liofilizadas imobilizadas em grãos de trigo e perceberam que a bactéria se manteve em concentrações superiores a 9 log UFC.g⁻¹, com e sem o uso de crioprotetores. Quando comparado ao presente estudo tais resultados podem ser justificados devido as células terem sido submetidas ao processo de liofilização antes da imobilização nos grãos de trigo. Outro fator que influencia a taxa de multiplicação e de adesão da bactéria seria a diferença entre linhagens como citado por CORCORAN (1985) como a utilização de uma cepa padrão e de um isolado de origem alimentar.

KOURKOUTAS et al., (2006) verificaram a concentração de *L. casei* ATCC 393 quando imobilizadas em pedaços de frutas e aplicadas na produção de queijos probióticos. Os autores puderam observar que a bactéria se manteve em concentrações superiores a 7 log UFC.g⁻¹ durante os 70 dias de armazenamento sob refrigeração. A alta concentração de células pode ser explicada pela adição

de NaCl durante o processamento do queijo, pois há relatos de que a incorporação do sal leva a um aumento da produção/acumulação de solutos compatíveis e, portanto, pode promover sobrevivência de bactérias ácido lácticas ao longo do armazenamento em estado seco (CARVALHO et al., 2003).

VITOLA (2017) imobilizou *L. casei* CSL3, em grãos de soja. A pesquisa demonstrou que o isolado manteve concentrações superiores a 6 log durante 30 dias de armazenamento sob refrigeração, resultados esses que não corroboram com o atual estudo, podendo atribuir esse fato a maior superfície de contato para adesão da bactéria nos flocos de aveia, quando comparadas aos cotilédones de grãos de soja (DEVI E SRIDHAR, 2000).

4. CONCLUSÕES

L. casei CSL3 quando imobilizado em flocos de aveia, manteve sua viabilidade, sob armazenamento em refrigeração por 42 dias, característica vantajosa visando uma futura aplicação em produtos lácteos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.; BRANYIK, T.; MORADAS-FERREIRA, P.; TEIXEIRA, J. Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Braga, v. 96, n. 6, p. 513-518, 2003.

BOSNEA, L.; KOURKOUTAS, Y.; ALBANTAKI, N.; TZIA, C.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M. Functionality of freeze-dried *L. casei* cells immobilized on wheat grains. **LWT- Food Science and Technology**, Atenas, v. 42, p. 1696-1702, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, julho de 2008. Acessado em 01 out. 2017. Online. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X.; GIBBS, P. Effect of various factors upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Food Science**, Porto, v. 68, n. 8, p. 2538–2541, 2003

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, Horwood**, v. 10, p. 12-50, 1985.

CRESTANI, M.; DE CARVALHO, F. IF F; OLIVEIRA, A. C.; DA SILVA, A. G.; GUTKOSKI, L. C.; SARTORI, J. F.; BARBIERI, R. L; BARETTA, D. Conteúdo de β -glucana em cultivares de aveia-branca cultivadas em diferentes ambientes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 3, p.261- 268, 2010.

DAOU, C.; ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its role in health promotion and prevention of diseases. **Comprehensive Reviews - Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 11, n. 4, p. 355–365, 2012.

DEVI, S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. **Process Biochemistry**, London, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2000.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization – FAO/ WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001, p. 34. Acessado em 01 out. 2017. Online. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf

FUJITA, A. H., FIGUEROA, M. O. R. Composição centesimal e teor de β -glicanas em cereais e derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 116-120, 2003.

KOURKOUTAS, Y.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Patras, v. 49, n. 3, p. 1417-1425, 2001.

KOURKOUTAS, Y., BOSNEA, L., TABOUKOS, S., BARAS, C., LAMBROU, D., & KANELAKI, M. Probiotic cheese production using *Lactobacillus casei* cells immobilized on fruit pieces. **Journal of Dairy Science**, Patras, v 89, n 5, p. 1439–1451, 2006.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITS, A.; MENSOUR, N. A. Mass transfer characteristics of immobilized cells used in fermentation processes – Critical Reviews. **Biotechnology**, Canada, v. 18, n. 2-3, p. 237,255, 1998.

SIDIRA, M.; KARAPETSAS, A.; GALANIS, A.; KANELAKI, M. KOURKOUTAS, Y. Effective survival of immobilized *Lactobacillus casei* during ripening and heat treatment of probiotic dry-fermented sausages and investigation of the microbial dynamics. **Meat Science**, Patras, v. 96, n. 2, p. 948-955, 2014.

VITOLA, H. R. S. **Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja**. 2017. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

WOOD, P. J. Cereal β -glucans in diet and health. **Journal of Cereal Science**, Ontario, v. 46, n. 1, p. 230-238, 2007.