

INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO E DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO NA VIABILIDADE DE *Lactobacillus casei* CSL3 IMOBILIZADO EM AVEIA

CAMILA WASCHBURGER AMES¹; KAMILA FURTADO DA CUNHA²; CLAUDIO EDUARDO DOS SANTOS CRUXEN²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA²; ÂNGELA MARIA FIORENTINI³

¹Universidade Federal de Pelotas – camilaames@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – kamilafurtado1@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cbrcruzen@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Para assim serem caracterizados, devem atender aos requisitos básicos como, resistir às condições do trato gastrointestinal e possuir capacidade de adesão e colonização às células intestinais (MARKOWIAK & SLIZEWSKA, 2017). Já do ponto de vista tecnológico, a adição de bactérias probióticas apresenta desafios, pois vários fatores podem afetar a viabilidade desses micro-organismos, como valores baixos de pH e temperatura de armazenamento (COOK et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

Em virtude desse problema, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, a fim de propor uma alternativa por meio da imobilização celular. Essa técnica consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas, possibilitando a reutilização das mesmas (KRASŃAN, STLOUKAL, ROSENBERG, REBROS, 2016).

Segundo CHARALAMPOPOULOS et al. (2002), cereais podem aumentar as taxas de sobrevivência e a estabilidade dos probióticos durante o processamento e armazenamento, especialmente quando as células são usadas em um estado imobilizado. A aveia (*Avena sativa* L.) se destaca pela sua elevada qualidade proteica, componentes com propriedades antioxidantes e alta proporção de fibras alimentares, destacando-se as β -glucanas (CRESTANI et al., 2010; DAOU; ZHANG, 2012;).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a influência do processo de liofilização e de diferentes temperaturas na viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 imobilizado em aveia.

2. METODOLOGIA

A bactéria *Lactobacillus casei* CSL3, foi isolada de silagem de colostro bovino e caracterizada em estudos anteriores por VITOLA et al. (2018). Para a imobilização do isolado *L. casei* CSL3, seguiu-se a metodologia proposta por BOSNEA et al. (2009), com adaptações. A imobilização foi realizada adicionando 2,4 g (peso úmido) das células de *L. casei* CSL3, 300 g de flocos de aveia em 600 mL de caldo MRS, sendo essa mistura incubada a 37 °C durante 48 h. A solução fermentada foi decantada e o biocatalisador (flocos de aveia mais bactéria) foi lavado três vezes com PBS, com a finalidade de remoção de células livres.

Parte do biocatalisador foi liofilizado para compreender se o processo de liofilização é capaz de adicionar melhor capacidade de manter a viabilidade das

células, durante o armazenamento refrigerado. Os tratamentos com *L. casei* CSL3 imobilizado e, *L. casei* CSL3 imobilizado e liofilizado foram armazenados a 4° e a - 18°C. A contagem das células ao longo do tempo foi realizada com dez gramas de cada biocatalisador diluídos em 90 mL de água peptonada 0,1% (AP 0,1%, Acumedia®, Brasil), submetidas a diluições decimais seriadas, semeadas em ágar MRS (Acumedia®, Brasil) e incubadas a 37 °C por 48 h, em condições de anaerobiose. As contagens (UFC.g⁻¹) foram realizadas nos tempos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de armazenamento.

Após, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e, no caso de diferença significativa, os fatores de tratamentos qualitativos foram comparados pelo teste T. O efeito do tempo foi avaliado pelo intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fatores de tratamento apresentaram interação significativa ($p < 0,05$). As comparações das variáveis qualitativas podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 (UFC.g⁻¹) imobilizado em aveia, liofilizado e não liofilizado e em diferentes temperaturas de armazenamento

Tempo (dias)	Imobilizado		Imobilizado/liofilizado	
	- 18 °C	4 °C	- 18°C	4 °C
0	7,94 ± 0,46 aA	7,77 ± 0,32 aA	7,40 ± 0,31 aA	7,46 ± 0,22 aA
3	7,51 ± 0,43 aA	8,06 ± 0,33 aA	6,87 ± 0,15 bA	7,26 ± 0,41 bA
7	7,49 ± 0,34 aA	7,76 ± 0,12 aA	7,34 ± 0,32 aA	7,65 ± 0,14 aA
15	7,48 ± 0,25 aA	8,00 ± 0,16 aA	7,02 ± 0,54 aA	7,06 ± 0,43 bA
30	7,19 ± 0,23 aA	7,54 ± 0,49 aA	7,20 ± 0,31 aA	7,04 ± 0,32 aA
60	5,92 ± 0,48 bB	6,88 ± 0,23 aA	7,28 ± 0,37 aA	6,94 ± 0,66 aA
C.V. (%)	4,96			

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T ($p \leq 0,05$) na comparação das diferentes formas de imobilização. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T ($p \leq 0,05$) entre as temperaturas, fixando os fatores de tratamento forma de imobilização e tempo.

Pode-se verificar na comparação entre o imobilizado liofilizado ou não liofilizado a - 18 °C, houve diferença no tempo 3 e no tempo 60 dias, sendo verificado nesse último tempo uma maior contagem para as células imobilizadas/liofilizadas. Já no armazenamento a 4°C houve diferença nos tempos 3 e 15 dias, sendo verificado em ambos os casos maiores contagens para as células apenas imobilizadas.

A comparação entre as diferentes temperaturas para as células imobilizadas demonstrou diferença apenas em 60 dias, sendo observado maiores contagens a 4°C. Já as diferentes temperaturas aplicadas nas células imobilizadas/liofilizadas não apresentaram diferença.

A comparação ao longo do tempo para cada tratamento foi realizada por intervalo de confiança (IC_{0,05} = 0,72), demonstrando que o único tratamento que

reduziu as contagens na comparação entre o tempo inicial e 60 dias foi as células imobilizadas a - 18 °C.

Com base nos resultados se pode compreender que para armazenar as células imobilizadas a - 18 °C deve-se optar pelo processo de liofilização para uma maior viabilidade. A imobilização com estocagem a 4 °C se mostrou muito interessante, pois dispensaria a etapa de liofilização e o emprego de temperaturas de congelamento, as quais elevam os custos de obtenção do processo.

As células imobilizadas combinam-se com compostos dos biocatalisadores (proteínas, polissacarídeos), produzindo um material viscoso e elástico (biofilme). Os micro-organismos sofrem alterações diversas durante o processo de imobilização, portanto o biofilme protege os micro-organismos das condições ambientais variáveis e assim, as células imobilizadas apresentam maior produtividade, maior tolerância a condições adversas e maior resistência aos inibidores (BOSNEA et al., 2016).

4. CONCLUSÕES

Os flocos de aveia demonstraram ser bons suportes para imobilização de CSL3. A liofilização das células imobilizadas não influenciou na viabilidade celular quando armazenadas a 4 °C, porém se faz necessária quando o armazenamento ocorrer a - 18 °C.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSNEA, L.A., 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**, 42, 1696-1702, 2009.

BOSNEA, L.A., KOPSAHELIS, N., KOKKALI, V., TERPOU, A., & KANELAKI, M. Production of a novel probiotic yogurt by incorporation of *L. casei* enriched fresh apple pieces, dried raisins and wheat grains. **Food and Bioproducts Processing**, 102, 62-71, 2016.

CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review, **International Journal of Food Microbiology** 79(1-2), 131-141, 2002.

CRESTANI, M., CARVALHO, F.I.F., OLIVEIRA, A.C., SILVA, J.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**, 45(3), 261-268, 2010.

COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.162, p.56-67, 2012.

DAOU, C., & ZHANG, H. Oat Beta-Glucan: Its role in health promotion and prevention of diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 11(4), 355-365, 2012.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions,

tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.186-193, 2012.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint **FAO/WHO Expert Consultation**, Córdoba, Argentina, 2001.

KRASŇAN, V., STLOUKAL, R., ROSENBERG, M., & REBROS, M. Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, nº 6, p.2535–2553, 2016.

KOURKOUTAS, Y., XOLIAS, V., KALLIS, M., BEZIRTZOGLU, E., & KANELAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, 40(1), 411-416, 2005.

MARKOWIAK, P., & SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. **Nutrients**, 9(9), 1021, 2017.

TRIPATHI, M.K., & GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, 9, 225–241, 2014.

VITOLA, H.R.S., DANNENBERG, G.S., MARQUES, J.L., LOPES, G.V., SILVA, W.P. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process Biochemistry**, 73, 1-7, 2018.