

Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

***Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte**

Camila Waschburger Ames

Pelotas, 2019

Camila Waschburger Ames

***Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111l Ames, Camila Waschburger

Lactobacillus casei CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte / Camila Waschburger Ames ; Angela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2019.

67 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Alimento funcional. 2. Bactéria ácido-lática. 3. Biocatalisador. 4. Leite fermentado. I. Fiorentini, Angela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 664

Camila Waschburger Ames

***Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte**

Dissertação de mestrado aprovada, como requisito final para obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28 de fevereiro de 2019.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Fiorentini (orientadora), Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Guilherme da Silva Dannenberg, Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a. Juliana de Lima Marques, Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a. Louise Haubert, Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico aos meus pais, Elton e Marise, e a minha
irmã Betina, pelo apoio e amor incondicional.**

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida e saúde, e por saber que Ele escreve certo por linhas tortas.

Aos meus amados pais, que sempre me incentivaram e sempre deixaram seus sonhos de lado, para realizar os nossos. Muito obrigada por todo apoio, incentivo e amor dedicados a mim. Por saber que sempre tenho um lugar para voltar, onde vou me sentir segura e amada. Por tantos 'falta pouco...', sou imensamente grata por ter vocês.

A minha irmã Betina, por toda a amizade, paciência e palavras de incentivo. Por saber que eu posso sempre contar, em qualquer lugar e momento.

A Prof.^a Vera Klajn, o anjo que Deus colocou no meu caminho, muito obrigada por ter acreditado em mim e ter aberto os caminhos da vida acadêmica.

A minha orientadora Ângela Maria Fiorentini, por me receber de braços abertos na UFPel, pela oportunidade e confiança, ensinamentos e orientação.

Ao meu co-orientador Wladimir Padilha da Silva, por todos os ensinamentos e apoio demonstrados.

Aos colegas da Planta de Processamento de Produtos de Origem Animal e do Laboratório de Microbiologia: Carla Kreutz, Claudio, Elisa, Guilherme, Helena, Juliana, Kamila e Pedro; Andreia, Carla Sehn, Darla, Greice, Isabela, Itiane, Letícia, Louise, Mariana, Natalie, Tassiana, que me receberam com todo o carinho, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados.

A minha dupla, Kamila com K, por toda ajuda durante esses dois anos, por todo carinho, amizade e cumplicidade. Por sempre me incentivar e estar presente nos momentos difíceis. Sou muito grata por você ter feito parte desse momento.

A Tassiana, por toda ajuda nos momentos de 'desespero', principalmente por sempre estar disposta a ajudar, independente a hora. A Isabela, por sempre me salvar dos 'perrengues' da vida e todo carinho. E a Juliana, por sempre ouvir meus áudios gigantescos, seja de desespero ou histórias do dia-a-dia, e por compartilhar das minhas aflições e alegrias.

Muito obrigada!

“O problema do mundo é que tolos e fanáticos estão sempre cheios de convicção, enquanto os sábios estão sempre cheios de dúvidas. ”

Bertrand Russel

Resumo

AMES, Camila Waschburger. ***Lactobacillus casei* CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte.** 2019. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O grande interesse e consumo de alimentos contendo probióticos, deve-se aos benefícios obtidos à saúde, que podem ser facilmente fornecidos ao consumidor por incorporação em produtos lácteos, como o iogurte. Para aumentar a viabilidade, atividade e a funcionalidade celular de probióticos no produto, técnicas de imobilização celular vem sendo utilizadas, através de diferentes tipos de biocatalisadores. A utilização de cereais como suportes para imobilização vem aumentando, com isso destaca-se a aveia (*Avena sativa* L.) pela sua alta proporção de fibras e compostos antioxidantes, tornando-a um potencial biocatalisador. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar *Lactobacillus casei* CSL3, quanto a viabilidade de imobilização celular em aveia e como cultura probiótica na produção de iogurte. Para isso, imobilizou-se *L. casei* CSL3 utilizando flocos de aveia como suporte e realizou-se microscopia eletrônica de varredura do biocatalisador. A viabilidade do biocatalisador e do biocatalisador liofilizado foi analisada através da contagem de células viáveis nos tempos 0, 3, 7, 15, 30 e 60 dias de armazenamento a 4 °C e -18 °C. A elaboração do iogurte consistiu de leite integral UHT, sacarose, culturas iniciadoras e *L. casei* imobilizado em aveia (YCLI). Foram realizadas análises de pH, acidez titulável e viabilidade do probiótico nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25, simulação *in vitro* do trato gastrointestinal (TGI), qualidade microbiológica, caracterização química e avaliação sensorial do produto. O biocatalisador armazenado a 4°C demonstrou melhor viabilidade durante os 60 dias de armazenamento. O iogurte produzido apresentou decréscimo do pH ao longo do tempo assim como o aumento da acidez durante o armazenamento do produto. O iogurte YCLI manteve sua viabilidade ($8,78 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) durante o período de armazenamento refrigerado a 4 °C por 25 dias. *L. casei* CSL3 e o iogurte YCLI foram tolerantes a passagem pelo TGI. Os flocos de aveia demostraram ser bons suportes para imobilização celular, sendo que o produto probiótico foi aceito sensorialmente, indicando potencial de comercialização. Portanto, *L. casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia, possui alto potencial como cultura probiótica na produção de iogurte.

Palavras-chave: alimento funcional; bactéria ácido-lática; biocatalisador; leite fermentado

Abstract

Ames, Camila Waschburger. ***Lactobacillus casei* CSL3: cellular immobilization in oats and application as probiotic culture in the production of yogurt.** 2019. 67f. Dissertation (Master Degree in Food Science and Technology) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

The great interest in the consumption of food containing probiotics is due to the health benefits that can easily be provided to the consumer by incorporation into dairy products such as yogurt. To increase the viability, activity and cellular functionality of probiotics in the product, cell immobilization techniques have been used, through different types of biocatalysts. The use of cereals as supports for immobilization is increasing, with oats (*Avena sativa* L.) being highlighted due to its high proportion of fibers and antioxidant compounds, making it a potential biocatalyst. Therefore, the present study aimed to evaluate *Lactobacillus casei* CSL3, regarding the feasibility of cellular immobilization in oats and as a probiotic culture in the production of yogurt. For this, *L. casei* CSL3 was immobilized using oat flakes as support and scanning electron microscopy of the biocatalyst was performed. The viability of the biocatalyst and lyophilized biocatalyst was analyzed by counting viable cells at times 0, 3, 7, 15, 30 and 60 days of storage at 4 °C and -18 °C. The yogurt elaboration consisted of UHT whole milk, sucrose, starter cultures and *L. casei* immobilized in oats (YCLI). Analyzes of pH, titratable acidity and probiotic viability at 0, 5, 10, 15, 20 and 25 times, in vitro simulation of the gastrointestinal tract (GIT), microbiological quality, chemical characterization and sensorial evaluation of the product were performed. The biocatalyst stored at 4 °C demonstrated better viability during the 60 days of storage. The yogurt produced showed a decrease in pH over time as well as an increase in acidity during storage of the product. YCLI yogurt maintained its viability (8.78 log CFU.g⁻¹) during the refrigerated storage period at 4 °C for 25 days. *L. casei* CSL3 and YCLI yogurt were tolerant to GIT passage. The oat flakes proved to be good supports for cellular immobilization, and the probiotic product was sensorially accepted, indicating potential commercialization. Therefore, *L. casei* CSL3 immobilized on oat flakes, has high potential as a probiotic culture in the production of yogurt.

Key-words: biocatalyst; fermented milk; functional food; lactic acid bacteria

Lista de Figuras

Figura 1	Diferentes métodos de imobilização celular de micro-organismos.....	21
Figura 2	Viabilidade de <i>L. casei</i> CSL3 em diferentes condições de imobilização e de temperatura de estocagem.....	39
Figura 3	Microscopia eletrônica de varredura após liofilização do <i>L. casei</i> CSL3 imobilizado em flocos de aveia.....	41
Figura 4	Acidez (A) e pH (B) de iogurte com adição de probiótico imobilizado e livre estocada a temperatura de 4 °C.....	42
Figura 5	Viabilidade de <i>L. casei</i> livre e imobilizado em iogurte, estocada a temperatura de 4 °C.....	44
Figura 6	Análise sensorial de iogurte com adição de <i>L. casei</i> CSL3 imobilizado em aveia armazenado a 4 °C.....	50

Lista de Tabelas

Tabela 1	Viabilidade de <i>L. casei</i> em diferentes formas de imobilização e em diferentes temperaturas de armazenamento refrigerado.....	38
Tabela 2	Simulação do trânsito gastrointestinal <i>in vitro</i> de <i>L. casei</i> CSL3 livre em caldo MRS e iogurte <i>L. casei</i> CSL3 imobilizado.....	46
Tabela 3	Caracterização de iogurte com adição de <i>L. casei</i> CSL3 (YCLI) imobilizado refrigerado a 4 °C.....	58

Sumário

1	Introdução.....	13
1.1	Objetivos.....	15
1.1.1	Objetivo geral.....	15
1.1.2	Objetivos específicos.....	15
2	Revisão bibliográfica.....	16
2.1	Bactérias ácido-láticas.....	16
2.1.1	Probióticos.....	17
2.1.2	<i>Lactobacillus</i> spp.....	18
2.2	Imobilização celular.....	19
2.2.1	Suportes sólidos para imobilização em superfície.....	22
2.3	Leites fermentados – iogurte.....	23
3	Manuscrito: <i>Lactobacillus casei</i> CSL3: imobilização em suporte de aveia e aplicação como cultura probiótica em iogurte.....	26
4	Considerações finais.....	59
	Referências.....	60

1 Introdução

O interesse pelo desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais, contendo micro-organismos probióticos combinados com ingredientes prebióticos, demonstram um grande potencial na promoção da saúde humana e, podem ser facilmente fornecidos ao consumidor por incorporação em produtos lácteos, como o iogurte (AKIN; OZCAN, 2017; FULLER; GIBSON 1998). O iogurte é produzido a partir da fermentação do leite pela ação sinérgica das bactérias ácido-láticas (BAL), como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (SCHOINA et al., 2014), que poderão associar-se com culturas adjuntas com potencial probiótico.

São denominados probióticos os micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas beneficiam a saúde dos consumidores, influenciando positivamente no equilíbrio microbiano intestinal (FAO/WHO, 2001). Além deste, outros benefícios são atribuídos às culturas probióticas como redução dos níveis de colesterol; aumento dos níveis de anticorpos; bloqueio da adesão de bactérias patogênicas nos tecidos epiteliais; tratamento para doenças inflamatórias do intestino, como síndrome do cólon irritado; redução de constipação e desconforto intestinal; controle de infecções orais, entre outros (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Para que esses benefícios à saúde sejam obtidos, o produto probiótico deve apresentar um número de micro-organismos viáveis de, no mínimo, 10^6 a 10^7 UFC.mL⁻¹ ou g⁻¹ de alimento, até o momento do consumo (FAO/WHO, 2002). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza ainda que a ingestão dessa dose de probióticos seja diária, para a obtenção máxima dos efeitos benéficos desses micro-organismos (BRASIL, 2008).

No entanto, a incorporação de bactérias probióticas em uma matriz alimentar apresenta desafios, não só por causa de suas interações com outros constituintes, mas também devido as condições adversas (como pH, altas concentrações de sais e altas temperaturas) frequentemente empregadas durante o processamento e armazenamento de alimentos, o que pode levar à redução na viabilidade do micro-organismo. Para superar estas condições, as técnicas de imobilização são geralmente aplicadas para manter a viabilidade, atividade e funcionalidade celular

(KOURKOUTAS et al., 2005; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; SIDIRA et al., 2013).

A imobilização celular (IC) consiste no confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas (FREEMAN; LILLY, 1998; KRASŇAN et al., 2016). Embora a maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utilizem células livres em suspensão, o uso de micro-organismos imobilizados, em determinado suporte, permitirá um aumento da produtividade, devido à elevada concentração celular (BOSNEA et al., 2009; KRISHNAN et al., 2001).

Na definição do material de suporte para imobilização celular, é interessante que o mesmo se caracterize como um prebiótico. O uso combinado de probióticos e prebióticos (simbióticos) em produtos alimentares tem se tornado, cada vez mais, aplicável dentre os alimentos funcionais. Além disso, os prebióticos auxiliam na melhoria da viabilidade dos micro-organismos probióticos, atuando como fonte de nutrientes e protetores contra as ações mecânicas, as quais os probióticos possam ser submetidos.

Diferentes tipos de materiais utilizados como suporte na imobilização celular foram relatados, como bagaço de cana de açúcar (DOMÍNGUEZ et al., 2001), pedaços de maçã e pera (KOURKOUTAS et al., 2001; 2006), grãos de cevada (ALMEIDA et al., 2003), grãos de trigo (BOSNEA et al., 2009; SIDIRA et al., 2014), proteína de soro de leite (SIDIRA et al., 2017) e grãos de soja (VITOLA et al., 2018).

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;). Por ser um cereal consumido, com determinada frequência, pela população, flocos de aveia mostram-se bons candidatos a suportes para a imobilização celular e aplicação em iogurte.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar *Lactobacillus casei* CSL3, quanto a viabilidade de imobilização celular em aveia e como cultura probiótica na produção de iogurte.

1.1.2 Objetivos específicos

- Imobilizar *L. casei* CSL3 em flocos de aveia;
- Avaliar a imobilização celular de *L. casei* CSL3 em aveia através de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliar a viabilidade da bactéria probiótica imobilizada em aveia;
- Desenvolver iogurte probiótico adicionado de *L. casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia;
- Avaliar a capacidade de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia tolerar o trânsito gastrointestinal simulado quando adicionado em iogurte;
- Avaliar a viabilidade da bactéria probiótica imobilizada em aveia em iogurte;
- Determinar as características do produto probiótico elaborado;
- Avaliar a aceitação sensorial e intenção de compra do iogurte probiótico.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Bactérias ácido-láticas

Bactérias ácido-láticas (BAL) compreendem um grupo de micro-organismos que apresentam morfologia em forma de cocos ou bacilos, Gram-positiva, não esporulados, anaeróbios facultativos e catalase negativa (AXELSSON, 1998). Essas bactérias são caracterizadas principalmente pela produção de ácido lático a partir de carboidratos, apresentando características metabólicas e fisiológicas semelhantes (FUGELSANG et al., 2007), bem como são tolerantes a diferentes condições em que são submetidas, como altas concentrações de sal, amplas faixas de pH e temperatura (AXELSSON, 2004).

Os principais gêneros pertencentes ao grupo de BAL são *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Bifidobacterium*, *Microbacterium* e *Propionibacterium* (HOLZAPFEL et al., 2001). Essas bactérias podem ser encontradas no solo, água, silagem, além de serem isoladas da cavidade oral, do trato gastrointestinal e genital, onde podem afetar benéficamente a microbiota de seres humanos e animais (MAKAROVA; KOONIN, 2007).

Em alimentos, podem estar presentes como microbiota nativa ou aplicadas como responsáveis em processos fermentativos. A aplicação de BAL como culturas iniciadoras em alimentos, aumentam o período de conservação, provocando a degradação dos carboidratos presentes na matéria-prima, o que conseqüentemente, causa redução do pH, tornando o meio inviável para a multiplicação de diversas bactérias deteriorantes e patogênicas (MADEIRA et al., 2003). A atividade antagonista promovida pelas BAL se dá devido à produção de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos, dióxido de carbono, diacetil, peróxido de hidrogênio e/ou bacteriocinas (CASTELLANO et al., 2008).

Ainda, podem apresentar propriedades que conferem benefícios à saúde, quando ingeridas vivas e em quantidades adequadas, sendo caracterizadas como bactérias probióticas, as quais vêm sendo estudadas na aplicação de alimentos, os quais recebem a denominação de alimentos funcionais (DORELLA et al., 2003; SOCCOL et al., 2010).

2.1.1 Probióticos

Entre as espécies de BAL, algumas destacam-se por apresentarem características probióticas. Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Para ser considerado probiótico, o micro-organismo deve ser identificado por métodos fenotípicos e genotípicos, ser seguro e caracterizado funcionalmente por estudos *in vitro* e *in vivo*, além de ter sua eficácia comprovada em humanos por estudos randomizados duplo-cego, controlados por placebo (FAO/WHO, 2002).

Aspectos de segurança incluem especificações da bactéria como sua origem e não apresentar patogenicidade. Outro aspecto importante de segurança é a resistência a antimicrobianos de uso clínico, pois probióticos não devem ser capazes de transferir essa resistência a outras bactérias da microbiota comensal ou oportunistas em humanos (DEL PIANO et al., 2006).

Com relação as características funcionais, as bactérias probióticas necessitam atender a um amplo espectro de requisitos, como persistência e viabilidade no trato gastrointestinal (TGI), que se inicia com a sobrevivência à ação do pH e das enzimas salivares (MATTILA-SANDHOLM, 1998; MATTILA-SANDHOLM, 2002, SAAD, 2006), as condições ácidas do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino, e, ainda, multiplicar-se e aderir no hospedeiro (COOK et al., 2012; MARTÍN et al., 2015).

O modo de ação dos probióticos não foi ainda completamente elucidado, embora já tenham sido relatados vários processos como a modificação do pH intestinal, a produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos, nutrientes e fatores de crescimento, modulação da resposta imune e produção de lactase (MARKOWIAK; SLIZEWSKA, 2017; PARVEZ et al., 2006).

Entre os benefícios conferidos aos probióticos, destacam-se: redução dos níveis de colesterol, aumento dos níveis de anticorpos, bloqueio da adesão de bactérias patogênicas ao epitélio intestinal, prevenção e alívio dos sintomas de doenças inflamatórias e do câncer intestinal, redução dos sintomas da intolerância à lactose, entre outros. Esses efeitos benéficos estão relacionados a um ou mais mecanismos, como modulação da microbiota intestinal, modulação da resposta imune e competição por nutrientes (GOLDIN, 1998; FRANCO et al., 2006; SHORI, 2016).

A recomendação de ingestão de probióticos é com base na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de $10^6 - 10^7$ UFC.g⁻¹ do produto (FAO/WHO, 2002; 2006). No Brasil, a legislação recomenda $10^8 - 10^9$ UFC/porção diária, correspondendo 100 g do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008).

No entanto, diversos problemas são relatados com relação a baixa viabilidade das bactérias probióticas presentes nos alimentos, pois vários fatores podem afetar a sobrevivência desses micro-organismos, como: valores baixos de pH, peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, interação com outros micro-organismos contidos no produto, concentração de ácido lático e acético e a concentração de proteínas (COOK et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

Portanto, a pesquisa de isolados provenientes de alimentos está relacionada com a diversidade dos micro-organismos probióticos e seus metabólitos, culminando com a seleção de micro-organismos capazes de permanecerem viáveis em matrizes alimentícias, durante o período de armazenamento (SHORI, 2016).

2.1.2 *Lactobacillus* spp.

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são Gram-positivos, microaerófilos, catalase negativa, não esporulados, não apresentam motilidade e fermentam carboidratos, produzindo como principal produto, ácido lático (KANDLER; WEISS, 1986). Apresentam faixa de temperatura ótima de 35 a 40 °C, pH ótimo para o desenvolvimento situa-se na faixa de 5,5 a 6,0 e são capazes de tolerar ambientes ácidos de 0,3% a 1,9% de acidez titulável (GOKTEPE et al., 2006; GOMES; MALCATA, 1999).

Este gênero é o mais diversificado do grupo de BAL, amplamente utilizado devido a sua importância para a saúde e aplicação em alimentos (COUSIN et al., 2015). *Lactobacillus* spp. apresentam *status* GRAS (grau-alimento) e são comumente utilizados como culturas iniciadoras em alimentos fermentados (AYENI et al., 2011).

Entre as bactérias probióticas, *Lactobacillus casei* é a mais utilizada na produção de leites fermentados, e de outros alimentos lácteos, devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no TGI após sua ingestão, garantindo efeito benéfico ao consumidor (HUNGRIA & LONGO, 2009). Além disso, esses micro-organismos podem também conferir aroma, sabor e textura aos alimentos, bem como contribuir na bioconservação dos mesmos (BURITI; SAAD, 2007; SIDIRA et al., 2014; VÁSQUEZ et al., 2006).

Kourkoutas et al. (2005), avaliaram a viabilidade de *L. casei* imobilizado em pedaços de frutas, e o uso do biocatalisador na produção de ácido láctico. Bosnea et al. (2009), avaliaram a viabilidade e a atividade fermentativa de células de *L. casei* ATCC 393 imobilizadas em grãos de trigo, bem como o efeito de crioprotetores durante a liofilização do biocatalisador. Dimitrellou et al. (2014), avaliaram o uso de *L. casei* ATCC 393 livre e imobilizado em proteína de soro como cultura iniciadora na produção de queijo tipo Feta probiótico. Vitola et al. (2018), avaliaram grão de soja como novo suporte para a imobilização de *L. casei* CSL3, além da viabilidade do biocatalisador durante o armazenamento em temperatura de refrigeração.

2.2 Imobilização celular

A imobilização celular (IC) consiste no confinamento físico ou químico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua, possibilitando a reutilização das mesmas. A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de micro-organismos imobilizados permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração de células (COVIZZI et al., 2007; FREEMAN; LILLY, 1998).

A IC pode ser empregada tanto na produção de metabólitos de interesse, a partir do cultivo de micro-organismos, quanto no uso deles como biocatalisadores,

em processos *in situ* (JUNTER; JOUENNE, 2004). A tecnologia de imobilização é efetiva no aumento da densidade celular, proteção do micro-organismo imobilizado durante o armazenamento e processamento, evita a resistência à contaminação, além de manter a estabilidade química e física das células (TRABELSI et al., 2014). Como exemplos, podem ser citados a biodegradação de compostos xenobióticos e processos de biotransformação. A característica fundamental das células imobilizadas para o uso nestes processos é a sua alta resistência à exposição a compostos tóxicos e ambientes hostis (JUNTER; JOUENNE, 2004).

De acordo com Kosseva (2011), apesar das vantagens da imobilização celular, o comportamento das células pode mudar (como sua fisiologia, morfologia, mobilidade), gerando alterações na sua atividade. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, sendo os principais o efeito estérico ou conformacional, devido às interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o suporte e o meio, o efeito difusional, onde há resistência para a movimentação do substrato até este chegar à célula, e a resistência para o produto chegar da célula até o meio.

As técnicas de imobilização podem ser classificadas em naturais (formação de biofilmes e adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais) e artificiais (encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes) (PILKINGTON, 1998) (Figura 1).

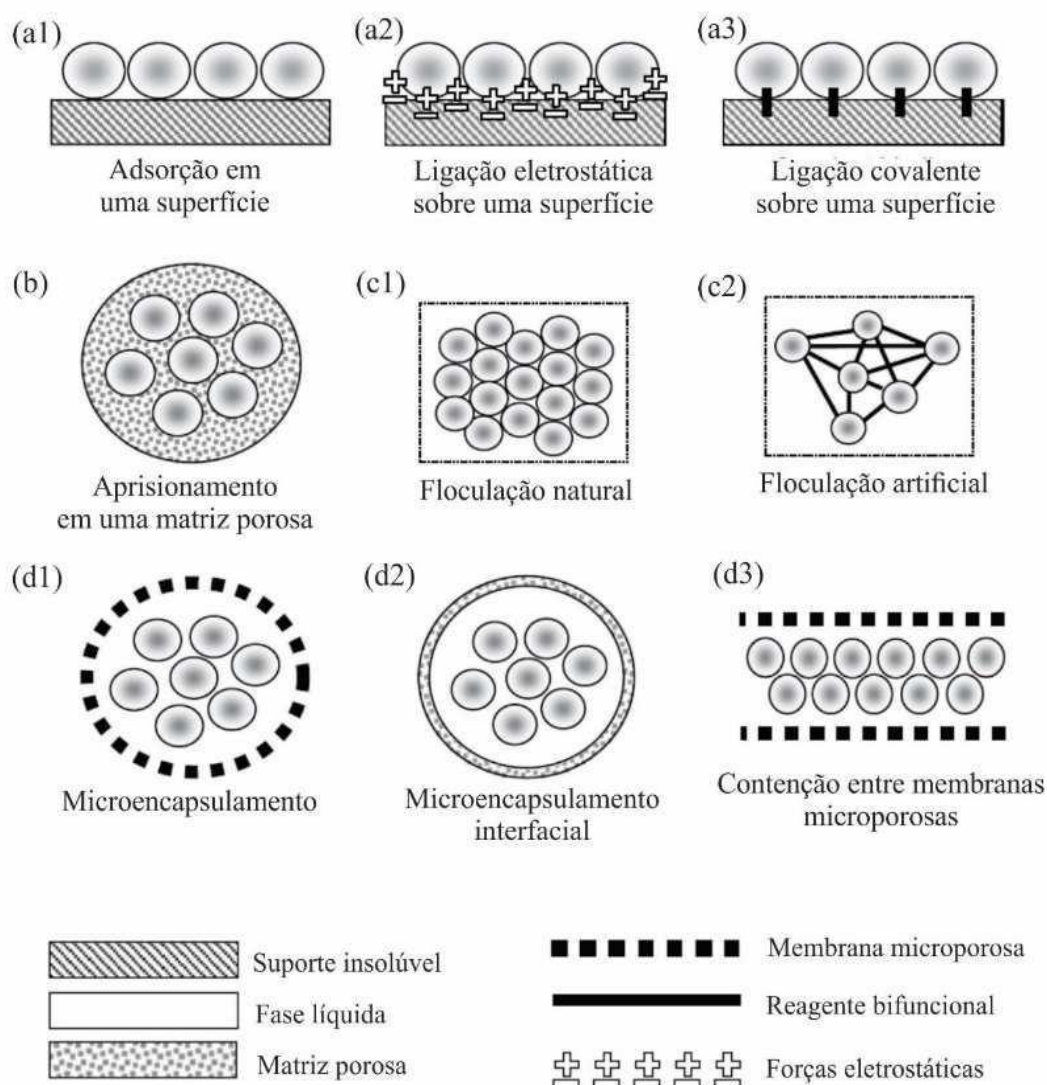


Figura 1. Diferentes métodos de imobilização celular: (a) imobilização em superfície; (b) aprisionamento em matriz porosa; (c) floculação natural (auto-agregação) e floculação artificial; (d) encapsulação.

Fonte: Adaptado de Kourkoutas et al. (2004).

A técnica de imobilização por fixação em suporte sólido consiste na adsorção física ou ligação das células à superfície do material de suporte escolhido de forma natural ou por meio de forças eletrostáticas ou ligações covalentes com a utilização de agentes ligantes, levando a formação de um biofilme (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). A ligação por meio de adsorção e/ou interações iônicas é um método simples e barato, fácil manipulação e grande diversidade de suportes, sendo a principal desvantagem a vulnerabilidade de perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional. Para aumentar a massa de biocatalisadores imobilizados, suportes porosos têm sido utilizados, permitindo a ligação do biocatalisador também à estrutura interna (COVIZZI et al., 2007).

A imobilização por meio de ligações covalentes resulta em uma interação biocatalisador-suporte mais forte, sendo a principal desvantagem o risco de danos à membrana celular, no caso de imobilização de células (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

O método de imobilização por encapsulamento, ocorre por meio de contenção por barreiras, envolvendo a utilização de membranas pré-formadas ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas. É utilizada como uma tecnologia alternativa ao aprisionamento em matrizes porosas, por oferecer vantagens como maior capacidade de contenção de células e prevenção das mesmas para o meio de fermentação (BORZANI et al., 2001; COVIZZI et al., 2007).

O método de engaiolamento está baseado na inclusão artificial das células, que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semirrígida, que impede a difusão destas para o meio de cultivo. Este aprisionamento do micro-organismo possibilita a troca de nutrientes, metabólitos, gases durante o processo fermentativo (KRISHNAN et al., 2001).

A floculação é uma técnica em que promove a formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural ou na presença de agentes floculantes ou ligantes (COVIZZI et al., 2007; FREEMAN; LILLY, 1998).

A auto-imobilização consiste na formação de agregados celulares que afetam diretamente o metabolismo celular e a produção de metabólitos celulares, a qual é influenciada pela quantidade de inóculo, pelas forças mecânicas empregadas durante a fermentação, pelos componentes e pela tensão superficial do meio de cultivo, assim como pela presença de O₂ dissolvido (COVIZZI et al., 2007; FENG et al., 2003; ZINDARSIC; PAVKO, 2001).

2.2.1 Suportes sólidos para imobilização em superfície

Vários tipos de materiais que podem ser utilizados como suporte para imobilização, são descritos na literatura. Esses materiais devem ser encontrados facilmente e em abundância, ter baixo custo, ser de fácil operação, não ser tóxico para a célula que se pretende imobilizar e ter alta resistência mecânica. Os suportes comumente utilizados para imobilização de células microbianas são de origem

biológica como alginato, ágar, carragena entre outros ou sintéticos como é o caso da poliacrilamida e polivinil álcool (MENDES et al., 2011).

Com intuito de manter a viabilidade celular quando submetidas aos processos industriais, inúmeras pesquisas em relação ao suporte para a imobilização por adsorção para bactérias probióticas, vêm sendo realizadas ao longo dos anos. O emprego de materiais como pedaços de frutas (maçã e pera) (KOURKOUTAS et al., 2001; 2005), bagaço de cana de açúcar (DOMÍNGUEZ et al., 2001), grãos de cevada (ALMEIDA et al., 2003) grãos de trigo (BOSNEA et al., 2009; SIDIRA et al., 2014), *whey protein* (SIDIRA et al., 2017), grãos de soja (VITOLA et al., 2018) entre outros, tem-se mostrado boas alternativas.

A busca por novos materiais deve estar relacionada ao tipo de alimento que o biocatalisador será aplicado e aos hábitos alimentares do consumidor. Desta forma, um cereal muito consumido nas refeições e que agrega valor aos derivados lácteos, é a aveia. A aveia (*Avena sativa* L.) se destaca pela sua elevada qualidade proteica, conteúdo lipídico com predominância de ácidos graxos insaturados, componentes com propriedades antioxidantes, conteúdo adequado de carboidratos, e alta proporção de fibras alimentares, destacando-se as β -glucanas (CRESTANI et al., 2010; DAOU; ZHANG, 2012;). As fibras alimentares são as responsáveis pelos efeitos benéficos à saúde humana e estão presentes na aveia em valores que variam de 7,1 a 12,1%. A concentração de fibra alimentar solúvel do grão de aveia é relativamente maior quando comparada aos demais cereais (FUJITA; FIGUEROA, 2003; WOOD, 2007).

Cereais como a aveia, possivelmente estimulam o crescimento e a sobrevivência dos probióticos devidos aos seus compostos prebióticos (CHEN et al., 2006; TERPOU et al., 2017). Por ser um cereal consumido com determinada frequência pela população, flocos de aveia corroboram ser bons suportes para a imobilização e aplicação em iogurte.

2.3 Leites fermentados - iogurte

Os produtos lácteos são amplamente utilizados como carreadores de micro-organismos probióticos, o que é favorecido pela composição físico-química do leite, formando uma matriz protetora que acaba auxiliando na sobrevivência dos mesmos às condições adversas do trato gastrointestinal (KOMATSU et al., 2008; RITTER et

al., 2009). O iogurte é um produto altamente recomendado pelas suas características sensoriais e nutricionais, por ser rico em proteínas, cálcio e fósforo, conter baixo teor de gorduras e fonte de minerais como zinco e magnésio. Seu valor nutricional é superior ao do leite em conteúdo de vitaminas do complexo B, sendo mais facilmente aceito por indivíduos com intolerância à lactose (ROCHA et al., 2008).

A boa digestibilidade da lactose no iogurte é devido a estimulação da atividade da lactase da mucosa intestinal; o tempo de trânsito intestinal é reduzido para o iogurte quando comparado com o leite; e devido a ação da β -galactosidase, que aumenta a digestão da lactose e, assim, reduz os sintomas da intolerância. Estas funções são atribuídas a algumas bactérias probióticas, que produzem a enzima β -galactosidase, auxiliando na quebra da lactose no intestino, sendo capazes de aliviar os sintomas da intolerância à lactose (SAAD et al., 2013).

Conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, definido pela Instrução Normativa nº 46, entende-se por iogurte o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se realiza com cultivos simbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007).

O eficiente desenvolvimento durante o processo de fermentação do leite, para a produção de iogurte, se deve, basicamente, a capacidade simbiótica de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. A bactéria *S. thermophilus* promove o crescimento de *L. bulgaricus* removendo o oxigênio e promovendo a liberação de substâncias estimulantes como ácido fórmico, ácido pirúvico e CO₂. Por outro lado, *L. bulgaricus* também estimula o desenvolvimento de *S. thermophilus* pela liberação de determinados aminoácidos principalmente glicina e histidina, necessárias ao seu crescimento e que são provenientes da degradação das proteínas do leite (TAMINE; ROBINSON, 2000).

No entanto, nas últimas décadas, a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como promotores de bem-estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (CRUZ et al., 2017). Iogurtes

funcionais possuem grande aceitação pelo público em geral e apresentam excelente valor nutritivo, sendo considerados bons veículos para a incorporação e o consumo de probióticos (SAAD et al., 2011).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são mais frequentemente utilizadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que têm sido isoladas de todas as porções do TGI humano. O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

No Brasil, são encontrados produtos lácteos probióticos comerciais diversificados, como o leite fermentado Yakult adicionado de *L. casei shirota* (Yakult®), iogurte Activia e leite fermentado Actimel adicionados de *B. animalis* e *L. casei defensis*, respectivamente (Danone®), o iogurte Bio Fibras acrescido de *L. acidophilus* e *B. lactis* (Batavo®), e queijo Minas Frescal SanBIOS com *B. lactis* (Santa Clara®).

Devido ao aumento da demanda por alimentos funcionais, diversas pesquisas vêm sendo incentivadas para o desenvolvimento de novos produtos. Como a incorporação de probióticos em uma matriz alimentar representa um grande desafio, técnicas de imobilização celular representam uma alternativa para manter a viabilidade celular no alimento.

3 Manuscrito - *Lactobacillus casei* CSL3: imobilizada em suporte de aveia e aplicação como cultura probiótica em iogurte

Camila Waschburger Ames^a, Kamila Furtado da Cunha^a, Claudio Eduardo dos Santos Cruxen^a, Wladimir Padilha da Silva^{ab}, Ângela Maria Fiorentini^{a*}

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS, Brasil.

^bNúcleo de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS, Brasil.

*Autor correspondente: Universidade Federal de Pelotas – Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Pelotas/RS, Brasil. Tel.: +55 53 991387367. E-mail address: angefiore@gmail.com

(Manuscrito será submetido para o periódico *LWT- Food Science and Technology*).

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar *Lactobacillus casei* CSL3, quanto a viabilidade de imobilização celular em aveia e como cultura probiótica na produção de iogurte. Flocos de aveia foram utilizados como suporte na imobilização celular de *L. casei* CSL3, onde foi avaliada a viabilidade do biocatalisador armazenado a 4 °C e -18 °C durante 60 dias. Para o iogurte produzido com o biocatalisador (YCLI), foram realizadas análises físico-químicas e viabilidade celular nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25, simulação do trato gastrointestinal (TGI), qualidade microbiológica, caracterização química e aceitação sensorial do produto. Demonstrou melhor resultado o biocatalisador armazenado a 4 °C, que manteve sua viabilidade durante os 60 dias de armazenamento. *Lactobacillus casei* CSL3, imobilizado em flocos de aveia, como cultura probiótica na produção de iogurte, manteve sua viabilidade ($8,78 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) durante o período de armazenamento refrigerado a 4 °C por 25 dias. Os flocos de aveia demostraram ser bons suportes para imobilização celular e o produto probiótico foi aceito sensorialmente, indicando potencial de comercialização.

Palavras-chave: alimento funcional; biocatalisador; leite fermentado, viabilidade celular.

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 micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). Estes micro-organismos 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 micro-organismos viáveis de, no mínimo, 10^6 a 10^7 UFC.mL⁻¹ ou g⁻¹ até o momento do consumo (FAO/WHO, 2002). Dessa forma, tem sido sugerida a ingestão mínima diária de pelo menos 10^8 - 10^9 células viáveis em aproximadamente 100 g de alimento, para fornecer um efeito probiótico ao consumidor (FAO/WHO, 2006).

Do ponto de vista tecnológico, a adição de bactérias probióticas em diferentes matrizes alimentares apresenta desafios, não só devido as suas interações com outros constituintes, mas também pelas condições adversas (como variação de temperatura e pH) frequentemente empregadas durante o processamento e armazenamento dos alimentos, o que pode levar a perdas na viabilidade do micro-organismo. Para superar estas condições, técnicas de imobilização vem sendo

aplicadas para auxiliar na viabilidade, atividade 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 são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas (Krasňan, Stloukal, Rosenberg, Rebros, 2016). A maioria dos processos fermentativos industriais convencionais utiliza células livres em suspensão, porém o uso de micro-organismos imobilizados, permite um aumento da produtividade devido à elevada concentração celular (Bosnea et al., 2009; Krishnan et al., 2001).

Diferentes tipos de materiais utilizados como suporte na imobilização celular foram relatados, como bagaço de cana de açúcar (Domínguez et al., 2001), pedaços de maçã e pera (Kourkoutas et al., 2001; 2006), grãos de cevada (Almeida et al., 2003), grãos de trigo (Bosnea et al., 2009; Sidira et al., 2014), proteína de soro de leite (Sidira et al., 2017) e grãos de soja (Vitola et al., 2018). Segundo Charalampopoulos et al. (2002), cereais podem aumentar a 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;). Ainda, por ser um cereal consumido amplamente pela população, flocos de aveia corroboram ser bons suportes para a imobilização celular e aplicação em iogurte.

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

2 Material e Métodos

2.1 Material

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

2.2 Bactérias

Utilizou-se o isolado *L. casei* CSL3 proveniente de silagem de colostro e, previamente caracterizado com potencial probiótico (Vitola et al., 2018), pertencente a coleção de bactérias probióticas e culturas iniciadoras do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e as culturas iniciadoras comerciais: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chr. Hansen[®]).

2.3 Desenho experimental

O experimento foi completamente casualizado arranjado em esquema trifatorial 2x2x6 (tipo de imobilização, temperatura e tempo) para estudo da viabilidade do isolado *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia. Esquema bifatorial 2x3

(formulação e etapas do trato gastrointestinal). Esquema unifatorial foi utilizado para viabilidade do isolado *L. casei* CSL3 em iogurte e para análises de pH e acidez.

2.4 Imobilização

A imobilização do isolado *L. casei* CSL3 seguiu a metodologia proposta por Bosnea et al. (2009), com adaptações. O isolado foi cultivado a 37 °C durante 24 h em caldo De Man Rogosa and Sharpe (MRS, Acumedia®, Brasil), sob condições de anaerobiose. As células foram centrifugadas a 4.165 *g* durante 10 min a 4 °C, lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) e centrifugadas novamente, nas mesmas condições. Flocos de aveia foram utilizados como suportes para as células. A imobilização foi realizada através da inoculação de 300 g de flocos de aveia juntamente com 2,4 g (peso úmido) das células em 600 mL de caldo MRS, e a mistura foi incubada a 37 °C durante 48 h. A solução fermentada foi decantada e o biocatalisador foi lavado três vezes com PBS, com a finalidade de remoção de células livres. Posteriormente, o biocatalisador foi dividido em duas porções para armazenamento em diferentes temperaturas (4 °C e -18 °C) e para secagem por liofilização (Liotop, modelo L101).

2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A visualização da imobilização das células de *L. casei* CSL3 em flocos de aveia foi realizada através de MEV, utilizando o biocatalisador liofilizado e magnetizado. A leitura foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura, em modo alto e baixo vácuo, Jeol, JSM - 6610LV, com microsonda de EDS, no Centro

de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.4.2 Determinação da viabilidade de *L. casei* CSL3 com armazenamento em diferentes temperaturas

Após a imobilização, a viabilidade de *L. casei* CSL3 foi avaliado através da contagem de células viáveis dos biocatalisadores armazenados a 4 °C e -18 °C e dos biocatalisadores liofilizados armazenados nas mesmas temperaturas. Para isso, dez gramas de cada biocatalisador foram 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 (APHA, 2002).

2.5 Produção de iogurte probiótico com bactéria imobilizada

A elaboração do iogurte consistiu de 1L de leite integral ultrapasteurizado (UHT), 10% de açúcar (sacarose), culturas iniciadoras (0,1%) e *L. casei* imobilizado em aveia (35%) (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, envasado e mantido em refrigeração (4 °C) até a execução das análises. Três repetições foram realizadas para o tratamento.

2.5.1 pH e acidez

A determinação do valor de pH foi realizada em pHmetro digital AK151 - AKSO®.

Foi realizada uma titulometria para determinar a acidez do produto, utilizando-se NaOH 0,1N e fenolftaleína como indicador de viragem. Os resultados foram expressos em percentual de ácido láctico presente na amostra.

As análises foram realizadas em triplicata nos tempos 0, 5, 10, 15, 20 e 25 dias de armazenamento do iogurte.

2.5.2 Viabilidade da cultura probiótica

A determinação da viabilidade da cultura probiótica 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 da contagem de células viáveis, 10 g de amostra foram homogeneizadas em 90 mL de AP 0,1%, seguida de diluições decimais seriadas. Após, 0,1 mL da suspensão em placas de Petri contendo ágar MRS suplementado com 0,02% de Bile Bovina (Sigma-Aldrich®) foram inoculados. As placas foram colocadas sob condições anaeróbicas e incubadas durante 48 h a 37 ° C (APHA, 2002).

2.5.3 Avaliação *in vitro* da tolerância de *L. casei* CSL3 ao trato gastrointestinal (TGI) simulado

A simulação ao trato gastrointestinal (TGI) *in vitro* seguiu o método de Madureira et al. (2011), com adaptações. A passagem pelo TGI foi realizada de forma contínua a 37 °C para simular a temperatura média corporal e, para simular os movimentos peristálticos, utilizou-se agitação em *shaker*.

Foram elaborados os seguintes tratamentos: *L. casei* livre em caldo MRS (CL) e iogurte com *L. casei* imobilizado em aveia (YCLI). Foram adicionados 10 mL de amostra ao suco gástrico, o qual foi constituído por 90 mL de água destilada, pH 2,5 ajustado com HCl 1M e adicionado 5% de pepsina (Sigma®) na concentração de 3 g mL⁻¹ preparada em solução de HCl 0,1M (Synth®). Após a adição de pepsina, o pH foi monitorado novamente e a mistura foi ajustada para pH 2. O tempo de incubação para a fase gástrica foi de 90 min a 130 rpm em *shaker*. A simulação da porção intestinal inferior (duodeno) ocorreu através da adição de 12,5% de solução contendo 2 g mL⁻¹ de pancreatina (Sigma®) e de 12,5% de solução contendo 5 g mL⁻¹ de sais biliares (Sigma®). Ambas soluções foram preparadas em NaHCO₃ 0,1 M (Synth®), e ajustadas para pH 5,0. A solução foi incubada em *shaker* por 20 min a 50 rpm. A simulação da porção intestinal inferior (íleo) foi realizada pelo aumento do pH para 6,5 usando NaHCO₃ 0,1 M e a solução foi incubada em *shaker* por 90 min a 50 rpm.

Para a enumeração das células viáveis, foi removido 1g de cada tratamento ao final de cada etapa do TGI e diluições decimais seriadas foram realizadas. Para a contagem de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia foi necessário, agitação em Vortex por 1 min para liberação das células imobilizadas.

A simulação foi contínua, portanto, as contagens de células viáveis referem-se ao volume atual de cada etapa do TGI, expressando resultados subestimados. Para eliminar esse efeito foi necessário multiplicar os resultados obtidos em cada etapa do TGI por um fator de correção (FC). Para se obter o fator de correção foi necessário: (1) absoluto controle do volume das soluções que entraram em cada etapa do TGI e (2) utilização da fórmula abaixo:

$$FC = \frac{0,1}{\left(\frac{\text{Volume de amostra utilizado}}{\text{Volume final de solução}} \right)}$$

Onde FC corresponde ao fator de multiplicação e 0,1 corresponde ao valor de uma diluição decimal.

2.6 Caracterização do iogurte probiótico com *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia

A caracterização do iogurte (YCLI) ocorreu no 15º dia de armazenamento sob refrigeração, onde foram realizadas análises de gorduras, proteínas, umidade, cinzas, textura, cor, análises microbiológicas e avaliação sensorial.

2.6.1 Gordura

O percentual de gordura foi determinado através do método Gerber, conforme descrito por Atherton & Newlander (1977).

2.6.2 Umidade e cinzas

O percentual de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105 °C e o percentual de cinzas foi determinado pelo método de incineração em forno mufla a 550 °C (AOAC, 1995).

2.6.3 Proteínas e carboidratos

A análise de proteínas foi realizada através da determinação do teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl e convertido em proteína bruta pelo fator 6,38 (AOAC, 1995). Já a análise de carboidratos foi realizada por diferença (AOAC, 1995).

2.6.4 Textura e cor

A textura foi avaliada utilizando um analisador de textura (TA-XT Plus, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). As amostras foram analisadas imediatamente após a remoção do armazenamento refrigerado e adicionadas em um contêiner de extrusão de fundo padrão (50 mm de diâmetro) até 75% de sua capacidade. As amostras foram comprimidas a 30% da altura original com disco de células de extrusão posterior (A/BE) (diâmetro de 40 mm; distância de 30 mm da amostra; velocidade de 1,0 mm/s) de acordo com o *software* de expoente de textura. Parâmetros de firmeza (g), consistência (g/s) e coesividade (g) foram determinados. Na avaliação da cor as amostras foram medidas para os valores CIE L*, a*, b* usando um colorímetro (Minolta Camera Ltda, Japão).

2.6.5 Qualidade microbiológica do iogurte

Quanto ao aspecto de segurança dos produtos, foi analisado a presença de *Salmonella* spp. e a enumeração de coliformes termotolerantes, segundo APHA (2002).

2.6.6 Avaliação sensorial

Para avaliação da aceitabilidade do iogurte probiótico com *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia (YCLI), foi realizada a análise sensorial (ISO, 2014) com 100 avaliadores não treinados, através do teste de aceitação avaliando os atributos de sabor, aroma, cor, textura e aspecto global, utilizando-se uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, com variação de desgostei muitíssimo (1 ponto) a gostei muitíssimo (9 pontos). A avaliação foi realizada em cabines individuais, sob luz fluorescente, umidade relativa $68\% \pm 2$ e temperatura $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. A intenção de compra também foi avaliada, através de uma escala de 5 pontos, com variação de certamente compraria (1 ponto) para certamente não compraria (5 pontos). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da UFPel, sob registro N° 89945118.9.0000.5317.

2.7 Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-wilk e a homogeneidade da variância pelo teste de Hartley. Após, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e, no caso de diferença significativa, os

fatores de tratamentos qualitativos com dois níveis foram comparados pelo teste t ($p \leq 0,05$) e com três níveis comparados pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os esquemas unifatoriais foram demonstrados graficamente com aplicação do intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

3 Resultados e discussão

3.1 Viabilidade de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia

O esquema fatorial 2x2x6 (imobilização, temperatura e tempo) apresentou efeito significativo para interação ($p < 0,05$). As comparações das variáveis qualitativas podem ser observadas na tabela 1. A viabilidade de *L. casei* CSL3 ao longo do tempo pode ser observado na Fig 2.

Tabela 1. Viabilidade de *Lactobacillus casei* CSL3 (log UFC.g⁻¹) em diferentes formas de imobilização em aveia 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 bB
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 forma de imobilização, fixando os fatores de tratamento temperatura e tempo pelo teste T. 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. Resultados em log UFC.g⁻¹.

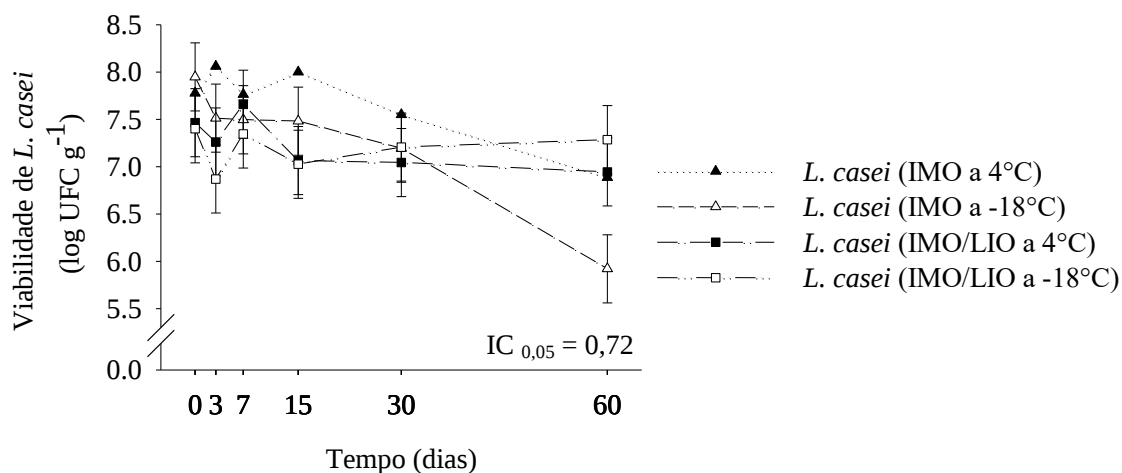


Fig 2. Viabilidade de *L. casei* CSL3 em diferentes condições de imobilização em aveia e de temperatura de estocagem. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$), entre as diferentes formas de imobilização e diferentes temperaturas de armazenamento em 0, 7, e 30 dias. No 3º dia houve diferença significativa ($p < 0,05$) na forma de imobilização, porém, não houve diferença na temperatura de armazenamento.

Pode se observar uma redução de 2,02 log UFC.g⁻¹ no biocatalisador imobilizado armazenado a -18 °C no tempo 0 (7,94log UFC.g⁻¹) para o tempo de 60 dias (5,92log UFC.g⁻¹). A temperatura de congelamento utilizada no estudo (-18 °C), reduziu a atividade metabólica da bactéria e uma redução da viabilidade do *L. casei* CSL3 imobilizado. Isso se deve ao estresse mecânico e à cristalização das

estruturas celulares dos probióticos, de forma que quanto maior o tempo de exposição às baixas temperaturas, menor será a atividade celular (Tripathi; Giri, 2014).

No 15º dia de armazenamento, houve maior contagem de células viáveis de *L. casei* CSL3 para a temperatura de 4 °C no biocatalisador imobilizado, sugerindo uma multiplicação de *L. casei* CSL3. Kourkoutas et al. (2005), observaram que não houve perda de atividade celular após promoverem sucessivas fermentações de *L. casei* imobilizado em pedaços de frutas, após longos períodos de armazenamento a 4 °C, fortalecendo a sobrevivência de *L. casei* imobilizado em biocatalisadores por longos períodos de tempo.

Além disso, bactérias imobilizadas em biocatalisadores parecem ser mais ativas do que as bactérias livres. 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). De acordo com os resultados obtidos, não se faz necessária a liofilização do biocatalisador para a aplicação em iogurte, devido ao elevado custo, acarretando em um maior valor ao produto final.

3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura permitiu observar a aderência das células de *L. casei* CSL3 em flocos de aveia. A imobilização celular de CSL3 em flocos de aveia pode ser observada na Fig 3 A, B e C.

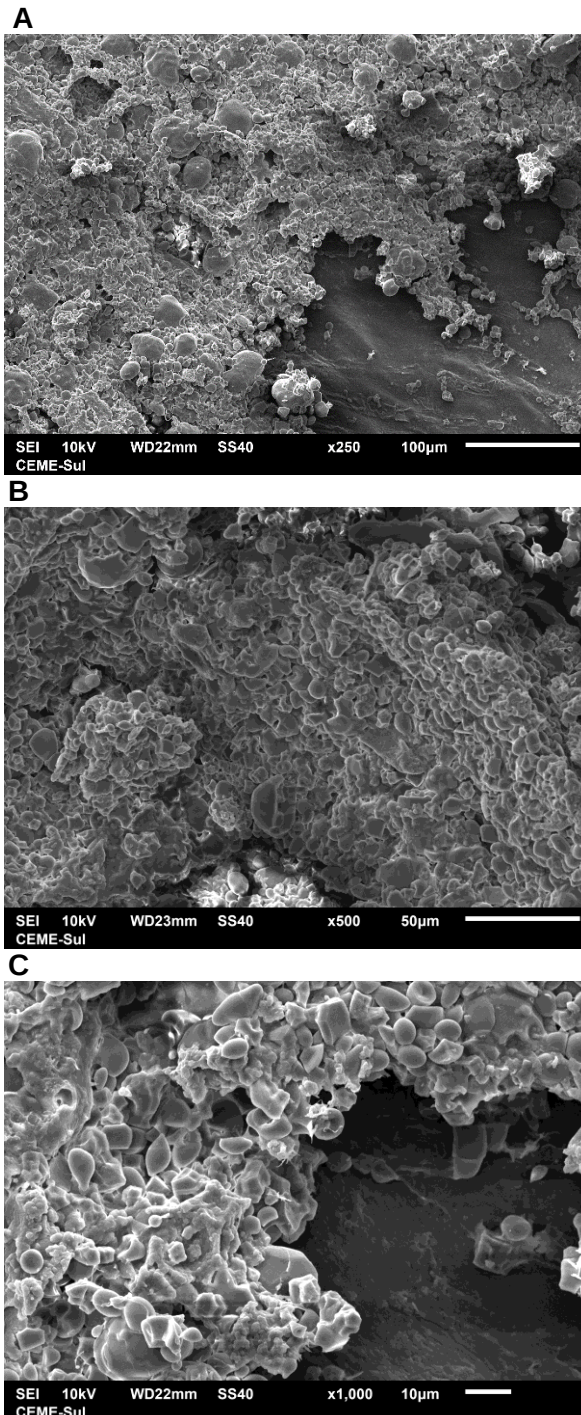


Fig 3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) após liofilização do biocatalizador: (A) *L. casei* imobilizadas na superfície da aveia (x 250); (B) *L. casei* imobilizadas na superfície da aveia (x 500); (C) *L. casei* imobilizadas na superfície da aveia (x 1.000).

Resultado semelhante foi encontrado por Terpou et al. (2016) que utilizaram bagas de espinheiro-marítimo (*Hippophae rhamnoides* L.) como suporte para a imobilização da cepa probiótica *L. casei* ATCC 393, assim como Vitola et al. (2018) que avaliaram a viabilidade celular de *L. casei* CSL3 imobilizado em grãos de soja.

3.2 Produção de iogurte probiótico

3.3.1 pH e acidez

Os valores de pH e acidez do iogurte imobilizado apresentaram efeito significativo para o tempo ($p < 0,001$). O efeito do tempo sobre acidez e pH pode ser visualizado na Fig 4 A e B.

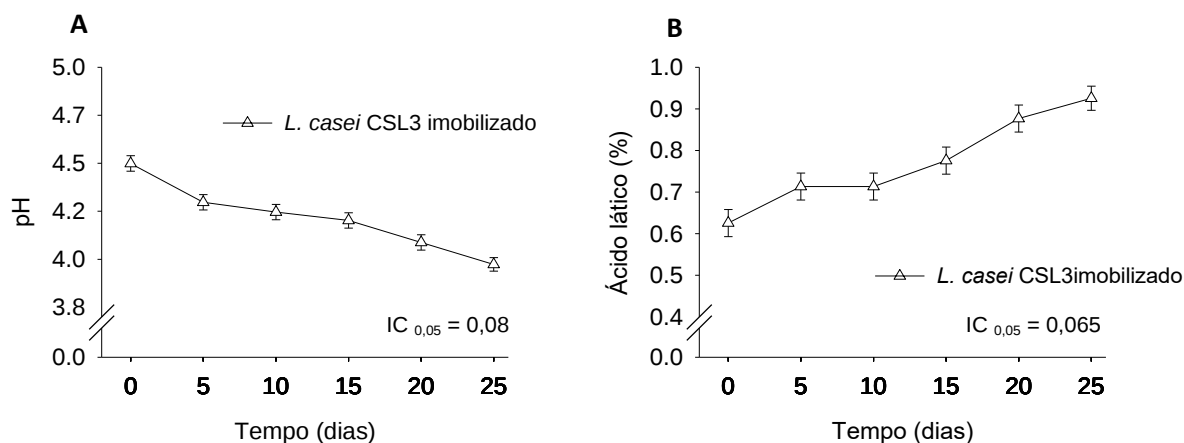


Fig 4. pH (A) e acidez (B) de iogurte com adição de probiótico *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia, armazenado a 4 °C. Barras verticais indicam o intervalo de

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 houve uma alta produção de ácido láctico ao longo do tempo de armazenamento do produto refrigerado a 4 °C. De acordo com Terpou et al. (2017), geralmente observa-se uma maior produção de ácido, tendência de menor pH, em produtos lácteos contendo culturas probióticas adjuntas em comparação com produtos lácteos comerciais. Além disso, uma maior produção de ácido durante a produção de iogurte depende da multiplicação, viabilidade e capacidade de *L. casei* CSL3 para fermentar os carboidratos presentes no meio.

Bosnea et al. (2016) avaliaram a imobilização de *L. casei* ATCC 393 em maçãs frescas, uvas passas e grãos de trigo como biocatalisadores em iogurte, bem como um iogurte com células de *L. casei* livres. Ao contrário dos resultados desse estudo, observaram valores de pH mais baixos para iogurtes com células de *L. casei* livres. Até o 15º dia de armazenamento, o iogurte com *L. casei* livre apresentou o valor de pH mais baixo (3,88), e no 30º dia de armazenamento todos os iogurtes apresentaram valores de pH semelhantes sem diferença significativa ($p < 0,05$) e variaram de 4,01 a 4,05.

3.2.2 Viabilidade da cultura probiótica em iogurte

O efeito do tempo sobre a viabilidade da bactéria probiótica imobilizada foi significativo ($p = 0,0134$) (Fig 5).

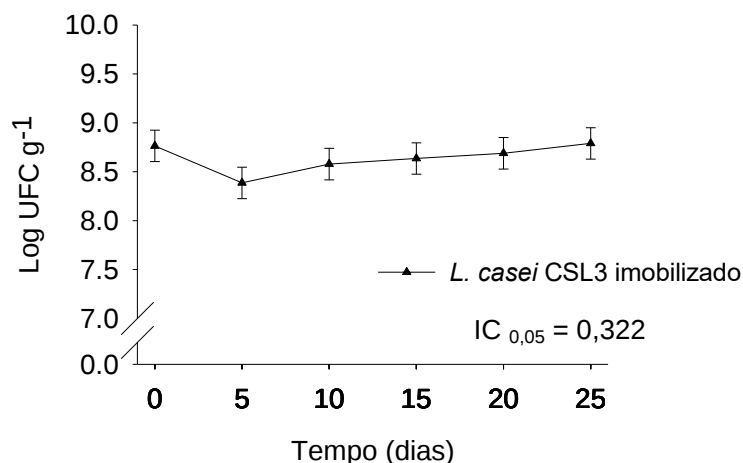


Fig 5. Viabilidade de *Lactobacillus casei* imobilizado em aveia em iogurte, armazenado a 4 °C. Barras verticais indicam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade, sendo consideradas diferenças significativas quando não houve sobreposição entre as barras verticais.

Pode se observar que no tempo 5 houve uma redução na contagem do probiótico em relação ao tempo zero. Também se verificou que a partir do 5º dia houve multiplicação do micro-organismo, pois não foram observadas diferenças significativas em relação ao tempo 0.

Durante todo o período de armazenamento, o iogurte com células probióticas imobilizadas apresentou altas taxas de sobrevivência (contagens acima de 8 log UFC.g⁻¹), mantendo-se dentro dos níveis recomendados para probióticos (acima de 7 log UFC.g⁻¹) até o 25º dia de armazenamento (FAO/WHO, 2002).

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

Quando ingeridas, grande parte das bactérias, não resistem à passagem do TGI, devido à acidez estomacal e a concentração dos sais biliares. Em vista disso, a matriz alimentícia ideal para cepas probióticas deve ter três requisitos: apresentar aspectos de segurança, garantir a viabilidade das cepas durante a vida útil do produto e proteger o probiótico durante a passagem pelo TGI, para que ele possa colonizar o cólon (Casarotti et al., 2015).

Diversas pesquisas têm demonstrado a proteção e a viabilidade de culturas probióticas durante a produção, armazenamento e passagem pelo TGI. Através da técnica de imobilização celular, as culturas podem ser significativamente protegidas em uma série de substratos, que incluem proteínas do leite a carboidratos complexos (Ross et al., 2005; Sidira et al., 2015).

Produtos lácteos são considerados sistemas ideais para a veiculação de micro-organismos probióticos, haja vista que contribuem para a manutenção da viabilidade do micro-organismo ao longo do TGI. Os probióticos apresentam diversas vantagens durante a fabricação de um produto lácteo, como auxiliar na conservação do leite por meio da produção de ácido láctico e de outros elementos antimicrobianos, desenvolver características sensoriais desejadas, aumentar os valores nutricionais do produto, além de promover propriedades benéficas ao organismo (Cruz et al., 2013).

Estudos vêm sendo descritos, evidenciando a viabilidade celular de probióticos imobilizados quando inseridos em produtos lácteos, como: pedaços de frutas na produção de queijo e leite fermentado (Kourkoutas et al., 2005; 2006), farelo de trigo na produção de leite azedo e iogurte (Terpou et al., 2016; 2017), pedaços de maçã fresca, passas secas e grãos de trigo na produção de iogurte

(Bosnea et al., 2009; 2016), e *whey protein* na produção de iogurte (Sidira et al., 2017).

A inserção de bactérias probióticas na produção de alimentos apresenta desafios, não apenas pelas interações com outros constituintes, mas também pelas condições adversas empregadas durante o processamento e armazenamento de alimentos, dificultando a viabilidade do micro-organismo (Sidira et al., 2015). Para superar estas deficiências, a técnica de imobilização celular demonstra ser uma alternativa para manter a viabilidade celular, atividade e funcionalidade dos probióticos em alimentos, assim como foi constatada nesse trabalho.

3.2.3 Simulação do trato gastrointestinal

O esquema fatorial apresentou interação entre os fatores de tratamento ($p < 0,05$). As comparações das variáveis qualitativas podem ser visualizadas na tabela 2.

Tabela 2. Simulação do trato gastrointestinal *in vitro* de *L. casei* CSL3 livre em caldo MRS e iogurte *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia (log UFC.g⁻¹)

Etapas TGI	CL		YCLI	
Concentração inicial	9,59		8,81	
Gástrica	1,81 ± 0,61*	aB	0,85 ± 0,11	bB
Duodeno	3,68 ± 0,11	aA	0,90 ± 0,07	bB
Íleo	3,08 ± 0,36	aA	1,10 ± 0,07	bA
Concentração final	6,51		7,71	

*Médias $\pm$ desvio padrão referente à redução em log da etapa do TGI em relação a concentração inicial. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste T ($p < 0,05$) e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CL - *L. casei* livre em caldo MRS, YCLI - iogurte *L. casei* imobilizado.

Pode-se observar que houve maiores reduções para a bactéria livre nas etapas das fases gástrica, duodeno e íleo em comparação com a bactéria imobilizada. Além disso, houve morte celular na fase gástrica e duodenal, não sendo verificado decréscimo significativo entre íleo e duodeno para bactéria livre. A bactéria imobilizada apresentou uma redução moderada na fase gástrica ($0,85 \log \text{UFC.g}^{-1}$) e não houve redução na fase duodenal, contudo na fase entérica do íleo constatou-se redução significativa. É necessário destacar que mesmo a bactéria livre estando em maiores concentrações iniciais, percebe-se uma concentração final menor em comparação com a bactéria imobilizada, indicando que o processo de imobilização ajudou a proteger as células probióticas das condições gástricas.

Segundo Li et al. (2011), para se observar os efeitos benéficos no hospedeiro, a cepa probiótica deve ser capaz de sobreviver à exposição aos sucos gástricos e intestinais e atingir o intestino grosso em quantidades suficientes para que ocorra sua colonização e proliferação. Para um produto ser comercializado no Brasil com a denominação de probiótico, é necessário apresentar resultados que comprovem a tolerância da cultura utilizada a essas barreiras do TGI (suco gástrico e sais biliares). Além disso, considera-se essencial que o micro-organismo apresente uma quantidade de células viáveis suficientes para desempenhar suas funções benéficas ao organismo do consumidor ao atingir o intestino (Brasil, 2008).

3.3 Caracterização do iogurte probiótico com *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia

A caracterização do iogurte com células de *L. casei* CSL3 imobilizadas em aveia ocorreu no 15º dia de armazenamento sob refrigeração, onde foi determinada o percentual de umidade, cinzas, proteína, gordura, carboidrato, textura, cor e realizadas análises microbiológica e sensorial. A caracterização do iogurte imobilizado com células de *L. casei* CSL3 em flocos de aveia está descrita na tabela 3.

Tabela 3. Caracterização de iogurte com adição de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia (YCLI) refrigerado a 4 °C

Caracterização físico-química	YCLI	
Caracterização química	Umidade (%)	77,78 ± 0,97
	Cinzas (%)	0,53 ± 0,01
	Proteína (%)	15,83 ± 1,38
	Gordura (%)	2,27 ± 0,06
	Carboidratos (%)	3,82 ± 1,75
Textura	Firmeza (g)	38,66 ± 3,46
	Consistência (g/s)	232,74 ± 29,83
	Coabilidade (g)	-16,85 ± 3,56
	Índice de viscosidade (g/s)	-8,71 ± 1,06
Cor	L*	83,66 ± 2,24
	a*	-0,93 ± 0,62
	b*	8,79 ± 0,40

L*: determina a posição do ponto sobre o eixo vertical de luminosidade; a*: ponto sobre o eixo a* (-) verde (+) vermelho; b*: ponto sobre o eixo b* (-) azul (+) amarelo

De acordo com a Instrução Normativa 46 do MAPA (BRASIL, 2007), não há recomendações mínimas de umidade, cinzas e carboidratos para produtos lácteos fermentados, como o iogurte. Para ser considerado um produto integral deve possuir matéria gorda mínima de 3,0 g e valor mínimo de proteínas de 2,9 g (g/100g). O

iogurte elaborado nesse trabalho foi adicionado de 35% de aveia (biocatalisador), por isso o valor de gordura encontrado nesse trabalho 2,27% ficou um pouco abaixo do requerido pela legislação. Ao contrário das proteínas, onde o valor encontrado 15,83% foi bem superior ao da legislação. Portanto, podemos inferir que a aveia influenciou diretamente nas características do produto, diluindo o percentual de gordura e aumentando o percentual de proteínas, obtendo-se um produto com alto valor proteico.

Quanto ao aspecto de segurança do produto, não foi observada a presença de *Salmonella* spp. e as contagens de coliformes termotolerantes foi <3 NMP/g, indicando que estão de acordo com os padrões microbiológicos vigentes (Brasil, 2001).

A análise sensorial resultou em uma média de aceitação de 7,36 no aspecto global, correspondendo a gostei regularmente na escala hedônica de 9 pontos. O índice de aceitação foi calculado a partir do aspecto global, resultando em 81,7% de aceitação do iogurte com adição de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia. Em relação a intenção de compra, a média observada foi de 2,02 na escala de 5 pontos, correspondendo a 76% dos avaliadores, estando entre certamente compraria e possivelmente compraria, sendo um resultado bastante satisfatório, representando potencial mercadológico para o produto (Fig 6 A e B).

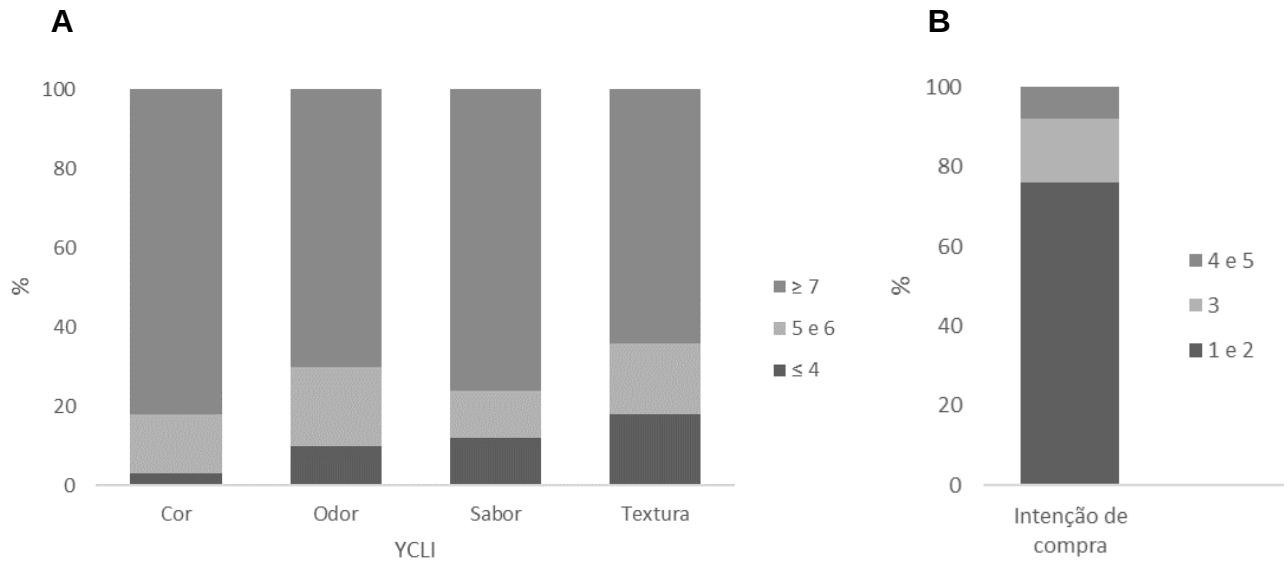


Fig 6. Análise sensorial de iogurte com adição de *L. casei* CSL3 imobilizado em aveia armazenado a 4 °C. Análise de frequência para aceitação sensorial (A) e para intenção de compra (B)

4 Conclusão

Os flocos de aveia demonstraram ser bons suportes para imobilização celular de *L. casei* CSL3, evidenciando a viabilidade durante os 60 dias de armazenamento. O isolado *L. casei* CSL3, imobilizado em flocos de aveia, como cultura probiótica na produção de iogurte, manteve sua viabilidade ($8,78 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) durante o período de armazenamento refrigerado a 4 °C por 25 dias. Além disso, o produto probiótico foi aceito sensorialmente, indicando potencial de comercialização.

5 Referências

Akin, Z., & Ozcan, T. (2017). Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 25–30.

Almeida, C.; Branvik, T.; Moradas-Ferreira, P.; Teixeira, J. (2003). Continuous production of pectinase by immobilized yeast cells on spent grains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 513-518.

APHA. American Public Health Association. (2002). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington.

AOAC. (1995). Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. (16^a edição).

Atherton, H. V., & Newlander, J. A. (1977) *Chemistry and testing of dairy products*. (4a ed.) Westport: Avi Publishing Company Inc., 388p.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 46, de 23 de novembro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007, Seção 1, pág. 4, 2007.

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.

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 Bioproducts Processing*, 102, 62-71.

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.

Crestani, M., Carvalho, F.I.F., Oliveira, A.C., Silva, J.A.G., Gutkoski, L.C., Sartori, J.F., Barbieri, R.L., & Baretta, D. (2010). Conteúdo de β -glucana em cultivares de aveia-branca cultivadas em diferentes ambientes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(3), 261-268.

Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C. (2002). Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 79(1–2), 131-141, 2002.

Cruz, A. G., Cadena, R. S., Alvaro, M. B. V. B., Sant’Ana, A. S., Oliveira, C. A. F., Faria, J. A. F., et al. (2013). Assessing the use of different chemometric techniques to

discriminate low-fat and full-fat yogurts. *LWT e Food Science and Technology*, 50, 210-214.

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

Dimitrellou, D., Kandyli, P., & Kourkoutas, Y. (2014). Freeze dried apple and casein supported biocatalysts for probiotic dairy products production. *Journal of Biotechnology*, 185(Supplement), S78eS79.

Dimitrellou, D., Kandyli, P., Sidira, M., Koutinas, A.A., & Kourkoutas, Y. (2014). Free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393 on whey protein as starter cultures for probiotic Feta-type cheese production. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 4675-4685.

Domínguez, A., Couto, S.R., Sanromán, A. (2001). Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors. *Biotechnology Letters*, 23(6), 451-455.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. (2001). 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.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations; World Health Organization. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations; World Health Organization. (2006). Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Rome: FAO/WHO, 50.

Gialleli, A.-I., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P., & Koutinas, A.A. (2016). Apple juice preservation through microbial adsorption by nano/micro-tubular cellulose. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 416-421.

ISO. (2014). *ISO 11136. Sensory analysis: Methodology-General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area* (:2014). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.

Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., & Rebros, M. (2016). Immobilization of cells and enzymes to LentiKats®. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(6), 2535–2553.

Krishnan, S., Lalitha, R.G., Misra, M.C., & Karanth, N.G. (2001) Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnology*, 15(3), 193-202.

Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A.A., Kanellaki, M. (2001). Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1417-1425.

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.

Kourkoutas, Y., Bosnea, L., Taboukos, S., Baras, C., Lambrou, D., & Kanellaki, M. (2006). Probiotic Cheese Production Using *Lactobacillus casei* Cells Immobilized on Fruit Pieces. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1439-1451.

Li, X.Y, Chen, X.G., Sun, Z.W., Park, H.J., & Cha, D.-S. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479–1485.

Madureira, A.R., Amorim, M., Gomes, A.M., Pintado, M.E., & Malcata, F.X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44, 465–470.

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

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.

Ross, R.P., Desmond, C., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2005). Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1410-1417.

Steele, C.M., Alsanei, W.A., Ayanikalath, S., Barbon, C.E., Chen, J., Cichero, J.A.Y., Coutts, K., Dantas, R.O., Duivestein, J., Giosa, L., Hanson, B., Lam, P., Lecko, C., Leigh, C., Nagy, A., Namasivayam, A.M., Nascimento, W.V., Odendaal, I., Smith, C.H., & Wang, H. (2015). The influence of food texture and liquid consistency modification on swallowing physiology and function: a systematic review. *Dysphagia*, 30(1), 2–26.

Sidira, M., Kandyli, P., Kanellaki, M., & Kourkoutas, Y. (2015). Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. *Food Chemistry*, 178, 201-207.

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.

Sidira, M., Santarmaki, V., Kiourtzidis, M., Argyri, A.A., Papadopoulou, O.S., Chorianopoulos, N., Tassou, C., Kaloutsas, S., Galanis, A., 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.

Schoina, V., Terpou, A., Gialleli, A.-I., Koutinas, A., Kanellaki, M., & Bosnea, L. (2014). Use of *Pistacia terebinthus* resin as immobilization support for *Lactobacillus casei* cells and application in selected dairy products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5700-5708.

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.

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., Papadaki, A., Bosnea, L., Kanellaki, M., & Kopsahelis, N. (2019). Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. *LWT, Food Science and Technology*.

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

Vitola, H.R.S., Dannenberg, G.S., Marques, J.L., Lopes, G.V., Silva, W.P. (2019). Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. *Process Biochemistry*, 73, 1-7.

4 Considerações finais

- Os flocos de aveia demonstraram ser bons suportes para imobilização celular, pois o biocatalisador auxiliou na manutenção da viabilidade do probiótico, bem como pode ter influenciado na sua multiplicação durante o armazenamento refrigerado do iogurte.

- O biocatalisador demonstrou-se viável durante os 60 dias analisados, destacando o imobilizado armazenado a 4 °C que mostrou melhores resultados.

- O iogurte com *L. casei* CSL3 imobilizado em flocos de aveia (YCLI), manteve sua viabilidade (8,78 log UFC.g⁻¹) durante o período de armazenamento refrigerado a 4 °C por 25 dias.

- O isolado *L. casei* CSL3 foi tolerante ao trato gastrointestinal simulado, assim como o iogurte com *L. casei* CSL3 na forma imobilizada (YCLI), com concentrações de 6,50 e 7,71 log UFC.g⁻¹, respectivamente.

- O produto probiótico foi aceito sensorialmente, indicando um produto com potencial para comercialização.

- Mais estudos são necessários para determinar o potencial probiótico de *L. casei* CSL3, utilizando critérios de seleção *in vivo*.

Referências

AKIN, Z., & OZCAN, T. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. **LWT - Food Science and Technology**, v.86, p.25-30, 2016.

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

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.101, p.56–66, 2014.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p.1-72, 1998.

AXELSSON, L. Acid lactic bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. *et al.* **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3 ed. New York: Marcel Dekker Inc, 2004.

AYENI, F. A., SÁNCHEZ, B., ADENIYI, B. A., DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G., MARGOLLES, A., RUAS-MADIEDO, P. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, n.2, p.97–104, 2011.

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

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho de 2008.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bacteria *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotics in foods and their importance paragraph to human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 57, 373- 380, 2007.

CARVALHO, W., CANILHA, L., SILVA, S. S. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, nº 36, 2006.

CASTELLANO, P.; BELFIORE, C.; FADDA, S.; VIGNOLO, G. A review of bacteriocinogenic lact acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. **Meat Science**, v. 79, p. 483-499, 2008.

CRESTANI, M.; et al. 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.

CRUZ, A. G., OLIVEIRA, C., CORASSIN, C. H., SÁ, P. **Processamento de produtos lácteos: Queijos, Leites Fermentados, Bebidas Lácteas, Sorvete, Manteiga, Creme de Leite, Soro em Pó e Lácteos Funcionais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

CHAMPAGNE, C. P., ROSS, R. P., SAARELA, M., HANSEN, K. F., CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

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.

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.

COUSIN, F. J., LYNCH, H. M., MCCANN, A., LYNCH, D. B., NEVILLE, B. A., IRISAWA, T., OKADA, S., ENDO, A., O'TOOLE, P. W. Detection and Genomic Characterization of Motility in *Lactobacillus curvatus*: Confirmation of Motility in a Species outside the *Lactobacillus salivarius* Clade. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, n.4, p.1297–1308, 2015.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. DA. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, n.2, p.143, 2007.

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

DEL PIANO, M.; MORELLIC, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARRA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v.38, suppl.2, p. S248-S255, 2006.

DOMÍNGUEZ, A.; COUTO, S. R.; SANROMÁN, A. Amelioration of ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in airlift bioreactors. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 6, p. 451-455, 2001.

DORELLA, F. A.; MIYOSHI, A.; PONTES, D. S.; AZEVEDO, V. Expressão de proteínas heterólogas em *Lactococcus lactis*. **R. Ci. méd. biol.**, Salvador, v.2, n.1, p. 123-132, 2003.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. (2001). **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.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. World Health Organization. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, 2002.

FAO/WHO. **Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation**. FAO Food Nutrition Pap. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006.

FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Probióticos – Uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.142, p.22-33, 2006.

FUGELSANG, K.C.; EDWARDS, C.G. **Wine microbiology: practical applications and procedures**. 2. ed. Springer, 2007.

FULLER, R.; GIBSON, G. Probiotics and Prebiotics: microflora management for improved gut health. **Clinical Microbiology and Infection**, v.4, p.477-480, 1998.

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

GOKTEPE, I. Probiotics as Biopreservatives for Enhancing Food Safety. **Probiotics in Food Safety and Human Health**. p.285-307, 2006.

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.80, n.2, p.203-207, 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. **Trends and food science & technology**, v.10, p.139-158, 1999.

HOLZAPFEL, W.H., SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research Internacional**, v.35, p.109-16, 2002.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.365S–73S, 2001.

HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida de prateleira. **Revista Saúde**, v.3, p.10-15, 2009.

JUNTER, G. A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome in leader or the cart before the horse. **Biotechnology Advances**, New York, v.22, n.8, p.633-658, 2004.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: J. G. HOLT & P. H. A. SNEATH (Org.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p.1208–1234.

CHEN, K. N., CHEN, M. J., LIU, J. R., LIN, C. W., CHIU, H. Y. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation, **Journal of Food Science**, v.70, nº 5, p.M260-M266, 2005.

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.

KRISHNAN, A. S.; LALITHA, R. G. A.; MISRA, A. M. C.; KARANTH, N. G. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum ncim 2084* cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. **Food Biotechnology**, New York, v.15, n.3, p.193-202, 2001.

KOMATSU, T. R., BURITI, F. C. A., SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.44, n.3, 2008.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. **Food and Bioprocess Technology**, v.4, n.6, p.1089–1118, 2011.

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**, Easton, v.49, n.3, p.1417-1425, 2001.

KOURKOUTAS, Y.; MCERLEAN, C.; KANELAKI, M.; HACK, C. J.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. High-temperature wine making using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.112, n.1, p.25-35, 2004.

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**, v.40, p.411-416, 2005.

MADEIRA, C., GARCÍA, P., JANSEN, T., RODRÍGUEZ, A., SUÁREZ, J. E. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.3, p.213-222, 2003.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal Bacteriology**, v.189, p.1199–1208, 2007.

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

MARTÍN, M. J., LARA-VILLOSLADA, F., RUIZ, M. A., & MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.27, p.15-25, 2015.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SALMINEN, S. Up-to-date on probiotics in Europe. **Gastroenterology International**, v.11, p. 8–16, 1998.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., CASTRO, H. F., GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v.34, n.5, p.831-840, 2011.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. et al. “**Tecnologia de Alimentos**”. Porto Alegre, RS. Editora Artmed, v.2, 2005.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n° 6, p.1171-1185. 2006.

PILKINGTON, P. H.; MARGARITIS, A.; MENSOUR, N. A.; RUSSEL, I. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.104, p.19-31,1998.

RITTER, P., KOHLER, C., VON, A.H.U. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasseri* K7 and Bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. **BMC Microbiology**, v.9, p. 1–9, 2009.

ROCHA, C. R., COBUCCI, M. A., MAITAN, V. R., SILVA, O. C. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutas do cerrado. **B. Ceppa**, v. 26, n. 2, p. 255-266, 2008.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol.42, nº1, 16p., jan/mar, 2006.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 669 p., 2011.

SIDIRA, M., KARAPETSAS, A., GALANIS, A., KANELLAKEI., 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**, v.96, p.948-955, 2014.

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**, v.96, nº5, p.3369–3377, 2013.

SIDIRA, M., SANTARMAKI, V., KIOURTZIDIS, M., ARGYRI, A. A., PAPADOPOULOU, O. S., CHORIANOPOULOS, N., TASSOU, C., KALOUTSA, A. G., KOURKOUTAS, Y. Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum* 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production. **LWT - Food Science and Technology**, v.75, p.137e146, 2017.

SOCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. D. S., MEDEIROS, A. B. P., YAMAGUISHI, C. T., DE DEALINDNER, J., PANDEY, A., THOMAZ-SOCOL, V. The potential of the probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v.48, n.4, p.413-434, 2010.

SCHOINA, V., TERPOU, A., ANGELIKA-IOANNA, G., KOUTINAS, A., KANELLAKEI, M., BOSNEA, L. Use of Pistacia terebinthus resin as immobilization support for *Lactobacillus casei* cells and application in selected dairy products, **Journal of Food Science and Technology**, v.52, nº9, p.5700-5708, 2014.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1262-1277, 2007.

TRABELSI, I., AYADI, D., BEJAR, W., BEJAR, S., CHOUAYEKH, H., BEM SALAH, R. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan

and gelatin on antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p.84–89, 2014.

VÁSQUEZ, M., SANCHEZ, F., HICHE, E., YÁÑEZ, E. Sensory evaluation of textured sunflower/soy protein. **Journal of Food Science**, v.44, p.1717-1719, 2006.

VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Probiotics from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714–728, 2008.

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

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