

Área: Tecnologia de Alimentos

VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* La-5 MICROENCAPSULADO COM PROTEÍNA DO FARELO DE ARROZ E MALTODEXTRINA EM IOGURTE

Rosane Vaniski, Samara C. da Silva, Cristiane Canan, Deisy A. Drunkler*

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Câmpus Medianeira, Av. Brasil, 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil

*E-mail: deisydrunkler@utfpr.edu.br

RESUMO – O iogurte, mais popular leite fermentado, é um alimento com elevado valor nutricional e amplamente consumido, tornando-se ideal para carrear probióticos. Entretanto, o maior desafio é manter a viabilidade desses micro-organismos durante a vida útil do produto. Logo, uma tecnologia bastante empregada para proteger os probióticos de condições adversas é a microencapsulação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulado com proteína do farelo de arroz e maltodextrina em iogurte durante o armazenamento. As microcápsulas exerceram proteção ao micro-organismo probiótico durante a vida útil do iogurte, pois ao final de 45 dias de armazenamento o *L. acidophilus* microencapsulado reduziu 2,73 ciclos log, ao contrário do *L. acidophilus* livre que reduziu 3,56 ciclos log. Portanto, a microencapsulação com proteína extraída do farelo de arroz e maltodextrina é uma técnica viável e benéfica à proteção do *L. acidophilus* La-5 durante a vida útil do iogurte.

Palavras-chave: Probiótico, leite fermentado, atomização.

1 INTRODUÇÃO

A adição de micro-organismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas, como o iogurte, possuem vantagens tanto sob o ponto de vista da saúde quanto tecnológico. Do ponto de vista da saúde, o consumo de probióticos está associado na prevenção de infecções gastrointestinais, diarreia e doença inflamatória intestinal (ARSLAN et al., 2015), possuem efeitos anticarcinogênico, anti-bacteriano e antimutagênico (TRIPATHI; GIRI, 2014), podem diminuir lipídios séricos e melhorar o sistema imunológico (SONG et al., 2013); além de melhorar os efeitos da intolerância a lactose (ALMEIDA et al., 2012; SONG et al., 2013), efeitos adversos a antibióticos, tratamento e prevenção de doenças alérgicas (ISOLAURI et al., 2012). Sob o ponto de vista tecnológico, pode melhorar as características do produto tradicional por reduzir a pós-acidificação do iogurte, fato evidenciado pela ação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp. (GALLINA et al., 2011).

No entanto, ainda sob o ponto de vista tecnológico, a suplementação de iogurte com culturas probióticas apresenta muitos desafios, em particular no que diz respeito à manutenção da viabilidade das culturas. Fatores

como acidez e oxigênio dissolvido e interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem influenciar na sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados (GALLINA et al., 2011; MARTIN et al., 2015; GARCÍA-CEJA et al., 2015).

A utilização de tecnologias como a microencapsulação tem sido sugerida como um método promissor para a proteção dos probióticos (RIBEIRO et al., 2014), já que oferece boa proteção a esses micro-organismos frente ambientes de estresse, promovendo o isolamento das células microbianas do meio externo, mantendo assim sua viabilidade.

Até então, não foi estudado a estabilidade de *L. acidophilus* microencapsulado com proteína do farelo de arroz e maltodextrina. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulado com proteína do farelo de arroz e maltodextrina em iogurte durante o armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A cultura probiótica de *L. acidophilus* La-5 (1% m.v-1) foi inoculada em caldo MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubada a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ até atingir a fase estacionária. A seguir, a biomassa do micro-organismo foi recolhida por centrifugação a 3000 g na temperatura de 4°C durante 10 minutos (Centrífuga Refrigerada Cientec, CT-5000R, Minas Gerais, Brasil), para posterior adição à suspensão a ser passada pelo *spray drying*. O concentrado protéico do farelo de arroz e a maltodextrina foram dispersos em 400 mL de água estéril, na razão maltodextrina/proteína de 10:2,5 (m:m⁻¹), homogeneizadas em banho ultrassônico ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, frequência 80 kHz, potência 100 W, 15 minutos) (Elma®, Elmasonic P120H, São Paulo, Brasil). Em seguida, as suspensões foram adicionadas de 1% (m.v⁻¹) da cultura em fase estacionária e homogeneizadas por um minuto em agitador magnético à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil). As suspensões foram submetidas à secagem em *Spray drying* de escala laboratorial (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil), mantidas sob agitação à temperatura ambiente e alimentadas para a câmara de secagem por meio de bomba peristáltica a temperatura do ar de entrada de 78°C , vazão de entrada foi 0,58 L.h-1, sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem (2 - 4 kgf.cm-2), vazão de ar comprimido (35 kgf.cm-2) e diâmetro de saída do ar no sistema (1 mm) com bico duplo fluído. As partículas em pó produzidas foram coletadas na base do ciclone e armazenadas em recipiente de vidro Scott hermeticamente fechados, previamente esterilizados e mantidas sob refrigeração a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante a realização das análises.

A elaboração do iogurte foi realizada de acordo com Picot e Lacroix (2004), com algumas modificações. O leite pasteurizado homogeneizado (Lactobom, Toledo, Paraná, Brasil) foi aquecido a temperatura de $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ em fermenteira (Brasholanda, Curitiba, Brasil) e, em seguida, foi inoculada a cultura láctica composta pelos micro-organismos *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii sp. bulgaricus*, conforme indicação do fabricante (DVS YF-L812, Chr. Hansen, Valinhos, Brasil).

Esta mistura foi dividida em duas formulações: a primeira foi inoculada o micro-organismo probiótico microencapsulado e a segunda com o probiótico na forma livre.

As formulações foram incubadas em fermenteira a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, até atingir o pH $4,6 \pm 0,1$ e acidez próxima a $0,6\% \pm 0,1\%$ de ácido láctico. Em seguida, foram resfriados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e armazenadas nesta temperatura durante 45 dias. Todas as formulações foram realizadas em triplicata.

A viabilidade celular do *L. acidophilus* microencapsulado e livre foi medida após 1, 15, 30 e 45 dias de armazenamento, em temperatura controlada de $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, de acordo com o método descrito por Albadran et al. (2015), com adaptações. Foi retirado 1 mL de amostra, sendo homogeneizada para o completo rompimento das cápsulas, então, foram feitas as respectivas diluições seriadas e o plaqueamento em profundidade em ágar MRS, em triplicata. As placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (Anaerobac®, Probac, São Paulo, Brasil) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A contagem de células viáveis foi expressa em log de unidades formadoras de colônia por grama ($\log \text{UFC.g}^{-1}$). A redução da viabilidade (RV ciclos log) do *L. acidophilus* durante o armazenamento foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{RV ciclos log} = (N - N_0) \quad (1)$$

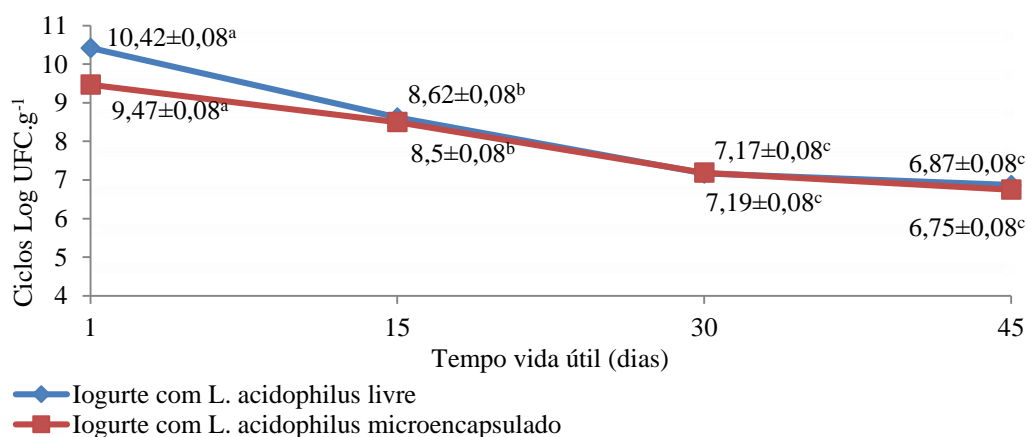
Onde: N: número de células viáveis no tempo inicial ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)

N_0 : número de células viáveis no tempo final ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade do *L. acidophilus* livre e microencapsulado no iogurte está apresentada na Figura 1, bem como a redução da viabilidade está apresentada na Tabela 1.

Figura 1 - Viabilidade do *L. acidophilus* livre e microencapsulado (Ciclos Log.g^{-1})



⁽¹⁾Médias \pm erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

O iogurte contendo *L. acidophilus* livre apresentou contagem inicial mais elevada deste probiótico, $10,42 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (Figura 1), isso se deve a maior concentração de bactérias viáveis adicionadas na elaboração do iogurte, e contagem ao final de 45 dias de armazenamento refrigerado foi de $6,87 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Já o iogurte contendo microcápsulas de *L. acidophilus*, apresentou contagem inicial de $9,47 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e contagem após 45 dias de $6,75 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

Para alegação funcional, no Brasil, a legislação estabelece a comprovação da quantidade mínima viável do micro-organismo para exercer a propriedade funcional no final do prazo de validade do produto e nas condições

de uso, armazenamento e distribuição (BRASIL, 2016). No caso do iogurte recomenda-se a ingestão diária de 200 mL (BRASIL, 2003).

Durante a vida de prateleira, o iogurte adicionado de *L. acidophilus* livre sofreu maior redução de células viáveis, 3,56 ciclos log. Em contrapartida, o iogurte elaborado com microcápsulas de *L. acidophilus* apresentou redução de 2,73 ciclos log, apresentando diferença significativa entre os iogurtes ($p \leq 0,05$), conforme Tabela 1.

Tabela 1–Redução da viabilidade do *L. acidophilus* livre e microencapsulado durante a vida útil do iogurte probiótico

Tempo (dias)	Iogurte contendo <i>L. acidophilus</i> livre (Ciclos Log.g ⁻¹)	Iogurte contendo <i>L. acidophilus</i> microencapsulado (Ciclos Log.g ⁻¹)
1-15	1,80± 0,04 ^{bA}	0,97± 0,15 ^{b,cB}
15-30	1,45±0,10 ^{cA}	1,31±0,06 ^{bA}
30-45	0,30± 0,04 ^{dA}	0,45± 0,25 ^{cA}
1-45	3,56± 0,09 ^{aA}	2,73± 0,15 ^{aB}

⁽¹⁾Médias± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Letras maiúsculas iguais, na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade

O micro-organismo encapsulado apresentou maior sobrevivência no tempo inicial de armazenamento em comparação com o não encapsulado, mostrando que os materiais de parede foram eficientes na proteção do *L. acidophilus* em ambientes adversos, como ambiente ácido do iogurte. De acordo com Kailasapathy (2006), a microencapsulação é a mais promissora tecnologia para proteger as células bacterianas de ambiente desfavoráveis.

A proteína do farelo de arroz como material de parede proporcionou maior proteção ao micro-organismo, uma vez que, o ponto isoelétrico das proteínas do arroz é 4,5, o que é muito importante para a estabilidade das microcápsulas considerando que o pH final do iogurte é 4,6 (GUPTA et al., 2008).

Shoji et al. (2013), ao final de 28 dias de armazenamento do iogurte, observaram contagem de *L. acidophilus* na forma livre de 4,4 e 4,9 log UFC.g⁻¹ e para o *L. acidophilus* encapsulado 7,9 e 7,5 log UFC.g⁻¹, onde os iogurtes preparados com *L. acidophilus* microencapsulado apresentaram valores menores de pós-acidificação e maior viabilidade da cultura durante o armazenamento refrigerado. Kailasapathy (2006) relatou um aumento da sobrevivência de 2 e 1 ciclos log de *L. Acidophilus* e *B. lactis*, respectivamente, devido a proteção das células por microencapsulação.

4 CONCLUSÃO

As microcápsulas exerceram boa proteção ao micro-organismo probiótico durante a vida útil do iogurte, mantendo sua viabilidade, desta forma, sugere que a proteína extraída do farelo de arroz e maltodextrina são materiais adequados para serem utilizados no processo de microencapsulação do *L. acidophilus* podendo as microcápsulas ser adicionadas para a elaboração de iogurte probiótico.

REFERÊNCIAS

- ALBADRAN, H. A.; CHATZIFRAGKOU, A.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Stability of Probiotic *Lactobacillus Plantarum* in Dry Microcapsules under Accelerated Storage Conditions. **Food Research International**, v. 74, p. 208-216, 2015.
- ALMEIDA, C. C.; LORENA, S. L. S.; PAVAN, C. R.; AKASAKA, H. M. I.; MESQUITA, M. A. Beneficial Effects of Long-Term Consumption of a Probiotic Combination of *Lactobacillus casei shirota* and *Bifidobacterium breve yakult* May Persist After Suspension of Therapy in Lactose-Intolerant Patients. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 247-251, 2012.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Var. *boulardii* with Different Wall Materials by *Spray Drying*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015.
- BRASIL. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dez. 2003.
- BRASIL. IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas 2016. Dispoes dos Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos, Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. 22 dez. 2016. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>>. Acesso em: 14 fev. 2017.
- GALLINA, A. D.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H. DE S.; CARUSI, J. Characterization of Fermented Milk, and Probiotics and Prebiotics Free Milk, and Viability Evaluation of Lactic Acid and Probiotic Bacteria Luring the Shelf Life. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.
- GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 482-489, 2015.
- GUPTA, S.; CHANDI, G. K.; SOGI, D. S. Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. **International Journal of Food Engineering**, v. 4, n. 2, art. 8, 2008.
- ISOLAURI, E.; RAUTAVA, S.; SALMINEN, S. Probiotics in the Development and Treatment of Allergic Disease. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 41, n. 4, p. 747-762, 2012.
- KAILASAPATHY, K. Survival of Free and Encapsulated Probiotic Bacteria and Their Effect on the Sensory Properties of Yoghurt. **LWT Food Science and Technology**, v. 39, p. 1221-1227, 2006.
- 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.
- PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of Bifidobacteria in Whey Protein-Based Microcapsules and Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions and in Yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 505-515, 2004.

RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Effect of Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on Physicochemical, Sensory and Microbiological Characteristics of Stirred Probiotic Yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431, 2014.

SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 83-88, 2013.

SONG, H.; YU, W.; GAO, M.; LIU, X.; MA, X. Microencapsulated Probiotics Using Emulsification Technique Coupled with Internal or External Gelation Process. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 181-189, 2013.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics during Processing and Storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225-241, 2014.