



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE - CEO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMOBILIZAÇÃO DO *Lactobacillus rhamnosus* E DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE COM ENRIQUECIMENTO PROTEICO

DIEGO PEROSA

PINHALZINHO, 2018

DIEGO PEROSA

**IMOBILIZAÇÃO DO *Lactobacillus rhamnosus* E DESENVOLVIMENTO DE
IOGURTE COM ENRIQUECIMENTO PROTEICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Ciências Agrárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia em Alimentos.

Orientadora: Elisandra Rigo

Coorientadora: Darlene Cavalheiro

**Pinhalzinho, SC, Brasil
2018**

Ficha de Identificação da Obra elaborada pelo autor, com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Perosa, Diego

IMOBILIZAÇÃO DO *Lactobacillus rhamnosus* E
DESENVOLVIMENTO DE IOGURTE COM ENRIQUECIMENTO
PROTEICO / Diego Perosa. - Chapecó , 2018.

64 p.

Orientadora: Elisandra Rigo

Co-orientadora: Darlene Cavalheiro
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do
Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2018.

1. Farelo de arroz. 2. Farelo de trigo. 3.
Probiótico. 4. Prebiótico. 5. Caseína. I. Rigo,
Elisandra. II. Cavalheiro, Darlene. , .III.
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de
Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. IV.
Título.

Diego Perosa

**IMOBILIZAÇÃO DO *Lactobacillus rhamnosus* E DESENVOLVIMENTO DE
IOGURTE COM ENRIQUECIMENTO PROTEICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Comissão examinadora:

(Dra. Elisandra Rigo) UDESC/OESTE:

(Dra. Juliana Steffens) URI

(Dra. Liziane Schittler) UDESC/OESTE

(Dra. Aniela Pinto Kempka) UDESC/OESTE

Pinhalzinho, 8 de agosto de 2018

AGRADECIMENTOS

Agracedeço a Deus pela força que me fez persistir e manter-me focado nesta caminhada para atingir o objetivo proposto.

Agradeço a minha esposa, Débora Cristina Albrecht, que sempre me apoia nos meus sonhos, transmitindo sua energia e tornando a jornada mais alegre e colorida. Confesso que é ela que me vê mau humorado e ranzinza, e também é ela que vibra quando o planejamento traz resultados positivos. Simplesmente é difícil reunir palavras para agradecer, amo muito você.

Agradeço a compreensão da minha mãe, Dona Inelva Ranzan Perosa, que neste período que estive distante e ausente, sempre foi muito amorosa e paciente, e também não poderia esquecer das delícias que cozinha para me presentear.

Sou imensamente grato ao meu irmão Jonas Perosa, companheiro de conversa, você não sabe, mas sempre que tenho um problema a resolver, procuro imaginar o que você faria. Também não posso deixar de agradecer pelas consultarias de inglês, grande abraço meu irmão.

Também quero agradecer imensamente as professoras, Dra. Elisandra Rigo e Dra. Darlene Cavaleiro, que sempre estiveram disponíveis para prestar auxílio. Agradeço por todos os questionamentos que me foram feitos e pelo tempo dedicado para as correções, vocês fazem parte deste trabalho que está chegando ao fim.

Não posso esquecer do crédito que me foi dado pela empresa SACCO do Brasil, especialmente ao consultor técnico da SACCO Eduardo Reis Peres Dutra e ao João Pedro Lourenço Neto, que me auxiliaram a tornar esta pesquisa possível.

Agradeço aos meus colegas e amigos: Neuri Zuzeliski, Vanessa Lando e Fabiane Schuster, que me ajudaram de inúmeras formas, em momentos trocando experiências, horas colocando a mão na massa e não posso esquecer de todas as risadas durante as longas jornadas do laboratório, isso certamente tornou tudo mais leve.

RESUMO

A busca por alimentos diferenciados vem conquistando cada vez mais adeptos, especialmente os que procuram um estilo de vida mais saudável, dentre estes destacam-se os funcionais e os suplementados com proteína. Neste sentido, o presente estudo buscou avaliar a suplementação proteica de iogurte com caseína ácida e globular, adicionado de cultura probiótica *Lactobacillus rhamnosus* imobilizada nos prebióticos farelo de trigo e farelo de arroz. A imobilização ocorreu a partir da deslignificação dos farelos e imobilização das células probióticas na base tratada, dando origem ao biocatalizador, isto é, os farelos servindo de suporte para proteção da cultura. Para avaliação da imobilização foi utilizado Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), simulação de digestão *in vitro*, contagem microbiológica, análises físico químicas (gordura, proteína, fibras), perfil de textura e análise de sinerese. A contagem microbiológica foi feita em PCA, ágar MRS, M17 e V-MRS, sendo que o ágar V-MRS foi utilizado para inoculação do *L. rhamnosus*. Em MEV, foi possível observar os nanotubos após a deslignificação, assim como seu preenchimento com a adição do probiótico. Os iogurtes produzidos tiveram suplementação proteica, com: leite em pó desnatado, caseína ácida e caseína globular, sendo acompanhado o pH durante o processo de elaboração. Os resultados apresentaram que os iogurtes do tipo IPPL (iogurte padrão com probiótico livre), IPBT (iogurte padrão com biocatalizador de trigo) e IPBA (iogurte padrão com biocatalizador de arroz) que eram adicionados de *L. rhamnosus* imobilizados resultaram em contagens de bactérias lácticas maiores, demonstrado aumento da viabilidade após o processo de digestão. Os biocatalizadores possibilitaram a produção de iogurte que após a digestão mantiveram-se com valores aproximados de 7 log Ufc.g⁻¹ em comparação ao *L. rhamnosus* livre de 6 log Ufc.g⁻¹. A dureza foi alterada pela adição das caseínas, dessa forma aumentando a viscosidade do iogurte. O iogurte elaborado com caseína ácida resultou em maiores teores de proteínas, contudo foi a formulação que apresentou maior sinerese.

Palavras-chave: Farelo de arroz. Farelo de trigo. Probiótico. Prebiótico. Iogurte. Caseína.

ABSTRACT

The search for differentiated foods has gained more and more adherents, especially those who adopt a healthier lifestyle, among which stand out the functional and supplemented with protein. In this sense, the present study aimed to evaluate the protein supplementation of casein and globular yoghurt added to the probiotic culture *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in the prebiotics wheat bran and rice bran. Immobilization occurred from the designation of bran and immobilization of treatment-based probiotic cells, giving rise to the biocatalyst, that is, the bran serving as support for crop protection. Immobilization was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), in vitro digestion simulation, microbiological counting, chemical physical statistics (fat, protein, fiber), texture profile and syneresis analysis. Microbiological counts were performed on PCA, MRS, M17 and V-MRS, and V-MRS was used for *L. rhamnosus* inoculation. In SEM, it was possible to observe nanotubes after delignification, as well as their filling with a probiotic addition. The yogurts had protein supplementation with: skimmed milk powder, acid casein and globular casein, being followed or pH during the elaboration process. The results presented for IPPL, IPBT (standard biographer with biographer) and IPBA (standard biographer with biographer) biologists using immobilized *L. rhamnosus* resulting in larger lactic containers, demonstrated increased viability after digestion process. The biocatalysts allowed the production of biochemicals which after digestion remained at approximately $7 \log \text{CFU.g}^{-1}$ compared to free *L. rhamnosus* of $6 \log \text{CFU.g}^{-1}$. The duration was altered by the addition of caseins, thereby altering the geographer's viscosity. Casein-produced yogurt resulted in higher protein content, but was shown to show higher syneresis.

Keywords: Rice bran. Wheat bran. Probiotic. Prebiotic. Yogurt. Casein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos farelo deslignificados de trigo (a) e de arroz (b), bem como do biocatalizador trigo -BT (c) e biocatalizador arroz -BA (d), com ampliação de x 850 36
- Figura 2 - Perfil do valor de pH em iogurtes formulados com leite em pó definidos como iogurte padrão (IP) nas seguintes variações: (a) IPSP (sem probiótico), IPPL (probiótico livre), IPBT (biocatalizador trigo), IPBA (biocatalizador arroz). Os iogurtes elaborados com caseína caseína ácida (ICA) nas seguintes variações: (b) ICASP (sem probiótico), ICAPL (probiótico livre), ICABT (biocatalizador trigo), ICABA (biocatalizador arroz). Os iogurtes elaborados com caseína caseína globular (ICG) nas seguintes variações: (c) ICGSP (sem probiótico), ICGPL (probiótico livre), ICGBT (biocatalizador trigo), ICGBA (biocatalizador arroz). 39
- Figura 3 - Perfil textura dos iogurtes formulados com diferentes fontes de proteína: leite em pó (IP), caseína ácida (ICA) e caseína globular (ICG) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador farelo de trigo (BT) e biocatalizador farelo de arroz (BA) 43
- Figura 4 - Sinérese dos iogurtes formulados com leite em pó (IP), com caseína ácida (ICA) e com caseína globular (ICG), avaliados sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA) 44
- Figura 5 - Contagem microbiológica em meios seletivos da digestão simulada (in vitro): Mastigação (a), esôfago – estômago (b), duodeno (c) e íleo (d), dos iogurtes formulados com leite em pó (IP) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA) (continua) 46
- Figura 6 - Contagem microbiológica em meios seletivos da digestão simulada (in vitro): Mastigação (a), esôfago – estômago (b), duodeno (c) e íleo (d), dos iogurtes formulados com leite em pó (IP) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA) 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de iogurte, classificados pelo processo de elaboração	17
Tabela 2 - Exemplos de micro-organismos que possuem características probióticas	21
Tabela 3 - Parâmetros de textura instrumental de alimentos semi-sólidos e definições	27
Tabela 4 - Análise da concentração de proteína e gordura presente nos iogurtes	41
Tabela 5 - Taxa de sobrevivência (%) da cultura láctica na simulação <i>in vitro</i> do trato gastrointestinal no meio V-MRS específico para <i>L. rhamnosus</i> , em Iogurte Padrão com Probiótico Livre (IPPL), Iogurte Padrão com Biocatalizador de Trigo (IPBT) e Iogurte Padrão com Biocatalizador de Arroz (IPBA)	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	Bactérias Ácido-láticas
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
OMS	Organização Mundial da Saúde
IP	Iogurte Padrão
IPSP	Iogurte Padrão Sem Probiótico
IPPL	Iogurte Padrão com Probiótico Livre
IPBT	Iogurte Padrão com Biocatalizador de Trigo
IPBA	Iogurte Padrão com Biocatalizador de Arroz
ICA	Iogurte Caseína Ácida
ICASP	Iogurte Caseína Ácida Sem Probiótico
ICAPL	Iogurte Caseína Ácida com Probiótico Livre
ICABT	Iogurte Caseína Ácida com Biocatalizador de Trigo
ICABA	Iogurte Caseína Ácida com Biocatalizador de Arroz
ICG	Iogurte Caseína Globular
ICGSP	Iogurte Caseína Globular Sem Probiótico
ICGPL	Iogurte Caseína Globular com Probiótico Livre
ICGBT	Iogurte Caseína Globular com Biocatalizador de Trigo
ICGBA	Iogurte Caseína Globular com Biocatalizador de Arroz
TPA	Perfil de Textura
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTST	Farelo de Trigo sem Tratamento
FAST	Farelo de Arroz sem Tratamento
FTD	Farelo de Trigo Deslignizado
FAD	Farelo de Arroz Deslignizado
BT	Biocatalisador de Trigo
BA	Biocatalisador de Arroz
ILPSP	Iogurte com Leite em Pó Sem Probiótico
FOS	Frutooligossacarídeos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	IOGURTE.....	16
3.2	CULTURAS LÁTICAS	17
3.3	CASEÍNA.....	19
3.4	PROBIÓTICOS	20
3.5	PREBIÓTICOS.....	23
3.6	AGENTE ENCAPSULANTE.....	24
3.6.1	Farelo de trigo.....	24
3.6.2	Farelo de arroz.....	25
3.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	26
3.8	PERFIL DE TEXTURA	26
3.9	SINÉRESE.....	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	IMOBILIZAÇÃO DA CULTURA PROBIÓTICA	30
4.2	CONTAGEM DE CÉLULAS PROBIÓTICAS IMOBILIZADAS	31
4.3	ELABORAÇÃO DO IOGURTE.....	32
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	31
4.5	AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA	33
4.6	ANÁLISES DE pH, GORDURA, PROTEÍNA E FIBRAS.....	33
4.7	PERFIL DE TEXTURA	34
4.8	SINÉRESE.....	34
4.9	ANÁLISE DO PROCESSO DE DIGESTÃO	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	35
5.2	PROCESSO DE FERMENTAÇÃO.....	37
5.3	ANÁLISE DE pH, GORDURA, PROTEÍNA E FIBRAS	40
5.4	PERFIL DE TEXTURA	41
5.5	SINÉRESE.....	43
5.6	ANÁLISE DO PROCESSO DE DIGESTÃO	45
6	CONCLUSÃO.....	50

REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE.....	60
APÊNDICE A - TEMPO DE FERMENTAÇÃO E O RESPECTIVO PH	60
APÊNDICE B – PONTOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE TEXTURA (MÉDIAS).61	
APÊNDICE C - VALORES DAS CONTAGENS MICROBIOLÓGICAS EM MEIOS SELETIVOS DA DIGESTÃO SIMULADA	62
ANEXOS.....	63
ANEXO 1- FLUXOGRAMA DA FABRICAÇÃO DO IOGURTE BATIDO E DO IOGURTE TIPO FIRME.....	63
ANEXO 2 - COMPORTAMENTO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS COMO INGREDIENTES ALIMENTARES NA MICROBIOTA INTESTINAL.....	64

1 INTRODUÇÃO

O interesse pelo desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais vem crescendo nos últimos anos, dentre eles destacam-se os elaborados com micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos, por apresentarem satisfação e aceitação por parte dos consumidores (BALTHAZAR et al., 2017) que buscam o bem-estar (SANTOS; MEDEIROS, 2016, FU et al., 2018). Assim, estes, passaram a assumir um papel importante no universo científico, diversas pesquisas têm sido centradas para linha especial de leites fermentados, iogurtes (SAAD et al., 2011a., GUNENC et al., 2016, ZAMBERLIN et al., 2017, TERPOU et al, 2017b, KARNOPP et al., 2017, VIANNA et al., 2017, FAZILAH et al., 2018) e queijos (LIU et al., 2018, VALENTE et al., 2019).

Os iogurtes simbióticos possuem um grande potencial de compostos que influenciam positivamente na saúde humana (TERPOU et al., 2017a), considerando ser um produto fermentado produzido a partir do leite e pela ação das bactérias ácido lácticas: *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, que podem ser complementados com outras bactérias deste grupo (KARNOPP et al., 2017, JORGENSEN et al., 2019). O *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) vem sendo amplamente estudada como probiótico em alimentos (RAJOKA, et al., 2017, YADAV et al., 2018, VALENTE et al., 2019, DOKOOHAKI et al., 2019).

A adição de bactérias probióticas em iogurtes é desafiadora, uma vez que a concentração mínima de probióticos em produtos alimentícios deve ser de pelo menos 6 log UFC . g⁻¹ até o final do prazo de validade (NEFFE-SKOCIŃSKA et al., 2018), para que seus benefícios à saúde sejam entregues ao consumidor. Devido a sua interação com outras espécies microbianas presentes nesse tipo de produto e pela sensibilidade aos constituintes destes, ao processamento e as condições de armazenamento, pode ocorrer perdas na viabilidade celular, sendo que o processo de imobilização da cultura probiótica seria uma alternativa para diminuir as interferências relatadas neste tipo de produto (SOUKOULIS et al, 2007; TERPOU et al., 2019, DOKOOHAKI et al., 2019), sendo que diferentes suportes podem ser empregados, entre eles o farelo de trigo (TERPOU et al., 2017a; 2017b), alginato de sódio (ABDEL-RAHMAN, et al., 2019, DOKOOHAKI et al., 2019), maltooligossacarídeos e concentrado de proteína de soro de leite (LIU et al., 2017), goma gelana e proteína de soro de leite (LI et al., 2019), alginato de cálcio e quitosana (FARIAS, et al., 2019).

As propriedades organolépticas, reológicas, textura e microestrutura de iogurte são dependes de vários fatores, como processo de fermentação, tipo de leite, culturas iniciais e cepas probióticas, embalagem e condições de armazenamento (FAZILAH et al., 2018) e concentração de proteína (VIANNA et al., 2017). As caseínas podem ser utilizadas nas formulações de iogurtes, visando um produto com maior aporte proteico, elástico, viscoso e com menos sinérese (SOUKOULIS et al, 2007, FU, et al., 2018, JORGENSEN et al., 2019), em comparação aos não suplementados (DAMIN et al, 2009; KARAM et al, 2012). A caseína comercial, é obtida a partir da precipitação ácida e essa é uma das principais proteínas com funcionalidade tecnológica utilizada em produtos como, bebidas lácteas, chocolates, coberturas, filmes comestíveis entre outros que possuem caseínas e caseinatos em sua formulação (ROMAN; SGARBIERI, 2005).

Combinações de produtos suplementados com proteínas e elaborados com culturas probióticas e ingredientes prebióticos, surge como uma proposta que responde a demanda de alimentos saudáveis e funcionais, sendo que a adição de diferentes proteínas no iogurte além de enriquecer o seu valor nutricional pode contribuir com a estrutura do gel. Neste contexto, a aplicação de cultura probiótica de *L. rhamnosus* imobilizada em suportes naturais com características prebióticas como os farelos acarretaria no desenvolvimento científico, de linha de produto e ainda surge como uma alternativa para aproveitamento de material excedente das linhas de beneficiamento de cereais, agregando valor aos mesmos.

2 OBJETIVOS

A seguir são apresentados os objetivos que nortearam a pesquisa sobre aplicação do *Lactobacillus rhamnosus* imobilizado em iogurte suplementado com proteína.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver iogurte suplementado com diferentes proteínas, adicionado de cultura probiótica imobilizada em suporte prebiótico de farelo de trigo e farelo de arroz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Imobilizar o *Lactobacillus rhamnosus* em farelos de trigo e farelo de arroz;
- II. Avaliar a imobilização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- III. Elaborar iogurte com a cultura probiótica na forma livre e imobilizada;
- IV. Suplementar os iogurtes com diferentes fontes proteicas, sendo elas a caseína ácida e caseína globular;
- V. Determinar o comportamento dos diferentes iogurtes quanto à textura, gordura, pH, sinérese e digestão simulada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica abordara assuntos pertinentes ao trabalho, como os materiais e métodos utilizados durante o processo experimental.

3.1 IOGURTE

A origem dos leites fermentados está relacionada com os Bálcãs, com o centro leste europeu e também com os países mediterrâneos. A produção desse produto é baseada na degradação e na acidificação do leite cru que ocorre após um certo tempo de estocagem, devido a presença de microorganismos presentes nesse meio (MORETTI, 2009).

O iogurte é um leite fermentado contendo ou não outras substâncias alimentícias, essas são obtidas através da desnaturação da caseína pela diminuição do pH do leite, que pode ser reconstituído e adicionado ou não de outros produtos lácteos. A fermentação desse produto é realizada com o cultivo de protosimbíóticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, esses podem ser acompanhados de forma complementar com outras bactérias ácido-lácticas, contribuindo para as características finais do produto (BRASIL, 2007).

Sendo um produto lácteo consumido no mundo todo, o iogurte possui alto valor nutricional e gera benefícios a saúde humana, principalmente se houver adição de componentes prebióticos e bactérias probióticas. Na produção tradicional, se tem o iogurte produzido a partir da interação de bactérias do ácido láctico no leite (TERPOU et al., 2017b). O sabor ligeiramente ácido, a diversidade de sabores e o valor nutricional são fatores que contribuíram para seu crescimento no mercado consumidor (MORETTI, 2009).

Tanto a textura como o flavor do iogurte, se devem pela atuação do *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e pelo *Streptococcus thermophilus*. Durante a observação destas bactérias, pode-se notar que o primeiro a crescer é o *S. thermophilus*, liberando algumas substâncias originadas da proteína do soro, e dessa forma estimulando o desenvolvimento do *L. bulgaricus*, que se faz necessário para se que se obtenha o produto final, neste caso, o iogurte (BRASIL, 2007).

A classificação dos iogurtes, acontece pela estrutura do coágulo e pela sua composição de gordura, havendo ou não a adição de outros ingredientes, como frutas, por exemplo. A Tabela 1

apresenta informações pertinentes aos tipos de iogurtes: firme ou consistente e iogurte batido (SILVA, 2007). No Anexo 01, é possível observar um fluxograma da fabricação dos iogurtes.

Tabela 5 - Tipos de iogurte, classificados pelo processo de elaboração

Iogurte tradicional (<i>set yogurt</i>)	Fermentação ocorre dentro da própria embalagem do produto, sem sofrer homogeneização. O produto é firme, podendo ser mais ou menos consistente.
Iogurte batido (<i>stirred yogurt</i>)	Fermentação acontece em fermentadeiras ou incubadoras, com isso se tem a posterior quebra do coágulo.
Iogurte líquido (<i>fluid yogurt</i>)	Fermentado em tanques e comercializado em embalagens plásticas.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

*Baseado nas informações de SILVA (2007) e Moretti (2009).

Alguns produtos que possuem como base os iogurtes, foram reformulados, dessa forma além de possuírem as culturas convencionais de iogurte, possuem culturas de *Lactobacillus acidophilus* e de *Bifidobacterium* ssp., então passaram a ser chamados de bio-iogurtes (SAAD et al., 2011a).

Existe uma competitividade na indústria de laticínios quanto ao segmento de produtos funcionais, essa demanda vem crescendo devido a tendência das mudanças do mercado consumidor, isso acontece também para manter a liderança tecnológica na indústria alimentícia (PENNA; THAMER, 2006).

3.2 CULTURAS LÁTICAS

A habilidade de fermentação, assim como a de coagulação do leite, foram as primeiras definições de culturas lácticas, e essas culturas incluíam os coliformes. O conceito mudou quando elas foram descritas como bactérias Gram positivas, onde os coliformes foram separados do grupo de bactérias lácticas (OLIVEIRA, 2015a).

Bactérias ácido lácticas (BAL), ou apenas bactérias lácticas, são um grupo de micro-organismos que está presente naturalmente em plantas, carnes e também a laticínios. São muito empregados na produção de alimentos, como bebidas lácteas e processamento de carnes (BRASIL, 2011). Segundo Moretti (2009) as BAL são descritas como gram positivas com preferência a

condições anaeróbicas, tolerantes ao ácido e produtoras de ácido láctico, sendo esse o produto principal. O grupo de culturas lácticas compreende diversos gêneros, entre eles estão o *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Vagococcus* (MOTTA; GOMES, 2015).

O processamento do iogurte é composto por duas culturas lácticas, sendo elas *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Dependendo das características envolvidas na temperatura de crescimento e desenvolvimento, as culturas podem ser divididas em mesofílicas ou termofílicas. Entre esses se tem o termo termofílico que na indústria descreve culturas ativas na faixa de 35 e 45°C (MORETTI, 2009; SILVA, 2007).

A atividade metabólica das bactérias da cultura láctica fica reduzida quando esta estocada em baixas temperaturas. Mas mesmo com sua atividade metabólica reduzida o produto final pode sofrer pós-acidificação. A pós-acidificação é maior nos primeiros sete dias da fabricação do iogurte e isso se deve ao consumo da lactose a uma atividade metabólica relativamente alta e a produção do ácido láctico. O *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* é o principal responsável pela pós-acidificação do iogurte (MORETTI, 2009).

As BAL, são agrupadas como homofermentativas e heterofermentativas, tendo como base o produto final da fermentação. As BAL homofermentativas produzem ácido láctico como principal produto da fermentação da glucose, já as heterofermentativas formam outras substâncias além do ácido láctico, como o ácido acético e o etanol (BRASIL, 2011; OLIVEIRA 2015a).

Culturas lácticas são importantes na utilização como culturas iniciadoras pela produção de ácido em diferentes meios e temperaturas, pelas atividades de proteinase e peptidase, autólise, resistência a bacteriófagos, produção de compostos voláteis e produção de compostos inibitórios (MOTTA; GOMES, 2015).

Pode ser entendida como cultura inicial a preparação microbiana de um grande número de células de pelo menos um organismo, e este será adicionado a matéria prima para que ocorra a produção de um produto fermentado, desta forma acelerando o seu processo de fermentação. BAL's possuem um papel importante nestes processos, possuindo uma história segura de aplicação e consumo na produção de alimentos fermentados (LEROY; VUYST, 2004).

Culturas congeladas e liofilizadas podem conter entre 10^9 e 10^{12} células ativas por grama. As culturas lácticas podem ser comercializadas na forma líquida, congelada ou liofilizada. Culturas com 10^{11} células por grama congeladas, são adicionadas em proporções equivalentes de 1 kg para

cada 10.000 litros de leite, resultando em um produto com contagem inicial de 10^7 UFC/g de produto (SILVA, 2007; MORETTI, 2009). Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), a contagem de bactérias lácticas totais que o iogurte deve apresentar é de no mínimo 10^7 UFC/g de produto.

3.3 CASEÍNA

O leite é de extrema importância na alimentação animal e humana, podendo ser considerado completo por possuir compostos essenciais para a vida. Proteínas do leite correspondem a caseínas e proteínas do soro (ROMAN; SGARBIERI, 2005).

A caseína está presente na forma de componentes esféricos, que são conhecidos como micelas de caseína possuindo um raio médio com cerca de 100 nm. A presença de partículas de fosfato de cálcio faz com que as caseínas se mantenham unidas dentro de complexos. A estabilidade da caseína micelar no leite acontece até o aquecimento de 100 °C (BALAKRISHNAN et al, 2018).

No leite, as micelas de caseína são estáveis, podendo suportar condições extremas durante o processo comercial. Mas vale ressaltar que sob algumas condições de temperatura e pH, pode ocorrer a interrupção da integridade coloidal das micelas e dessa forma resultar na floculação, diminuição de estabilidade, na gelificação e na separação de proteínas (SAUER; MORARU; 2012).

Segundo Anema (1997), mesmo as micelas de caseína possuindo uma notável estabilidade, e capacidade de suportar tratamentos severos, em certas condições a dissociação micelar pode acontecer pela formação de proteínas solúveis de caseína. A dissociação pode ocorrer pela adição de agentes caotrópicos, pela quelação de cálcio e também por causa de altas pressões hidrostáticas.

A caseína micelar e as proteínas globulares são importantes componentes estruturais e nutricionais em produtos alimentícios, sendo utilizados junto a formulação para melhorar a textura e a funcionalidade dos alimentos (SILVA et al, 2018).

Caseínas são utilizadas devido ao valor nutricional que possuem, e pelas suas propriedades físico-químicas e funcionais. Desta forma, pode-se citar as propriedades emulsificantes e a viscosidade (BELICIU; SAUER; MORARU, 2012). Tanto caseínas como caseinatos, são utilizados na panificação e em produtos cárneos (SAUER; DOEHNER; MORARU, 2012).

Existe uma tendência na incorporação de proteínas vegetais em laticínios, isso se deve a aceitação sensorial que misturas com proteínas lácteas e bioativos provindos de proteínas vegetais possuem (LIANG et al, 2016).

A produção em larga escala de concentrados de caseína micelar foi possível devido ao desenvolvimento da tecnologia de filtração por membrana, dessa forma a caseína micelar possui propriedades mais próximas do seu estado natural do que se fosse obtida por processos químicos. Uma das aplicações da caseína micelar obtida da forma anteriormente citada, é a fabricação de bebidas com alto teor de proteínas e com grande durabilidade de prateleira (BELICIU, SAUER, MORARU, 2012).

3.4 PROBIÓTICOS

O cientista russo Eli Metchnikoff, foi o primeiro a explicar os efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes no leite fermentado, por volta do século XX. Segundo ele, os povos bulgáricos possuíam boa saúde por causa das grandes quantidades de leite fermentado consumido (PINHEIRO, 2003).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e também a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos são micro-organismos vivos que geram efeitos benéficos a saúde do hospedeiro quando administrado em quantidades adequadas (FAO/OMS, 2006). No anexo 2, é possível observar um fluxograma exemplificando o comportamento de ingredientes probióticos e prebióticos no organismo.

Existe uma variedade de bactérias aeróbias e anaeróbias que fazem parte da microbiota intestinal, pelo fato de interagirem entre si são capazes de influenciar fatores imunológicos, microbiológicos e bioquímicos do hospedeiro. Conhecendo a microbiota intestinal, é possível adequar a alimentação com o objetivo de manutenção de bactérias que estão presentes no cólon. Sendo assim, micro-organismos probióticos, são capazes de corrigir algum desbalanceamento que tenha ocorrido nessa microbiota (ALMEIDA, 2016).

Segundo SILVA (2007), para linhagens de bactérias serem classificadas como probióticas, elas devem apresentar as propriedades abaixo:

- i. Habitante normal das espécies alvo;
- ii. Genética estável;

- iii. Não ser tóxica ou patogênica;
- iv. Aderência e colonização;
- v. Viabilidade populacional elevada;
- vi. Resistência ao suco gástrico e a bile;
- vii. Efeitos benéficos para a saúde;
- viii. Competir com a microbiota normal;
- ix. Qualidades organolépticas desejáveis;
- x. Propriedade imunoestimuladora.

Para ser considerado um iogurte probiótico, frequentemente são utilizadas as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium adolescentes*, essas devem conter um número de células viáveis esse $> 10^6$ por mL no produto até seu consumo (PINHEIRO, 2003). A Tabela 2, lista alguns exemplos de micro-organismos possuidores de características probióticas citadas acima.

Tabela 6 - Exemplos de micro-organismos que possuem características probióticas

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. infantis</i>	
<i>L. lactis</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Fonte: Kopp-Hoolihan, 2001.

O gênero *Bifidobacterium ssp.* é amplamente utilizada pela indústria. Em forma de bastonetes e sendo Gram-positivos, não produzem esporos e são anaeróbias. Por possuírem a capacidade de interação com células epiteliais do intestino, são capazes de modulação da

microbiota intestinal, resistem a valores de pH baixos e em testes *in vitro* suportam os ácidos biliares (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014; ALIMEIDA, 2016).

Lactobacillus rhamnosus é uma espécie pertencente ao grupo *Lactobacillus casei*, que possui importante relevância comercial para a indústria de alimentos, devido a sua utilização na produção de leites fermentados e como culturas starter na fabricação de queijos. Cepas desse grupo têm sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo frequentemente empregadas como probióticos em alimentos industrializados. Destaca-se, também, o fato delas poderem apresentar atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos, contaminantes e deteriorantes em alimentos (BARCELOS et al., 2018).

Probióticos são muito consumidos como parte da nutrição fermentada, laticínios fermentados, kefir, queijo e iogurte são exemplos mais comuns, já em produtos não lácteos, se tem malte e iogurte de soja. Em 2008, o mercado global de ingredientes probióticos, alimentos e suplementos era de 16 bilhões de dólares, em 2010 cerca de 21 bilhões e em 2015 31,1 bilhões, possuindo uma taxa de crescimento anual de 7,6%. Ao fazer uso de culturas probióticas, se tem o crescimento de microrganismos positivos na biota intestinal e a eliminação de bactérias nocivas, aumentando a imunidade do corpo humano (MISHRA, S. & MISHRA, H. N., 2012).

O desenvolvimento de probióticos eficazes aumenta a resistência contra patógenos. Puupponen-Pimiä et al. (2002), relatam que o emprego de culturas probióticas exclui micro-organismos potencialmente patogênicos e reforça os mecanismos naturais de defesa do organismo. Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização da mucosa intestinal, esta ação impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas.

A estabilização da microbiota intestinal, é um dos principais benefícios que os probióticos podem induzir. Tal é exercida pela atividade antagonista que o probiótico causa, frente a organismos patogênicos, resultando na produção de ácidos orgânicos e substâncias inibidoras, pela competição dos nutrientes, pelos mecanismos de exclusão competitiva e pela melhora do sistema imunológico (PUUPPONEN-PIMIA, 2002; BORBA; FERREIRA, 2012).

Probióticos possuem a capacidade de se manterem vivos em produtos fermentados, e conseguem sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, fornecendo melhorias na microbiota de consumidores periódicos desses tipos de produtos (SILVA, 2007).

Probióticos e prebióticos são conceitos de alimentos funcionais, que fornecem nutrientes básicos e promovem a saúde. Na microbiota intestinal humana alguns dos benefícios probióticos são: efeitos imunológicos e a competição contra micro-organismos que são indesejáveis nesse sistema. No intestino humano, existem diversas espécies de bactérias, sendo assim, essas influenciam as reações bioquímicas do hospedeiro. Quando em equilíbrio essa microbiota faz com que os micro-organismos patogênicos não consigam exercer os seus efeitos patogênicos (SANDERS, 1998; BECKER, 2009).

3.5 PREBIÓTICOS

Prebiótico pode ser definido com um ingrediente alimentar não digerível pelo hospedeiro, sendo fermentado no colón de forma seletiva, permitindo mudanças na composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal, assim melhorando a saúde do hospedeiro (SILVA, 2007; ALVES et al, 2009; FERREIRA, 2012).

Segundo Murarolli (2008), existem relatos que os prebióticos podem estimular o desenvolvimento de bactérias benéficas, sendo elas *Bifidobacterium ssp*, *Lactobacillus ssp* e *Eubacterium ssp*, essas utilizam alguns açúcares complexos como nutrientes. No entanto, prebióticos não se limitam apenas ao incentivo do desenvolvimento de organismos benéficos, mas também podem exercer efeitos sob a colonização do trato gastro intestinal por bactérias de origem patogênica.

Os prebióticos podem dificultar a multiplicação de patógenos, e isso gera benefícios a saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam de forma mais frequente no intestino grosso, mas pode impactar em micro-organismos do intestino delgado (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; SAAD, BEDANI, MAMIZUKA, 2011b;).

Quando se fala em prebióticos, a não-digeribilidade e a fermentação seletiva são processos que devem ser determinados e possuem grande importância. Para um substrato ser classificado como prebiótico, existem alguns critérios, são eles: (i) o substrato não pode ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou no intestino delgado; (ii) o substrato deve ser seletivo para as bactérias comensais que sejam benéficas no cólon, estimulando esses organismos a crescer; (iii) alterar a microflora para uma composição saudável sendo benéfico para o hospedeiro. (FULLER; GIBSON, 2000).

Fibras alimentares solúveis e insolúveis, proteínas, peptídeos e alguns lipídeos se destacam como prebióticos. Carboidratos não digeríveis são exemplos de fibras alimentares, esses resistem a passagem pelo sistema digestivo. Partes não digeríveis do vegetal são a celulose, as ligninas, hemiceluloses, pectinas, oligossacarídeos e os frutanos como inulina e oligofrutose. O termo frutano é empregado para descrever os oligo e polissacarídeos. Os frutanos do tipo inulina podem ser divididos em inulina e os compostos relacionados a ela, sendo esses a oligofrutose e os frutooligossacarídeos (FOS), sendo considerados os prebióticos modelos (ALMEIDA, 2016; SILVA, 2007).

Pode-se justificar a adição de prebióticos em produtos lácteos pela sua alta funcionalidade, sendo que o consumo de prebióticos vem sendo relacionado a benefícios fisiológicos como a redução dos níveis de triglicerídeos e também do colesterol (ALMEIDA, 2016).

3.6 AGENTE ENCAPSULANTE

Em um estado imobilizado, prebióticos podem aumentar as taxas de estabilidade e sobrevivência de probióticos durante o processamento e armazenamento. Fibras alimentares de cereais como de arroz e trigo, podem produzir efeitos fisiológicos benéficos, isso acontece por causa dos carboidratos não digeríveis, podendo também, atuar como prebiótico, para o crescimento e a sobrevivência das espécies probióticas (TERPOU et al, 2017a).

O trato gastrointestinal possui condições extremas para a sobrevivência de cepas probióticas, por isso a microencapsulação tem sido proposta com o intuito de melhorar a sobrevivência dessas culturas (MACIEL et al, 2014).

3.6.1 Farelo de trigo

Segundo Costabile et al (2008), consumir grãos integrais, está associado a efeitos benéficos para a saúde. O trigo é amplamente consumido no mundo todo, deste se tem a farinha de trigo que é muito utilizada na fabricação de pães, bolos e massas em geral. O farelo de trigo é um subproduto abundante, mas pouco explorado na alimentação humana, sendo que este fornece fibras e proteínas (SANTOS; MEDEIROS, 2016).

Os cereais, contêm grandes quantidades de fibras dietéticas, entre os benefícios para a saúde estão a redução da pressão arterial, melhor controle do peso e a função intestinal apropriada. O farelo de trigo, é rico em proteínas, óleos, fibras e outros nutrientes, sendo potencial para a imobilização de culturas probióticas para uso em produtos lácteos (TERPOU et al, 2017a).

Para aumentar a viabilidade de células probióticas nos produtos lácteos, ingredientes prebióticos são importantes. Sendo assim, subprodutos de cereais como o farelo de trigo são benéficos e promovem a sobrevivência de micro-organismos probióticos (TERPOU et al, 2018), considerando que os grãos de trigo, possuem amido granular e fibras dietéticas como celulose e hemiceluloses, tal pode ser usado para imobilização de BAL. Com um potencial caráter prebiótico, as fibras dietéticas aumentam a viabilidade do ácido láctico probiótico de bactérias ácidas (BOSNEA et al., 2009).

Em alimentos funcionais a aplicação de cereais pode ocorrer em substratos fermentáveis para o crescimento de probióticos, principalmente lactobacilos, pois possuem carboidratos não digeríveis, servindo como material encapsulante de probióticos (MISHRA, S., 2012; MISHRA, H. N., 2012).

3.6.2 Farelo de arroz

A constituição de um grão inteiro de arroz, é formado de vários tecidos, esses possuem estruturas diferenciadas. A casca possui de 15 a 30% do peso do grão, e isso depende de diversos fatores como: temperatura, estação do ano, práticas culturais e também a localização geográfica. A celulose e minerais são os maiores componentes da casca do arroz (DORS; PINTO; BADIEALE-FURLONG, 2009).

O farelo de arroz possui fitoquímicos, esses por sua vez possuem atividades antioxidantes que protegem os tecidos animais de doenças degenerativas provindas de radicais livres e envelhecimento (HEIDTMANN-BEMVENUTI; NORA; BADIALE-FURLONG, 2012). Esse farelo possui altos níveis de proteínas, lipídeos, teor de fibras elevados e baixo valor comercial. É muito usado para extração de óleos, na alimentação animal e também como fertilizante orgânico (GARCIA et al., 2012; OLIVEIRA, 2012).

A composição química do farelo de arroz depende de fatores como processos de moagem e também da composição química dos grãos. Muitos estudos vêm sendo feitos utilizando esse

componente, por causa de seu baixo custo e alto valor nutricional. Quando estabilizado possui uma vida útil de aproximadamente seis meses, em temperaturas abaixo de 30° C (OLIVEIRA, 2012).

Demirci et al. (2017), estudou o efeito do farelo de arroz como prebiótico, e *L. casei* probiótico em amostras de iogurtes, tendo em vista que esse farelo é rico em nutrientes, e gera benefícios a saúde humana.

A fibra do farelo de arroz possui alta capacidade de absorção de água e óleo, o que pode levar ao desenvolvimento de diversos produtos processados que requerem tais propriedades (GARCIA et al., 2012).

3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura, tem como base a quantificação de elétrons secundários emitidos, sendo que a medida de elétrons secundários permite definir de forma qualitativa a morfologia e a topografia amostral (AMADUCI, 2007).

A MEV, produz um novo conceito para estudos de morfologia, produzindo imagens em alta resolução e ampliação. As imagens são formadas através de um monitor que codifica os sinais gerados pelas interações entre elétron e amostra (AZEVEDO, 2010).

As amostras dos biocatalizadores foram avaliadas através do método de MEV, dessa forma foi possível observar e certificar a imobilização das células de *L.rhamnosus* no farelo de trigo sem tratamento alcalino (FTST), no farelo de arroz sem tratamento alcalino (FAST), no farelo de trigo deslignizado (FTD), farelo de arroz deslignizado (FAD), e nos imobilizados, sendo esses o biocatalizador de trigo (BT) e o biocatalizador de arroz (BA).

Para a coleta das amostras, foi utilizado fita dupla face de carbono sobre suporte de alumínio – stubs. Após metalização, os stubs foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL - JSM-6701F), com tensão de aceleração de 15 Kv. O aumento aplicado foi de 850x [4].

3.8 PERFIL DE TEXTURA

A textura de um alimento, afeta ativamente a aceitação de um produto no mercado pois esse é um atributo sensorial. Entende-se por textura a manifestação sensorial e funcional das

propriedades de um alimento, tal manifestação pode ser sentida pela visão, audição, tato e medidas cinéticas (SZCZESNIAK, 2002). Através de avaliações de textura instrumental e da aceitação sensorial é possível determinar a textura ideal de um alimento ou produto. Aparência, sabor e textura são algumas das qualidades de um alimento que fazem com que ele seja bem aceito pelo consumidor (GAUCHE, 2007; SOUZA et al, 2011).

A textura dos alimentos pode ser determinada pelos teores de umidade e gorduras, também pelos tipos e quantidades de carboidratos estruturais, sendo esses celulose, amidos e outros, também pode ser determinada pelas proteínas presentes. A perda de umidade ou gordura, formação ou a quebra de emulsões e géis, assim como a hidrólise de carboidratos pode causar a alteração da textura (FELLOWS, 2006).

Existem diversos estudos para avaliar a melhoria nutricional do iogurte, isso pode ser conduzido através da fortificação da proteína ou da fibra. Propriedades que envolvem a textura de iogurtes são indicativos da qualidade do mesmo (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017).

A adição de sólidos e o tratamento térmico são dois fatores relevantes que possuem grande influência nas características de textura de iogurtes. Ingredientes que possuem a adição de leite aumentam a firmeza do iogurte, entre esses ingredientes se tem o leite em pó integral ou desnatado, pectina, gelatina, soro, amido modificado e gomas (LIMA, 2011).

Iogurtes com baixo teor de gordura, são associados a uma textura pobre. A gordura é substituída normalmente por leite em pó desnatado, caseinato de sódio ou proteínas do soro do leite (SANDOVAL-CASTILLA et al, 2004).

A partir da classificação de alimentos sólidos e semi-sólidos, se teve a origem da descrição do perfil de textura instrumental (TPA) (SZCZESNIAK, 2002). A Tabela 3 descreve os parâmetros estabelecidos através do perfil de análise instrumental para alimentos semi-sólidos.

Tabela 7 - Parâmetros de textura instrumental de alimentos semi-sólidos e definições

Parâmetro de textura	Definição
Fraturabilidade	Força necessária para a primeira quebra (fratura) significativa da estrutura do produto.
Firmeza	Força máxima na primeira compressão, representa a força necessária para obter a deformação resultante.
Adesividade	Trabalho necessário para retirar a sonda do interior do produto, obtido pela área negativa do primeiro ciclo.

Coesividade	Representa a força das ligações internas do produto, obtida dividindo a área positiva do segundo ciclo pela área positiva do primeiro ciclo.
Elasticidade	Corresponde à recuperação da condição original do produto após a sua deformação, obtida dividindo a altura recuperada pelo produto do segundo ciclo pela altura obtida no primeiro ciclo.
Gomosidade	Força necessária para desintegrar um alimento semi-sólido, definido pelo produto da firmeza x coesividade.
Mastigabilidade	Trabalho necessário para mastigar um alimento sólido, definido pelo produto da gomosidade x elasticidade.

Fonte: Gauche, 2007.

De acordo com Mantovani et al (2012), sólidos não gordurosos devem estar nas faixas de 8,5 % e 10% para o iogurte batido, o produto tradicional possui uma textura mais firme com cerca de 12% de sólidos não gordurosos. Portanto, quanto maior for a porcentagem de sólidos haverá uma maior firmeza no gel, obtendo um produto mais firme.

3.9 SINÉRESE

A formação de gel, consiste na união de micelas de pectina, as forças de Van der Waals permitem que o gel possua uma rede tridimensional sólida, e dessa forma retenha na malha uma fase líquida, mas se houverem perturbações e alterações no equilíbrio ocorre a exclusão de água, e essa denomina-se sinérese (LICODIEDOFF, 2008).

A sinérese é algo indesejável durante a vida útil de um produto, pois ocorre a formação de uma camada de soro superficial em iogurtes, dessa forma ocasionando a rejeição por parte dos consumidores (HATANAKA, 2009).

A sinérese é um defeito comum em iogurtes e leites, para prevenção dessa separação, os fabricantes procuram adicionar mais sólidos, submetendo o leite a tratamentos térmicos e adição de estabilizantes. O produto da contração de um gel é conhecido como sinérese espontânea, onde não há aplicação de uma força externa, mas existe a instabilidade da rede do gel. Portanto, resulta na não retenção da fase aquosa. Já na sinérese por centrifugação, existe uma força aplicada que

mede o soro que sai do iogurte, relacionada com a capacidade que o gel tem em reter a água (BEZERRA, 2010).

Em alguns tipos de iogurtes, gomas e gelatina são usados para conferir um produto com textura mais consistente, dessa forma se tem a redução da sinérese (COSTA et al, 2013). Tanto a textura como a sinérese se modificam quando ocorre a adição de concentrado proteico de soro de leite nos produtos, ocorrendo uma maior firmeza no produto e a diminuição da sinérese (LIMA et al, 2011). De acordo com Moretti (2009), quanto maior for a sinérese, menos viscoso e mais granuloso o produto será.

Razões para que a sinérese aconteça incluem altas temperaturas na fase de incubação, concentrações de proteínas do soro altas quando relacionadas com as caseínas, concentração de sólidos totais baixas, possíveis alterações no produto que podem ocorrer durante estocagem e distribuição (GAUCHE, 2007).

O controle sobre as condições de fermentação e as operações de pós-incubação (resfriamento, bombeamento e armazenamento), são medidas que podem ser adotadas para que se evite a sinérese durante a fabricação do iogurte (HATANAKA, 2009).

Diante dessa revisão, o presente estudo se faz importante para que ocorra o entendimento sobre as interações entre probiótico e prebiótico, assim como a adição de caseínas, e pela análise compreender os benefícios que esses produtos podem oferecer a saúde humana quando ingeridos juntos e em quantidades adequadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este ítem apresenta a metodologia utilizada no presente estudo em relação a elaboração do iogurte e imobilização da cultura probiótica. As análises de microscopia eletrônica de varredura, físico-químicas, perfil de textura, sinérese e microbiológicas considerando os processos de simulação da digestão, foram realizadas no Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA CULTURA PROBIÓTICA

A cultura probiótica utilizada no presente estudo foi a do *L. rhamnosus*, gentilmente fornecida pela empresa SACCO do Brasil. O farelo de trigo (*Triticum aestivum*) foi adquirido do moinho Riqueza (Riqueza/SC) e o farelo de arroz (*Oryza sativa*) do Fumanence Alimentos (Morro da Fumaça /SC). Os farelos foram utilizados como agentes prebióticos e também como matriz de imobilização do probiótico buscando aumentar a sua estabilidade e sobrevivência durante o processamento, armazenamento e processo digestivo.

Para a imobilização da cultura probiótica, o farelo de trigo e o farelo de arroz foram tratados com solução alcalina de hidróxido de sódio 1% (m/v) para a deslignização das fibras, buscando a formação de nanotubos para posterior imobilização das células do probiótico nestes espaços. Assim, adicionou-se 500 mL de hidróxido de sódio em 200 gramas de farelo, sendo a mistura mantida durante três horas a temperatura de ebulição. Após realizou-se a lavagem dos farelos com água destilada até ocorrer a neutralização, verificada pela medida de pH. Os farelos foram acondicionados em estufa com temperatura de 105 °C durante 12 horas (TERPOU et al, 2017b), até valores de umidade para o farelo de trigo ($0,003 \pm 0,001$ %) e farelo de arroz ($0,023 \pm 0,001$ %) buscando avaliar a eficiência da secagem e garantindo um agente para imobilização de qualidade.

O *L. rhamnosus* foi inoculado em caldo MRS a 37 °C e propagada por três gerações, até a concentração de $10 \log \text{Ufc.g}^{-1}$, sendo o caldo centrifugado a 5.000 rpm durante 10 min. para separação das células para posterior imobilização nos farelos (TERPOU et al, 2017a). Todos os meios foram autoclavados a 120 ° C e a 1–1,5 atm por 15 minutos antes do uso.

O processo de imobilização ocorreu com a adição das células 5 gramas de células em 25 gramas de farelo de trigo ou arroz deslignificados, homogeneizados em meio MRS onde permaneceram incubados em shaker com agitação de 20 rpm, durante 48 horas a 37 °C de acordo com TERPOU et al, (2017a) com modificações, ressaltando que as células livres foram removidas do processo com lavagem sucessiva representando 20 % (v/v) do volume do meio, com solução estéril de água peptonada. Os biocatalizadores compostos do *L. rhamnosus* aprisionado naturalmente a cada um dos farelos de trigo (BT) e arroz (BA) foram distribuídos em placas de petry para congelamento em ultrafreezer à – 80 °C durante 24 horas e posterior liofilização (ilShin® America, série TFD). Os biocatalizadores foram armazenadas a -80°C para posterior adição no iogurte, sendo estes isentos de crioprotetores.

4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS PROBIÓTICAS IMOBILIZADAS

Para contagem do *L. rhamnosus* imobilizado em farelo de trigo e arroz, 10 g de biocatalisador (farelo imobilizado) foram misturados com 90 ml de solução de água peptonada, e realizada a diluição seriada, plaqueando em ágar MRS e incubada a 37 °C por 48 horas (TERPOU et al, 2017a). As contagens iniciais, dos farelos foram padronizadas a 9 log UFC/g de biocatalizador.

4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para analisar a conformação dos farelos após a deslignificação, bem como estes deslignificados impregnados de células do probiótico foi utilizado a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Assim, foram analisados o farelo de trigo deslignificado sem adição de probiótico (FTSP), e no farelo de arroz (FASP) e nos imobilizados, sendo esses denominados de biocatalizador de trigo (BT) e o biocatalizador de arroz (BA).

Para a coleta das amostras, foi utilizado fita dupla face de carbono sobre suporte de alumínio – stubs. Os stubs montados com as amostras foram recobertos com ouro em evaporador Sputtercoater Balzers SCD 004 (Bal-Tec, Alemanha). Após metalização, os stubs foram visualizados em microscópio eletrônico de varredura (JEOL - JSM-6701F), com tensão de aceleração de 15 Kv e aumento aplicado de x 850.

4.4 ELABORAÇÃO DO IOGURTE

A preparação do iogurte padrão (IP) foi realizada utilizando leite integral UHT da marca, Aurora (3% de gordura; 3,0% proteína e 8,55 % de extrato seco desengordurado); 0,5% de açúcar cristal (União) e 4% de leite em pó integral (Aurora) de acordo com formulação descrita por Ferreira, (2005) com modificações. O leite, açúcar e o leite em pó foram adicionados na Termomix Vorwerk, sob agitação (500 rpm) até atingir a temperatura de 90 °C, dividido em iguais porções de 500 mL em copos de becker estéreis, resfriados até a temperatura de 35 °C, para adição da cultura láctica (0,003%) (Thermophilic Yoghurt Culturs-YFL811 da marca Chr Hansen), previamente ativada, homogeneizados e acondicionamento em embalagens plásticas de polietileno com tampa e capacidade para 100 gramas e incubados em estufa a 42 °C até atingir pH de 4,5±0,05, sendo identificados de FPSP (formulação padrão sem probiótico). As adicionadas de 0,5 (p/v) % de células do probiótico livre (IPL) e/ou 0,5 (p/v) % do probiótico imobilizado em farelo de trigo (IPBT) e/ou 0,5 % do probiótico imobilizado em farelo de arroz (IPBA), foram padronizadas quanto a concentração de células viáveis do *L. rhamnosus*.

Além da formulação padrão (IP) com proteína oriunda do leite em pó, foram elaboradas da mesma forma anteriormente descrita, as adicionadas de 3,7 % de caseína ácida (CA) e/ou caseína globular (CG) (BEKAPLUS® BP 800), ambos fornecidos pela empresa ICL Foods. A composição destes consiste para CA: 90% de proteína, 2% de gordura, 1% de lactose, 2,5 % de cinzas e valor de pH médio de 4. Para CG: 80% de proteína, 2% de gordura, 15% de lactose, 8,5% de cinzas e valor de pH médio de 7,0, resultando nas seguintes formulações e identificações:

a) **iogurte padrão (IP):** com leite em pó desnatado: sem adição de probiótico (IPSP), com adição de probiótico livre (IPPL), com adição do biocatalizador de farelo de trigo (IPBT), com biocatalizador de farelo de arroz (IPBA).

b) **iogurte caseína ácida (ICA):** sem adição de probiótico (ICASP), com adição de probiótico livre (ICAPL), com adição do biocatalizador de farelo de trigo (ICABT); com adição do biocatalizador de farelo de arroz (ICABA).

c) **iogurte caseína globular (ICG):** sem adição de probiótico (ICGSP), com adição de probiótico livre (ICGPL), com adição do biocatalizador de farelo de trigo (ICGBT); com adição do biocatalizador de farelo de arroz (ICGBA).

Ao final do processo fermentativo as amostras de iogurte foram armazenadas em um refrigerador a temperatura de 4 ± 2 °C. Neste processo foram realizadas análises do pH ao longo da fermentação, físico químicas (textura, proteína, gordura, fibras e sinerese), análise de digestão simulada e avaliação microbiológica 24 horas após a elaboração.

4.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS IOGURTES

Foram coletadas amostras de 25 g de cada formulação de iogurte, para contagem de células viáveis, sendo estas suspensas em 225 mL de solução de água peptonada, homogeneizadas (Bagmixer 400 - VW, Interscience), diluídas em série (oito), e subsequentemente plaqueadas em meios seletivos conforme descrito em (TERPOU et al, 2017a) com modificações. Para avaliação da contagem do *L. rhamnosus* este foi inoculado em ágar MRS (cód. 69966 Sigma Aldrich) contendo 50 mg/L de vancomicina (cód. 75423 Sigma Aldrich) identificado como V-MRS e incubado a 37 °C por 48 horas.

O *Streptococcus thermophilus* foi incubado em meio M17 (cód. 63016 Sigma Aldrich) com 1% de lactose a 45 °C durante 48 horas. O *Lactobacillus bulgaricus* foi quantificado em ágar MRS (cód. 69966 Sigma Aldrich) com pH ajustado para 5,2 a 45 °C por 48 horas (ZAMBERLIN; SAMARZIJA, 2017). A contagem de bactérias mesofílicas totais foi realizada em ágar PCA (cod. 70139 Sigma Aldrich) em placa após incubação a 30 °C por 72 horas. As contagens de células foram expressas em log UFC.g⁻¹.

4.6 ANÁLISES DE pH, GORDURA, PROTEÍNA E FIBRAS DOS IOGURTES

A determinação da fibra alimentar total, foi realizada nos farelos de trigo e arroz pelo método AOAC 32-05 e AOAC 985.29. Neste, os farelos deslignificados secos foram submetidos a ação da α -amilase em pH 6 para hidrólise dos amidos. Para que ocorresse a precipitação das fibras solúveis foi adicionado solução de etanol (95%), sendo seco em estufa e pesado (BRASIL, 2011). Com a determinação de fibras nos farelos foi possível definir a quantidade adicionada em cada formulação de iogurte.

As formulações de iogurte foram avaliadas em relação ao pH através de um pHmetro de bancada (TERPOU et al, 2017a), proteínas pelo método Kjeldahl (BRASIL, 2006), a gordura pelo método de Gerber (BRASIL, 2006).

4.7 PERFIL DE TEXTURA

Para realizar a análise de textura dos iogurtes, foi utilizado um analisador de textura (CT-3; Brookfield Engineering Laboratories, Inc.), este foi executado com distância de penetração de 30 mm, usando uma sonda cilíndrica de acrílico com diâmetro de 25,10 mm e 20 mm de altura. A compressão, o relaxamento das amostras e o disparo foi de 4,5 g. A velocidade fixada da sonda foi de 1 mm/s. A amostra era cilíndrica, possuindo 50 mm de diâmetro, 65 mm de altura e 100g. A carga Trigger foi de 0,04 e a taxa de dados gerada foi de 50 pontos por segundo em dois ciclos. Para avaliar a textura do iogurte, foram utilizados parâmetros como coesão, adesividade e dureza. As medidas de textura foram feitas em quintuplicata (WANG et al, 2015).

4.8 SINÉRESE

Determinou-se através da sinérese, análise realizada após 24 do término da acidificação, nas formulações de iogurte, foi feita determinando o volume de soro desprendido de uma amostra de 100 mL de iogurte, disposta sobre uma peneira de aço inox (Mesh 120), acoplada a um funil e a uma proveta graduada de 50 mL a 6 °C durante 2 horas (HASSAN et al, 1996). A cada intervalo o volume do soro foi separado da amostra que foi obtida, desta forma foi possível estimar a taxa inicial da sinérese. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9 ANÁLISE DO PROCESSO DE DIGESTÃO

Após a produção dos iogurtes, foi feito o processo de digestão simulada, *in vitro*, dessa forma foi possível simular o processo de mastigação com saliva contendo α -amilase, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio com agitação de 200 rpm durante dois minutos. Para a contagem microbiológica na região do estômago, o pH foi alterado para dois e essa acidificação foi feita com ácido clorídrico, tratado com solução de pepsina durante 90 minutos com agitação de 130 rpm. No

duodeno o pH foi modificado para 5 com adição de bicarbonato de sódio e ficou em agitação por 20 minutos à 45 rpm. Por fim, no íleo o pH foi aumentado para 6,5 também com bicarbonato de sódio e ficou em agitação durante 90 minutos com rotação de 45 rpm. A contagem microbiológica foi feita em PCA, ágar MRS, M17 e V-MRS (TERPOU et al, 2017a).

Para avaliação da taxa de sobrevivência do *L. rhamnosus* foi utilizado a Equação 1, com base nas informações de Almeida (2016).

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)}: \left(\frac{\log UFC N1}{\log UFC N0} \right) \times 100 \quad (1)$$

O número total de células viáveis do probiótico após a etapa de simulação gástrica em cada etapa equivale a N_1 , e o número de células viáveis de *L. rhamnosus* inicial equivale ao N_0 , sendo anterior a simulação gástrica.

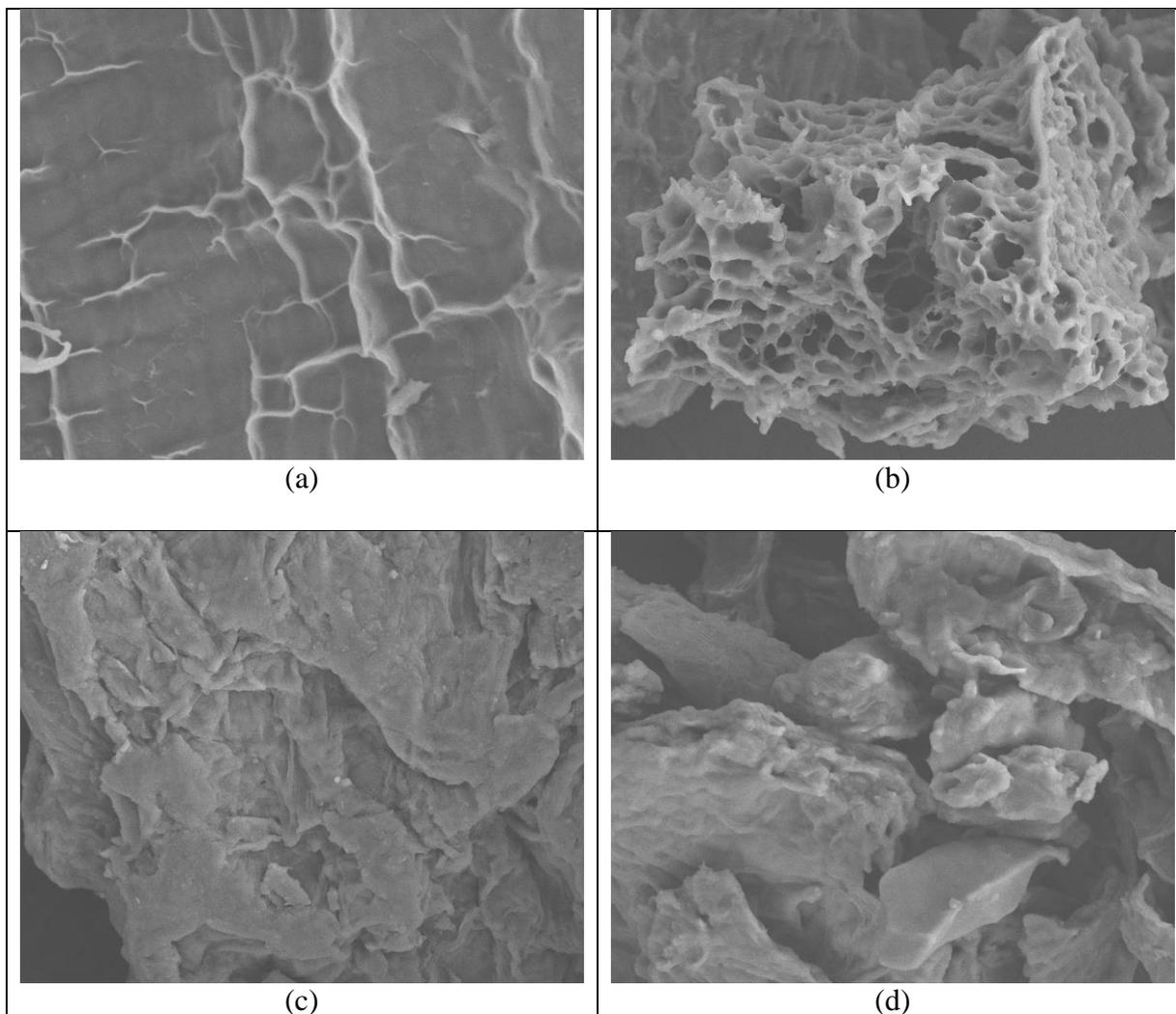
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nos tópicos abaixo são apresentados e discutidos os resultados da pesquisa.

5.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os biocatalisadores impregnados de *L. rhamnosus* foram avaliados quanto ao processo de imobilização por MEV em relação aos farelos deslignificados, sendo apresentados na Figura 1 (a) a superfície de amostras de farelo de trigo sem a adição do probiótico (FTSP) e com adição do *L. rhamnosus* na Figura 1 (c), o biocatalizador (BT). A Figura 1 (b) demonstra a superfície das amostras do farelo de arroz sem a adição do probiótico (FASP) e com o probiótico a Figura 1 (d), biocatalizador (BA).

Figura 1 –Imagens de microscopia eletrônica de varredura das superfícies dos farelo deslignificados de trigo (a) e de arroz (b), bem como do biocatalizador trigo -BT (c) e biocatalizador arroz -BA (d), com ampliação de x 850



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Os dois farelos após deslignificação (Fig 2a e Fig 2b), apresentaram estrutura mais porosa, o que indica realmente ter ocorrido a exposição da parede celular, assim com o observado por TERPOU et al. (2017a), para o farelo de trigo com ampliação de x 1000. Para o de arroz (Fig. 2 (b)), considerando que consistem em subprodutos obtidos após a separação da camada externa do endosperma amiláceo (incluindo o Pericarpo, Testa, Hialina e Aleurona) (Hemery et al., 2007). A composição em fibra bruta consiste em aproximadamente 10 % para farelo de trigo (NUNES et al., 2001) e 13,2 % para farelo de arroz (DAL MORO et al., 2004; POMERANZ & ORY, 1982).

Dias et al. (1994) encontrou, no farelo de arroz fresco, os seguintes teores de celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente: 2,64 g 100 g⁻¹, 17,3 g 100 g⁻¹ e 20,9 g 100 g⁻¹ e Luh, Barber e Barber (1991) encontraram valores de lignina de 7,70-13,11 g 100 g⁻¹. Já para o farelo de trigo seriam as frações de celulose, lignina, arabinosilanos (AX) e β -glucanos (Nordlund et al., 2013). Há relatos sobre o preparo de materiais ricos em celulose para desenvolvimento de bioprocessos utilizando *Trichoderma reesei* para a deslignificação de celulose e preparo das matrizes (CHEN et al, 2005). O maior conteúdo em fibras no farelo de arroz em relação ao trigo, bem como a presença de hemicelulose possa estar relacionado a diferença da formação da nova estrutura após a deslignificação desta fração.

Nas Figuras 2 (c) e 2 (d) é possível verificar que houve o preenchimento das superfícies dos farelos, pelo *L. rhamnosus* sendo assim denominado de biocatalizadores, buscando realizar a proteção física da cultura probiótica perante o suco gástrico, e a própria condição do meio ácido do iogurte de acordo com o relatado em SOUKOULIS et al, (2007), TERPOU et al., (2019), DOKOOHAKI et al.,(2019). Cabe ainda ressaltar que os cereais assim como, seus subprodutos, podem estimular o crescimento e a sobrevivência das bactérias ácido lácticas (BAL) (TERPOU et al, 2017a; VERRUCK, 2017).

Neste sentido, estes processos podem contribuir para a manutenção de culturas probióticas em iogurte, as quais são amplamente reconhecidas pela ciência e pela indústria (CUMMINGS; MACFARLANE, 2002; TERPOU et al, 2017a; TERPOU et al, 2017b; PENNA; THAMER, 2006), considerando que meio gástrico pode causar danos as células bacterianas, ressaltando a importância da utilização matrizes para proteção (CHEN et al, 2005; TERPOU et al, 2017a). As contagens dos biocatalizadores trigo e arroz apresentaram 9 log UFC/g.

5.2 PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

O tempo de fermentação dos iogurtes foi relacionado ao pH buscando monitorar a desestabilização do complexo de caseínas e as proteínas do soro quando o valor de pH chega ao ponto isoelétrico (4,6 e 4,7), acarretando a formação do gel característico aos iogurtes (SOUKOULIS, 2007), sendo que este processo pode ser evidenciado nas diferentes formulações na Figura 3, assim como no Apendice A, considerano que o controle de pH é uma das maneiras

de monitorar a produção de iogurte, visto que este apresenta relação com a acidez e o desenvolvimento microbiológico (BETT et al. 2017).

O tempo de fermentação do iogurte, até atingir o pH de 4,5 (TERPOU et al, 2017a) devido a produção de ácido lático pelas bactérias lácticas, foi de 270 min., nas formulações elaboradas com fonte de proteína do leite em pó (IP) (Fig. 3a), e com caseína globular (CG) (Fig. 3c), demonstrando que estas fontes de proteína não influenciaram no desenvolvimento da cultura iniciadora, já com caseína ácida (ICA) (Fig. 3b), observamos que o pH alvo foi atingido aos 240 min de processo, possivelmente devido a condição de desenvolvimento da cultura iniciadora (tem as condições de pH para ação das iniciadoras, pode colocar aqui se tiver relação com o inicial quando adicionou a caseína ácida pq não pode ser igual aos do leite e da globular).

De acordo com TERPOU et al (2017a), os baixos valores de pH podem estar relacionados também ao desenvolvimento das células imobilizadas devido a ação protetora do farelo, agindo contra o efeito inibidor da concentração do ácido lático que é crescente durante a produção. Ainda segundo Bezerra (2010), pode ocorrer certa influência na coagulação devido a composição do leite ou suas misturas, modificando a atividade bacteriana. O teor de gordura ligado aos teores de sólidos totais do leite, pode influenciar o crescimento de lactobacillus. A fase lag é maior quando se tem o aumento do teor de sólidos presentes, e a fase de crescimento logaritmo se torna mais curta.

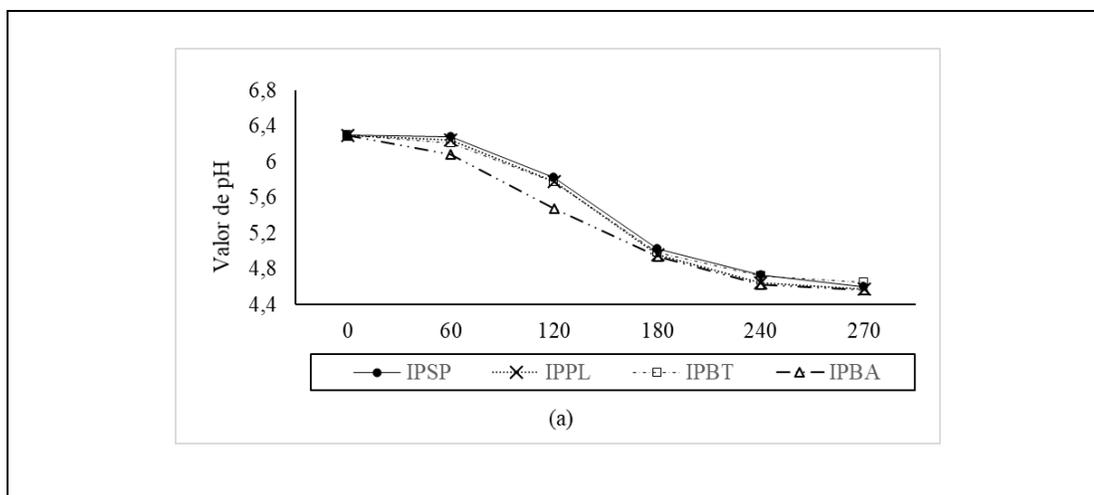
As formulações com adição do probiótico imobilizado em farelo de arroz (IPBA) apresentou maior queda do pH evidenciada já em 60 min. de fermentação quando comparada as demais (IPSP, IPPL, IPBT), o que pode estar associada a sua composição em fibra bruta (DAL MORO et al., 2004; POMERANZ & ORY, 1982), comparando com IPSP sem probiótico ou IPPL probiótico livre. A proteção *L. rhamnosus* pelo FA na formulação IPBA quando comparada ao IPB, pode estar relacionada com a aparente maior formação de poros na Fig. (2b) em relação a Fig. (2a) do FT deslignificado o que pode ter influenciado positivamente para proteção das células impregnadas conforme observado em TERPOU et al, (2017a), bem como pela ação prebióticos (HEIDTMANN-BEMVENUTI; NORA; BADIALE-FURLONG, 2012; DAL MORO et al., 2004, DAS et al., 2019) criando um ambiente mais adequado para o *L. rhamnosus*.

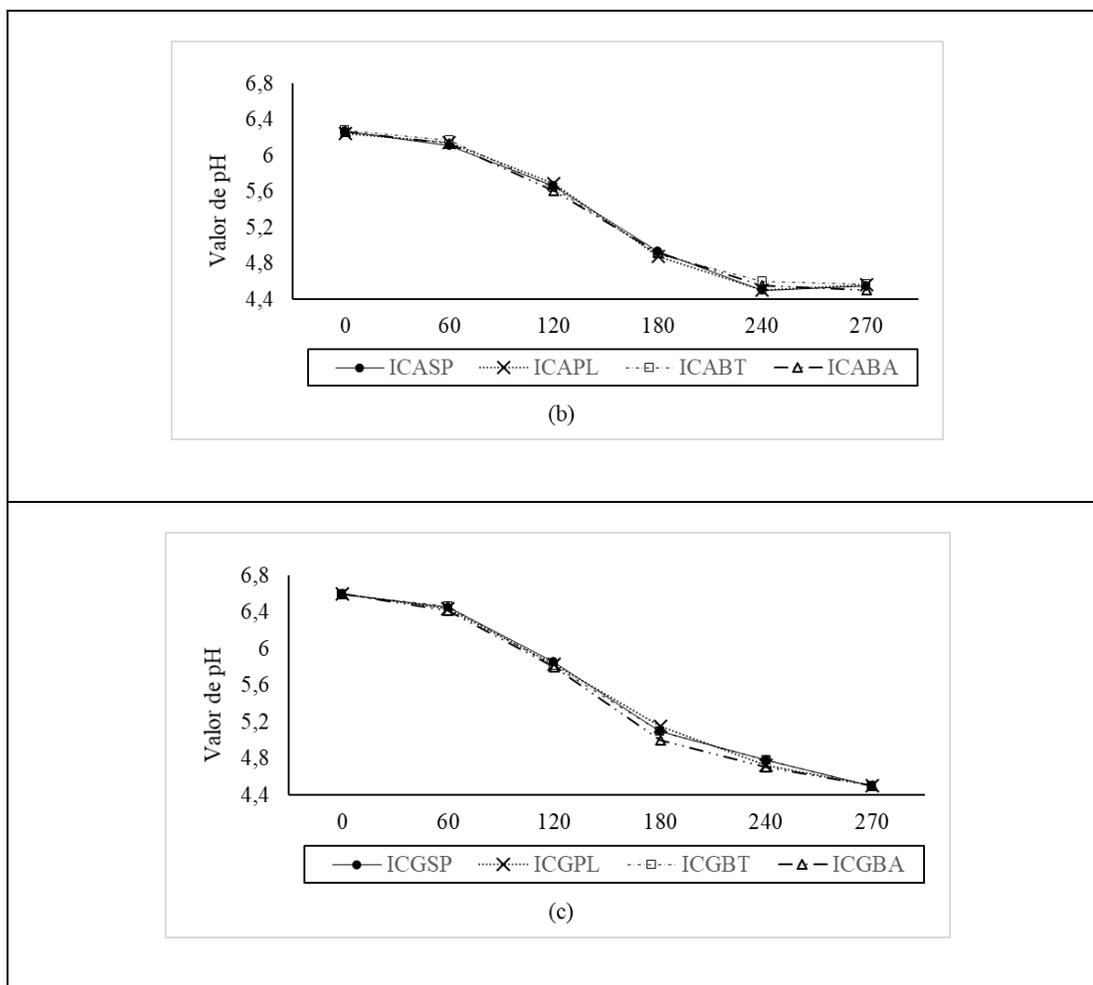
Nas formulações quando a caseína ácida ou a caseína globular foram suplementadas ao iogurte e adicionadas com BA não ocorreu diferença entre as curvas de fermentação indicando

que a cultura probiótica não influenciou o processo fermentativo, visto que as curvas na Figura 3 (a), (b), (c) são similares quando comparamos os iogurtes sem adição de probiótico (SP) aos adicionados deste na forma livre (PL) ou imobilizada (BT, BA), indicando que a diminuição do pH é ocasionada pela cultura iniciadora ou influenciada pela caseína ácida.

Os resultados indicaram que a cepa de *L. rhamnosus* realmente apresenta característica de baixa acidificação, sendo indicada para aplicação em formulações de iogurtes sem interferir no processo, conforme já indicado pelo fornecedor da cultura (SACCO, 2009), mesmo que a utilização de diferentes cultivos bacterianos de cultura iniciadora, a composição do leite assim como seu processamento, a adição de soro, etapas de pós-fermentação e temperatura de armazenagem podem influenciar o pH de produtos lácteos (COSTA et al, 2013).

Figura 2 - Perfil do valor de pH em iogurtes formulados com leite em pó definidos como iogurte padrão (IP) nas seguintes variações: (a) IPSP (sem probiótico), IPPL (probiótico livre), IPBT (biocatalizador trigo), IPBA (biocatalizador arroz). Os iogurtes elaborados com caseína caseína ácida (ICA) nas seguintes variações: (b) ICASP (sem probiótico), ICAPL (probiótico livre), ICABT (biocatalizador trigo), ICABA (biocatalizador arroz). Os iogurtes elaborados com caseína caseína globular (ICG) nas seguintes variações: (c) ICGSP (sem probiótico), ICGPL (probiótico livre), ICGBT (biocatalizador trigo), ICGBA (biocatalizador arroz).





Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

5.3 ANÁLISE DE pH, GORDURA, PROTEÍNA E FIBRAS DOS IOGURTES

Na Tabela 4, pode-se visualizar as quantidades de proteínas, gorduras e fibras presentes nas formulações de iogurtes elaboradas com diferentes fontes de proteína: leite em pó (IP), caseína ácida (ICA) e caseína globular (ICG) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador farelo de trigo (BT) e biocatalizador farelo de arroz (BA), sendo as formulações adicionadas dos biocatalizadores as que foram quantificadas em termos de fibras, ICABT e ICGBT resultando em 0,37% e ainda as ICABA, ICGBA com 0,33%.

Os teores de gordura das formulações não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), conforme descritos na Tabela 4. As proteínas apresentaram valores de 4,45 das formulações

elaboradas com leite em pó, 4,85 as com caseína globular e 6,30 com a caseína ácida. As diferenças entre o conteúdo proteico das caseínas comerciais justificam os resultados, sendo que a caseína ácida possui 90% de proteína, em comparação a 80% da caseína globular de acordo com o indicado na ficha técnica dos suplementos fornecidos pela ICL FOODS.

Tabela 8 - Análise da concentração de proteína e gordura presente nos iogurtes

Iogurte	Proteína (%)	Gordura (%)	Fibras (%)
IPSP	4,33 ± 0,03 ^a	3,10 ± <0,01 ^a	SF*
IPPL	4,45 ± 0,03 ^a	3,15 ± 0,03 ^a	SF*
IPBT	4,50 ± 0,03 ^a	3,05 ± 0,03 ^a	0,37 ^a
IPBA	4,50 ± 0,02 ^a	3,15 ± 0,03 ^a	0,33 ^a
ICASP	6,25 ± 0,03 ^b	3,00 ± <0,01 ^a	SF*
ICAPL	6,24 ± 0,02 ^b	3,15 ± 0,03 ^a	SF*
ICABT	6,35 ± <0,01 ^b	3,10 ± <0,01 ^a	0,37 ^a
ICABA	6,38 ± 0,01 ^b	3,05 ± 0,02 ^a	0,33 ^a
ICGSP	5,82 ± 0,02 ^b	3,05 ± 0,03 ^a	SF*
ICGPL	5,86 ± 0,02 ^b	3,10 ± <0,01 ^a	SF*
ICGBT	5,96 ± <0,01 ^b	3,10 ± <0,01 ^a	0,37 ^a
ICGBA	5,95 ± 0,02 ^b	3,10 ± 0,02 ^a	0,33 ^a

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

*Sem adição de farelo. Médias ± desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas, em cada formulação de iogurte adicionada de diferentes proteínas, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.4 PERFIL DE TEXTURA

A qualidade do iogurte e a aceitação do consumidor podem ser estabelecidas por parâmetros analíticos, entre os principais está a textura (Vieira et al., 2019). É um critério chave usado para determinar a qualidade organoléptica dos produtos lácteos (Steele et al., 2015).

A Tabela 5 apresenta o perfil de textura após 24 horas de elaboração das formulações. A firmeza do iogurte estabelece a força necessária para atingir uma certa deformação (MUDGIL; BARAK; KHATKAR, 2017). Pode ser observado na Tabela 5, que as avaliações de dureza foram

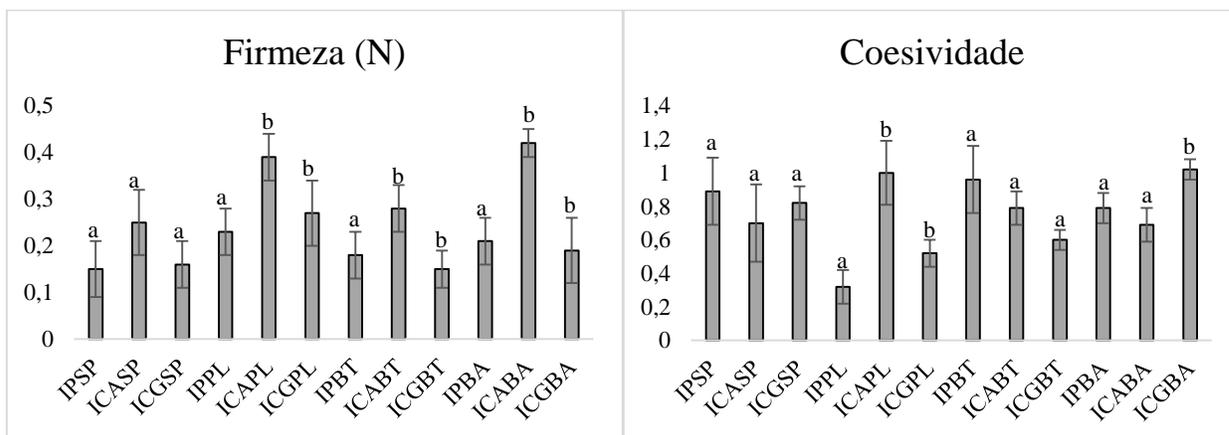
impactadas pela adição das caseínas apresentando maiores valores (ICA e ICG), possivelmente as interações aumentaram com a adição das caseínas, resultando em iogurte mais consistentes (WANG et al, 2015).

Os dados da Tabela 5 demonstram que não houve diferença estatística entre a firmeza dos iogurtes elaborados com o leite em pó definidos como IP (IPSP, IPPL, IPBT, IPBA) ($p \leq 0,05$), assim como entre os suplementados com CA e CG. Contudo entre o sem suplementação IP com os adicionados de CA e CG houve diferença significativa ($p \leq 0,05$), demonstrando que com a mesma fonte de proteína não ocorre alteração da firmeza dos iogurtes, até nos adicionados de biocatalizadores, indicando que a suplementação exerce influência sobre esta característica em relação ao elaborado somente com leite em pó.

Os iogurtes que possuíam probióticos na formulação, sendo este livre ou imobilizados (FA e BA em sua composição apresentaram um aumento na firmeza, esse fator foi observado também por Mudgil, Barak e Khatkar (2017) em trabalho utilizando fibra dietética em iogurtes. Em iogurtes padrões avaliados por Vieira et al., (2019) indicaram valores de firmeza de 0,40 N após 1 dia de estocagem em refrigeração, sendo este maior que os obtidos no presente estudo, mesmo dos suplementados e adicionados de biocatalizadores, os quais apresentaram os maiores valores.

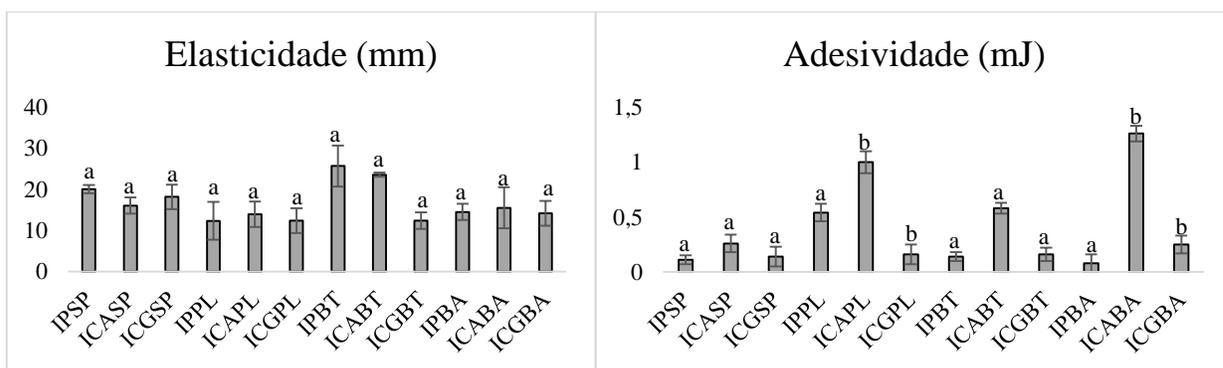
A adesividade, parâmetro que reproduz o tempo que o produto permanece na boca durante a mastigação, mostrou que o biocatalizador elaborado com o arroz apresentou diferença significativa ($p < 0,05$). Os tratamentos não demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) para as avaliações de coesividade, elasticidade e gomosidade, tendo como parâmetro o experimento em questão. O Apêndice B, apresenta mais dados experimentais de TPA.

Figura 3 - Perfil textura dos iogurtes formulados com diferentes fontes de proteína: leite em pó (IP), caseína ácida (ICA) e caseína globular (ICG) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico immobilizado em biocatalizador farelo de trigo (BT) e biocatalizador farelo de arroz (BA)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

*Médias \pm desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas, em cada formulação de iogurte, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

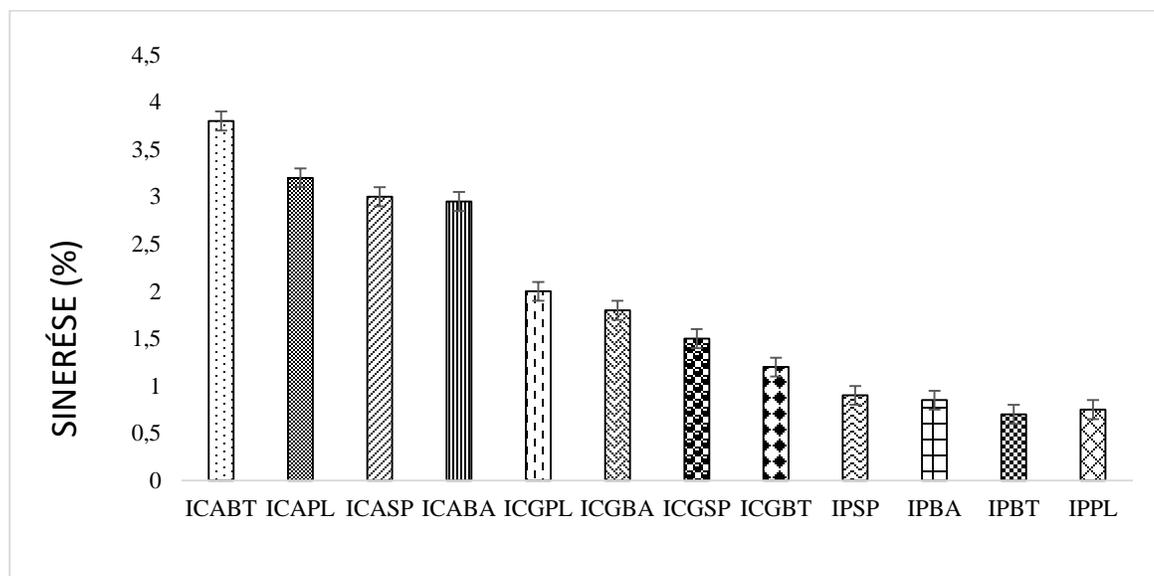
*Médias \pm desvio padrão seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas, em cada formulação de iogurte, diferem estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

5.5 SINÉRESE

A sinérese dos iogurtes formulados com leite em pó (IP), com caseína ácida (ICA) e com caseína globular (ICG), avaliados sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico immobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA) são apresentadas

na Figura 3, onde observou-se que os iogurtes elaborados com fonte proteica de leite em pó apresentaram as menores sinéreses.

Figura 4 - Sinérese dos iogurtes formulados com leite em pó (IP), com caseína ácida (ICA) e com caseína globular (ICG), avaliados sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

Segundo Oliveira (2015a), o teor de sólidos totais do leite, o resfriamento imediato, a homogeneização e a adição de hidrocolóides são fatores que podem auxiliar na prevenção da sinérese, mas a queda de pH durante a acidificação pode corroborar com o aumento de sinérese, que acontece porque as cadeias de caseína sofrem um rearranjo, tendo em vista que as maiores sinéreses ocorreram quando os iogurtes foram elaborados com caseína ácida (CA). A adição da cultura probiótica livre ou nos biocatalizadores farelo de trigo (BT) e farelo de arroz (BA) parecem não ter afetado a sinérese, considerando que resultaram em valores variados de acordo com a fonte proteica utilizada. A formulação ICABT e ICABA resultaram em valores de 3,80 a 2,95 de sinérese em comparação a elaborado com leite em pó, IPBT e IPBA, com 0,80 e 0,85 respectivamente.

A precipitação de caseínas com pH equivalente a 4,6 relaciona-se com o processo de separação do soro. A formação do gel é ligada ao rearranjo de proteínas, dando ênfase às caseínas, a sua forma de estruturação pode alterar a influência na consistência do coágulo que se formará (BEZERRA, 2010).

Estudos demonstram que o aumento da concentração da proteína diminuiria a sinérese, considerando que aumentaria a quantidade de água ligada e consequentemente, na firmeza do gel resultante, contudo no presente estudo este comportamento não foi observado para a suplementação de proteína pela caseína ácida (MAHOMUD; KATSUNO; NISHIZU, 2017).

5.6 ANÁLISE DO PROCESSO DE DIGESTÃO

A contagem microbiológica em meios seletivos da digestão simulada (*in vitro*) são apresentadas na Figura 5, Mastigação (a), esôfago – estômago (b), duodeno (c) e íleo (d), dos iogurtes formulados com leite em pó (IP) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA). No Apêndice C é possível observar dados da contagem microbiológica da digestão simulada (*in vitro*).

Existe um conceito de que prebióticos se restringem apenas a ingredientes fermentáveis, mas proteínas de leite como as caseínas quando são aliadas aos probióticos, auxiliam na viabilidade de micro-organismos em alimentos. Esse fato se deve ao nitrogênio que a caseína oferece aos micro-organismos encontrados em aminoaçúcares (ALMEIDA, 2016; TERPOU et al, 2018).

Figura 5 - Contagem microbiológica em meios seletivos da digestão simulada (*in vitro*): Mastigação (a), esôfago – estômago (b), duodeno (c) e íleo (d), dos iogurtes

formulados com leite em pó (IP) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA) (continua)

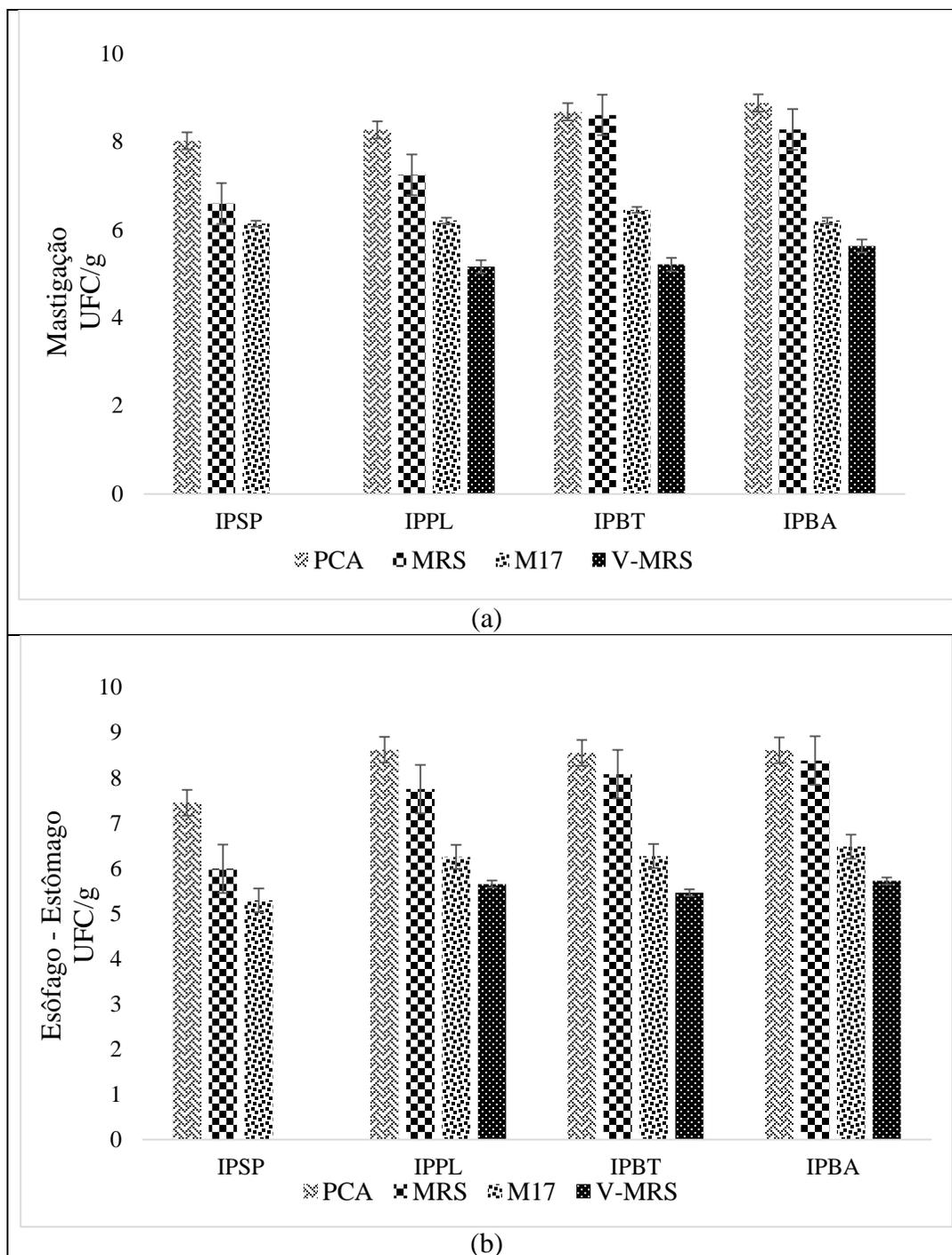
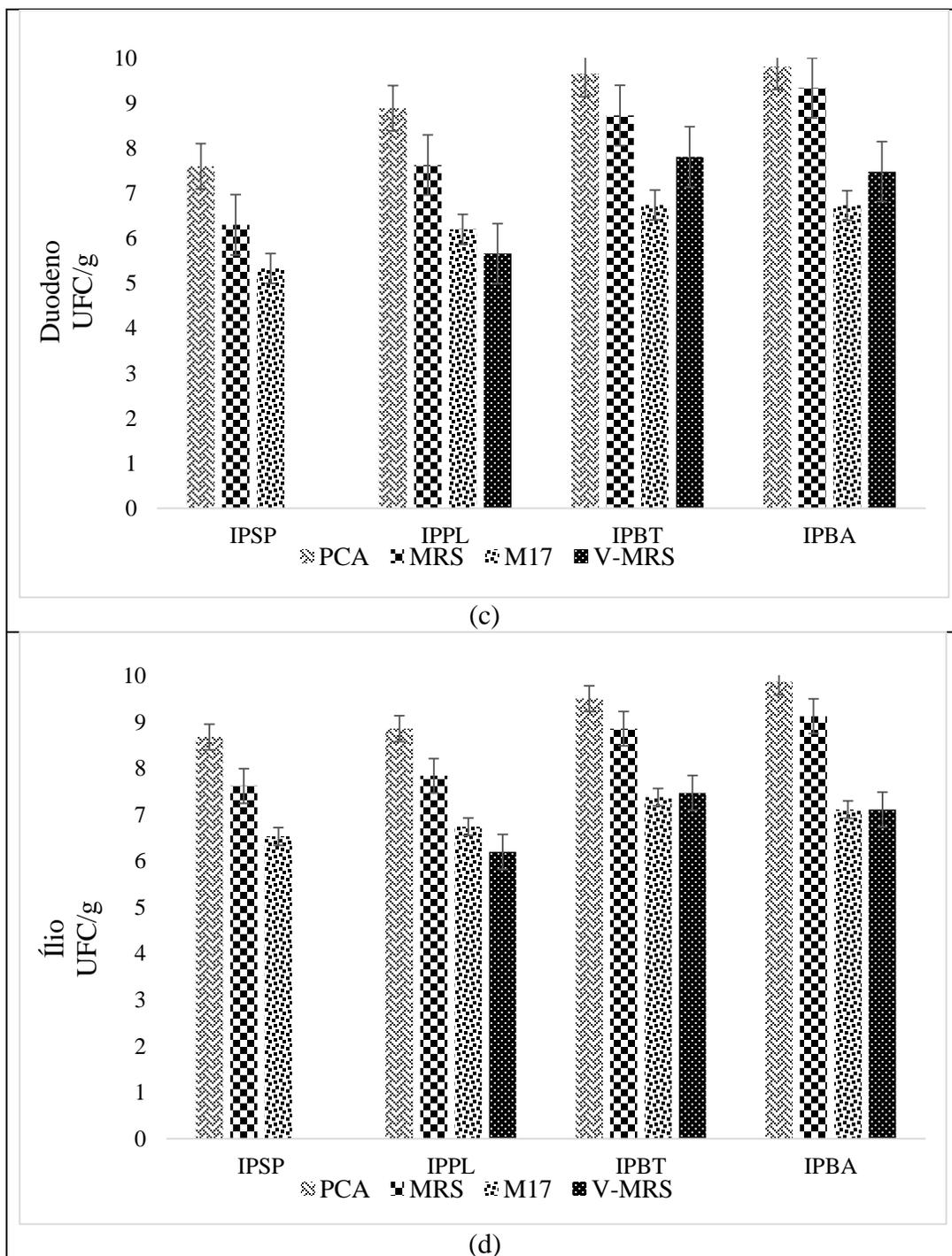


Figura 6 - Contagem microbiológica em meios seletivos da digestão simulada (in vitro): Mastigação (a), esôfago – estômago (b), duodeno (c) e íleo (d), dos iogurtes formulados com leite em pó (IP) avaliando sem adição de probiótico (SP), com probiótico livre (PL) e probiótico imobilizado em biocatalizador trigo (BT) e biocatalizador arroz (BA)



Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

A Figura 6 apresenta que os biocatalizadores de farelo de trigo e farelo de arroz proporcionaram um aumento na viabilidade do probiótico *L. rhamnosus*, considerando as contagens obtidas após o processo de digestão (d), em meio V-MRS (específico para probiótico *L. rhamnosus*) apresentou contagem de 7,47 log UFC.g⁻¹ e 7,11 log Ufc.g⁻¹ respectivamente, em comparação ao livre 6,20 log Ufc.g⁻¹. Houve uma pequena diminuição da viabilidade celular no momento (b), das células livres se comparado com as células imobilizadas.

Assim como observado no trabalho de Terpou et al (2017a), a imobilização aumentou a viabilidade do probiótico nas condições gástricas simuladas. Dessa forma fazendo com a imobilização dos farelos sejam úteis como forma de aumentar a viabilidade do *L. rhamnosus*, fazendo com que sobreviva em números elevados durante a fermentação e a passagem pelo trato gastrointestinal.

Na Tabela 5, podem ser observados valores de taxa de sobrevivência do probiótico, através desses valores é possível compreender o comportamento do probiótico durante a passagem pelo trato gastrointestinal *in vitro*.

Tabela 5 - Taxa de sobrevivência (%) da cultura láctica na simulação *in vitro* do trato gastrointestinal no meio V-MRS específico para *L. rhamnosus*, em Iogurte Padrão com Probiótico Livre (IPPL), Iogurte Padrão com Biocatalizador de Trigo (IPBT) e Iogurte Padrão com Biocatalizador de Arroz (IPBA)

TAXA DE SOBREVIVÊNCIA (%)			
MASTIGAÇÃO (a)	TEMPO 1D	TEMPO 10D	TEMPO 20D
IPPL	80,37±1,39	78,35±1,55	65,02±2,02
IPBT	70,41±0,77	57,45±2,20	51,09±1,20
IPBA	73,50±0,92	56,21±1,05	47,67±1,47
ESÔFAGO-ESTÔMAGO (b)	TEMPO 1D	TEMPO 10D	TEMPO 20D
IPPL	88,01±1,39	64,35±1,08	55,87±1,07
IPBT	73,78±0,77	47,45±2,35	45,66±1,06
IPBA	74,67±0,92	45,44±1,66	40,05±2,10
DUODENO (c)	TEMPO 1D	TEMPO 10D	TEMPO 20D
IPPL	88,16±0,14	66,35±2,51	35,06±1,45
IPBT	105,54±1,35	68,55±1,45	40,08±1,56
IPBA	97,65±1,37	69,46±2,66	33,77±2,10
ÍLEO (d)	TEMPO 1D	TEMPO 10D	TEMPO 20D
IPPL	96,57±1,94	62,05±2,03	30,45±1,05

IPBT	100,95±1,65	68,33±1,88	38,98±1,23
IPBA	92,82±0,70	69,09±2,10	25,45±1,68

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

O pH é um fator importante e pode influenciar na sobrevivência de culturas probióticas nos alimentos, sendo que a sobrevivência se torna limitada em valores de pH baixo (DUNNE et al, 2001; MADUREIRA et al, 2005). Na simulação b, a taxa de sobrevivência dos probióticos obteve um aumento nos iogurtes com biocatalizador se comparados os mesmos valores na etapa a (MADUREIRA et al, 2011), indicando que o prebiótico cumpriu sua proteção durante o baixo valor de pH presente no estômago.

Na etapa c, onde o pH era 5, pode ser observado um aumento relevante de sobrevivência do *L. rhamnosus*. Segundo Madureira et al (2011), esse aumento pode ser relacionado a recuperação de células lesadas, ocorrido pelas etapas anteriores. Já no Óleo (d), não houveram diferenças extremas, isso pode ser explicado pelo fato dessa parte do sistema possuir um pH mais neutro, *in vitro* cerca de 6,5 dessa forma ainda poderia estar acontecendo a recuperação do probiótico.

Através da Tabela 6, também é possível observar que a taxa de sobrevivência do probiótico foi maior utilizando o biocatalizador de trigo (c e d), e dessa forma sendo a melhor opção para utilização em produtos lácteos, seguido do biocatalizador de arroz.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, a produção de iogurte utilizando como probiótico cepa de *L. rhamnosus* imobilizada em farelo de trigo e farelo de arroz, se mostrou eficiente, onde os resultados mostraram que os biocatalizadores de trigo e arroz favoreceram a viabilidade das bactérias lácticas após passarem pelo sistema gástrico. Os resultados obtidos na simulação gástrica confirmam o potencial dos biocatalisadores liofilizados prontos para uso na produção de iogurte probiótico.

O enriquecimento proteico com caseína ácida e caseína globular se mostrou eficiente, as amostras que utilizaram o suplemento proteico atingiram um maior nível proteico e essa elevação da proteína total não trouxe maiores impactos do ponto de vista do perfil de textura e da avaliação de sinérese.

O desenvolvimento deste trabalho demonstrou que é possível desenvolver um produto que possa ser uma fonte suplementar de proteína atendendo dietas específicas e agregando benefício ao consumidor no que diz respeito a propriedade probiótica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, A.M. Incorporation of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* into infantfoods inhibit proliferation of toxicogenic *Bacillus cereus* strains. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 18, p. 101013, fev. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISO 4833**: Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Métodos horizontais para enumeração de microrganismos – Técnica de contagem de colônias a 30°C , Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

ALMEIDA, J. S. O. **Avaliação do efeito protetor da matriz de queijo tipo Mascarpone adicionado de Bifidobacterium BB-12**. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2016.

ALVES, L. L. et al. Aceitação sensorial e caracterização de frozen yogurt de leite de cabra com adição de cultura probiótica e prebiótico, **Ciência Rural**, Santa Maria, 2009.

AMADUCI, M. R. L. **Efeitos do Campo Eletromagnético em Células e Bactérias**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ANEMA, S. G.; KLOSTERMEYER, H. Heat-Induced, pH-Dependent Dissociation of Casein Micelles on Heating Reconstituted Skim Milk at Temperatures below 100 °C. **J Agric Food Chem**, [s.l.], v. 45, n. 4, p. 1108–1115, 1997.

AZEVEDO, L. M. S. **Síntese do niobato de sódio a partir do óxido de nióbio e do nióbio metálico**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BALAKRISHNAN, G. et al. Specific effect of calcium ions on thermal gelation of aqueous micellar casein suspensions. **Colloids Surf B Biointerfaces**, [s.l.], v. 163, p.218-224, mar. 2018.

BETT,S.C.; PICANÇO, N.F.M.; FARIA, R.A.P.G., Nascimento, E. Elaboração e qualidade de iogurte com polpa de mangaba. **Higiene alimentar**, v.31, 2017.

BECKER, L. V. **Iogurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça**. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BELICIU, C. M.; SAUER, A.; MORARU, C. I. The effect of commercial sterilization regimens on micellar casein concentrates. **J Dairy Sci.**, [s.l.], v. 95, n. 10, p.5510-5526, out. 2012.

BEZERRA, M. F.. **Caracterização Físico-química, Reológica e Sensorial de iogurte obtido pela mistura dos leites bubalino e caprino.** 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

BORBA, L. M.; FERREIRA, C. L. L. F.. Probióticos em Bancos de Leite Humano. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção.** Rio de Janeiro: Rubio, 2012. Cap. 4. p. 73-84.

BOSNEA, L. A. et al. Functionality of freeze-dried L. casei cells immobilized on wheat grains. **LWT - Food Sci Technol**, [S.l.], v. 42, n. 10, p.1696-1702, dez. 2009.

BRASIL, **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos,** Embrapa, 2006.

BRASIL, **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados,** Embrapa, 2007.

BRASIL. **Manual de Curadores de Germoplasma - Micro-organismos: Bactérias Ácido Lácticas.** 2011. Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc336-151.pdf/4c82dbc8-73bd-4689-a47e-5819e3f1ffc7>>. Acesso em: 29 abr. 2018.

CHEN, Kun-Nan, et al. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. **J Food Sci**, [s.l.], v. 70, n. 5, p. 260-266, jun. 2005.

COSTA, A. V. S. et al. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.209-226, 11 mar. 2013.

COSTABILE, A. et al. Whole-grain wheat breakfast cereal has a prebiotic effect on the human gut microbiota: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Br J Nutr**, v. 99, n. 01, p.110-120, 29 ago. 2008.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **Br J Nutr**, v. 87, n. 2, p.145-151, maio 2002.

DAMIN, M. R. et al. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **LWT - Food Sci Technol**, [s.l.], v. 42, n. 10, p.1744-1750, dez. 2009.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. *Soft Matter*, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: Edipucrs, 2007. 60 p.

DUNNE, C. et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am J Clin Nutr**, [s.l.], v. 73, n. 2, p.386-392, 1 fev. 2001.

DOKOOHAKI, Z.N. et al. Dairy dessert containing microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC53103) with quince seed mucilage as a coating material. *LWT - Food Science and Technology*, v. 115, p. 108-429, jul. 2019.

DOMINGO, E. C. **Avaliação da qualidade e da competitividade de iogurtes produzidos no sul de Minas Gerais**. 2011. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DEMIRCI, T. et al. Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 36, p.396-403, set. 2017.

DORS, G. C.; PINTO, R. H.; FURLONG, E. B. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, v. 29, n. 1, p.219-224, jan/mar. 2009.

FARIAS, T.G.S. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream **LWT - Food Science and Technology**. v. 100, p. 391–396, 2019.

FAO/OMS. **Probiotics in Food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. In: FAO Food Nutrition paper 85, 2006.

FAZILAH, N. F., et al. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p.387-399, 2018.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e Prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de Bactérias Lácticas e Aplicação Tecnológica de Bactérias Probióticas. In: FERREIRA, C. L. L. F.. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Rubio, 2012. Cap. 1, p. 18.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Probióticos e Prebióticos na Alimentação de Aves**, Rio de Janeiro: Rubio, 2012. Cap. 12. p. 195-212.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2005.

GARCIA, M. C. et al. Application of roasted rice bran in cereal bars. **Food Sci Technol**, Campinas, v. 32, n. 4, p. 718-724, 23 ago. 2012.

FU, R. et al. Salecan stabilizes the microstructure and improves the rheological performance of yogurt. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 474-480, mar. 2018.

GAUCHE, C. **Polimerização de proteínas do soro de leite por transglutaminase e propriedades físicas de iogurte elaborado após tratamento enzimático**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

GIBSON, G. R.; FULLER, R. Aspects of In Vitro and In Vivo Research Approaches Directed Toward Identifying Probiotics and Prebiotics for Human Use. **J Nutr**, v. 130, n. 2, p.391-395, 1 jan. 2000.

HASSAN, A. N. et al. Textural Properties of Yogurt Made with Encapsulated Nonropy Lactic Cultures. **J Dairy Sci**, [s.l.], v. 79, n. 12, p.2098-2103, dez. 1996.

HATANAKA, C. L. **Efeito da adição de goma tara e carragena em iogurte firme desnatado**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

HEIDTMANN-BEMVENUTI, R.; NORA, N. S.; BADIALE-FURLONG, E. Extraction of γ -oryzanol from rice bran. **Ciênc agrotec**, Lavras, v. 36, p. 665-673, 2012.

KARNOPP, A.R., et al. Optimization of an organic yogurt based on sensorial, nutritional, and functional perspectives. **Food Chemistry**, v. 233, p. 401–411, 2017.

KARAM, M. C. et al. Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process. **J Dairy Res.**, [s.l.], v. 79, n. 03, p.280-286, 4 abr. 2012.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics. **J Am Diet Assoc**, [s.l.], v. 101, n. 2, p.229-241, fev. 2001.

LEROY, F.; VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends Food Sci Technol**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.67-78, fev. 2004.

LI, K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. **LWT - Food Science and Technology** doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108521>.

LIU, L. et al. Effect of microencapsulation with the Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival rate of *Lactobacillus rhamnosus* in white brined cheese. **Food Control**. v. 79, p. 44-49, mar. 2017.

LIANG, Y. et al. Effects of globular protein type and concentration on the physical properties and flow behaviors of oil-in-water emulsions stabilized by micellar casein–globular protein mixtures. **Food Hydrocoll**, [s.l.], v. 54, p.89-98, mar. 2016.

LICODIEDOFF, S. **Influência do teor de pectinas comerciais nas características físico-químicas e sensoriais da geléia de abacaxi**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

LIMA, S. C. G. et al. Efeito da adição de diferentes sólidos na textura, sinérese e característica sensorial de iogurte firme, **Rev Inst Latic**, [s.l.], v. 66, p. 32-39, 2011.

LUCEY, J.A. ; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Res Int**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.529-542, ago. 1998.

MACIEL, G.M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **J Dairy Sci**, [s.l.], v. 97, n. 4, p.1991-1998, abr. 2014.

MADUREIRA, A. R. et al. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **Int Dairy J**, [s.l.], v. 15, n. 6-9, p.921-927, jun. 2005.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Res Int**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.465-470, jan. 2011.

MAHOMUD, Md. S.; KATSUNO, N.; NISHIZU, T. Formation of soluble protein complexes and yoghurt properties influenced by the addition of whey protein concentrate. **Innov Food Sci Emerg Technol**, [s.l.], v. 44, p.173-180, dez. 2017.

MANTOVANI, D. et al. Elaboração de iogurte com diferentes concentrações de sólidos totais, análise físico-química e perfil da textura. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.680-687, 30 jul. 2012.

MISHRA, S.; MISHRA, H. S. Technological aspects of probiotic functional food development. **Nutrafoods**, v. 11, n. 4, p. 117 - 130, oct. 2012.

MORETTI, B. R. **Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura láctica em iogurtes**. 2009. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2009.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S.M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Rev Inst Latic Cândido Tostes**, [s.l.], v. 70, n. 3, p.172-184, 9 dez. 2015.

MUDGIL, D.; BARAK, S.; KHATKAR, B. S. Texture profile analysis of yogurt as influenced by partially hydrolyzed guar gum and process variables. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 12, p. 3810-3817, 21 set. 2017.

MURAROLLI, V. D. A. **Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte**. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Nutrição e Produção Animal) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K., RZEPKOWSKA, N, A., SZYDŁOWSKA, A., KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D., 2018. Chapter 3 - **Trends and possibilities of the use of probiotics in food production**. In: Holban, A.M., Grumezescu, A.M. (Eds.), *Alternative and Replacement Foods*. Academic Press, pp. 65–94 (Alternative and Replacement Foods).

OLIVEIRA, M. G. C. et al. Stability and microbiological quality of rice bran subjected to different heat treatments. **J Food Sci Technol**, Campinas, v. 32, n. 4, p.725-733, 23 ago. 2012.

OLIVEIRA, N. C. **Microscopia Eltrônica de Varredura de campo amplo e mapeamento elementar de raios-x de fósseis do período cretáceo**. 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 2015b.

OLIVEIRA, R. F. **EFEITO DE DIFERENTES CULTURAS LÁTICAS NAS CARACTERÍSTICAS DE QUEIJO TIPO PETIT SUISSE COM RETENÇÃO DE SORO**. 2015. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015a.

PENNA, A. L. B.; THAMER, K. G. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Ciênc Tecnol Aliment**, Campinas, v. 3, n. 26, p.589-595, jul. 2006.

PINHEIRO, M. V. S. **Caracterização de iogurtes fabricados com edulcorantes, fermentados por culturas lácticas probióticas**. 2003. 196 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Res Int**, v. 55, p. 247-262, 2014.

PREZZI, L. E. **Efeito da adição de Lactobacillus rhamnosus em queijos Minas frescal sobre as contagens de Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes**. 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2014.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci Technol**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.3-11, jan. 2002.

RAJOKA, M.S.R. et al. Identification, characterization, and probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus isolated from human milk. **LWT - Food Science and Technology**. V. 84, p. 271-280, mai. 2017.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Obtention and chemical and nutritional characterization of different bovine casein concentrates. **Rev Nutr**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 75-83, jan. 2005.

SAAD, S. M. I. et al. Probióticos e Prebióticos em alimentos: Aspectos tecnológicos, Legislação e Segurança no uso. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011a. Cap. 1. p. 23-50.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.1-16, mar. 2006.

SAAD, S. M. I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E. M. Benefícios à Saúde dos Probióticos e Prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011b. Cap. 2. p. 51-84.

SACCO. **Lyofast LR B**. 2009. Disponível em: <<http://test.tuteuralimentos.com.ar/archivos/documentos/lrb.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2018.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **Int Dairy J**, Amsterdam, v.8, p.341-347, 1998.

SANDOVAL-CASTILLA, O. et al. Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. **Int Dairy J**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.151-159, fev. 2004.

SANTOS, F. S.; MEDEIROS, S. R. A. Prospecção tecnológica sobre o uso do farelo de trigo na alimentação humana. **GEINTEC**, São Cristóvão, v. 6, n. 1, p. 2861-2873, 27 mar. 2016.

SAUER, A.; DOEHNER, I.; MORARU, C. I. Steady shear rheological properties of micellar casein concentrates obtained by membrane filtration as a function of shear rate, concentration, and temperature. **J Dairy Sci**, [s.l.], v. 95, n. 10, p.5569-5579, out. 2012.

SILVA, J. V. C. et al. Heat-induced gelation of aqueous micellar casein suspensions as affected by globular protein addition. **Food Hydrocoll.**, [s.l.], v. 82, p.258-267, set. 2018.

SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, 2007.

SOUKOULIS, C. et al. Industrial Yogurt Manufacture: Monitoring of Fermentation Process and Improvement of Final Product Quality. **J Dairy Sci**, [s.l.], v. 90, n. 6, p.2641-2654, jun. 2007.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. **Food Qual Prefer**, v. 13, p. 215-225, 2002.

TERPOU, A. et al. Enhanced probiotic viability and aromatic profile of yogurts produced using wheat bran (*Triticum aestivum*) as cell immobilization carrier. **Process Biochem.**, [s.l.], v. 55, p.1-10, abr. 2017a.

TERPOU, A. et al. Sour milk production by wheat bran supported probiotic biocatalyst as starter culture. **Food Bioprod Process.**, [s.l.], v. 101, p.184-192, jan. 2017b.

TERPOU, A. et al. Novel frozen yogurt production fortified with sea buckthorn berries and probiotics. **LWT - Food Science and Technology.**, v. 105, p. 242–249, fev. 2019.

VALENTE, G.L.C. In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, V. 102, P. 5957-5961, jul. 2019.

VERRUCK, S. et al. Survival of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. **Small Ruminant Res**, Florianópolis, v. 153, p.48-56, ago. 2017.

VIANNA, F. S, et al. Development of new probiotic yoghurt with a mixture of cow and sheep milk: effects on physicochemical, textural and sensory analysis. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 154–162, 2017.

WANG, C. et al. Physicochemical, textural, sensory properties and probiotic survivability of Chinese Laosuan Nai (protein-fortified set yoghurt) using polymerised whey protein as a co-thickening agent. **Int J Dairy Technol**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.261-269, 3 fev. 2015.

YADAV, R. et al. Evaluation of anti-diabetic attributes of *Lactobacillus rhamnosus* MTCC: 5957, *Lactobacillus rhamnosus* MTCC: 5897 and *Lactobacillus fermentum* MTCC: 5898 in streptozotocin induced diabetic rats. **Microbial Pathogenesis**, v. 125, p. 454-462, dec. 2018.

ZAMBERLIN, Š.; SAMARŽIJA, D. The effect of non-standard heat treatment of sheep's milk on physico-chemical properties, sensory characteristics, and the bacterial viability of classical and probiotic yogurt. **Food Chem**, [s.l.], v. 225, p.62-68, jun. 2017.

APÊNDICE

APÊNDICE A - TEMPO DE FERMENTAÇÃO E O RESPECTIVO PH

A		B		C	
Tempo	pH	Tempo	pH	Tempo	pH
00:00	6,50	00:00	6,50	00:00	6,50
00:30	6,48	00:30	6,45	00:30	6,44
01:00	6,12	01:00	6,12	01:00	5,86
01:30	6,02	01:30	5,91	01:30	5,46
02:00	6,02	02:00	5,74	02:00	5,05
02:30	5,80	02:30	5,40	02:30	4,90
03:00	5,45	03:00	5,10	03:00	4,80
03:30	5,29	03:30	5,00	03:30	4,55
04:00	5,10	04:00	4,80	04:00	-
04:30	4,80	04:30	4,55	04:30	-
05:00	4,50	05:00	-	05:00	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

*A: iogurte sem a adição do imobilizado; B: iogurte com biocatalizador de trigo; C: iogurte com biocatalizador de arroz

APÊNDICE B – PONTOS EXPERIMENTAIS DO PERFIL DE TEXTURA (MÉDIAS)

Amostra	Dureza (N)	Adesividade (mJ)	Coesividade	Elasticidade (mm)	Gomosida de (N)
IPSP	0,15±0,06 ^a	0,11±0,01 ^a	0,89±0,31 ^a	20,06±1,00 ^a	0,16±0,03 ^a
ICASP	0,25±0,07 ^a	0,26±0,18 ^a	0,70±0,23 ^a	16,06±2,00 ^a	0,17±0,05 ^a
ICGSP	0,16±0,05 ^a	0,14±0,09 ^a	0,82±0,48 ^a	18,18±3,00 ^a	0,15±0,05 ^a
IPPL	0,23±0,05 ^a	0,54±0,15 ^a	0,32±0,10 ^a	12,33±4,60 ^a	0,18±0,05 ^a
ICAPL	0,39±0,05 ^b	1,00±0,19 ^b	1,00±0,19 ^b	13,96±3,12 ^a	0,27±0,04 ^b
ICGPL	0,27±0,10 ^b	0,16±0,09 ^b	0,52±0,08 ^b	12,38±3,00 ^a	0,16±0,05 ^b
IPBT	0,18±0,05 ^a	0,14±0,21 ^a	0,96±0,49 ^a	25,70±5,00 ^a	0,16±0,11 ^a
ICABT	0,28±0,05 ^b	0,58±0,30 ^a	0,79±0,15 ^a	23,57±0,50 ^a	0,24±0,04 ^a
ICGBT	0,15±0,10 ^b	0,16±0,06 ^a	0,60±0,50 ^a	12,40±2,0 ^a	0,16±0,06 ^a
IPBA	0,21±0,05 ^a	0,08±0,08 ^a	0,79±0,11 ^a	14,51±2,0 ^a	1,76±0,25 ^a
ICABA	0,42±0,10 ^b	1,26±0,57 ^b	0,69±0,12 ^a	15,50±5,0 ^a	0,28±0,02 ^b
ICGBA	0,19±0,07 ^b	0,25±0,15 ^b	1,02±0,06 ^b	14,19±3,0 ^a	0,23±0,02 ^b

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

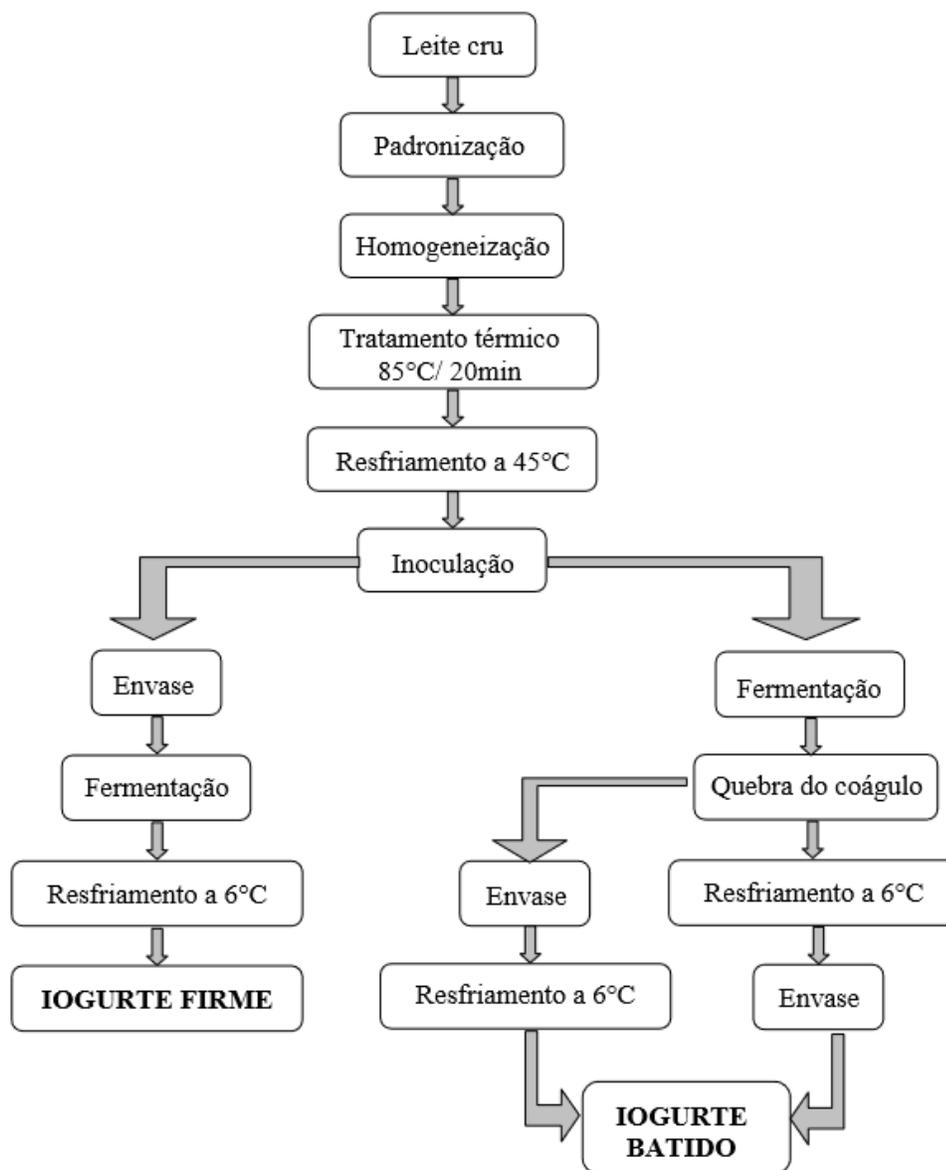
APÊNDICE C - VALORES DAS CONTAGENS MICROBIOLÓGICAS EM MEIOS SELETIVOS DA DIGESTÃO SIMULADA

MASTIGAÇÃO				
	IPSP	IPPL	IPBT	IPBA
PCA	8,02	8,27	8,68	8,88
MRS	6,6	7,25	8,61	8,28
M17	6,14	6,21	6,45	6,21
V-MRS	4,39	5,16	5,21	5,63
ESÔFAGO - ESTÔMAGO				
	IPSP	IPPL	IPBT	IPBA
PCA	7,45	8,62	8,55	8,61
MRS	5,99	7,75	8,08	8,38
M17	5,29	6,25	6,27	6,48
V-MRS	3,8	5,65	5,46	5,72
DUODENO				
	IPSP	IPPL	IPBT	IPBA
PCA	7,6	8,89	9,65	9,81
MRS	6,3	7,63	8,73	9,34
M17	5,33	6,2	6,74	6,73
V-MRS	4,32	5,66	7,81	7,48
ÍLEO				
	IPSP	IPPL	IPBT	IPBA
PCA	8,68	8,86	9,51	9,87
MRS	7,62	7,84	8,86	9,13
M17	6,53	6,74	7,38	7,11
V-MRS	6,38	6,2	7,47	7,11

Fonte: Elaborada pelo autor, 2018.

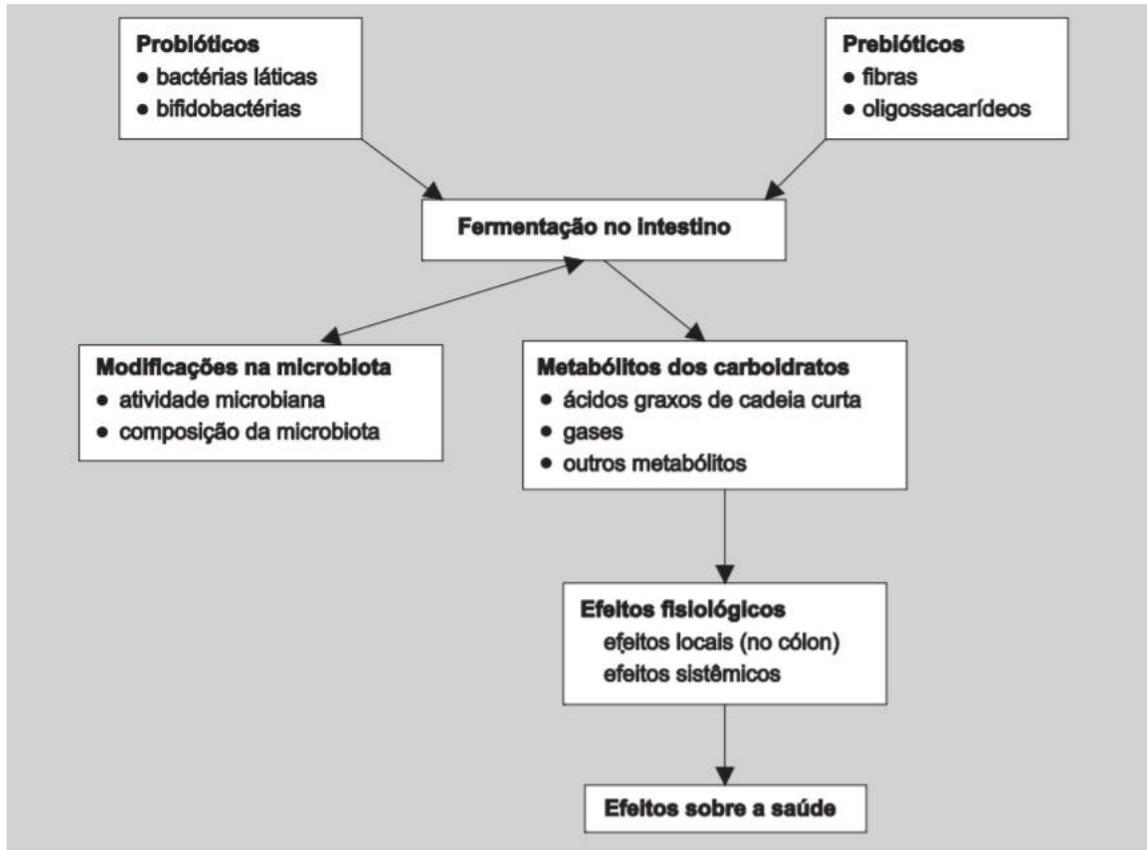
ANEXOS

ANEXO 1- FLUXOGRAMA DA FABRICAÇÃO DO IOGURTE BATIDO E DO IOGURTE TIPO FIRME.



Fonte: Moretti, (2009. p. 12).

ANEXO 2 - COMPORTAMENTO DE PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS COMO INGREDIENTES ALIMENTARES NA MICROBIOTA INTESTINAL



Fonte: Saad, (2006, p. 2.)