



**DAELEN RESENDE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE  
LEVEDURAS E O USO NA ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA  
FERMENTADA A BASE DE SORO DE LEITE E SUCO DE  
BETERRABA**

**LAVRAS- MG**

**2018**

**DAELEN RESENDE OLIVEIRA**

**IN VITRO EVALUATION OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF YEASTS AND  
THE USE IN THE ELABORATION OF FERMENTED BEVERAGES BASED ON  
WHEY AND BEET JUICE**

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Whasley Ferreira Duarte

**LAVRAS- MG**

**2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Daelen Resende.

Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de leveduras e o uso na elaboração de uma bebida fermentada a base de soro de leite e suco de beterraba / Daelen Resende Oliveira. - 2018.

54 p. : il.

Orientador(a): Whasley Ferreira Duarte.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Kluyveromyces lacti*. 2.  $\beta$ -galactosidase. 3. Bebidas funcionais. I. Duarte, Whasley Ferreira. . II. Título.

**DAELEN RESENDE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE LEVEDURAS E O USO  
NA ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA FERMENTADA A BASE DE SORO DE LEITE  
E SUCO DE BETERRABA**

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola para  
obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 8 de maio de 2018

Prof. Dr. Whasley Ferreira Duarte - UFLA

Prof. Dr. Euziclei Gonzaga de Almeida - UFMT

Prof. Dr. Michel Cardoso de Angelis Pereira – UFLA

Orientador: Whasley Ferreira Duarte

**LAVRAS- MG**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, não há palavras que possam expressar minha gratidão por seu amor, por ter sempre me abençoado me dando força e animo nos momentos de cansaço, por ter iluminado minha mente nos momentos de dificuldades e fornecido a energia necessária para sempre prosseguir em busca dos meus objetivos, me ajudando sempre à alcançá-los.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao departamento de biologia (DBI) e ao setor de microbiologia agrícola, por me proporcionar um ambiente adequado a minha formação e realização deste trabalho.

À instituição de fomento CNPq pelo apoio financeiro possibilitando a realização do todo experimento.

À minha família, principalmente à minha mãe por todo apoio, amor e carinho, por contribuíram para minha formação pessoal e também para minha formação acadêmica. Espero que toda a preocupação e que toda saudade sentida tenha valido a pena.

À todos meus amigos e colegas de mestrado, principalmente Cibelli Castro, Suzana Eda, Rafael Carvalho, José Bonett, Thiago Condé, Mauro Cardoso e Lisiane Fonseca pelos momentos de alegria e descontração.

À todos colegas de laboratório, principalmente Rafaela Andrade por toda ajuda e amizade.

À meu noivo Yuri Max de Carvalho, por todo amor e carinho que tenho recebido nos últimos anos, agradeço o apoio em todos os momentos de estudo. Agradeço também à sua família por todo amor recebido, o carinho de uma segunda família fez toda diferença na minha vida e na minha formação acadêmica.

À meu orientador Whasley Ferreira Duarte, o qual possibilitou a realização de todo esse experimento através de sua continua dedicação, me ajudando e me apoiando da melhor maneira possível. Sua atenção, paciência e seus ensinamentos foram de grande importância para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação do potencial probiótico de cepas de *Kluyveromyces lactis*, previamente isoladas de Queijo da Serra da Canastra, considerando sua capacidade de resistência à passagem pelo trato gastrointestinal simulado e propriedades de adesão, além de efeitos funcionais como inibição à patógenos entéricos, atividade antioxidante e produção/atividade enzimática de  $\beta$ -galactosidase. A levedura selecionada foi ainda aplicada na elaboração de uma bebida fermentada à base de soro de leite e suco de beterraba. Todas as cepas mantiveram viabilidade acima de 75% após exposição aos sucos gástrico e duodenal simulado. Com exceção da levedura B51, cuja taxa de autoagregação foi de 34,51%, todas as demais apresentaram resultados superiores a 84% em 24h. Destas, apenas duas leveduras (B9 e C16) apresentaram taxas de hidrofobicidade superiores à 60%, com atividade de  $\beta$ -galactosidase em pH 6 de  $1,08 \pm 0,22$  e  $0,96 \pm 0,13$  U/g, respectivamente. A levedura B9 selecionada foi com base em seu bom desempenho nos testes de viabilidade, adesão e produção de  $\beta$ -galactosidase, sendo utilizada na elaboração de bebidas fermentadas a base de suco de beterraba e soro de leite concentrado e não concentrado. Os carboidratos foram mensurados por HPLC e as propriedades antioxidantes avaliadas após o período de fermentação (120h) nos tempos 0 e 21 dias de armazenamento sob refrigeração pela porcentagem de inibição de DPPH e pelo método de Folin-Ciocalteu, tendo os resultados expressos  $\mu$ g de Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) /mL. O suco apresentou interessantes propriedades antioxidantes com inibição de DPPH entre 52,75% a 96,93% no tempo inicial e 38,69% a 81,02% no tempo final de armazenamento, com concentrações de fenólicos totais entre 113,88 a 304,96 (T0) e 102,75 a 291,61  $\mu$ g EAG/mL (T21). Além da eliminação total da lactose nas bebidas com soro concentrado (SC A e SC B) e com soro diluído (NW B) com redução à 1,99g/L em uma das bebidas com soro diluído (NW A), mostrando ser um produto inovador com propriedades funcionais.

**Palavras chave:** *Kluyveromyces lactis*.  $\beta$ -galactosidase. Bebidas funcionais. Atividade Antioxidante. HPLC.

## SUMÁRIO

### CAPITULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	5
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	7
2. 1. Probióticos .....	7
2.1.1 Efeitos Benéficos dos Probióticos .....	7
2.1.1.1 Inibição de Patógenos Entéricos.....	7
2.1.1.2 Estimulação do Sistema Imune.....	8
2.1.1.3 Probióticos e Nutrientes .....	9
2.1.1.4 Probióticos e Intolerância a Lactose .....	9
2.1.1.5 Redução do Colesterol Plasmático .....	10
2.2.1 Leveduras Probióticas .....	10
2.2.1.1 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	12
2.3. Critérios de Segurança para Uso de Probióticos .....	13
2.4 Bebidas Probióticas.....	14
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	17
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

### CAPITULO 2

*In vitro* evaluation of the probiotic potential of yeasts and the use in the elaboration of fermented beverages based on whey and beet juice

1. INTRODUCTION.....	26
2 MATERIALS AND METHODS.....	28
2.1 Microorganisms used.....	28
2.2 Inoculum Preparation .....	28
2.3 Evaluation of probiotic viability .....	28
2.3.1 Passage through the gastrointestinal tract resistance .....	28
2.3.2 Self-aggregation test.....	29
2.3.3 Hydrophobicity assay.....	29
2.4 Functional activities .....	30
2.4.1 Activity and stability <i>K. lactis</i> $\beta$ -galactosidase .....	30
2.4.2 Inhibition of pathogens .....	30
2.4.3 Evaluation of antioxidant activity of cells.....	31

2.4.4 Evaluation of the antioxidant activity of the cell free extract .....	31
2.4 Elaboration of Fermented beverages .....	32
2.4.1 Inoculum Preparation .....	32
2.4.2 Preparation of Raw Material .....	32
2.4.3 Fermentation.....	32
2.4.4 Stability of beverages .....	33
2.4.5 Analysis by High Performance Liquid Chromatography .....	33
2.4.6 Evaluation of the Antioxidant activity of the beverage.....	33
2.4.7 Quantification of total phenolics.....	34
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	34
3.1 Probiotic Viability .....	34
3.2 Functional activities .....	38
3.3 Elaboration of Fermented beverages .....	40
4 CONCLUSIONS.....	44
5 REFERENCES.....	44



## CAPITULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

Os probióticos têm-se destacado cada vez mais como foco de pesquisa, apresentando inúmeros benefícios à saúde humana, mostrando interação indispensável para manutenção da integridade intestinal bem como outros efeitos sistêmicos, como por exemplo, a modulação imunológica.

Os probióticos são por definição microrganismos vivos capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (FAO; WHO, 2001). Já os prebióticos são substâncias não são digeríveis por enzimas humanas, atuando como substratos para os probióticos, estimulando seletivamente a proliferação e/ou atividade de populações microbianas desejáveis no cólon (GIBSON, ROBERFROID, 1995).

Os probióticos exercem vários benefícios a microbiota intestinal exercendo efeitos antagônicos de competição e efeitos imunológicos (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Além de outros benefícios como, por exemplo, a redução do colesterol, produção de vitamina B, tratamento de diarreia, regularização da microbiota intestinal e aumento da biodisponibilidade de nutrientes (CUMMINGS, 2002).

Os gêneros de microrganismos mais usados como probióticos na indústria alimentícia são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, comumente utilizados para fermentação do leite, além da levedura *Saccharomyces boulardii* que atua como medicamento principalmente no tratamento de diarreias e doenças inflamatórias intestinais como a doença de Crohn. Bebidas fermentadas são produtos tradicionais que atuam como veículos de probióticos na dieta humana. Muitos estudos nas últimas décadas concluíram que os melhores substratos para a entrega de probióticos são os produtos lácteos (KANDYLIS et al., 2016).

O soro de leite é uma interessante matéria prima para produção de alimentos funcionais vinculando probióticos, devido suas propriedades nutricionais e por se tratar de um subproduto altamente poluente à natureza quando descartado (DRAGONE et al., 2009). O soro é rico em cálcio e peptídeos bioativos, além de apresentar aminoácidos essenciais, como leucina, valina, isoleucina e cisteína, que são agentes importantes no metabolismo, função neural e homeostase (PATEL, 2015).

Os sucos de frutas com probióticos também tem ganhado espaço devido a crescente demanda por produtos veganos, além de serem atrativos devido suas propriedades nutricionais

(ALVES FILHO et al, 2017; COSTA et al, 2017; BETORET et al, 2017; NEMATOLLAHI et al, 2016).

Os sucos de legumes ainda são pouco explorados comercialmente no Brasil, sendo um mercado recente. Assim como as frutas os legumes possuem excelentes propriedades nutricionais com alto teor de aminoácidos e vitaminas além da presença de compostos antioxidantes biologicamente ativos (KIEFER et al., 2004).

O suco de beterraba contém um alto nível de antioxidantes biologicamente acessíveis, bem como muitos outros compostos promotores da saúde, como potássio, magnésio, ácido fólico, ferro, zinco, cálcio, fósforo, niacina, biotina, B6 e fibras (WOOTTON-BARBA, RYAN, 2011).

Os novos gêneros de microrganismos estudados devem seguir alguns critérios para serem considerados probióticos. Estes critérios dizem respeito ao gênero a que os microrganismos pertencem, levando-se em consideração as espécies que já são consideradas seguras para uso humano, a sua estabilidade e segurança, considerando-se os parâmetros de aderência e potencial invasivo, bem como resistência ao baixo pH, aos sucos gástricos, aos sucos biliares e pancreáticos e à capacidade de colonização, além de outros aspectos funcionais e fisiológicos como antagonismo aos patógenos e consequente estimulação às bactérias benéficas.

Mediante tais considerações torna-se evidente a importância da busca por novos microrganismos com propriedades probióticas, assim como as leveduras, que possuam os efeitos benéficos comuns aos gêneros já estabelecidos e comercializados, além de outros efeitos benéficos adicionais. Agregando à classe de probióticos outros microrganismos com novas propriedades terapêuticas e preventivas resultantes de produtos específicos gerados por estes microrganismos. Além de possibilitar a produção e comercialização de novos tipos de bebidas e alimentos probióticos.

## 2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

### 2. 1. Probióticos

O termo ‘probiótico’, de origem grega, significa ‘para a vida’. De acordo com Lilly e Stillwell (1965) o termo próbiótico foi utilizado para definir compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano; sendo que a definição atualmente aceita internacionalmente é a de que são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Os gêneros mais conhecidos com propriedades probióticas são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. Infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. Dentre as bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *b. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. Plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*. Além de outras bactérias ácido lácticas como *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis*, *Leuconstoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus thermophilus* e bactérias não ácido lácticas como *Toyo*, *Escherichia coli* cepa nissle *Propionibacterium freudenreichii*, além da levedura *Saccharomyces boulardii* (HOLZAPFEL et al., 2001).

No Brasil os probióticos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), até o momento são: *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *B. bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Os alimentos probióticos são considerados alimentos funcionais, visto que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de doença (ROBERFROID, 2002).

#### 2.1.1 Efeitos Benéficos dos Probióticos

##### 2.1.1.1 Inibição de Patógenos Entéricos

Os microrganismos probióticos impedem a colonização da mucosa intestinal por

microrganismos potencialmente patogênicos, pela competição por sítios de ligação, da competição por nutrientes e pela produção de compostos antimicrobianos (GUARNER, MALAGELADA, 2003).

Em nível intestinal os probióticos competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis. No cólon do hospedeiro há disponível quantidade limitada de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam o que impede o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico. As bactérias podem inibir o crescimento de seus concorrentes produzindo substâncias antimicrobianas chamadas bacteriocinas. A capacidade de sintetizar bacteriocinas é amplamente distribuída entre as coletividades microbianas do trato gastrointestinal (GUARNER, MALAGELADA, 2003).

Bacteriocinas são peptídios ou proteínas antimicrobianas sintetizadas nos ribossomos das células microbianas e liberadas no meio extracelular apresentando ação bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos. (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008)

Aplicações práticas de probióticos incluem seu uso em imunoterapia antitumoral e antialérgica, mas também há evidências crescentes de que alguns probióticos podem estimular uma resposta imune protetora suficientemente para aumentar a resistência a patógenos microbianos (CROSS, 2006).

#### **2.1.1.2 Estimulação do Sistema Imune**

Os probióticos mostram também atuação benéfica estimulando o sistema imune. Algumas bactérias do ácido lático são capazes de induzir imunidade secretória específica, e outras irão aumentar a resposta imune inflamatória intestinal. Os probióticos demonstraram estimular as células produtoras de IgA e a migração de linfócitos T do intestino (PERDIGÓN 1999). Acredita-se também que há um aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK -*natural killer*) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (SAAD, 2006).

Diferentes probióticos mostram efeitos completamente diferentes, dependendo da espécie e da estirpe de microrganismo utilizado. Algumas estirpes têm um efeito pró-inflamatório, enquanto que outras anti-inflamatório (FOLIGNE, 2007).

Estudos *in vivo* em voluntários humanos saudáveis, medindo as mudanças nos perfis de transcrição de genes para determinar as respostas moleculares que ocorrem na mucosa duodenal humana após o consumo de probiótico *Lactobacillus* spp mostraram que as respostas mediante estirpes distintas de *Lactobacillus* são profundamente diferentes,

ilustrando a especificidade das respostas do hospedeiro a bactérias de estirpes específicas e/ou espécies distintas (VAN BAARLEN, 2009; VAN BAARLEN, 2010).

### 2.1.1.3 Probióticos e Nutrientes

Alguns microrganismos fermentadores podem atuar favoravelmente sobre a quantidade, biodisponibilidade e a digestibilidade de alguns nutrientes da dieta humana. A fermentação do leite por bactérias lácticas pode aumentar a concentração de determinados nutrientes, como vitaminas do complexo B. Alimentos com bactérias do ácido láctico como o iogurte têm sua concentração de ácido fólico aumentada, aumentando também os níveis de niacina e riboflavina. Vitamina B12 em queijo cottage e vitamina B6 em queijo Cheddar também são aumentadas com a fermentação. As bactérias lácticas também secretam várias enzimas no lúmen intestinal que atuam sobre a digestão de alguns nutrientes (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Além de ácido láctico, ácidos graxos de cadeia curta, como o propiônico, acético e butírico, também são produzidos pelas bactérias lácticas e leveduras. Esses ácidos contribuem para nutrição dos colonócitos, podendo proteger contra mudanças patológicas na mucosa do cólon. A expressão de várias enzimas capazes de atuar na degradação de compostos carcinógenos é favorecida pela redução do pH intestinal (manutenção de um pH apropriado), provocado pela presença desses ácidos (KOPP-HOOLIHAN, 2001).

Estudos mostram que a *S. boulardii* exerce um efeito positivo sobre o intestino aumentando significativamente a atividade específica e total de enzimas como sacarase-isomaltase, lactase e maltase-glicoamilase, melhorando a absorção de nutrientes (JAHN et al., 1996; BUTS et al., 1999 e ZAUCHE et al., 2000).

### 2.1.1.4 Probióticos e Intolerância a Lactose

A alteração do metabolismo microbiano pelos probióticos ocorre por meio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. Algumas bactérias como *L. acidophilus* e *B. bifidum* produzem a enzima  $\beta$ -galactosidase (galactosidase) no lúmen intestinal, que auxilia na quebra da lactose no intestino. Essa ação pode auxiliar no tratamento de indivíduos com intolerância a lactose, diminuindo as reações intestinais, como aumento de gases e diarreia. Por outro lado, algumas bactérias lácticas hidrolisam a lactose, por meio de fosfo- $\beta$ -galactosidase, que pode

não ser tão eficaz no intestino (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2002).

Estudos mostram que a *S. boulardii* é capaz aumentar a produção intestinal de lactase, o que auxilia na melhora do quadro de intolerância à lactose (JAHN et al., 1996; BUTS et al., 1999 e ZAOUCHE et al., 2000).

Almeida (2012) demonstrou que o consumo de *L. casei shirota* e *B. breve* melhorou o quadro de sintomas em pacientes com intolerância à lactose, com persistência do efeito até 3 meses após a suspensão do consumo. Uma estirpe recombinante de *L. lactis* também demonstrou eficácia no alívio de sintomas como diarreia provocada pela deficiência na absorção de lactose (LI et al., 2012).

### **2.1.1.5 Redução do Colesterol Plasmático**

Os probióticos exercem efeito benéfico sobre a concentração sanguínea de lipídios, reduzindo os níveis de colesterol total, de lipoproteínas de baixa densidade (Low Density Lipoprotein – LDL-c) e de triacilgliceróis (KOPP- HOOLIHAN, 2001).

As bactérias probióticas fermentam carboidratos não digeríveis (prebióticos) derivados de alimentos, produzindo ácidos graxos de cadeia curta no intestino, que podem causar uma diminuição nos níveis sistêmicos de lipídios sanguíneos, inibindo a síntese de colesterol hepático e / ou redistribuindo o colesterol do plasma para o fígado (PEREIRA, GIBSON, 2002). Outras linhas indicam que a redução do colesterol pode ser proveniente da assimilação do colesterol pelas bactérias, incorporação do colesterol à parede celular das células microbianas e desestruturação enzimática dos sais biliares (HONG, 2005).

### **2.2.1 Leveduras Probióticas**

Alternativamente às bactérias, leveduras tem sido exploradas quanto ao seu potencial probiótico, sendo a *S. cerevisiae* var. *boulardii* a principal espécie de levedura comercializada como probiótica.

Embora *S. cerevisiae* var. seja a levedura mais amplamente testada, outros gêneros de levedura como *Debaromyces*, *Torulasporea*, *Kluyeromyces*, *Pichia* e *Candida* tem demonstrado potencial probiótico, tolerando a passagem pelo trato gastrointestinal e exercendo efeitos antagonistas contras bactérias patogênicas (FADDA et al., 2016; DIOSMA et al., 2014; SYAL e VOHRA, 2013; CHEN et al., 2010; RAJKOWSKA, STYCZYNSKA,

2010; HATOUM, LABRIE e FLISS, 2012).

Leveduras do gênero *Kluyveromyces*, principalmente *K. lactis* surgiram como umas das mais importantes espécies de leveduras para pesquisa e biotecnologia industrial, sendo adequada para a produção de metabólitos e proteínas, principalmente da enzima  $\beta$ -galactosidase, já comercializada com fins industriais para produção de alimentos lácteos livres de lactose (SPOHNER et al., 2016). São isolados de leite e queijos, sendo naturalmente consumidas juntamente com estes alimentos (ANDRADE et al, 2017; CEUGNIEZ et al., 2017; FADDA et al, 2017) . Este gênero tem ainda mostrado propriedades probióticas, resistindo a passagem pelo trato gastrointestinal e potencial de adesão ao epitélio intestinal, além de propriedades funcionais como produção de ácidos graxos de cadeia curta, modulação imune, inibição à patógenos e atividade pró-apoptótica em células epiteliais cancerosas (CEUGNIEZ et al., 2017; SABER et al., 2017; MACCAFERRI et al., 2012; KUMURA et al., 2004).

Além dos benefícios geralmente atribuídos aos probióticos leveduras dos gêneros *S. cerevisiae*, *Candida sp.*, *Pichia sp.*, e *Aureobasidium sp* têm mostrado benefícios adicionais como degradação de compostos antinutricionais pela produção de enzimas fitases, propriedades anticarcinogênicas pela produção de L-asparaginase, melhora na capacidade de digestão pela produção de lipases e proteases e mostraram-se capazes de produzir vitamina B12 (SYAL e VOHRA, 2013).

A asparaginase é uma enzima produzida por bactérias e fungos, sendo geralmente purificada a partir das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, esta enzima é responsável pela desaminação extracelular da asparagina, aminoácido essencial para a síntese protéica de algumas células tumorais; com a desaminação a célula tumoral não consegue utilizar este aminoácido. Por neste motivo a asparaginase é indicada tratamento de neoplasias hematológicas, principalmente a leucemia linfoblástica aguda (CLAVELL et al., 1986). Syal e Vohra (2013) mostraram em seu estudo que algumas cepas de leveduras também são capazes de produzir esta enzima.

Buzzini (2002) em seu estudo sobre os perfis enzimáticos extracelulares relatou a produção de enzimas de interesse industrial tais como amilases, esterases, lipases, proteases, pectinases, e quitinases.

As leveduras também apresentam importância na indústria química pela produção de enzimas, pigmentos, acidulantes de alimentos e redutores químicos, em pesquisas biomédicas e na indústria farmacêutica pela produção de vacinas, hormônios e fatores sanguíneos e em

tecnologias ambientais pela sua atuação em biorremediação, utilização de subprodutos industriais, controle biológico e bioabsorção de metais, além das pesquisas fundamentais (biologia celular e molecular, bioquímica e genética) (WALKER, 1998).

### **2.2.1.1 *Saccharomyces boulardii***

*Saccharomyces boulardii* é uma levedura probiótica exercendo diversos efeitos benéficos sobre o hospedeiro, atualmente é usada no tratamento de diarreia decorrente do uso de antibióticos ou decorrente de infecção, possui efeito positivo quando utilizada no tratamento de doenças inflamatórias intestinais como doença de Crohn, também estimula o sistema imune com efeito anti-inflamatório, além de neutralização de toxinas bacterianas, mostrando-se efetiva no tratamento de diarreia infecciosa (CZERUCKA, PICHE, RAMPAL, 2007).

*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* apresenta efeito inibitório sobre bactérias entéricas patogênicas, atua na manutenção da integridade da barreira epitelial e apresenta ação em anti-inflamatória (MOSLEHI-JENABIAN et al., 2010).

Estudos mostram que a *S. boulardii* pode melhorar a absorção de nutrientes e exercer efeito trófico da mucosa intestinal em ratos Wister submetidos a processo de ressecção proximal ou transecção do intestino aumentando significativamente a atividade específica e total de enzimas como sacarase-isomaltase, lactase e maltase-glicoamilase, auxiliando na recuperação dos ratos após a cirurgia. (JAHN et al., 1996; BUTS et al., 1999 e ZAOUCHE et al., 2000).

Everard (2014) mostrou os benefícios da *S. boulardii* em casos de obesidade e diabetes tipo 2, através da modulação da microbiota intestinal e o metabolismo de ratos. A administração da levedura foi capaz de reduzir o peso e os níveis de gordura corporal, resultou em menor acúmulo de gordura no fígado e modulação inflamatória, resultando em diminuição dos níveis de esteatose hepática.

Li (2014) sugeriu por meio de seu estudo que a administração oral de *S. boulardii* pode atuar no tratamento preventivo de cirrose, desacelerando a progressão de fibrose hepática.

Há indícios que *S. boulardii* pode atuar no tratamento ou na prevenção de úlceras induzidas por fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, mas o seu mecanismo de ação necessita ser mais explorado. (GIRARD et al., 2010).

Karen (2010) revelou em seu estudo que o tratamento com *S. boulardii* em casos de



pancreatite aguda foi capaz de reduzir a translocação bacteriana, bem como diminuir as citocinas pró-inflamatórias, reduzindo o dano em outros órgãos provocado pela inflamação sistêmica.

Diversos trabalhos de pesquisa tem relatado o potencial probióticos de espécies diferentes de *S. cerevisiae* var. *boulardii* (FADDA et al., 2016; DIOSMA et al., 2014; SYAL e VOHRA, 2013; CHEN et al., 2010; KOURELIS et al., 2010; RAJKOWSKA e KUNICKA-STYCZYNSKA, 2010).

Tais evidências dos benefícios advindos da única levedura probiótica comercializada, mostra a importância do estudo de novos gêneros de leveduras que possuam propriedades probióticas.

### **2.3. Critérios de Segurança para Uso de Probióticos**

Além dos benefícios conferidos, os probióticos devem obedecer a critérios de segurança para serem usados como produtos alimentares ou medicamentos, devendo receber o título de GRAS (generally recognized as safe)

Os fatores que devem ser abordadas na avaliação de segurança dos probióticos incluem patogenicidade, infecciosidade, e fatores de virulência que compreendem toxicidade, atividade metabólica e as propriedades intrínsecas dos microrganismos (DONOHUE e SALMINEN 1996)

Regulamentos aplicáveis ao uso de culturas microbianas em alimentos variam entre os países e em muitas regiões ainda estão em desenvolvimento. Na maioria dos casos, os probióticos são aprovados com base nas espécies/gêneros os quais pertencem devendo ser reconhecidos como seguros, e/ou possuir histórico de uso seguro em alimentos (O'BRIEN et al., 1999)

O grau de risco, considerado como aceitável pode variar dependendo do padrão a ser utilizado para avaliar a segurança e das exigências feitas pelos órgãos regulamentares.

No Brasil a categoria de substâncias bioativas e de probióticos é regulamentada pela Resolução RDC n. 02/2002 da ANVISA. Essa norma estabelece as definições de substâncias bioativas e de probióticos e a obrigatoriedade da comprovação da segurança de uso, previamente à comercialização, além de outros requisitos, como a comprovação de um efeito fisiológico ou metabólico específico, que será comunicado por meio de uma alegação de propriedade funcional ou de saúde (BRASIL, 2013).

A expressão de resistência aos antibióticos e transferência de genes de resistência a antibióticos de cepas probióticas são componentes importantes da avaliação de segurança. Assumindo que o probiótico em questão não apresenta um risco de infecciosidade, a principal preocupação é que possam transferir genes de resistência a antibióticos a outros microrganismos patogênicos presentes na microbiota (SANDERS et al., 2010) Tem-se sugerido que os probióticos para uso humano devem ser susceptíveis a, pelo menos, dois antibióticos clinicamente relevantes (BORRIELLO et al., 2003)

Outro requisito dos probióticos é que estes não devem produzir substâncias nocivas por atividades metabólicas (ISHIBASHI e YAMAZAKI 2001). As aminas biogênicas, tais como a histamina e a tiramina são moléculas orgânicas de baixo peso molecular, estando presentes em muitos alimentos, mas também produzidos em quantidades elevadas por alguns microrganismos. A ingestão de grandes quantidades de aminas biogênicas pode ser confundida com reações alérgicas devido à semelhança dos sinais e sintomas, incluindo rubor facial, sudorese, erupção cutânea, diarreia e cólicas entre outras reações graves, incluindo dificuldade respiratória, inchaço da língua da garganta e visão turva (TAYLOR et al., 1989)

Gelatinase e DNase são as enzimas produzidas principalmente por microrganismos patogênicos. As gelatinases (MMP-2 e MMP-9, MMP) são capazes de degradar quase todos os componentes de equilíbrio da matriz extracelular e da membrana basal e podem proporcionar um substrato adequado para uma maior atividade de gelatinases humanas ou de outras proteases bacterianas (ZHAO et al., 2011). A DNase extracelular fornece uma vantagem de crescimento para o agente patogênico, aumentando o leque de nucleotídeos disponíveis pela hidrólise do DNA contribuindo para a disseminação e propagação do agente patogênico, ajudando na evasão da resposta imune inata por degradar neutrófilos extracelulares (HASEGAWA et al., 2010).

## **2.4 Bebidas Probióticas**

Entre os alimentos com alegação de propriedades funcionais amplamente divulgados nos últimos anos e que apresentam estudos para sua utilização tecnológica e industrial, destacam-se aqueles que contêm cepas de microrganismos probióticos (LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001).

Os probióticos têm sido associados a alimentos; sendo que no Brasil o mercado de alimentos probióticos se concentra nos produtos lácteos, devido às propriedades nutricionais

do leite o qual favorece a fermentação e manutenção da viabilidade de bactérias probióticas, como as bactérias do ácido láctico. A levedura *Saccharomyces boulardii* e bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também são comercializados em cápsulas na forma de medicamentos.

Para suprir a crescente demanda por alimentos funcionais, a indústria alimentícia tem desenvolvido novos produtos probióticos contendo cepas específicas de bactérias lácticas tais como *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. longum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. plantarum*, *B. animalis* e *B. lactis* (GRANATO et al., 2010).

À medida que a comunidade científica estuda os efeitos benéficos dos probióticos, as empresas de alimentos seguem a tendência tecnológica e lançam muitos produtos em todo o mundo, tanto lácteos quanto não lácteos. Esses alimentos incluem sucos vegetais, queijos, sorvetes, iogurtes, leites fermentados e muitos outros (GRANATO et al., 2018).

A crescente demanda por produtos vegetarianos, a presença de colesterol no leite e intolerância à lactose tem motivado a busca por bebidas probióticas obtidas a partir de substratos vegetais (PRADO et al., 2008). O uso de frutas para produção de bebidas probióticas tem sido uma das alternativas preferidas em função principalmente do sabor agradável e por serem refrescantes e saudáveis (TOURILA e CARDELLO, 2002)

Os sucos vegetais a base de legumes ainda são pouco explorados comercialmente no Brasil, sendo um mercado recente. Assim como as frutas esses vegetais possuem excelentes propriedades nutricionais com alto teor de aminoácidos e vitaminas, além da presença de compostos antioxidantes biologicamente ativos (KIEFER et al., 2004).

Devido suas propriedades nutricionais e funcionais a beterraba se destaca como um vegetal interessante na produção de sucos funcionais veiculando probióticos. O açúcar principal na beterraba é a sacarose com apenas pequenas quantidades de glicose e frutose, apresenta ainda compostos antioxidantes como as betalaínas, uma classe de derivados do ácido betalâmico que podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas e as betaxantinas (PITALUA et al., 2010). A beterraba possui nutrientes promotores da saúde, como ácido fólico, ferro, magnésio, selênio, potássio, cálcio, zinco, fósforo, biotina, niacina e  $\beta$ -caroteno, bem como vitaminas A, B6 e C. A alta capacidade antioxidante do suco de beterraba, juntamente com seu outro valor nutricional, tornam o suco de beterraba uma adição positiva à dieta (WOOTTON-BARBA, 2011)

O soro de leite também é uma interessante matéria prima pra produção de alimentos funcionais vinculando probióticos, devido suas propriedades nutricionais.

De acordo com a Instrução Normativa nº 16 de 2005 (BRASIL, 2005) entendesse por soro de leite: “O líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína”.

O soro de leite de vaca apresenta alto valor nutricional, contendo proteínas com alto teor de aminoácidos essenciais, especialmente os de cadeia ramificada. Também apresentam alto teor de cálcio e de peptídeos bioativos (HARAGUCHI, 2006).

As proteínas do soro de leite são: beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactoalbumina (ALA), albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas (Ig's) e glico-macropéptídeos (GMP). A beta-lactoglobulina é o maior peptídeo do soro (45,0%-57,0%), representando, no leite bovino, cerca de 3,2 g/L. É o peptídeo que apresenta maior teor de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), com cerca de 25,1% (De WIT, 1998). A alfa-lactoalbumina é o segundo peptídeo do soro (15%-25%) do leite bovino. Contém o maior teor de triptofano (6%) entre todas as fontes protéicas alimentares, sendo, também, rica em lisina, leucina, treonina e cistina (KINSELLA, 1989; MARKUS, 2002). A ALA possui a capacidade de se ligar a certos minerais, como cálcio e zinco, o que pode afetar positivamente sua absorção (LÖNNERDAL, 2003).

A BSA corresponde a cerca de 10% das proteínas do soro do leite. É rica em cistina (aproximadamente 6%), e relevante precursor da síntese de glutathione (SALZANO, 2002; KINSELLA, 1989). O soro de queijo contém aproximadamente 55% dos sólidos existentes no leite integral original representado em torno de 85 a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ANDRADE, MARTINS, 2002).

O soro é considerado um produto altamente poluente, sendo que cerca de 90% do volume de leite utilizado para a produção de queijo são transformados em soro (DRAGONE et al., 2009).

Devido às propriedades nutritivas apresentadas e da necessidade de reaproveitamento, o soro de leite torna-se uma matéria prima atrativa para produção de alimentos probióticos.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

São inúmeros os benefícios atribuídos aos probióticos, mas para exercerem suas propriedades funcionais é necessário, primeiramente, que estes apresentem resistência à passagem pelo trato gastrointestinal, seguido de adesão ao epitélio intestinal.

A forma de veiculação dos probióticos em alimentos é um importante fator a ser considerado, levando em conta que a matéria prima deve possuir propriedades que garantam o crescimento e estabilidade da viabilidade das cepas durante o período de validade do produto; além de possuir características nutricionais e sensoriais que sejam atrativas ao consumidor.

O soro de leite é um subproduto atrativo por possuir propriedades nutricionais interessantes para promoção da saúde e para manutenção da viabilidade de cepas probióticas, assim como sucos vegetais a base de legumes, os quais ainda não pouco explorados comercialmente no Brasil.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C. C., LORENA, S. L. S., PAVAN, C. R., AKASAKA, H. M. I., MESQUITA, M. A. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 27, n. 2, p. 247-251, 2012.

ANDRADE, BATISTA J, FERRARI E. e BRAUN G. Valor nutritivo da silagem de cana-de-açúcar tratada com uréia e acrescida de rolão-de-milho. **Pesq. agropec. bras.**, v. 36, n. 9, p. 1169-1174, 2001.

ANDRADE, R.L.P., MARTINS, J.F.P. Influencia da adição da fécula de Batata Doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, p. 249-253, 2002.

BORRIELLO, S. P., HAMMES, W. P., HOLZAPFEL, W., MARTEAU, P., SCHREZENMEIR, J., VAARA, M., VALTONEN, V. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or *Bifidobacteria*, **Clinical Infectious Diseases**, v.36, p.775-780, 2003.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alegações de Propriedades Funcionais Aprovadas. Disponível em <[www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 10 de Agosto de 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 ago. p. 1-13, 2005

BUTS J.P, KEYSER N., MARANDI S. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellularadaptation after proximal enterectomy in rats. **Gut**, v. 45, n. 1, p. 89-96, 1999.

BUZZINI, P., A. MARTINI. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 6, p. 1020-1025, 2002.

CAMPEOTTO, F., SUAUA, A., KAPEL, N., MAGNE, F., VIALON, V., FERRARIS, L. DUPONT, C. A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. **British journal of nutrition**, v. 22, p. 1–10, 2011.

CHEN, L. S., M. A, Y., MAUBOIS, J. L., HE, S. H., CHEN, L. J., LI, H. M. Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. **Dairy Science e Technology**, v. 90, n. 5, p. 537-548, 2010.

CLAVELL, L. A., GELBER, R. D., COHEN, H. J., HITCHCOCK-BRYAN, S., CASSADY, J. R., TARBELL, N. J., SALLAN, S. E. Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **New England journal of medicine**, v. 315, n. 11, p. 657-663, 1986.

CLSI Método de Referência. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição **Norma M2-A8 do CLSI (ISBN 1-56238-485-6)**, 2006.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, n.4, p.245-253, 2006.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition.**, Wallingford, v. 87, n. 2, p.145-151, 2002.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. **Alimentary pharmacology e therapeutics**, v. 26, n. 6, p. 767-778, 2007.

De WIT J.N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p.597-608, 1998.

DIOSMA, G.; ROMANIN, D. E.; REY-BURUSCO, M. F.; LONDERO, A.; GARROTE, G. L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-53, 2013.

DONOHUE DC, SALMINEN S. Safety of probiotic bacteria. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition** , v. 5, p. 25-28, 1996.

DRAGONE, G., MUSSATTO, S. I., VILANOVA, M., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., SILVA, J. B. A.. Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Braga, v. 7, p. 120-123, June 2009

DUARTE, W. F., DIAS, D. R., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., DE ALMEIDA E SILVA, J. B., SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticaba and umbu LWT. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1564-152, 2010.

DUARTE, W. F., DRAGONE, G., DIAS, D. R., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., SILVA, J. B., SCHWAN, R. F. Fermentative behavior of *Saccharomyces* strains during microvinification of raspberry juice (*Rubus idaeus* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, n. 3, p. 173-182, 2010.

EVERARD, A., MATAMOROS, S., GEURTS, L., DELZENNE, N. M., CANI, P. D. *Saccharomyces boulardii* administration changes gut microbiota and reduces hepatic steatosis,

low-grade inflammation, and fat mass in obese and type 2 diabetic db/db mice. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01011-14, 2014.

FADDA, M. E., MOSSA, V., DEPLANO, M., PISANO, M. B., e COSENTINO, S. In vitro screening of Kluyveromyces strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 100-106, 2017.

FOLIGNE, B. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. **World J. Gastroenterol.** V.13, p.236–243, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. **Disponível em:** <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)>. Acesso em: 10 de novembro de 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, 1989.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr., Bethesda**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M., CARRASCOSA, A. V., e REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156-1162, 2015.

GIRARD, P., COPPÉ, M. C., PANSART, Y., GILLARDIN, J. M. Gastroprotective effect of *Saccharomyces boulardii* in a rat model of ibuprofen-induced gastric ulcer. **Pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 188-193, 2010.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, G. A.; FARIA, J. A.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Food Science and Food Safety**, v.9, p.455-470, 2010.

GRANATO, D., NAZZARO, F., PIMENTEL, T. C., ESMERINO, E. A., DA CRUZ, A. G. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement, **Reference Module in Food Science**, 2018

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, n. 9356, p. 512-519, 2003.

GUPTA, P.K.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 03, p. 409-421, 1997.

HARAGUCHI, F. K., ABREU, W. C., PAULA, H. D. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev Nutr**, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.



HASEGAWA, T., MINAMI, M., OKAMOTO, A., TATSUNO, I., ISAKA, M., OHTA, M. Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*. **Microbiology**, v. 156, n. 1, p. 184-190, 2010.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial properties of yeasts: from fundamental do novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-12, 2012.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJÖRKROTH, J., SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American journal of clinical nutrition**, v. 7, n. 2, p.365-373, 2001.

HONG, Z. J. R. Y. Progress in the effect of probiotics on cholesterol and its mechanism. **Acta Microbiologica Sinica**, v. 45, n. 2, p. 315-319, 2005.

ISHIBASHI, N., YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. *The American journal of clinical nutrition* v. 73, n. 2, p. 465s-470s, 2001.

JAHN, H. U., ULLRICH, R., SCHNEIDER, T., LIEHR, R. M., SCHIEFERDECKER, H. L., HOLST, H., ZEITZ, M. Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. **Digestion**, v. 57, n. 2, p. 95-104, 1996.

KAREN, M., YUKSEL, O., AKYÜREK, N., OFLUOĞLU, E., ÇAĞLAR, K., ŞAHİN, T. T., BOSTANCI, H. Probiotic Agent *Saccharomyces boulardii* Reduces the Incidence of Lung Injury in Acute Necrotizing Pancreatitis Induced Rats. **Journal of Surgical Research**, v. 160, n. 1, p. 139-144, 2010.

KINSELLA, J. E., e WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical, and functional properties. **Advances in food and nutrition research**, v. 33, p. 343-438, 1989.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n.2, p. 229-241, 2001.

KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOŠIĆ, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n.6, p. 981-987, 2003.

KOURELIS, A. et al. Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. **Journal of Biological Research-Thessaloniki**, v. 13, p. 93-104, 2010.

LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends in Food*

LI M., ZHU L. , XIE A., YUAN J. Oral Administration of *Saccharomyces boulardii* Ameliorates Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis in Rats via Reducing Intestinal Permeability and Modulating Gut Microbial Composition. **Springer Science**, v. 5, n 10, p. 107, 2014.

- LI, J., ZHANG, W., WANG, C., YU, Q., DAI, R., PEI, X. Lactococcus lactis expressing food-grade  $\beta$ -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1499-1506, 2012.
- LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**. v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.
- LÖNNERDAL, B. O. Dietary factors influencing zinc absorption. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1378S-1383S, 2000.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2001.
- MARKUS C.R, OLIVER B, DE HAAN E.H.F. Whey Protein rich in alfa-lactoalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. **Am J Clin Nutr**, V 75, p.1051, 2002 .
- MORR, C.V. Whey proteins: manufacture. In: FOX, P.F. (Ed.). Developments in dairy chemistry-4: functional milk proteins. New York: **Elsevier Applied Science**, p. 245–284, 1989.
- MOSLEHI-JENABIAN, S., LINDEGAARD, L.; JESPERSEN, L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. **Nutrients**, v. 2, n. 4, p. 449-473, 2010.
- NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.2, p.120-127, 2008.
- O'BRIEN, J., CRITTENDEN, R., OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. SAFETY evaluation of probiotics. **Trends in food science e Technology**, v. 10, n. 12, p. 418-424, 1999.
- OUWEHAND, C.A, E SALMINEN, S.J. Os efeitos sobre a saúde de produtos lácteos cultivados com bactérias viáveis e não viáveis. **Journal Dairy Internacional**, v. 8, n. 9, p. 749-758, 1998.
- PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM<sup>2</sup>, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.;JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bileresistance of Lactobacillus acidophilus strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World J.I of Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 35–37, 2006.
- PARKER, G. A. Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. **Journal of theoretical Biology**, v. 47, n.4, p. 223-243, 1974.
- PELEGRINE, D.H.G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento de soro do queijo no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food, Campinas**, v. 7, n. 21, p. 145-151, dez. 2008.

PERDIGON, G., VINTINI, E., ALVAREZ, S., MEDINA, M., MEDICI, M. Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1108-1114, 1999.

PEREIRA, D.I.A.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Rev. Biochem. Molec. Biol.**, v.37, n.4, p.259-281, 2002.

PÉREZ, P. F., MINNAARD, Y., DISALVO, E. A., DE ANTONI, G. L. SURFACE properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 1, p. 21-26, 1998.

PRADO, F. C., PARADA, J. L., PANDEY, A., SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111-123, 2008.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2002.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefir. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 257-263, 2010.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., MÄTTÖ, J., MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, v. 84, n.3, p. 197-215, 2000.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D, DE VOS, W. M., FONDEN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E. ,MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 93-106, 1998.

SALZANO JR, I. Nutritional supplements: practical applications in sports, human performance and life extension. **Symposium series**. p. 1996-2002.

SANDERS, M. E., AKKERMANS, L. M., HALLER, D., HAMMERMAN, C., HEIMBACH, J. T., HÖRMANNSPERGER, G., HUYS, G.. Safety assessment of probiotics for human use. **Gut microbes**, v. 1, n. 3, p. 164-185, 2010.

SANTOS, M. C., NUSSIO, L. G., MOURÃO, G. B., SCHMIDT, P., MARI, L. J., RIBEIRO, J. L. Influência da utilização de aditivos químicos no perfil da fermentação, no valor nutritivo

e nas perdas de silagens de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n.9, p.1555-1563, 2008.

SONGISEPP, E., HÜTT, P., RÄTSEP, M., SHKUT, E., KÕLJALG, S., TRUUSALU, K., e MIKELSAAR, M. Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* Tensia according to a variety of health indices in different age groups. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 10, p. 5495-5509, 2012.

SYAL, P.; VOHRA, A. Probiotic potential of yeast isolated from traditional Indian food. **International Journal of Microbiology Research**, v. 2,n.3, p. 390-398, 2013.

TAYLOR, S. L., STRATTON, J. E., NORDLEE, J. A. Histamine poisoning (scombroid fish poisoning): an allergy-like intoxication. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 27, n. 4-5, p. 225-240, 1989.

TOURILA, H; CARDELLO, A. V. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. **Food Quality and Preference**, v. 13, n. 7, p. 561-569, 2002.

VAN BAARLEN, P. Differential NF- $\kappa$ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.106, p.2371–2376, 2009.

VAN BAARLEN, P. Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** v.108 (Suppl. 1), p.4562–4569, 2011.

WALKER G.M. Yeast Physiology and Biotechnology. **John Wiley and Sons Ltd.** England, 1998.

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 73, n. 2, p. 451-455, 2001.

ZAOUCHE, A., LOUKIL, C., DE LAGAUSIE, P., PEUCHMAUR, M., MACRY, J., FITOUSSI, F., CEZARD, J. P. Effects of oral *Saccharomyces boulardii* on bacterial overgrowth, translocation, and intestinal adaptation after small-bowel resection in rats. **Scand J Gastroenterol** ; v. 35, n. 2, p. 160-165, 2000.

ZHAO, Q., LIU, ZD, XUE, Y., WANG, JF, LI, H., TANG, QJ, XUE, CH. Ds-echinoside A, a new triterpene glycoside derived from sea cucumber, exhibits antimetastatic activity via the inhibition of NF- $\kappa$ B-dependent MMP-9 and VEGF expressions. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 7, p. 534-544, 2011.

## CAPITULO 2

### ***In vitro* evaluation of the probiotic potential of yeasts and the use in the elaboration of fermented beverages based on whey and beet juice**

#### **ABSTRACT**

The objective of the present work was to evaluate the probiotic potential of *Kluyveromyces lactis* strains previously isolated from Canastra cheese process production, considering their capacity of resistance to passage through the simulated gastrointestinal tract and adhesion properties, as well as functional effects such as inhibition of pathogens enteric, antioxidant activity and production/enzymatic activity of  $\beta$ -galactosidase. The selected yeast was used in the elaboration of a fermented beverage based on mixture of cheese whey and beet juice. All strains maintained viability above 75% after exposure to simulated gastric and duodenal juices. With the exception of strain B51, with a self-aggregation rate of 34.51%, all strains presented aggregation values above 84% in 24h. Of these, only two strains (B9 and C16) presented hydrophobicity rates above 60%, with  $\beta$ -galactosidase activity at pH 6 of  $1.08 \pm 0.22$  and  $0.96 \pm 0.13$  U/g, respectively. The selection of strain B9 was based on its good performance in the tests of viability, adhesion and  $\beta$ -galactosidase production, presenting enzymatic stability at pH 7 and pH 9 with activity 2.17 and 2.21 U / g, respectively. The strain was then used in the elaboration of fermented beverages composed by beet juice and concentrated and unconcentrated whey. Carbohydrates were measured by HPLC and the antioxidant properties evaluated at times 0 and 21 days of storage under refrigeration by the percentage of DPPH inhibition and by the Folin-Ciocalteu method, with the results expressed  $\mu\text{g}$  of Gallic Acid Equivalent (GAE) /mL. The beverages presented interesting antioxidant properties with inhibition of DPPH from 52.75% to 96.93% at the initial time and 38.69% at 81.02% at the final time of storage, with total phenolic concentrations ranging from 113,88 to 304,96 (T0) and 102,75 to 291,61  $\mu\text{g}$  EAG/mL (T21). In addition to the total elimination of lactose in beverages containing concentrated whey (CW A and CW B) and with non-concentrated whey (NW B) with reduction to 1,99 g/L in one of the beverages with non-concentrated whey (NW A), showing to be a product innovative and functional properties.

**Key words:** *Kluyveromyces lactis*.  $\beta$ -galactosidase. Functional drinks. Antioxidant activity. HPLC.

## 1. INTRODUCTION

Probiotics have been increasingly highlighted as a research focus, presenting innumerable benefits to human health, showing interaction essential for maintaining intestinal integrity as well as other systemic effects, such as immunological modulation.

Probiotics are by definition living microorganisms capable of conferring health benefits to the host when administered in adequate quantities (FAO, WHO, 2001). Prebiotics are substances that are not digestible by human enzymes, acting as substrates for probiotics, selectively stimulating the proliferation and / or activity of desirable microbial populations (GIBSON, ROBERFROID, 1995).

Probiotics exert several benefits to the intestinal microbiota with antagonistic effects of competition, resulting in increased resistance against pathogens (PUUPONEN-PIMIÄ et al., 2002). In addition to other benefits such as cholesterol reduction, vitamin B production, treatment of diarrhea, regularization of intestinal microbiota and increased bioavailability of nutrients (CUMMINGS, 2002).

The genera of microorganisms most used as probiotics in the food industry are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, commonly used in dairy products. Alternatively to bacteria, yeasts have been exploited for their probiotic potential, being *S. cerevisiae* var. *bouardii* the main species of yeast marketed as probiotic.

Although *S. cerevisiae* var. *bouardii* is the most widely tested yeast, other yeast genera such as *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Torulaspota*, *Pichia*, and *Candida* have demonstrated probiotic potential, tolerating passage through the gastrointestinal tract and exerting antagonistic effects against pathogenic bacteria.(FADDA et al., 2016; DIOSMA et al., 2014; SYAL, VOHRA, 2013; CHEN et al., 2010; RAJKOWSKA, STYCZYNSKA, 2010; HATOUM, LABRIE e FLISS, 2012).

Yeasts of the genus *Kluyveromyces*, mainly *K. lactis*, have emerged as one of the most important species of yeasts for research and industrial biotechnology, being suitable for the production of metabolites and proteins, mainly the enzyme  $\beta$ -galactosidase already commercialized for industrial purposes for food production lactose-free dairy products (SPOHNER et al., 2016). They are isolated from milk and cheese, and are naturally consumed along with these foods (ANDRADE et al., 2017 CEUGNIEZ et al., 2017, FADDA et al, 2017).

This genus has also shown probiotic properties, resistant to the passage through the gastrointestinal tract and potential for adhesion to the intestinal epithelium, as well as

functional properties such as short-chain fatty acid production, immune modulation, inhibition of pathogens and pro-apoptotic activity in cancerous epithelial cells (CEUGNIEZ et al., 2017; SABER et al., 2017; MACCAFERRI et al., 2012; KUMURA et al., 2004).

In order for new genera of microorganisms to be considered as probiotic, some criteria must be met. These criteria are related to the genus to which the microorganisms belong, taking into account the species that are already considered safe for human use, their stability and safety, considering the parameters of adhesion and invasive potential, as well as resistance to low pH, gastric juices, biliary and pancreatic juices and colonization capacity, as well as other functional and physiological aspects (SALMINEN et al., 1998).

Fermented beverages are traditional products that act as vehicles for probiotics in the human diet. Many studies in the last decades have concluded that the best substrates for delivery of probiotics are dairy products (KANDYLIS et al., 2016).

Cheese whey is an interesting raw material for the production of functional foods, with probiotics, due to its nutritional properties. Besides the need for reuse because it is a highly polluting by-product to nature when discarded (DRAGONE et al., 2009). Cheese whey is rich in calcium and bioactive peptides, as well as essential amino acids such as leucine, valine, isoleucine and cysteine, which are important agents in metabolism, neural function and homeostasis (PATEL, 2015).

Fruit juices with probiotics have also gained space due to the growing demand for vegan products, as well as being attractive due to their nutritional properties (ALVES FILHO et al., 2017, COSTA et al., 2017, BETORET et al, 2017, NEMATOLLAHI et al, 2016).

The vegetable juices are still little explored commercially in Brazil, being a recent market. As fruits, vegetables have excellent nutritional properties with a high content of amino acids and vitamins besides the presence of biologically active antioxidant compounds (KIEFER et al., 2004).

Beet juice contains a high level of biologically available antioxidants as well as many other health promoting compounds such as potassium, magnesium, folic acid, iron, zinc, calcium, phosphorus, niacin, biotin, B6 and fibers (WOOTTON-BARBA, RYAN, 2011).

These considerations make evident the importance of the search for new genera of microorganisms with probiotic properties, as well as yeasts, which have the beneficial effects common to established and marketed genera, as well as other beneficial effects. In addition, the discovery of new probiotics would enable the production and marketing of new types of beverages and probiotic foods.

The objective of this work was to evaluate the probiotic potential of *K. lactis* strains isolated Canastra cheese production process (Andrade et al., 2017), and in addition, use the selected strain to produce a functional beverage based on cheese whey and beet juice.

## **2 MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Microorganisms used**

The yeast strains used were previously isolated from the Serra da Canastra cheese (ANDRADE et al., 2016), all of them being *K. lactis* coded as B7, B34, B35, B51, C1, C3, C5, C16, D22 . The strain *S. cerevisiae* var. *boulardii* (S1) was obtained from the commercial product Floratil® AT 250 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and used as a positive control once it is a probiotic yeast.

### **2.2 Inoculum Preparation**

The strains were initially grown at 28°C for 48h in 2 mL YEPG broth (1% Yeast Extract, 2% Bacteriological Peptone and 1% Glucose) until reaching the  $10^7$  cell/mL population. The cultures obtained were centrifuged at 5488G for 10 min at 4°C and then washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) g/L: sodium chloride 8.0, potassium chloride 0.2, disodium phosphate 1.44 and potassium phosphate 0, 24; pH 7. The biomass obtained after washing was used as the initial inoculum for the tests.

### **2.3 Evaluation of probiotic viability**

#### **2.3.1 Passage through the gastrointestinal tract resistance**

To evaluate the passage through the upper gastrointestinal tract the cells were initially exposed to 10 mL of synthetic gastrointestinal juice (6.2 g/L NaCl, 2.2 g/L KCl, 0.22 g/L CaCl<sub>2</sub>, 1.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.3% pepsin, pH 3.0) and incubated at 37°C under stirring. After 90 min, 17.5 mL of synthetic duodenal juice (6.4 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.239 g/L KCl, 1.28 g/L NaCl, 0.1% pancreatin) adjusted to pH 7.4 with 5M HCl, and 4 mL of bile % (oxbile - Sigma) was added. To determine the survival time at 0 (T<sub>0</sub>), 90 (T<sub>1</sub>), and 270 (T<sub>2</sub>) min of the test, the YEPG plating method was used with incubation at 37°C for 48h (FADDA et al., 2016).



### 2.3.2 Self-aggregation test

The self-aggregation test was performed according to Fadda (2016) with adaptations. The cell biomass was resuspended in 3 ml of PBS, the solution was vortexed for 10 seconds and then subjected to reading in a glass cuvette in a spectrophotometer at OD of 560 nm. The solution was kept in the cuvette, incubated at 37°C for further readings at times 2, 4 and 24h. The percentage of self-aggregation was expressed by the equation:

$$\text{Auto-aggregation\%} = (\text{At} / \text{A0}) \times 100,$$

Where, **At** represents the absorbance at time 3h, or 20h and **A0** and the absorbance at time 0.

### 2.3.3 Hydrophobicity assay

The washed inoculums were resuspended in 5 ml PBS. 3 mL aliquots were placed in contact with 1mL of n-hexadecane and vortexed for 120 seconds. The solution was incubated for 1h at 37°C to allow complete separation of phases. The aqueous phase was carefully removed and the absorbance was measured in a spectrophotometer at 560 nm (FADDA et al., 2016).

The decrease in absorbance was taken as a measure of the hydrophobicity of the cell surface, calculated on the basis of the equation:

$$[(\text{OD0} - \text{OD}) / \text{OD0}] \times 100,$$

where **OD0** and **OD** are the optical densities before and after the extraction with n-hexadecane, respectively

## 2.4 Functional activities

### 2.4.1 Activity and stability *K. lactis* $\beta$ -galactosidase

The inoculums grown in 2 mL up to the  $10^8$  cell/mL population were transferred to 10 mL of the enzyme production medium: 3.0% lactose, 0.7% yeast extract, 0.3% peptone, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (SONG et al., 2010). The yeasts were incubated at 30°C, shaken at 200rpm for 48h; 500mg of cells were used for the assay. Cell permeabilization was done with the addition of 5 mL of isoamyl alcohol and 25 mL of phosphate buffer plus glass bead addition (1 mm) followed by vortexing for 5 min and incubation under stirring for a further 15 min at room temperature.

The substrate for enzyme was prepared according to Cardoso (2015). Initially 200  $\mu\text{L}$  of permeabilized cell solution was placed in contact with 800  $\mu\text{L}$  of the ONPG solution (2.5 mg/mL ONPG in 0.1M phosphate buffer, pH6); the reaction occurred for 15min at 37°C and then stopped by the addition of 200 $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (mmol L<sup>-1</sup>). The reaction was read in a spectrophotometer at 420 nm.

The yeast that showed the best result was then characterized as the enzymatic activity at pH 5, 7, 9 and also at three different temperatures (20°C, 30°C and 45°C) in order to verify the stability of the enzyme under different conditions.

For the calculation of the enzymatic activity, the method described by Food Chemical Codex (1993) was used, based on an extinction coefficient of ONPG of 4.6 / mM.

### 2.4.2 Inhibition of pathogens

Three methods were used to evaluate the inhibitory potential against pathogens, according to Ceugniz (2015) with modifications, being a late method, addition of supernatant and test of antagonism by gas production.

In the late method, 100  $\mu\text{L}$  of a yeast culture ( $10^8$  cells/mL) previously grown in YEPG were incubated at 28°C for 48h. Colonies were removed and plates were inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of the  $10^4$  cell/ml pathogen cultures (*Escherichia coli* ATCC 055, *Salmonella enteritidis* ATCC 5190 and *Listeria monocytogenes* ATCC 11778). Plates were incubated at 37°C for 48h.

In the supernatant assay the TSA plates were flooded with 100 $\mu\text{L}$  of the pathogen

cultures. After drying, 7 wells of 0.2 mm were made on each plate and filled with 50 ml of the yeast growth filtrate medium. After 2h of incubation at 4°C (allowing diffusion of supernatant) the plates were incubated at 37°C for 48h.

In the gas production antagonism test, two compartments plaques were inoculated with a yeast culture in one compartment and one pathogen culture in another. After drying the plates were incubated at 37 ° C for 48 h. In all of these experiments, the presence or absence of zones of inhibition was inspected after the incubation period.

### **2.4.3 Evaluation of antioxidant activity of cells**

To evaluate the antioxidant activity of intact and ruptured cells, the percent reduction of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) was measured according to Gil-Rodríguez (2015), with modifications.

Cell cultures previously grown in YEPG broth were harvested by centrifugation, washed twice with 0.9% NaCl solution and the resulting pellet resuspended in 1 ml of the same solution. The cell suspension (800 µL) was transferred into a new tube, where 1 mL of a DPPH solution (0.2 mM in ethanol) was then added. The mixture was stirred and then incubated for 30 min at room temperature in the dark.

The antioxidant activity of the ruptured cells was determined in the same way with the use of liquid nitrogen for mechanical disruption of the sediment obtained followed by resuspension in 1 mL of 0.9% NaCl.

Ethanol was used as a blank and the DPPH solution without sample addition was used as a control.

The reaction was read in a spectrophotometer at 517 nm. The percentage of DPPH reduction was calculated as follows:

$$\% \text{ DPPH Inhibition} = [(\text{Sample Absorbance} / \text{Control Absorbance}) \times 100]$$

### **2.4.4 Evaluation of the antioxidant activity of the cell free extract**

The evaluation of the antioxidant activity of the cell free extract was evaluated according to Datta (2016), with modifications.

Cells cultured in YEPG for 48h were centrifuged for separation of the supernatant. The

supernatant was used to evaluate the antioxidant capacity, through the elimination of DPPH.

The supernatant fraction was extracted using ethyl acetate in the ratio of 1: 3 (v / v) with 3 h stirring followed by concentration in a 50% water bath. The solute was resuspended in 40% ethanol and used for the test.

An aliquot of 1 ml of 0.1 mmol L<sup>-1</sup> solution of DPPH in ethanol and 0.5 ml of extract were mixed. The mixture was stirred vigorously, followed by incubation at room temperature for 30min in the dark. The absorbance was measured at 517 nm and the percent inhibition of DPPH was calculated as described above.

## **2.4 Elaboration of Fermented beverages**

### **2.4.1 Inoculum Preparation**

The selected isolate was reactivated in 2 ml YEPG medium, incubated at 28 ° C for 24h. Afterwards the biomass was transferred to Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium, incubated for another 48h followed by transfer of the biomass to 1L of YEPG medium, and incubated until reaching a population of 10<sup>7</sup> cells / mL. This culture was used as an inoculum for the fermentation of whey.

### **2.4.2 Preparation of Raw Material**

Concentrated whey was obtained from a dairy in the region of Lavras-MG. Non-concentrated whey was obtained from the cheese making process.

The beet juice was prepared by grinding the vegetable with water in the ratio p: v (1kg: 1L). Followed by pasteurization.

Whey and beet juice were pasteurized by means of flowing steam using autoclave for 7 minutes (ANDRADE et al, 2016).

### **2.4.3 Fermentation**

The yeasts were added to the concentrated (CW) and non-concentrated (NW) sera followed by incubation at 28°C until the stabilization of the soluble solids concentration,

measured through the Brix refractive index.

After fermentation the beet juice was added to whey in the ratio of 1: 1 v: v (CW A, NW A) and 3: 1 v: v (CW B, NW B).

#### **2.4.4 Stability of beverages**

After the fermentation (120h), each beverage was bottled in 4 bottles of 250 ml each, which were kept under refrigeration at 4°C for 21 days. Every 7 days a bottle was evaluated for the yeast population and the presence of psychrotrophic and mesophilic microorganisms.

For determination of mesophilic and psychrotrophic bacteria, aliquots of the juice were plated in Plate Count Agar (PCA) (yeast extract 0.25%, bacterial peptone 0.5%, glucose 0.1%, agar 1.5%), supplemented with nystatin 0.4 g / L. The plates were incubated at 37 ° C for mesophilic bacteria and 4°C for psychrotrophic bacteria.

Yeast viability was measured by plating YEPG agar supplemented with 1g / L chloramphenicol, followed by incubation at 28°C for 48h.

#### **2.4.5 Analysis by High Performance Liquid Chromatography**

HPLC analysis (High Performance Liquid Chromatography) was performed using a Shimadzu (Shimadzu Corp., Japan) chromatograph equipped with a refractive index detector (RID-10A) and Supelcogel 8H column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) operated at 30 ° C. Elution was performed with 5 mM sulfuric acid at a flow rate of 0.4 mL / min. The carbohydrate identification was performed by comparing the retention times of the peaks in the samples with those of the pure standards injected under the same conditions. The quantification was performed by the external calibration method (DUARTE et al., 2010).

#### **2.4.6 Evaluation of the Antioxidant activity of the beverage**

The method of elimination of DPPH described by Escudero-López (2016), with modifications, was used for the test.

Firstly 120 µL of the centrifuged beverages (10,000 rpm, 10 min, 4 ° C) and 600 µL of methanol were mixed. 180 µL of a DPPH solution (0.5 mM in ethanol) was added. The reaction was incubated for 60 min at 30°C in the dark and then read in a spectrophotometer at

517 nm. Ethanol was used as blank and the DPPH solution without juice addition was used as a control. The percentage of DPPH reduction was calculated as follows:

$$\left[ \frac{\text{Control Absorbance} - \text{Sample Absorbance}}{\text{Control Absorbance}} \right] \times 100$$

#### **2.4.7 Quantification of total phenolics**

The total content of polyphenols was determined using the method of Folin Ciocalteu, according to Wootton-Beard (2011) with adaptations.

A 0.2 mL aliquot of beet juice was added to 1.5 mL of Folin Ciocalteu Reagent (1:10, v / v, with water). The solution was allowed to equilibrate for 5 min and then mixed with 1.5 ml of sodium carbonate (60 g / L), followed by incubation in the dark for 90 min. The absorbance of the mixture was read at 725 nm using the respective solvent as blank. The results were expressed in mg equivalents of gallic acid.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 Probiotic Viability**

In order for probiotics to exert their functional effect on the human organism, they must first resist the adversities encountered during the traversal of the gastrointestinal tract.

All yeasts tested showed resistance above 82% after exposure to simulated gastric juice (Time: 90min), ranging from 82.12% (strain D22) to 93.86% (strain C3) (table 1).

Table 1 - Resistance of yeast strains in gastric environment (90 min) and simulated intestinal (270 min).

Yeasts	Survival rate (%) 90 min	Survival rate (%) 270 min
B7	88.00 ± 0.05	79,46 ± 0,02
B9	84,09 ± 0,04	83,87 ± 0,03
B34	82,95 ± 0,11	75,31 ± 0,05
B35	86,51 ± 0,16	78,53 ± 0,00
B51	83.27 ± 0.10	75.64 ± 0.03
C1	85.54 ± 0.15	75.99 ± 0.05
C3	93.86 ± 0.01	84.03 ± 0.05
C5	86.32 ± 0.01	78.61 ± 0.01
C16	85.64 ± 0.03	80.40 ± 0.01
D19	88.35 ± 0.01	81.93 ± 0.03
D22	82.12 ± 0.03	75.43 ± 0.20
<i>S. boulardii</i>	88.13 ± 0.07	79.29 ± 0.06

Results expressed as log CFU / mL (mean ± standard deviation experimental).

The resistance to gastric juice is important once the stomach pH is the first barrier that the microorganisms find, being this one form of defense of the organism to pathogenic microorganisms. The hydrochloric acid excreted by the parietal cells is responsible for the acidity in this environment, which is between 1.5 and 3.5. According to Gupta (1996) and Park (2006), for a bacterium to be considered probiotic, it must survive between pH 2.0 and 3.0, during 3 hours that would be the average time of passage of the food through the stomach, this is also a requirement for yeasts,

After exposure to simulated pancreatic juice, the survival of the strains varied from 75.33% (strain B34) to 84.05% (strain C3), but all remained viable with populations between  $10^5$  and  $10^6$  cells / mL (Table 1).

Pancreatic secretion is the barrier found after the exit of the stomach, occurring at the

beginning of the duodenum. It contains multiple enzymes to digest all three major food groups: proteins, carbohydrates and fats. It also presents a large amount of bicarbonate ions that contribute, in a very important way, to the neutralization of the chymos acidity transported from the stomach to the duodenum (GUYTON and HALL, 2011). In this work, this condition was experimentally simulated by the addition of commercial pancreatin (creon®) to the synthetic duodenal juice which contains the lipase, amylase and protease enzymes.

The last barrier faced by probiotics is the action of bile. Thus, tolerance to bile salts is an important requirement to be met in order for microorganisms to settle in the intestinal epithelium. The physiological concentration of bile salts in the small intestine ranges from 0.2 to 2.0% (HOFMANN, 1998), and the strains chosen should show resistance to these concentrations.

The commercial yeast *S. boulardii* showed survival of 79.31%. Six of the yeasts tested showed higher results (B9, C3, C5, C16, D19, B7) and other similar or lower results (Table 1). Fadda (2017) reported a decrease in the viability of *Kluyveromyces* strains of up to 87.4%, while Ceugniesz (2017) found a decrease of 55%. In our study the decrease did not exceed 24.67%, a higher resistance comparatively to the ones previously reported for the isolates of this genre.

The *K. lactis* strains tested were isolated from samples of milk, Canastra cheese, cheese whey and “pingo” (endogenous yeast from the natural fermentation of the whey), which are naturally low pH environments, an adaptation condition that may have favored the resistance of the yeasts to the acidity of the stomach.

After resisting the adversities presented during the crossing of the upper gastrointestinal tract the probiotics must be able to adhere to the cells of the intestinal mucosa. Adhesion to intestinal epithelial cells is an important requirement for the colonization of probiotic strains in the gastrointestinal tract, preventing their immediate elimination through peristaltic movements and providing a competitive advantage (KOS et al., 2003).

The strains evaluated had good self-aggregation rates ranging from 55, 24% (D19) to 80.58% (C16) in the time of 4h and from 77.14% (D19) to 94.87% (C16) in the time of 24 h which approached the values found for *S. boulardii* probiotic yeast (63.97% and 94.85%, at time 4 and 24h, respectively). Evidence of the possibility of adhesion to the intestinal mucosa. Only B51 yeast presented unsatisfactory results with 34.51% of autoaggregation in 24h (table 2). The autoaggregation of probiotic strains is necessary for the adhesion of cells to the



intestinal epithelium (PÉREZ, 1998). It is considered a strong self-aggregation of up to 80% (KOS et.al, 2003).

Table 2 - Auto-aggregation of yeast strains

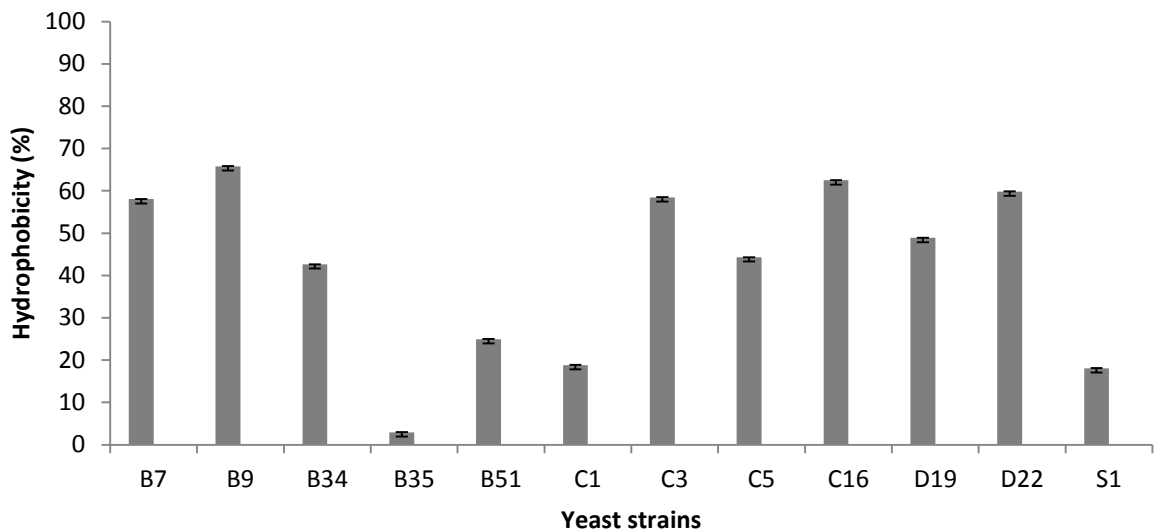
Yeast	Auto-aggregation (%)		
	2h	4h	24h
B7	32.31 ± 0.02	63.97 ± 0.01	93.67 ± 0.01
B9	35.97 ± 0.03	66.19 ± 0.13	89.93 ± 0.00
B34	25.77 ± 0.02	58.53 ± 0.00	87.37 ± 0.00
B35	49.86 ± 0.01	68.22 ± 0.01	84.79 ± 0.02
B51	16.90 ± 0.02	45.07 ± 0.01	34.51 ± 0.02
C1	47.87 ± 0.01	64.45 ± 0.01	84.83 ± 0.01
C3	29.82 ± 0.01	63.82 ± 0.00	92.98 ± 0.01
C5	37.77 ± 0.01	57.08 ± 0.01	83.26 ± 0.01
C16	67.41 ± 0.01	80.58 ± 0.00	94.87 ± 0.00
D 19	36.43 ± 0.01	55.24 ± 0.01	77.14 ± 0.00
D22	32.82 ± 0.01	62.75 ± 0.01	91.30 ± 0.00
<i>S. boulardii</i>	2.76 ± 0.01	63.97 ± 0.01	94.85 ± 0.04

Results expressed as log CFU / mL (mean ± standard deviation experimental).

Adherence depends in part on reversible or irreversible interactions. The initial and reversible stage is mediated by a complex of physicochemical interactions, including hydrophobicity and charges, which are not considered specific but important properties (PELLETIER et al., 1997), evaluating the hydrophobicity of yeasts through the use of n-hexadecane. The yeasts B35, B51, C1 and S1 presented the lowest rates, ranging from 2.91% to 24.91%, while two yeasts (B9 and C16) presented hydrophobicity rates above 60% (65.80

and 62, 48%). These results are superior to those reported by Fadda (2017), reporting hydrophobicity for *Kluyveromyces* strains from 39.9 to 59.1%, and higher than those found by Ceugniz (2017), with results below 10% hydrophobicity.

Figure 1 - Hydrophobicity of yeast strains



Results expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

S1: *Saccharomyces boulardii*.

### 3.2 Functional activities

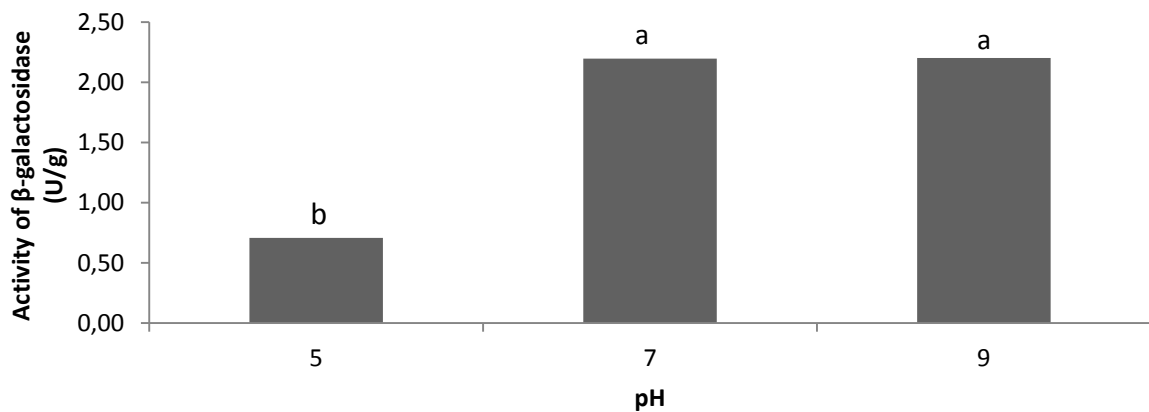
It was not possible to show the antioxidant action or the inhibitory action of the yeasts against the pathogens tested. However, these results can not be extrapolated to live action, considering the complexity of factors that inhibit pathogens or their pathogenicity factors such as competition for the same receptors and nutrients, as well as other actions such as the inhibition of toxins, which can not be evaluated through the tests used (OELSCHLAEGE, 2010).

The yeasts B9 and C16 were selected based on their good resistance and adhesion results, also presenting in a preliminary test a higher production of  $\beta$ -galactosidase. The strains had enzymatic activity of  $1.08 \pm 0.22$  (B9)  $0.96 \pm 0.13$  (C16) U/g. The production of this enzyme resulted in total breakdown of lactose present in the whey during the fermentation process (Table 5).

Isolate B9, due to its higher  $\beta$ -galactosidase activity, was selected for enzyme stability evaluation under different conditions. The enzyme has an optimum activity at neutral and

alkaline pH, ranging from 2.17 to 2.21 U/g (pH 7 and 9), there being no difference between these two conditions, but when submitted to pH 5 the activity dropped significantly, varying from 0.53 to 0.88 U/g. The temperature was not a determinant factor in the enzymatic activity, and there were no significant differences between the three temperatures tested (20, 30 and 45°C) (Figure 3).

Figure 3- Activity of  $\beta$ -galactosidase of *K.lactis* (B9) at acidic, basic and alkaline pH.



$\beta$ -galactosidase activities presented as averages, taking into account the three different temperatures tested (20, 30 and 45°C). Averages followed by the same letter did not differ statistically at the significance level of 0.05%.

The results are positive both from the functional point of view, showing that there is enzyme activity in body temperature and intestinal pH, and may help in cases of lactose intolerance, and commercially, with potential use of the enzyme in industrial processes that show variations temperature and pH.

The ability of lactose degradation by microorganisms is an important finding, considering the beneficial performance in patients with lactose intolerance, with production of  $\beta$ -galactosidase in the intestinal lumen or indirect action, through the application of the microorganism in the manufacture of free dairy foods of lactose.

The study of the production of  $\beta$ -galactosidase from microorganisms is not new, but many of them were not approved because they were not obtained from microorganisms isolated from foods. Microorganisms are the preferred source and yeasts are the main commercial source of this enzyme (CHANALIA et al., 2018).

*Kluyveromyces lactis* is a yeast established in the production of  $\beta$ -galactosidase, the enzyme marketed under the trade names Maxilact (DMS), Lactase (SNAM Progetti),

biolactase (Quest International) and  $\beta$ -galactosidase (Sigma-Aldrich).

$\beta$ -galactosidase of *K. lactis* has also been extensively applied and studied in the production of galactooligosaccharides (GOS) (SHEN, 2012; GONZÁLEZ-DELGADO, 2016, SANTIBÁÑEZ, 2016). GOS are not digestible by the gastrointestinal tract, acting as prebiotics, which are considered selectively fermentable ingredients that allow specific changes in the composition and / or activity in the gastrointestinal microbiota, conferring benefits to the host's health and well-being (GIBSON et al., 2011).

Although yeasts show only  $\beta$ -galactosidase production as functional property, other activities may be studied in order to show greater beneficial contributions as a potentially probiotic microorganism.

### 3.3 Elaboration of Fermented beverages

B9 yeast was chosen for the fermentation of concentrated and diluted whey due to its good performance in the other tests, presenting resistance, adhesion capacity and high production of  $\beta$ -galactosidase.

Diluted (NW) and concentrated (CW) whey were used for fermentation, which was finalized after 120h with stabilization of the soluble solids concentration (brix). The initial brix was around 7° and the final one was around 3°, which evidences that there was consumption of lactose by the yeasts during the fermentation.

After the fermentation, the beet juice was pre-pasteurized in the proportions of 1: 1 (CW A and NW A) and 3: 1 (CW B and NW B) in relation to whey totalizing 1L of beverage.

To exert beneficial effects, microorganisms must be alive and available in large numbers, usually around  $10^8$  to  $10^9$  cells/g of product at the time of consumption. In Brazil, the National Agency of Sanitary Surveillance (ANVISA) recommends that probiotics should be located in the range of  $10^8$  to  $10^9$  CFU in the daily recommendation of the ready-to-eat product, according to the manufacturer's recommendation, although lower values can be accepted, provided the effectiveness has been proven.

The fermentation process started with  $10^7$  cells/mL maintaining the same population after the end of the fermentation and during the shelf life up to 21 days.

The drinks did not show growth of psychrotrophic and mesophilic microorganisms during the 21 days of storage under refrigeration.

The whey carbohydrate concentration before fermentation and with the finished product (21 days) was measured by HPLC (table 5).

Table 5 - Concentration of carbohydrates of diluted and concentrated whey, beet juice and fermented beverages.

Beverages	Concentration of carbohydrates (g/L)				
	Lactose	Fructose	Glucose	Sucrose	Galactose
Beet juice*	-	12 ± 2,12	-	17,87± 0,18	-
Concentrated Whey*	55,45 ± 4,11	-	58,08 ± 2,67	-	38,89 ± 1,87
Non Concentrated Whey *	46,33	-	LD	-	LD
NW A	1,99	1,5	2,28	LD	LD
NW B	LD	1,63 ± 0,03	1,02 ± 1,13	1,06 ± 1,50	LD
CW A	LD	0,87 ± 0,12	1,28 ± 0,10	1,29 ± 0,16	5,205 ± 3,32
CW B	LD	0,70 ± 0,27	1,90 ± 0,92	0,54 ± 0,11	LD

Results expressed as mean ± standard deviation.

NW A: Beet juice plus non-concentrated whey fermented in a ratio of 1: 1 v: v; NW B: Beet juice plus unfermented whey fermented in the ratio of 3: 1 v: v; CW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in a ratio of 1: 1 v: v; NW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in the ratio of 3: 1 v: v. \* Not fermented.

Concentrated whey had a high amount of lactose (55.44 g / L) which was reduced to zero after fermentation with *K. lactis* (B9), highlighting the high activity of  $\beta$ -galactosidase by yeast. The same results were found with *k.lactis* by Andrade (2016).

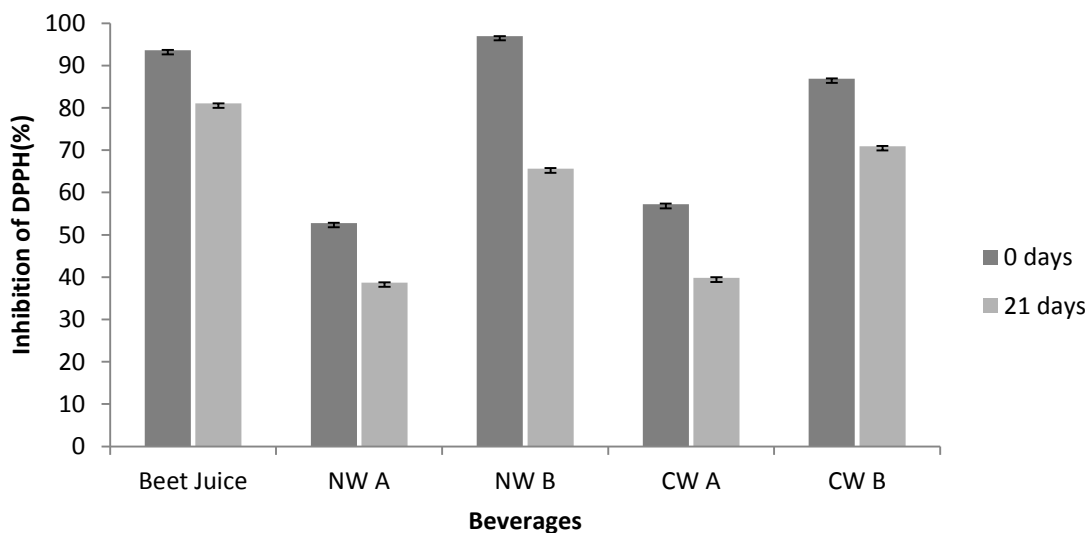
The hydrolytic activity of  $\beta$ -galactosidase is commonly applied in the food industry with the aim of reducing the lactose content of dairy products, preventing problems of crystallization of lactose and increasing sweetness, taste and solubility (GÄNZLE, HAASE, JELEN, 2008). In addition, the hydrolysis of lactose allows the production of lactose-free products suitable for people intolerant to lactose.

The total antioxidant activity was evaluated by the DPPH test, which has the principle

of quantification by the percentage inhibition of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. The total phenolics were also quantified by the Folin-Ciocalteu method at 0 and 21 days of storage under refrigeration at 4°C (Figure 4).

As shown in Figure 3, there was a decrease in the percentage of DPPH reduction between the initial and final days of shelf life, for the Pure Juice, NW A, NW B, CW A, CW B, respectively. The variation between the percentage of inhibition of the products shows that the antioxidant activity is proportionally related to the amount of beet juice present. The beverage NW B and CW B containing higher ratio of beet juice to whey (3: 1 / v: v) showed higher DPPH inhibition values as well as higher total phenolic concentration (figure 4). The data also suggest that the dilution of the juice in the whey reduces proportionately the activity in relation to the pure juice, which makes it possible to affirm that the whey did not interfere in the antioxidant activity of the juice of beet, which are bound only the concentrations of the juice.

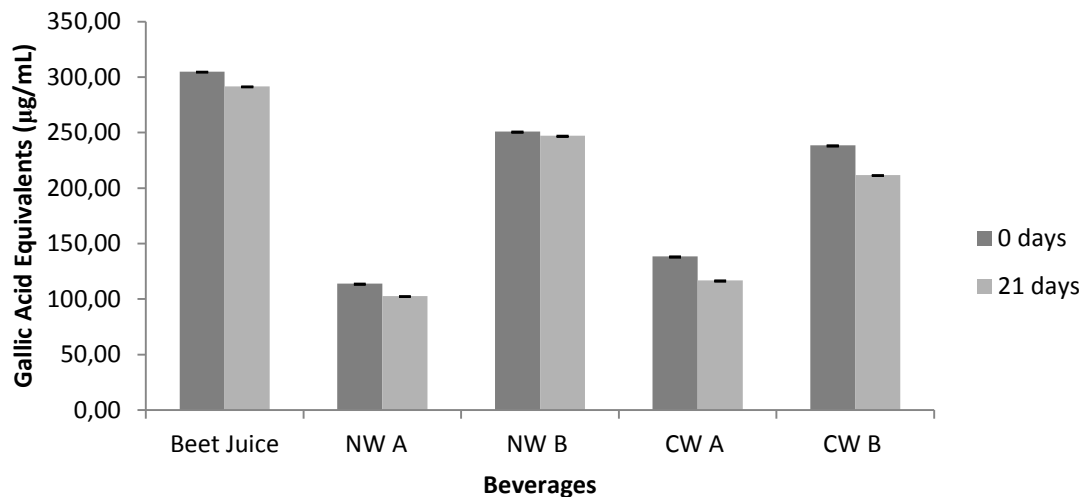
Figure 3. Inhibition of DPPH by beverages at time 0 and 21 days of storage under refrigeration at 4 ° C.



Results expressed as mean  $\pm$  standard deviation

NW A: Beet juice plus non-concentrated whey fermented in a ratio of 1: 1 v: v; NW B: Beet juice plus unfermented whey fermented in the ratio of 3: 1 v: v; CW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in a ratio of 1: 1 v: v; NW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in the ratio of 3: 1 v: v.

Figure 4 - Concentration of total phenolics of beverages, expressed as Gallic Acid Equivalents  $\mu\text{g/mL}$ ) at time 0 and 21 days of storage under refrigeration at 4°C



Results expressed as mean  $\pm$  standard deviation

NW A: Beet juice plus non-concentrated whey fermented in a ratio of 1: 1 v: v; NW B: Beet juice plus unfermented whey fermented in the ratio of 3: 1 v: v; CW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in a ratio of 1: 1 v: v; NW A: Beet juice plus fermented concentrated whey in the ratio of 3: 1 v: v.

Wootton-Barba also showed a rate of inhibition of DPPH of beet juice up to 100%, showing that beet juice has higher values than tomato juice and carrot juice.

The antioxidant activity of beets comes mainly from compounds such as betalans, a class of betalamic acid derivatives that can be divided into two structural groups: betacyanins and betaxanthines (PITALUA et al., 2010).

Among the phenolic acids found in beets are hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids, among them 4-hydroxybenzoic acid, cinnamic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, ferulic acid and caffeic acid, gallic acid (WRUSS et al., 2015; RAVICHANDRAN et al., 2012).

In addition to high antioxidant activity, beet is a source of many other health-promoting components, such as folic acid, iron, magnesium, selenium, potassium, calcium, zinc, phosphorus, biotin, niacin and  $\beta$ -carotene, as well as vitamins A, B6 and C. The high antioxidant capacity of beet juice, along with its other nutritional value, make beet juice a positive addition to the diet (WOOTTON-BARBA, 2011). Whey also has advantageous nutritional properties containing proteins with high content of essential amino acids, especially branched-chain ones. It also has high calcium content and bioactive peptides (HARAGUCHI, 2006).

## 4 CONCLUSIONS

The results showed that yeasts B9 and C16 presented the best performances regarding survival during passage through the simulated gastrointestinal tract, indicative of adhesion to intestinal epithelium and  $\beta$ -galactosidase production; B9 being chosen for the production of the beverage based on fermented cheese whey and beet juice.

The product obtained stands out for being commercially innovative, where it was possible to obtain a product with antioxidant and lactose-free properties without the addition of commercial  $\beta$ -galactosidase, using the fermentative yeast itself and potentially probiotic. Which is advantageous both economically and functionally. In addition to presenting the benefits already inherent to whey and beet.



## 5 REFERENCES

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alegações de Propriedades Funcionais Aprovadas. Disponível em <[www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)> Acesso em: 10 de Agosto de 2014.

ALVES FILHO G., E., RODRIGUES, T. H. S., FERNANDES, F. A. N., PEREIRA, A. L. F., NARAIN, N., DE BRITO, E. S., RODRIGUES, S. Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. **Food Research International**, v. 99, p. 461-468, 2017.

ANDRADE, R. P., MELO, C. N., GENISHEVA, Z., SCHWAN, R. F., DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food research international**, v. 91, p. 72-79, 2017.

BETORET, E., CALABUIG-JIMENEZ, L., PATRIGNANI, F., LANCIOTTI, R., DALLA ROSA, M. Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 418-422, 2017.

CARDOSO, V. M., BORELLI, B. M., LARA, C. A., SOARES, M. A., PATARO, C., BODEVAN, E. C., ROSA, C. A. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, v. 69, p. 331-340, 2015.

CEUGNIEZ, A., COUCHENEY, F., JACQUES, P., DAUBE, G., DELCENSERIE, V., DRIDER, D. Anti-Salmonella activity and probiotic trends of *Kluyveromyces marxianus* S-2-05 and *Kluyveromyces lactis* S-3-05 isolated from a French cheese, Tomme d'Orchies. **Research in microbiology**, v. 168, n. 6, p. 575-582, 2017.

CEUGNIEZ, A., DRIDER, D., JACQUES, P., COUCHENEY, F. Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. **Food microbiology**, v. 52, p. 177-184, 2015.

CHANALIA, P., GANDHI, D., ATTRI, P., DHANDA, S. Purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from probiotic *Pediococcus acidilactici* and its use in milk lactose hydrolysis and galactooligosaccharide synthesis. **Bioorganic Chemistry**, 2018.

CHEN, L. S., M. A. Y., MAUBOIS, J. L., HE, S. H., CHEN, L. J., LI, H. M. Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. **Dairy Science e Technology**, v. 90, n. 5, p. 537-548, 2010.

COSTA, G. M., DE CARVALHO SILVA, J. V., MINGOTTI, J. D., BARÃO, C. E., KLOSOSKI, S. J., PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange

juice. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 195-201, 2017.

DAGBAGLI, S.; GOKSUNGUR, Y. Optimization of b-galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 11-12, 2008.

DATTA, S., TIMSON, D. J., ANNAPURE, U. S. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 3039-3049, 2017.

DIOSMA, G.; ROMANIN, D. E.; REY-BURUSCO, M. F.; LONDERO, A.; GARROTE, G. L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-53, 2013.

DRAGONE, G., MUSSATTO, S. I., VILANOVA, M., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., SILVA, J. B. A.. Obtenção e caracterização de bebida destilada a partir da fermentação do soro de queijo. **Brazilian Journal of Food Technology**, Braga, v. 7, p. 120-123, June 2009

DUARTE, W. F., DIAS, D. R., OLIVEIRA, J. M., TEIXEIRA, J. A., DE ALMEIDA E SILVA, J. B., SCHWAN, R. F. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabiroba, jaboticaba and umbu LWT. **Food Science and Technology**, v. 43, n. 10, p. 1564-152, 2010.

ESCUADERO-LÓPEZ, B., CERRILLO, I., GIL-IZQUIERDO, Á., HORNERO-MÉNDEZ, D., HERRERO-MARTÍN, G., BERNÁ, G., FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S. Effect of thermal processing on the profile of bioactive compounds and antioxidant capacity of fermented orange juice. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 67, n. 7, p. 779-788, 2016.

FADDA, M. E., MOSSA, V., DEPLANO, M., PISANO, M. B., e COSENTINO, S. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT-Food Science and Technology**, v. 75, p. 100-106, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. **Disponível em:** <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)>. Acesso em: 10 de novembro de 2013.

FOOD CHEMICAL CODEX (1993). (3rd ed.). Washington, D.C.: National Academy Press.

FURLAN, SA, SCHNEIDER, AL, MERKLE, R., DE FÁTIMA CARVALHO-JONAS, M., JONAS, R. Formulation of a lactose-free, low-cost culture medium for the production of  $\beta$ -D-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 7, p. 589-593, 2000.

GÄNZLE, M. G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 685-694, 2008

GIBSON, G. R., PROBERT, H. M., VAN LOO, J., RASTALL, R. A., ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition research reviews**, v. 17, n. 2, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G. R., SCOTT, K. P., RASTALL, R. A., TUOHY, K. M., HOTCHKISS, A., DUBERT-FERRANDON, A., MACFARLANE, S. Dietary prebiotics: current status and new definition. **Food Sci Technol Bull Funct Foods**, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2010.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M., CARRASCOSA, A. V., REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156-1162, 2015.

GONZÁLEZ-DELGADO, I., LÓPEZ-MUÑOZ, M. J., MORALES, G., SEGURA, Y. Optimisation of the synthesis of high galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose with  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **International Dairy Journal**, v. 61, p. 211-219, 2016.

GUPTA, P.K.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 03, p. 409-421, 1997.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica / John E. Hall. - 12.ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, p. 823, 2011.

HARAGUCHI, F. K., ABREU, W. C., PAULA, H. D. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. *Rev Nutr*, v. 19, n. 4, p. 479-88, 2006.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial properties of yeasts: from fundamental do novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-12, 2012.

HOFMANN, A. F. Bile secretion and the enterohepatic circulation of bile acids. **Gastrointestinal and liver disease**, p. 937-948, 1998.

KANDYLIS, P., PISSARIDI, K., BEKATOROU, A., KANELAKI, M. E KOUTINAS, A.A. Bebidas probióticas lácteas e não lácteas. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2016.

KIEFER, I., PROCK, P., LAWRENCE, C., WISE, J., BIEGER, W., BAYER, P., RIEDER, A. Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased serum antioxidants and folate in healthy adults. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 3, p. 205-211, 2004.

KOS, B., ŠUŠKOVIĆ, J., VUKOVIĆ, S., ŠIMPRAGA, M., FRECE, J., MATOŠIĆ, S.

Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n.6, p. 981-987, 2003.

KUMURA, H., TANOUE, Y., TSUKAHARA, M., TANAKA, T., SHIMAZAKI, K. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 12, p. 4050-4056, 2004

MACCAFERRI, S., KLINDER, A., BRIGIDI, P., CAVINA, P., COSTABILE, A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 4, p. 956-964, 2012.

NEMATOLLAHI, A., SOHRABVANDI, S., MORTAZAVIAN, A. M., JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49-53, 2016.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.300, p.57–62, 2010.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions—a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57-62, 2010.

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM<sup>2</sup>, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.;JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bileresistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World J of Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p 35–37, 2006.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308-319, 2015.

PELLETIER, C., BOULEY, C., CAYUELA, C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P., BELLON-FONTAINE, M. N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, 1997.

PELLETIER, C., BOULEY, C.C., BOUTTIER, S., BOURLIOUX, P. BELLON-FONTAINE, M-N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, 1997, p. 1725-1731.

PÉREZ, P. F., MINNAARD, Y., DISALVO, E. A., DE ANTONI, G. L. SURFACE properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and environmental microbiology**, v. 64, n. 1, p. 21-26, 1998.

PITALUA, E., JIMENEZ, M., VERNON-CARTER, E. J., BERISTAIN, C. I. Antioxidative

activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 2, p. 253-258, 2010.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefir. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 257-263, 2010.

RAVICHANDRAN, K., AHMED, A. R., KNORR, D., SMETANSKA, I. The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 16-20, 2012.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006

SABER, A., ALIPOUR, B., FAGHFOORI, Z., KHOSROUSHAHI, A. Y. Secretion metabolites of dairy *Kluyveromyces marxianus* AS41 isolated as probiotic, induces apoptosis in different human cancer cell lines and exhibit anti-pathogenic effects. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 408-421, 2017.

SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., MORELLI, L., MARTEAU, P., BRASSART, D., DEVOS, W. M., FONDEN, R., SAXELIN, M., COLLINS, K., MOGENSEN, G., BIRKELAND, S. E., MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 93-106, 1998.

SANTIBÁÑEZ, L., FERNÁNDEZ-ARROJO, L., GUERRERO, C., PLOU, F. J., ILLANES, A. Removal of lactose in crude galacto-oligosaccharides by  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 85-91, 2016.

SHEN, Q., YANG, R., HUA, X., YE, F., WANG, H., ZHAO, W., E WANG, K. Síntese enzimática e identificação de oligossacáridos obtidos por transgalactosilação de lactose na presença de frutose utilizando  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces lactis*. **Química dos Alimentos**, v. 135, n. 3, p. 1547-1554, 2012.

SONG, C., LIU, G. L., XU, J. L., & CHI, Z. M. Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 954-960, 2010.

SPOHNER, S. C., SCHAUM, V., QUITMANN, H., CZERMAK, P. *Kluyveromyces lactis*: an emerging tool in biotechnology. **Journal of biotechnology**, v. 222, p. 104-116, 2016.

SYAL, P.; VOHRA, A. Probiotic potential of yeast isolated from traditional Indian food. **International Journal of Microbiology Research**, v. 2,n.3, p. 390-398, 2013.

SYAL, P.; VOHRA, A. Probiotic potential of yeast isolated from traditional Indian food. **International Journal of Microbiology Research**, v. 2,n.3, p. 390-398, 2013.

YOU, S., CHANG, H., YIN, Q., QI, W., WANG, M., SU, R., HE, Z. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of  $\beta$ -galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. *Bioresource technology*, v. 245, p. 1271-1276, 2017.

WOOTTON-BEARD, P. C .; RYAN, L.. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of functional foods**, v. 3, n. 4, p. 329-334, 2011.

WRUSS, J., WALDENBERGER, G., HUEMER, S., UYGUN, P., LANZERSTORFER, P., MÜLLER, U., WEGHUBER, J. Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 46-55, 2015