



IPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102018013962-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102018013962-2

(22) Data do Depósito: 09/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 04/02/2020

(51) Classificação Internacional: A23G 1/42; A23G 1/40.

(54) Título: ACHOCOLATADO EM PÓ SIMBIÓTICO ADICIONADO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS E DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE BACILLUS SUBTILIS NATTO

(73) Titular: INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO ESTADO DE SÃO PAULO - ITAL, Pessoa Jurídica. Endereço: AVENIDA BRASIL, CAMPINAS, SP, BRASIL(BR), Brasileira; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA. CGC/CPF: 78640489000153. Endereço: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380, Londrina, PR, BRASIL(BR), 86051-990; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, Pessoa Jurídica. Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS UNIVERSITARIO, LONDRINA, PR, BRASIL(BR), 86055-900, Brasileira

(72) Inventor: MARIA ANTONIA PEDRINE COLABONE CELLIGOI; AGNES IZUMI NAGASHIMA; FERNANDA ZARATINI VISSOTTO; IZABELA DUTRA ALVIM; AGNES MAGRI; RAUL JORGE HERNAN CASTRO GOMEZ; NICOLE CALDAS PAN.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 09/07/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 06/08/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

ACHOCOLATADO EM PÓ SIMBIÓTICO ADICIONADO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS E DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE BACILLUS SUBTILIS NATTO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção diz respeito ao desenvolvimento de achocolatado em pó simbiótico contendo o probiótico *Lactobacillus acidophilus* e o prebiótico fruto-oligossacarídeos de *Bacillus subtilis* natto.

Antecedentes da Invenção

[002] O desenvolvimento de novos produtos alimentícios visa proporcionar atrativos, trazendo melhoras no paladar, aparência, estabilidade, propriedades funcionais e diminuição de custos, o que torna estes mais convenientes ao consumidor. Atualmente os alimentos funcionais são uma tendência mundial, cuja a aceitabilidade e o reconhecimento de seus benefícios para a saúde e bem-estar são cada vez mais evidentes¹

[003] Na última década, o mercado de produtos funcionais cresceu muito além do que o de alimentos e bebidas, devido a fatores como o aumento do custo da saúde, crescimento da população e seu envelhecimento, aumento da incidência de doenças crônicas não transmissíveis e maior informação e grau de escolaridade da população, gerando maior interesse do consumidor pela inter-relação entre alimentos e saúde^{2 3}.

[004] Alimentos funcionais, farmacêuticos ou nutracêuticos, são definidos como alimentos que, em virtude da presença de componentes fisiologicamente

¹ Sangeetha PT, Ramesh MN, Prapulla SG (2005) Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. Trends Food Sci Technol 16:442-457. Doi: 10.1016/j.tifs.2005.05.003.

² Vialta A, Madi LFC (2017) O workshop ingredientes, alimentos processados funcionais e saúde no âmbito das atividades do Agropolo Campinas-Brasil. Brazilian J Food Technol 21. doi: 10.1590/1981-6723.1017.

³ Kaur N, Singh DP (2017) Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. Appetite 112:167-187. Doi: 10.1016/j.appet.2017.01.033.

ativos, proporcionam benefícios à saúde humana, além da nutrição básica⁴. O conhecimento científico sobre o papel benéfico dos componentes dos alimentos funcionais na prevenção de doenças e consequente melhoria na qualidade de vida está rapidamente crescendo e impulsionando o mercado.

[005] Atualmente, sabe-se que a riqueza e a diversidade da microbiota intestinal são influenciadas pela dieta e padrões alimentares, que por sua vez influenciam a saúde humana⁵. A dieta está relacionada a cada 6 de 10 causas de morte, além de ser responsável por cerca de 70% dos tipos de câncer. Estudos recentes demonstram a ligação da causa, prevenção ou tratamento de doenças como obesidade, diabete, doenças coronárias, hipertensão, osteoporose, doença inflamatória intestinal, depressão e esquizofrenia, à falta de uma flora intestinal balanceada e favorecida por uma boa alimentação⁶. Nesse contexto, a utilização diária de alimentos funcionais pode ser vista como um meio para reduzir os custos e cuidados com a saúde pública e contribuir não apenas para um período de vida mais longo, mas também para uma vida mais saudável.

[006] De acordo com Vialta e Madi, o mercado de produtos funcionais continuará a crescer nos próximos anos sendo o grande desafio, para que o Brasil acompanhe a demanda do mercado por produtos funcionais, a necessidade de aumento em pesquisas na área, desenvolvimento de novos produtos e investimento. O desenvolvimento de ingredientes funcionais e a comprovação científica de seus efeitos também têm esbarrado no alto custo de produção, além do investimento para atender às normas de eficácia e segurança de uso, rotulagem e informação ao consumidor.

[007] Dentre os componentes ativos presentes nos alimentos funcionais, os prebióticos vêm ganhando grande destaque, devido as suas propriedades

⁴ Patil GR, Singh AK (2005) Recent Developments in Health Foods and Nutraceuticals. In: 18th Short Course. National Dairy Research Institute. P 300.

⁵ Collins FL, Kim SM, McCabe LR, Weaver CM (2017) Bone Toxicology. Doi: 10.1007/978-3-319-56192-9

⁶ Kanji S, Fonseka TM, Marshe VS, Sriretnakumar V, Hahn MK, Muller DJ (2017) The microbiome-gut-brain axis: implications for schizophrenia and antipsychotic induced weight gain. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 268:3-15. Doi: 10.1007/s00406-017-0820-z.

funcionais. Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares fermentáveis não digeríveis que beneficiam a saúde através da fermentação seletiva, levando a modificações na composição e atividade da microbiota intestinal⁷. Dentre os prebióticos mais utilizados, e também reconhecidos como fibras alimentares, estão os oligossacarídeos. Oligossacarídeos são carboidratos de ocorrência natural com baixo grau de polimerização (GP) variando entre 3 e 10 unidades de monossacarídeos⁸. Seu uso, recentemente foi reportado, como modificador de respostas biológicas incluindo efeitos anti-inflamatórios sistêmico e anti-colesterolêmico⁹.

[008] Nesse contexto, os oligossacarídeos são amplamente reconhecidos como ingredientes alimentares funcionais, e dentre esses, destacam-se os fruto-oligossacarídeos (FOS) devido a três fatores: suas propriedades funcionais abrangentes, a produção em larga escala ser relativamente simples e o seu sabor doce, muito similar ao da sacarose¹⁰. Os FOS são considerados prebióticos, ou seja, não sofrem a ação das enzimas digestivas do trato gastrointestinal e chegam intactos ao intestino, onde estimulam o crescimento de bactérias benéficas que trazem uma série de vantagens ao hospedeiro¹¹. A não digestibilidade de alguns oligossacarídeos vem do átomo de carbono anomérico (C¹ ou C²) das unidades de monossacarídeos que possuem configuração que tornam as ligações glicosídicas não digeríveis pela atividade hidrolítica das enzimas digestivas. Dessa forma, são considerados açúcares não calóricos. Por não serem digeridos pelos seres humanos, são adequados para uso em doces, alimentos de baixa caloria, e para o consumo por pessoas

⁷ Roberfroid M (2007) Prebiotics: The Concept Revisited. *J Nutr* 22-3166:830S.

⁸ Carabin IG, Flamm WG (1999) Evaluation of safety of insulin and oligofructose as dietary fibre. *Reg Toxicol Pharmacol* 30:268-282.

⁹ Giese EC, Barbosa AM, Dekker RFH (2010) Pathways to bioactive oligosaccharides: biological functions and potential applications. In: *Handbook of Carbohydrate Polymers*. Pp 279-309.

¹⁰ Yun JW (1996) Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. *Enzyme Microb Technol* 19:107-117. Doi: 10.1016/0141-0229(95)00188-3.

¹¹ Silva PB Da, Garcia S, Baldo C, Celligoi MAPC (2016) Prebiotic activity of fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. *Acta Aliment* 46:1-7. Doi: 10.1556/066.2016.0004.

com diabetes. Além disso, apresentam efeitos semelhantes às fibras dietéticas, podendo assim, prevenir a constipação¹²¹³.

[009] Estudos relatam os efeitos benéficos dos FOS sob a produção de estrógenos¹⁴, a absorção mineral¹⁵, propriedades anticancerígenas¹⁶¹⁷, antidiabéticas¹⁸, hipolipidêmicos¹⁹, imunomoduladoras²⁰ e anti-inflamatórias²¹.

[010] Devido aos seus efeitos benéficos serem comprovados, em 2000, o U.S. Food and Drug Administrations (FDA) reconheceu os FOS como “Generally Recognized as Safe” (GRAS), podendo ser usados como ingredientes de alimentos e produtos nutricionais como fonte de energia seletiva nos tratos digestivos humano e animal. Desde 1990 era usado como alimento médico para aves domésticas, e em 1994 foi liberado para uso em iogurtes e pães como suplemento dietético. Atualmente, é usado como ingrediente alimentar

¹² Crittenden RG, Playne MJ (1996) Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 7:353-361.

¹³ Castro A, Céspedes G, Carballo S, Bergenstahl B, Tornberg E (2013) Dietary fiber, fructooligosaccharides, and physicochemical properties of homogenized aqueous suspensions of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Res Int* 50:392-400. Doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.048.

¹⁴ Tousein Y, Uehara M, Abe F, Kimira Y, Ishimi Y (2013) Effects of short-term fructooligosaccharide intake on equol production in Japanese postmenopausal women consuming soy isoflavone supplements: a pilot study. *Nutr J* 12:127. Doi: 10.1186/1475-2891-12-127.

¹⁵ Lopez HW, Coudray C, Feillet-coudray C, Demigne C, Re C (2000) Fructooligosaccharides enhance mineral apparent absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J Nutr Biochem* 11:500-508 . doi: 10.1016/S0955-2863(00)00109-1

¹⁶ Allsopp P, Possemiers S, Campbell D, Oyarzábal IS, Gill C, Rowland I (2013) An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity. *Anaerobe* 22:38-44 . doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.05.006

¹⁷ Zheng S, Steenhout P, Kuiran D, Qihong W, Weiping W, Hager C, Haschke F, Clemens R a. (2006) Nutritional support of pediatric patients with cancer consuming an enteral formula with fructooligosaccharides. *Nutr Res* 26:154-162 . doi: 10.1016/j.nutres.2006.04.001

¹⁸ Bharti SK, Krishnan S, Kumar A, Rajak KK, Murari K, Bharti BK, Gupta AK (2013) Antidiabetic activity and molecular docking of fructooligosaccharides produced by *Aureobasidium pullulans* in poloxamer-407-induced T2DM rats. *Food Chem* 136:813-21 . doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.083

¹⁹ Giacco R, Clemente G, Luongo D, Lasorella G, Fiume I, Brouns F, Bornet F, Patti L, Cipriano P, Rivellese a a, Riccardi G (2004) Effects of short-chain fructo-oligosaccharides on glucose and lipid metabolism in mild hypercholesterolaemic individuals. *Clin Nutr* 23:331-40 . doi: 10.1016/j.clnu.2003.07.010

²⁰ Thakur M, Connellan P, Deseo M a, Morris C, Praznik W, Loeppert R, Dixit VK (2012) Characterization and in vitro immunomodulatory screening of fructo-oligosaccharides of *Asparagus racemosus* Willd. *Int J Biol Macromol* 50:77-81 . doi: 10.1016/j.ijbiomac.2011.09.027

²¹ Zenhom M, Hyder A, Vrese M De, Heller KJ, Roeder T (2011) Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPAR g and Peptidoglycan Recognition Protein 3 1 – 3. *J Nutr* 141:971-977 . doi: 10.3945/jn.110.136176.The

em mais de 18 países, tendo suas propriedades reconhecidas, como bifidogênicas, e aceito como fibra.

[011] Estruturalmente são polímeros lineares ou ramificados de frutose, mais especificamente formadas por polímeros de resíduos β -D-frutofuranosil ligados a um resíduo terminal D-glicosil e podem ser produzidas por plantas (frutanas) e microrganismos (levanas de baixo peso molecular ou FOS)²². No entanto, a obtenção de FOS por via vegetal apresenta baixa produtividade, além de ser sazonal.

[012] Além dos benefícios causados pela ingestão de prebióticos, os probióticos tem recebido bastante atenção na área. O propósito da administração de produtos probióticos também é proporcionar uma microbiota intestinal balanceada, impactando favoravelmente sobre a saúde do hospedeiro²³. É comprovado que o reestabelecimento do microambiente gastrointestinal melhora a absorção e também impacta diretamente no aumento da imunidade²⁴.

[013] Para potencializar os efeitos benéficos dos prebióticos e probióticos, hoje já existe a administração combinada dos dois em um único produto ou alimento, recebendo a denominação de simbióticos. A aplicação destes tem se mostrado uma alternativa promissora no uso isolado ou associado à antibióticos em pacientes no período pós-operatório devido ao controle de infecções bacterianas²⁵. Foi demonstrado que o efeito desses componentes administrados simultaneamente pode levar a efeitos sinérgicos, além dos de adição, dos seus benefícios à saúde²⁶ sendo uma alternativa promissora a

²² Martínez-Fleites C, Ortíz-Lombardía M, Pons T, Tarbouriech N, Taylor EJ, Arrieta JG, Hernández L, Davies GJ (2005) Crystal structure of levansucrase from the Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biochem J* 390:19–27 . doi: 10.1042/BJ20050324

²³ Kearney SM, Gibbons SM (2018) Designing synbiotics for improved human health. *Microb Biotechnol* 11:141–144 . doi: 10.1111/1751-7915.12885

²⁴ Saavedra JM (2001) Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 73:

²⁵ Flesch AGT, Poziomyck AK, Damin DC (2014) O uso terapêutico dos simbióticos. *ABCD Arq Bras Cir Dig* 27:206–209 . doi: 10.1590/S0102-67202014000300012

²⁶ Park J, Floch MH (2007) Prebiotics, Probiotics, and Dietary Fiber in Gastrointestinal Disease. *Gastroenterol Clin North Am* 36:47–63 . doi: 10.1016/j.gtc.2007.03.001

administração isolada dos prebióticos, visando a redução dos custos com a saúde pública.

[014] Um grande fator que tem restringido a ampla utilização do FOS na indústria alimentícia é o custo de produção. A obtenção do FOS a partir de substratos vegetais está sujeira a intempéries climáticas, grandes oscilações do preço de mercado dos produtos agrícolas e a produção sazonal. Além disso, o rendimento da produção de FOS usando enzimas originárias de plantas é baixo, e a sua produção em massa é limitada pelas condições citadas anteriormente. Portanto, a indústria depende principalmente de enzimas microbianas. Assim, a produção de FOS através de processos fermentativos é vantajoso sob a extração de FOS de origem vegetal, pois apresenta maior produtividade e rendimento, além de tornar o processo mais rentável.

[015] Dessa forma, a produção de FOS em larga escala a um preço mais acessível possibilita sua vasta aplicação em produtos alimentícios. Os achocolatados são alimentos consumidos por pessoas de todas as idades e faz parte do hábito de consumo do brasileiro, sendo de relevante importância econômica para as empresas alimentícias. Sua formulação é composta principalmente por cacau em pó, açúcar e aroma, e suas formulações dietéticas e/ou light apresentam maior quantidade de lipídeos, quase o dobro da concentração dos ácidos graxos saturados, e de proteínas, uma vez que o teor de cacau em pó é maior.

[016] Considerando a vasta abrangência de consumo deste produto, propomos tornar o achocolatado um “alimento funcional” através da substituição do açúcar convencional, pelo FOS, o que também o torna um produto menos calórico. Além disso, para potencializar o efeito benéfico do produto, propomos a adição de uma cepa probiótica, gerando, portanto, um produto simbiótico. Os simbióticos consistem na utilização simultânea de um prebiótico e um probiótico, e o efeito sinérgico desses dois componentes leva ao aumento da persistência do probiótico no trato gastrointestinal, uma vez que o prebiótico selecionado deve ser metabolizável pelo microrganismo, o que leva ao aumento da sua capacidade de sobrevivência.

[017] A busca de anterioridade foi realizada em 26 de fevereiro de 2018 na base de dados do INPI e do Espacenet, relacionando as palavras achocolatado, bebidas lácteas, fruto-oligossacarídeo, oligofrutose, oligofrutana, frutana, frutooligo, fruto oligo, fruto-oligo, oligossacarídeo, prebiótico, probiótico e simbiótico. Foram encontradas patentes descrevendo a produção e formulação de produtos alimentícios contendo prebióticos e probióticos, como bolachas, queijo, bebidas lácteas, sorvetes e iogurtes.

[018] A patente BR 10 2015 025575-6 A2 refere-se à produção de queijos cremosos funcionais, adicionado de bactérias lácticas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, não restringindo-se a essas cepas) e prebiótico(s) (principalmente inulina e frutooligossacarídeo).

[019] A patente BR 10 2014 028655-1 A2 descreve o processo de obtenção de queijo tipo chevrotin simbiótico, com leite de cabra e é reportado os benefícios desse produto simbiótico na multiplicação de culturas benéficas para o organismo humano.

[020] As patentes BR 10 2014 024495-6 A2 e RU 2478294 (C1) descrevem bactérias lácticas probióticas e ingredientes prebióticos para a formulação de um iogurte simbiótico.

[021] A patente BR 10 2013 020557-5 A2 descreve a formulação de um biscoito funcional simbiótico com a presença da inulina (prebiótico) e o *Lactobacillus caseishirota* (probiótico) com o objetivo de prevenir a constipação em adultos e crianças.

[022] A patente BR 11 2013 004194-3 A2 refere-se a uma composição de um produto simbiótico com a combinação de carboidrato prebiótico e uma cepa de *Bacillus* formadora de esporos, como probióticos.

[023] A patente PI 1001541-8 B1 descreve um processo para produção de um produto simbiótico, para consumo humano, a partir da utilização de resíduos industriais de laticínios e citros, utilizando como fonte de matéria-prima soro de leite em pó e bagaço de laranja.

[024] A patente PI 0905343-3 A2 descreve sorvetes ~~comestíveis~~ contendo culturas probióticas e ingredientes prebióticos. A patente “Ice-cream production method”, RU 2012108991 (A), descreve a produção de sorvetes com a adição de lactulose, visando melhorar as propriedades simbióticas do produto.

[025] A patente CN103271403 (A) descreve a produção de uma bebida simbiótica a base de aveia contendo fruto-oligossacarídeo e inulina.

[026] Na invenção intitulada “Symbiotic milk beverage preparation method”, CN 106234590 (A), xarope de frutose, probióticos e prebióticos, *Lactobacillus casei* ou *Lactobacillus paracasei* liofilizado, xilitol, eritritol e semelhantes são adicionados ao leite desnatado.

[027] Muitas patentes abordam produtos alimentícios simbióticos devido à importância desses produtos associados, que aumentam a qualidade do produto final. Porém, patentes envolvendo produção de achocolatados simbióticos acrescidos de *Lactobacillus acidophilus* e de fruto-oligossacarídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis natto* não foram descritos e encontrados nesta busca.

Sumário da Invenção

[028] A presente invenção refere-se à um achocolatado em pó simbiótico com *Lactobacillus acidophilus* e fruto-oligossacarídeos produzidos por *Bacillus subtilis natto*. O produto apresenta elevada importância industrial, visando à comercialização de um achocolatado com propriedades funcionais. Também se torna um processo relevante, principalmente no setor alimentício, visando o desenvolvimento de produtos promissores a saúde humana, como os fruto-oligossacarídeos de *B. subtilis*, que já foi comprovado como prebiótico, o que poderá contribuir para aumentar o valor nutricional do produto, além de auxiliar na melhoria da qualidade de vida da população, que busca incessantemente por alimentos saudáveis.

Descrição Detalhada da Invenção

Produção do prebiótico fruto-oligossacarídeos

[029] Para a produção de FOS, foi utilizado o *Bacillus subtilis* natto CCT 7712, microrganismo isolado do alimento japonês Natto no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e identificado pela Coleção de Culturas Tropicais – Fundação André Tosello – Campinas – SP. A cepa foi mantida a 4°C, em meio inclinado de preservação contendo (g L⁻¹): peptona, 50; extrato de carne, 30 e ágar, 20.

[030] O inóculo foi preparado pela transferência da cultura do meio de preservação para frascos Erlenmeyer (1L) com 200 mL de meio contendo (g L⁻¹): sacarose, 100; extrato de levedura, 2; KH₂PO₄, 2; (NH₄)₂SO₄, 1 e MgSO₄(7H₂O), 0,5 [29]. O pH do meio de inóculo foi ajustado em 7,0 com NaOH 2N. Após incubação por 24 horas, 150 rpm a 37°C, os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9050 x g, 15 min, 4°C para obtenção das células. O pellet celular foi solubilizado em solução salina (NaCl 0,9% (m/v)) e a concentração determinada por turbidimetria a $\lambda = 400$ nm e correlacionada a uma curva de calibração de biomassa (g L⁻¹).

[031] A produção de FOS foi realizada utilizando frascos de 2L contendo 400 mL de meio de fermentação, contendo (g L⁻¹): sacarose, 400; extrato citrato, 0,25. O meio foi inoculado com 0,2 g L⁻¹ de células. O pH inicial foi ajustado em 7,7 com NaOH 2 N e a temperatura foi mantida a 35°C e agitação de 234 rpm. Após 48 horas, o cultivo foi interrompido por centrifugação a 9050 x g por 15 min, a 4°C²⁷.

[032] Após a centrifugação e retirada da biomassa, os FOS foram separados por membrana de ultrafiltração de acetato de celulose regenerado, com limite de peso molecular nominal de 3kDa (Millipore). O filtrado obtido foi precipitado com etanol absoluto na proporção de 1:3 (v/v), por 12 horas a 4°C. Após centrifugação (12000 x g, 15 minutos, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e os FOS solubilizados em água destilada e precipitados novamente nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi dialisado por 24 horas, com 2 trocas de água destilada, e liofilizado.

²⁷ Patrícia BDS, Dionsio B, Maria APCC (2014) High production of fructooligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. African J Biotechnol 13:2734–2740 . doi: 10.5897/AJB2014.13797

[033] As quantificações de FOS (cestose e nistose), sacarose, glicose e frutose foram realizadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Jung et al.²⁸, em cromatógrafo Shimadzu, acoplado a um detector refratométrico diferencial Shimadzu RID-10^a e coluna AMINEX Carbohidrate HPX-87C (300 x 7,8 mm). Como eluente na fase móvel foi utilizada água desmineralizada (ultrapura) e degaseificada a 80°C sob fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Como padrões foram utilizados 1-cestose, nistose (Sigma Aldrich), sacarose, glicose e frutose. As amostras submetidas à análise foram previamente filtradas com membrana 0,45 µm (Millipore). A determinação realizada em quadruplicata indicou produção de 76,21 ± 3,16 g L⁻¹ de fruto-oligossacarídeos.

*Produção do probiótico *Lactobacillus acidophilus* em pó*

[034] A bactéria láctica *Lactobacillus acidophilus* La-5 foi obtida de cultura comercial na forma liofilizada (Chr. Hansen, Dinamarca). A cultura de *L. acidophilus* foi reativada em meio estéril (110°C, 5 min) contendo 10% (m/v) de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé Brasil Ltda.) e 1% (m/v) de sacarose, e incubada a 37°C por 18-24 h²⁹. Foi adicionada 90 mL de solução estéril de leite em pó desnatado 10% (m/v) à cultura assim produzida. Após ser incubada nas mesmas condições iniciais, adicionou-se 900 mL de solução estéril de leite em pó desnatado 10% (m/v) aos 100 mL da cultura obtida, permanecendo em incubação a 37°C por 18-24 h. Posteriormente, uma parte desse cultivo foi centrifugada (12.850 x g, 10 min, 4°C) para assim obter biomassa úmida.

[035] A biomassa foi congelada com adição de leite desnatado 10% (m/v) para posteriormente ser liofilizada. O leite desnatado vem sendo utilizado como crioprotetor, por conter grande quantidade de proteínas (32-35,7%) e lactose

²⁸ Jung KH, Yun JW, Kang KR, Lim JY, Lee JH (1989) Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. *Enzyme Microb Technol* 11:491–494 . doi: 10.1016/0141-0229(89)90029-X

²⁹ Pereira VG, Gómez RJHC (2007) Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. *Semin Ciências Agrárias* 28:229–240

(48,4-54,1%), que são capazes de estabilizar os constituintes da membrana celular e evitam a injúria celular³⁰³¹.

Contagem de bactéria láctica

[036] Para a contagem de bactéria láctica, foi aplicada a técnica de semeadura em profundidade (método de “*pour plate*”) utilizando-se meio MRS (Man, Rogosa e Sharp) ágar estéril, inoculando assepticamente as placas em triplicata, a partir de diluições seriadas adequadas das amostras em água peptonada 0,1% (m/v) estéril. As placas foram incubadas em estufa a 37°C para *Lactobacillus acidophilus* durante 72 horas. A unidade formadora de colônia (UFC) é dada por $UFC/g = N \times F$, em que N é o número de colônias e F é o fator de diluição.

Desenvolvimento do achocolatado em pó simbiótico

[037] O achocolatado em pó foi desenvolvido pela mistura dos ingredientes conforme formulação apresentadas na tabela 1. A formulação 1 refere-se ao achocolatado tradicional, sem probiótico e sem FOS, a formulação 2 ao achocolatado probiótico, sem FOS e a formulação 3 ao achocolatado simbiótico com probiótico e FOS.

Estabilidade no armazenamento

[038] O achocolatado em pó foi armazenado por 60 dias a 25°C em embalagem de plástico na cor branca e com tampa de rosca (FIG 3). Para as análises periódicas da viabilidade dos microrganismos, amostras de 700 mg das formulações foram coletadas e solubilizadas em 6,3 mL de água peptonada. Das amostras, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para diluição seriada seguida de plaqueamento em meio MRS ágar. Após crescimento em estufa a 37°C por 72 horas, determinou-se o número de unidades formadoras

³⁰ Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Vias I (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int J Food Microbiol* 65:173–182 . doi: 10.1016/S0168-1605(00)00513-4

³¹ Winton AL, Winton KB (2014) *Milk and Milk Products*

de colônia de *Lactobacillus acidophilus*. As análises foram realizadas em triplicata. A análise de variância e a comparação de média por teste de Tukey foram realizadas ao nível de 5% de significância utilizando o Software SAS-Agri.

[039] Os resultados obtidos (tabelas 2 a 4) mostraram que o achocolatado simbiótico apresentou menor queda de viabilidade quando comparado ao achocolatado probiótico. O ciclo logarítmico para o achocolatado probiótico após 60 dias foi de 2,44, enquanto para o simbiótico foi de 1,56. A queda mais acentuada de viabilidade ocorreu durante os primeiros 15 dias de armazenamento, sendo de 1,48 ciclos logarítmicos (22,06%) para o probiótico e 0,69 para o simbiótico (12,00%).

[040] A melhor viabilidade do microrganismo probiótico no achocolatado simbiótico pode ser devido à presença do prebiótico fruto-oligossacarídeos, sendo que, após 60 dias de armazenamento, o achocolatado com presença do FOS apresentou 72,87% da sua viabilidade inicial e do achocolatado probiótico, sem FOS, 63,64% (Tabela 3). O FOS mostrou ser um prebiótico adequado para a cepa *L. acidophilus*.

Atividade de água e distribuição do tamanho médio de partículas

[041] A atividade de água foi medida utilizando o analisador Decagon Device, marca Aqualab, modelo Aqua LAB 4TEV. A distribuição do tamanho médio de partículas foi avaliada por espalhamento de luz utilizando o analisador de distribuição de tamanho de partícula por difração a laser Horiba – LA950. As amostras foram dispersas em etanol absoluto e adicionadas à câmara de amostras do equipamento. As análises foram realizadas em triplicata.

[042] Os resultados apresentados na tabela 5 mostram que os achocolatados apresentaram atividade de água variando de 0,39 a 0,51. A atividade de água é um parâmetro que determina a vida de prateleira de um alimento pela disponibilidade da água para a atividade microbiológica, química ou enzimática.

Quando a atividade de água está abaixo de 0,6 – 0,7, não há crescimento microbiológico³².

[043] Já para a característica de distribuição de tamanho de partículas dos achocolatados (FIG 4) (Tabela 5), é possível observar que as amostras apresentaram tamanhos variados de partículas. O achocolatado tradicional apresentou partículas de menor diâmetro médio (36,14 µm) e o simbiótico, com partículas de maior diâmetro (137,56 µm), sendo resultante das partículas de maior diâmetro a partir da liofilização do FOS.

[044] Conclui-se que o achocolatado desenvolvido é uma base promissora para produção de bebida probiótica com o *Lactobacillus acidophilus* e que o FOS nas concentrações utilizadas melhorou a viabilidade celular, desenvolvendo assim um produto simbiótico de interesse à indústria alimentícia.

Legendas das figuras

[045] **Figura 1.** Produção e separação do prebiótico fruto-oligossacarídeos por *Bacillus subtilis* natto.

[046] **Figura 2.** Produção e liofilização do probiótico *Lactobacillus acidophilus* no achocolatado em pó.

[047] **Figura 3.** Achocolatados: (A) Simbiótico (B) probiótico e (C) tradicional.

[048] **Figura 4.** Distribuição de tamanho de partícula das amostras de achocolatado A – tradicional; B – probiótico e C – simbiótico.

Tabelas

Tabela 1. Formulações de achocolatados

³² Fellows PJ, Oliveira FC, Rubensan JM, Nitzke JA, Thys RCS (2006) Tecnologia do processamento de alimentos : princípios e prática. In: Food processing technology. p 608.

Composição	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3
Sacarose (% m/m)	60	60	30
Maltodextrina (% m/m)	20	20	20
Leite em pó desnatado (% m/m)	10	-	-
Cacau em pó alcalino (% m/m)	10	10	10
<i>Lactobacillus acidophilus</i> * (liofilizado em leite em pó desnatado) (% m/m)	-	10	10
Fruto-oligosacarídeos (% m/m)	-	-	30

*suficiente para atingir uma concentração de 10^6 UFC/g

Tabela 2. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em ciclos logarítmicos nos achocolatados probióticos e simbióticos, após 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 25 °C.

Achocolatado	t= 0	t= 15 dias	t = 30 dias	t= 60 dias
Probiótico	6,71	5,23	4,5	4,27
Simbiótico	5,75	5,06	4,83	4,19

Tabela 3. Viabilidade em % de *Lactobacillus acidophilus* nos achocolatados probióticos e simbióticos, após 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento a 25 °C.

REIVINDICAÇÕES

1. **ACHOCOLATADO EM PÓ SIMBIÓTICO ADICIONADO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE *BACILLUS SUBTILIS NATTO***, caracterizado por ser um alimento funcional de baixa caloria, devido a substituição do açúcar convencional pelo FOS; Em virtude da utilização simultânea de um prebiótico e um probiótico, gerando um simbiótico, o efeito sinérgico desses dois componentes leva ao aumento da persistência do probiótico no trato gastrointestinal, uma vez que o prebiótico selecionado deve ser metabolizável pelo microrganismo, o que leva ao aumento da sua capacidade de sobrevivência;

2. **ACHOCOLATADO EM PÓ SIMBIÓTICO ADICIONADO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE *BACILLUS SUBTILIS NATTO***, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o achocolatado ser desenvolvido pela mistura dos seguintes ingredientes: 30% m/m de sacarose, 20% m/m de maltodextrina, 10% m/m cacau em pó alcalino, 10% m/m *Lactobacillus acidophilus* (liofilizado em leite em pó desnatado) e 30% m/m de fruto-oligossacarídeos;

3. **ACHOCOLATADO EM PÓ SIMBIÓTICO ADICIONADO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* E DE FRUTO-OLIGOSSACARÍDEOS DE *BACILLUS SUBTILIS NATTO***, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por o achocolatado em pó ter sido armazenado por 60 dias a 25°C em embalagem de plástico na cor branca e com tampa de rosca; Para as análises periódicas da viabilidade dos microrganismos, amostras de 700 mg das formulações foram coletadas e solubilizadas em 6,3 mL de água peptonada; Das amostras, alíquotas de 1,0 mL foram retiradas para diluição seriada seguida de plaqueamento em meio MRS ágar; Após crescimento em estufa a 37°C por 72 horas, determinou-se o número de unidades formadoras de colônia de *Lactobacillus acidophilus*; As análises foram realizadas em triplicata; A análise de variância e a comparação de

média por teste de Tukey foram realizadas ao nível de 5% de significância utilizando o Software SAS-Agri;

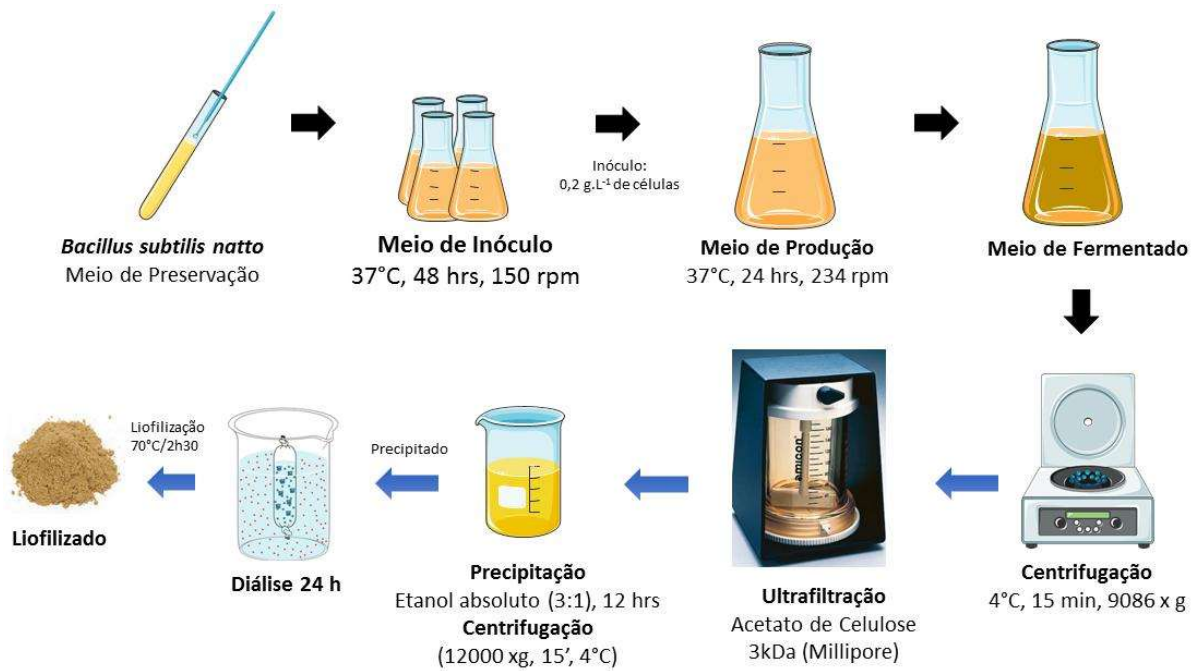
DESENHOS

Fig. 1

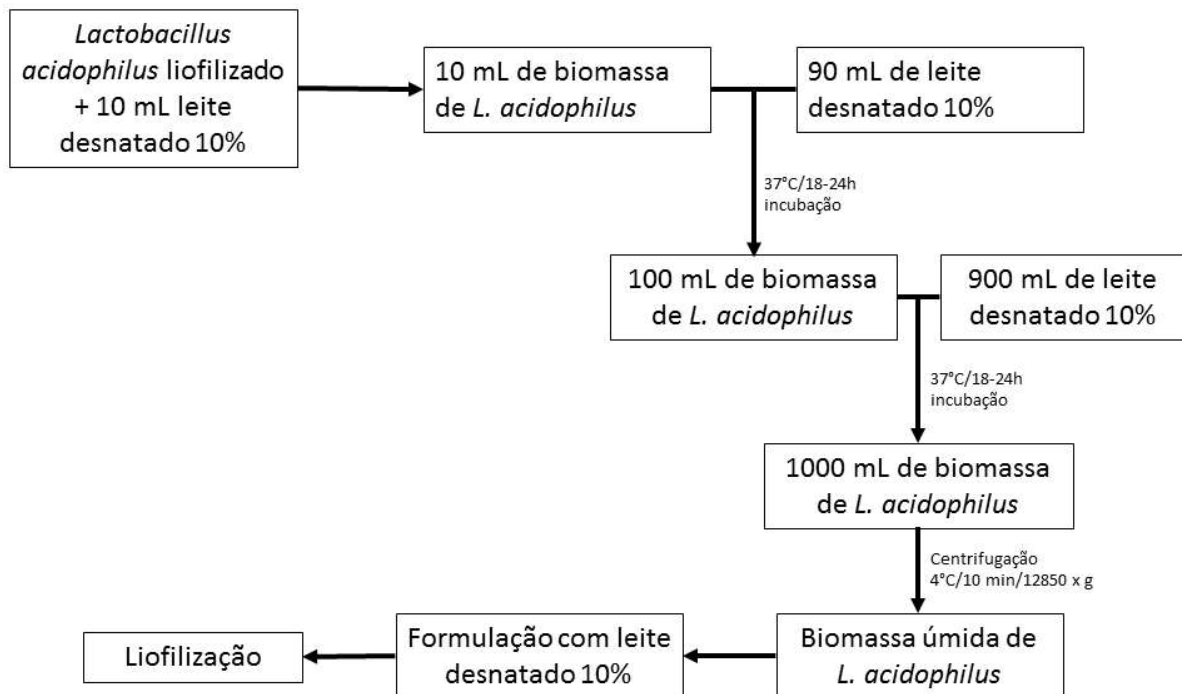


Fig. 2

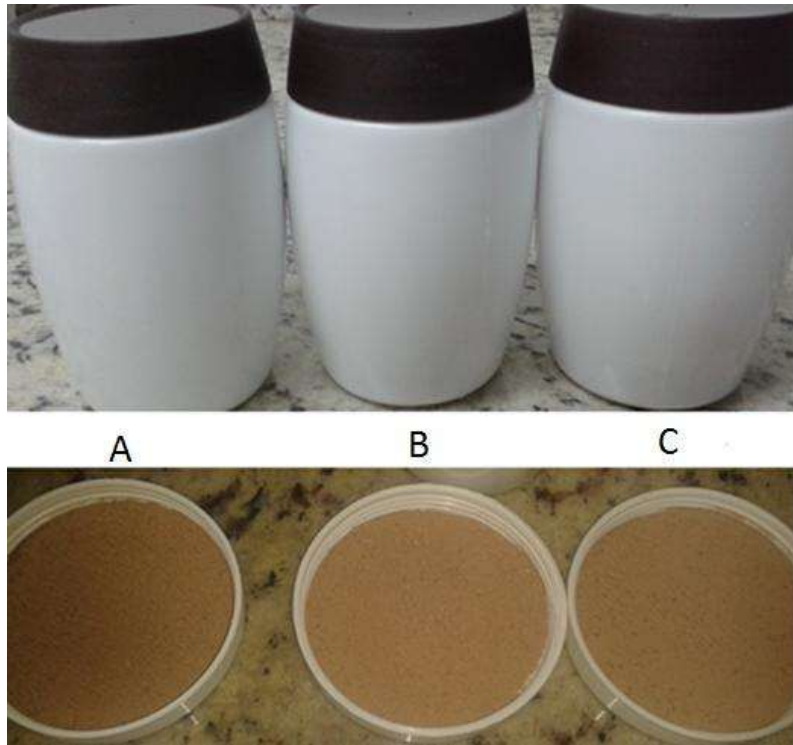


Fig. 3

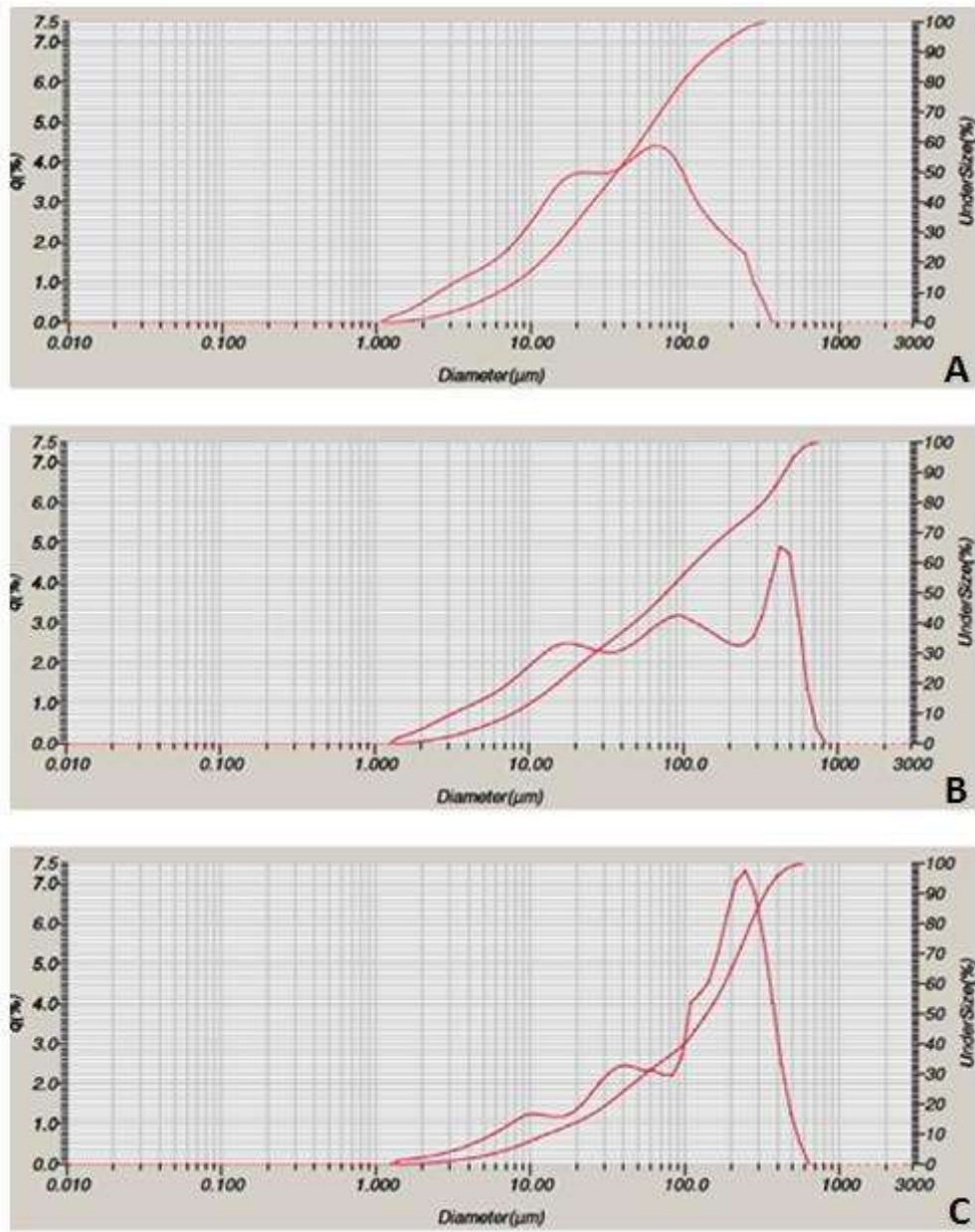


Fig. 4