

MAURICIO DE OLIVEIRA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE
PROBIÓTICOS COM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2005

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

L533d Leite, Mauricio de Oliveira, 1970-
2005 Desenvolvimento de processos para a produção de
probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20
/ Mauricio de Oliveira Leite. – Viçosa : UFV, 2005.
xii, 76f. : il. ; 29cm.

Orientador: Magda Alencar Teixeira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 71-76.

I. Microbiologia industrial. 2. Probióticos. 3. Lacto-
bacilos. 4. *Lactobacillus delbrueckii*. 5. Derivados do
leite - Microbiologia. 6. Microbiologia - Culturas e meios
de cultivo. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 660.62

MAURICIO DE OLIVEIRA LEITE

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE
PROBIÓTICOS COM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 21 fevereiro de 2005.

Prof^a. Célia Alencar de Moraes
(Conselheira)

Prof. Arnaldo Chaer Borges
(Conselheiro)

Prof. Cláudio Furtado Soares

Dr^a. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

Prof^a. Magdala Alencar Teixeira
(Orientadora)

Aos meus pais Antônio Emílio e Maria da Luz,
pelo amor, apoio e exemplo de vida.

À minha esposa Juliana e à minha filha Ana Clara,
pelo amor, carinho, apoio e pela amizade e compreensão.

Aos meus familiares, pelo incentivo.

AGRADECIMENTO

A Deus pela força da fé que nos move para novas conquistas.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do curso.

Aos meus pais que me ensinaram o caminho da honestidade, da fé e do trabalho, a todos os meus irmãos e demais familiares.

À minha filha Ana Clara pelo sorriso, pelos abraços, beijos e carinhos que me fortalecem nos momentos mais difíceis.

À minha esposa Juliana, pela compreensão, pelo carinho e companheirismo em todas as horas.

À professora Magdala, pela orientação, paciência, pelos ensinamentos, pela confiança e valiosa colaboração.

À professora Célia por todos os conselhos, pelas palavras de apoio, pela nobreza dos gestos e sentimentos, pelos ensinamentos e orientação;

Ao professor Cláudio, pelo apoio, profissionalismo e oportunidade;

Ao professor Chaer pela confiança, incentivos e conselhos;

À Doutora Cláudia pelo apoio, amizade e solidariedade;

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia.

Ao professor Brandão pelo apoio, conselhos e compreensão.

Aos amigos do Serviço de Vigilância – UFV, pelo apoio e pela solidariedade.

Ao Professor Luiz Fontes e ao Coordenador da DPP Antônio de Pádua, pela confiança e pelo apoio.

Aos amigos Bruno Milagres, Baltazar, Ana Cláudia, Eliane; Néia, Gustavo, Daniele, Gustavo, Agenor, Maurílio, Eliane e aos demais alunos do laboratório de Microbiologia Industrial.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos.

Ao Sr. Valente, pela grande contribuição na execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

Mauricio de Oliveira Leite, filho de Antônio Emílio de Oliveira Leite e Maria da Luz de Oliveira Leite, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 28 de outubro de 1970.

Em dezembro de 1997, graduou-se como Tecnólogo em Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

No período de 1998 a 2000, foi funcionário da Cooperativa Central do Estado de São Paulo (Leite Paulista), onde atuou como responsável técnico pela produção e pelo controle de qualidade de produtos lácteos.

Em março de 2001, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

Nesse mesmo ano, concluiu o curso de Pós-graduação "Lato Sensu" na área de Processamento de carnes, leite, ovos e pescado, pela Universidade Federal de Lavras – UFLA.

Em 2002 iniciou o trabalho no Laboratório de Físico-Química do Departamento de Tecnologia de Alimentos, onde atua na área de análise de alimentos e de determinação de compostos por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e cromatografia gasosa (GC).

Em abril de 2003, iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Microbiologia Industrial.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA	3
3 – MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 – Estabelecimento dos processos para a produção de probióticos	14
3.2 – Meio para produção das células do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	17
3.2.1 – Caracterização físico-química do soro de Queijo Minas Frescal ..	17
3.2.2 – Efeito de estabilizantes na precipitação de proteínas durante o tratamento térmico do soro de queijo Minas Frescal....	17
3.2.3 – Efeito da concentração de sais estabilizantes no crescimento do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal ...	18
3.2.4 – Produção da cultura estoque de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal.....	19
3.3 – Produção do concentrado de células viáveis e inativadas do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em escala piloto	19

3.4 – Produção de probióticos em escala piloto	20
3.4.1 – Produção de leite fermentado por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	20
3.4.2 – Produção de sorvete probiótico contendo células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	21
3.4.3 – Produção de leite em pó contendo células viáveis <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	22
3.4.4 – Produção de leite em pó contendo células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	22
3.4.5 – Produção de leite pasteurizado adicionado de células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	22
3.4.6 – Produção de leite UHT adicionado de células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	23
3.5 – Morfologia celular de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 nos diferentes meios de propagação de células e nos produtos probióticos	23
3.6 – Análise para decisão sobre a conveniência de registro de patente do processo	24
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 – Fluxograma do processo de produção de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal	25
4.2 – Meio de cultivo para produção de células de <i>L. delbrueckii</i> UFVH2b20	28
4.2.1 – Caracterização físico-química do soro de queijo Minas Frescal ...	28
4.2.2 – Efeito de estabilizantes na precipitação de proteínas durante o tratamento térmico	29
4.2.3 – Efeito da concentração de sais estabilizantes no crescimento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal..	33
4.2.4 – Estabelecimento do sistema de produção de células	34
4.3 – Processo de produção de probiótico	38

4.3.1 – Fluxograma de produção de leite fermentado por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	38
4.3.2 – Fluxograma de produção de sorvete contendo células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	40
4.3.3 – Fluxograma de produção de leite em pó contendo células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	42
4.3.4 – Fluxograma de produção de leite em pó contendo células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	44
4.3.5 – Fluxograma de produção de leite pasteurizado contendo células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	46
4.3.6 – Fluxograma de produção de leite UHT contendo células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	48
4.4 – Produção de probióticos em escala piloto	50
4.4.1 – Leite fermentado por <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	50
4.4.2 – Sorvete probiótico com <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	52
4.4.3 – Leite em pó contendo células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	53
4.4.4 – Leite em pó contendo células inativadas de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	55
4.4.5 – Leite pasteurizado adicionado de células inativadas do <i>L.</i> <i>delbrueckii</i> UFV H2b20	55
4.4.6 – Leite UHT adicionado de células inativadas do <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	57
4.5 – Morfologia de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 em resposta a diferentes meios e condições de cultivo	62
4.6 – Decisão sobre o registro de patente	65
5 – RESUMO E CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

RESUMO

LEITE, Mauricio de Oliveira Leite, M.S. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2005. **Desenvolvimento de processos para a produção de probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. Orientadora: Magdala Alencar Teixeira. Conselheiros: Célia Alencar de Moraes e Arnaldo Chaer Borges.

O objetivo deste trabalho foi definir as rotas tecnológicas para o desenvolvimento de processos de produção de probióticos contendo células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, bem como o de analisar a viabilidade técnica dos processos identificados, considerando a otimização do conjunto das etapas de cada processo. A produção de concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, a ser usado em todos os produtos, foi estabelecida em soro de queijo Minas Frescal esterilizado por calor. As condições ótimas para a esterilização foram determinadas. O rendimento em células foi da ordem de 10^9 UFC/mL. Os probióticos produzidos foram leite fermentado com *L. delbrueckii* UFV H2b20, leite em pó e sorvete contendo células viáveis dessa bactéria; foram produzidos também leite UHT, leite pasteurizado e leite em pó contendo células inativadas pelo calor. O leite fermentado apresentou valores de pH entre 4,0 a 4,5 e aproximadamente 10^8 UFC/g, e, estocado a 5°C, manteve-se nestas condições por até 30 dias; após 45 dias, a contagem foi de 10^7 UFC/g, valor ainda em conformidade com o estabelecido pela Resolução 47/97 de GMC para probióticos. O sorvete apresentou contagem na ordem de 10^8 UFC/g

até 45 dias a -20°C . Após 60 dias nessa temperatura, houve redução para 10^7 UFC/g, contagem estável até 90 dias. O leite em pó probiótico foi produzido com células pré-tratadas para melhor sobrevivência ao processo em *spray dryer*, rendendo 10^8 UFC/g de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Este número reduziu-se 10^7 UFC/g em 90 dias de estocagem a -20°C e a 10^6 e 10^5 à temperatura ambiente após 60 e 90 dias, respectivamente. A adição de células inativadas no leite pasteurizado não causou alterações no pH e na acidez do produto. No leite contendo células inativadas, houve desenvolvimento de proteólise e a conseqüente coagulação das proteínas após 30 dias de estocagem do produto, tornando seu processo inviável. As rotas tecnológicas definidas, o estudo de viabilidade técnica e a análise dos processos levaram a conclusões que recomendam a submissão de pedido de patente em função de três pontos demonstrados como inovações em processos.

ABSTRACT

LEITE, Mauricio de Oliveira Leite, M.S. Universidade Federal de Viçosa, february, 2005. **Development of processes for the production of probióticos with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Adviser: Magdala Alencar Teixeira, Committee members: Célia Alencar de Moraes and Arnaldo Chaer Borges.

The objective of this work was to define the technological routes for development of processes of production of probiotics which have cells of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, as well as to analyze the viability technique of the identified processes, considering the optimization set of stages of each process. The production of concentrated cells of *L. delbrueckii* UFV H2b20, to be used in all the products, was established in cheese whey Minas Frescal sterilized by heat. The excellent conditions for the sterilization had been determined. The income of cells was in order of 10^9 UFC/mL. The produced probiotics had been fermented milk with *L. delbrueckii* UFV H2b20, powdered milk and ice cream having viable cells of this bacterium. There have also been produced UHT milk, pasteurized milk and powdered milk with inactivated cells by heat. Fermented milk presented values of pH between 4,0 to 4,5 and approximately 10^8 UFC/g, and, stored at 5°C, was remained in these conditions for up to 30 days; after 45 days, the counting was of 10^7 UFC/g, value still in compliance with the established Resolution 47/97 of GMC for probiotics. The ice cream presented counting in order of 10^8 UFC/g up to 45 days at -20°C.

After 60 days in this temperature, it had been reduced to 10^7 UFC/g, steady counting up to 90 days. The probiotic powdered Milk was produced with cells pre-treated for better survival to the process in *spray dryer*, generating 10^8 UFC/g de *L. delbrueckii* UFV H2b20. This number was reduced to 10^7 UFC/g in 90 days of storage at -20°C and 10^6 and 10^5 at environment temperature after 60 and 90 days, respectively. The addition of inactivated cells in pasteurized milk did not cause modifications in pH and acidity of the product. Proteolyse have developed in milk with inactivated cells and a consequent coagulation of proteins after 30 days of storage of the product, becoming this process impracticable. The defined technological routes, the viability study techniques and the process analysis had taken the conclusions which advise a patent order in three points functions showed as innovations in processes.

1 – INTRODUÇÃO

Os estudos realizados com o *L. delbrueckii* UFV H2b20, a partir de seu isolamento em 1984, comprovaram que este microrganismo possui os requisitos necessários para que possa ser utilizado como probiótico.

O desenvolvimento de um processo tecnológico para a produção do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em escala industrial depende de um conjunto de fatores que torne o sistema de produção de células e sua adição em produtos alimentícios economicamente viáveis, além de assegurar número de células suficiente para promover os benefícios desejados.

A utilização do soro de queijo para a propagação de células tem sido amplamente pesquisada, em função de sua rica composição de vitaminas, minerais, carboidratos, aminoácidos e também em razão do baixo custo desse produto. Contudo, a instabilidade térmica do soro “in natura” dificulta a sua utilização, em função da precipitação de proteínas e perda de nutrientes essenciais ao microrganismo. O desenvolvimento de um método para aumentar a sua estabilidade a tratamentos térmicos é um dos requisitos para o uso do soro de queijo na produção de células em escala industrial, inclusive para a produção de probióticos.

Os resultados dos estudos desenvolvidos no âmbito do projeto “Estudo da produção de *L. acidophilus* UFV H2b20 e de seus fatores inibidores de bactérias patogênicas em alimentos”, financiado pela FINEP, e no estudo da “Resposta ao estresse em *L. acidophilus* UFV H2b20”, financiado pela

FAPEMIG, entre outros, geraram conhecimento quanto à otimização da produção de células viáveis, demonstraram o potencial probiótico dessa bactéria, conhecimento sobre a sua capacidade de responder a condições ambientais e de estimular o sistema imunológico do hospedeiro, além de outras características relevantes para o desenvolvimento técnico-científico.

Fundamentado na hipótese de que a “transferência para a indústria do conhecimento acumulado e a produção de probióticos de *L. delbrueckii* UFV H2b20 dependem da conversão do estoque de informações geradas em processos de produção de probióticos”, este trabalho teve como objetivo geral definir as rotas tecnológicas para processos de produção de probióticos de *L. delbrueckii* UFV H2b20, bem como o de analisar a viabilidade técnica dos processos identificados, considerando a otimização do conjunto das etapas de cada processo. Os processos selecionados foram testados em escala piloto para subsidiar sua descrição em um possível pedido de depósito de patente.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

A hipótese de que as bactérias de alimentos fermentados contribuíam para a saúde humana foi formulada há aproximadamente um século por Elie Metchnikoff (CROSS, 2002). Ao longo de décadas essa idéia tem sido testada por microbiologistas e, nos últimos anos, os mecanismos de atuação dessas bactérias têm sido compreendidos.

Probióticos são culturas de microrganismos, puras ou mistas, que afetam benéficamente o homem ou o animal, melhorando as propriedades da microbiota indígena (HUIS IN'T VELD et al., 1994). Este conceito significa que eles contêm, necessariamente, células viáveis. Em estudo mais recente tem-se demonstrado atividade imunoestimuladora de probióticos cujas células foram inativadas (NEUMANN et al., 1998).

As propriedades de probióticos incluem o efeito benéfico em atividades metabólicas intestinais, a promoção de resistência à colonização do intestino por microrganismos patogênicos, por exclusão competitiva ou, ainda, o estímulo à resposta imunológica (HUIS IN'T VELD et al., 1994). As pesquisas com bactérias do gênero *Lactobacillus* mostram a relação direta de algumas estirpes com os efeitos benéficos no hospedeiro. A prevenção de diarreia causada pelo uso de antibióticos (SIITONEM et al., 1990), o combate a gastroenterite infantil devido ao estímulo da resposta imunológica ao rotavírus causador da doença (MAJAMAA et al., 1995) e a redução de enzimas fecais que podem estar relacionadas a tumores intestinais (SANDERS, 1993) são

alguns dos efeitos benéficos que despertam o interesse para a utilização em muitas formulações de produtos probióticos. A literatura não registra infecções em humanos causadas por estes microrganismos (ADAMS e MARTEAU 1995), porém, a administração de células viáveis de *Lactobacillus* a pessoas imunodeprimidas é desaconselhável, pois as pesquisas realizadas ainda não asseguram a ausência do risco de infecções nestas pessoas (GUARNER e SHAAFSMA, 1998).

A partir do isolamento de *Lactobacillus* de fezes de recém nascidos, com três dias de idade, alimentados exclusivamente com leite materno, e da seleção de estirpe com características adequadas para a aplicação como probiótico (SANTOS, 1984), uma série de trabalhos foi desenvolvida com o *L. delbrueckii* UFV H2b20. O isolado, inicialmente, identificado como *L. acidophilus* (SANTOS, 1984), com base em características morfológicas e testes bioquímicos, foi posteriormente identificado como *L. delbrueckii* pela seqüência do rRNA 16S (UETANABARO, 1999) e por homologia genética (NEVES, 2003). Foram demonstradas suas características promissoras para aplicação como probiótico (SANTOS, 1984), tanto em produtos contendo células viáveis, para uso imediato, ou para produtos estáveis com prazos de validade mais longos (FIGUEIREDO, 1997), assim como em produtos contendo células inativadas, destinados a pacientes com deficiência imunológica ou para produtos nos quais não se deseja a proliferação das células (NEUMANN et al., 1998).

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 produz peróxido de hidrogênio em quantidade suficiente para inibir grupos bem diversificados de microrganismos, incluindo o de patógenos intestinais, como: Salmonella, Shigella e outras bactérias causadoras de distúrbios intestinais no homem (RIBEIRO, 1995).

A ingestão de células viáveis ou inativadas do *L. delbrueckii* H2b20 foi relacionada a estímulo à resposta imunológica inespecífica em camundongos, por promover o aumento no número de células de Kupffer, as responsáveis pela eliminação de bactérias que circulam no sangue (NEUMANN et al., 1998).

A viabilidade das células em produtos probióticos é geralmente baixa. Assim, a viabilidade e a estabilidade de probióticos estão entre os maiores desafios tecnológicos para a produção industrial, juntamente com a

manutenção de células em níveis satisfatórios durante o prazo de validade do produto (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Nos critérios regulatórios para produtos probióticos não se contempla o fato de que células inativadas podem contribuir significativamente para a imunestimulação ou imunomodulação, efeitos também desejáveis em probióticos (NEUMANN et al., 1998) e de que alguns microrganismos podem exercer efeitos benéficos mesmo em concentrações abaixo dos níveis estabelecidos (VINDEROLA et al., 1999).

De acordo com o Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade do Leite Fermentado aprovado pela Resolução 47/97 do Grupo de Mercado Comum (GMC) e, pela resolução nº. 5 de 13 de novembro de 2000 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), a contagem de bactérias lácticas totais em leite cultivado ou fermentado é da ordem de 10^6 UFC/g do produto (Nova Legislação de Produtos Lácteos..., 2002).

O probiótico produzido em condições industriais deve manter a sua funcionalidade durante a estocagem e a ingestão pelo homem ou animal (MATTILA-SANDHOLM et al., 2001). Assim, as células devem ter a capacidade de sobreviver nas condições de estresse prevalentes no trato gastrointestinal, tais como a presença de ácido no suco gástrico e de sais biliares. Além disso, recomenda-se a avaliação do probiótico no que se refere possível aderência à superfície de células do epitélio e a persistência no trato gastrointestinal (AGOSTINHO, 1988), atividade antagônica contra patógenos e a manutenção das suas propriedades no hospedeiro (MATTILA-SANDHOLM et al., 2001). Ao ser incorporado ao alimento, o probiótico não deve produzir características sensoriais indesejáveis, ou seja, as células devem se manter viáveis no produto sem apresentar crescimento (MATTILA-SANDHOLM et al., 2001).

Os estudos sobre métodos para a conservação de culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas, associados a uma série de crioprotetores e à subsequente liofilização, mostraram bons resultados no período de um ano (AGOSTINHO, 1988). A produção de culturas *starters* congeladas ou liofilizadas é uma prática comum nas indústrias produtoras de biomassa (SAXELIN et al., 1999).

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 produz, relativamente a outras estirpes da mesma espécie, baixa acidez (SANTOS, 1984). As condições para a produção de células viáveis dessa bactéria definidas em função do pH e da concentração de ácido láctico, influenciam a cinética de crescimento e a morte das células (GOMES, 1996). Os estudos realizados por FIGUEIREDO (1997) e PASSOS (1997) mostraram a estabilidade de cultura produzida em meio à base de soro de queijo. BATISTA (1997) demonstrou que *L. delbrueckii* UFV H2b20 não sofre inibição quando cultivada com outros lactobacilos, o que possibilita a formulação de probiótico com essa bactéria em consórcio. Confirmou, ainda, a ação antagonista do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em relação a patógenos comumente associados a alimentos. A caracterização da resposta do lactobacilo ao estresse térmico (MONTEIRO, 1999) constitui em importante conhecimento para o estabelecimento de etapas em diferentes processos de produção de probiótico (FURTADO, 2001).

O desenvolvimento de técnicas de produção de biomassa em escala industrial, economicamente viáveis para produtos com propriedades probióticas, inclui a oportunidade de formulação de novos produtos com características sensoriais agradáveis para atender às exigências e necessidades dos consumidores de todas as classes sociais.

Formulações de meios de cultura, de baixo custo, à base de soro de queijo ultrafiltrado, com proteína hidrolisada ou suplementada com fontes de nitrogênio para produção de células viáveis em larga escala já foram definidas para outra cultura láctica (PAOLUCCI, 1991) e para o *L. delbrueckii* UFV H2B20 (PASSOS, 1997).

O soro de queijo é considerado como uma fonte excelente de vitaminas do complexo B, minerais (Ca, P, Na, Cl, K) e aminoácidos essenciais, os quais estão presentes em níveis acima da referência da FAO (BOUMBA et al., 2001). Ele é também uma importante fonte de lactose e proteínas (GONZALEZ-MARTÍNEZ et al., 2002) e o conteúdo de sólidos varia de 6,0 a 6,5%. Estes valores representam a metade dos sólidos do leite (PINTADO et al., 2002), o que resulta em uma demanda biológica de oxigênio correspondente a valores acima do que 30.000 ppm. A descarga dessa carga orgânica em cursos de água não é permitida, a não ser que o efluente seja tratado e a DBO reduzida para um máximo é de 60 ppm (COPAM, 1980).

Estima-se que 250.000 L de soro de uma fábrica de queijos correspondam a mesma carga orgânica do efluente de esgoto sanitário doméstico de uma cidade de 50.000 habitantes (FAO, 1974 apud HOMEM, 2000).

A produção estimada de soro de queijo no Brasil em 1997 correspondeu a 2,6 bilhões de litros (HOMEM, 2000). De acordo com a Confederação Nacional de Agricultura e Pecuária (CNA), o Brasil importou, em 2002, cerca 37,5 toneladas de soro em pó, o que corresponde a aproximadamente 524 milhões de litros (AGROLINE, 2004), enquanto em 2001 descartou o correspondente a 1,6 bilhões de litros (ZUÑIGA, 2001).

O soro de queijo em décadas passadas era destinado principalmente à alimentação animal ou, simplesmente descartado nos rios e mananciais (BOUMBA et al., 2001). Mais recentemente, passou a ser empregado na indústria de alimentos, como em produtos de confeitarias, bebidas light, alimentos funcionais e, em derivados de carnes, além de ser utilizado como espumante, emulsificante e na formação de gel em certos alimentos como, por exemplo, os embutidos. É, ainda, o substrato para a produção de ácido láctico, o que despertou o interesse mundial para utilização do soro em grande escala (BOUMBA et al., 2001). Em razão de sua composição, a utilização de soro de queijo para a produção de culturas bacterianas tem sido amplamente pesquisada nos últimos anos. Uma das vantagens de se utilizar o soro é a facilidade de separar as células bacterianas após o crescimento. *Spray drying*, liofilização, centrifugação e ultrafiltração são exemplos comuns de sistemas que podem ser utilizados para concentração de células (PEPPLER e PERLMAN, 1979).

Em meio de cultura formulado com concentrado protéico de soro ultrafiltrado e hidrolisado (10% ESD) para o crescimento de *Lactococcus lactis ssp lactis*, contagem na ordem de 10^9 UFC/mL é obtida após 12 h de incubação a 32°C (PAOLUCCI, 1991).

As proteínas do soro em meio para crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 são precipitadas, quando se utilizam tratamentos térmicos elevados, enquanto a remoção destas proteínas por tratamentos como a centrifugação e ultrafiltração, reduz também a quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, o número total de células viáveis (FIGUEIREDO, 1997). Em soro suplementado com alguma fonte de

nitrogênio e também no soro sem suplemento, que não havia recebido os tratamentos para remoção das proteínas precipitadas, números de células superiores a 10^9 UFC/mL foram obtidos. Números similares foram obtidos em soro suplementado com 1% de peptona, 0,5% de acetato de sódio e 0,2% de citrato de amônio, como promotores de crescimento para o *L. delbrueckii* UFV H2b20 (PASSOS, 1997).

Esse fato representa uma das maiores dificuldades para utilização do soro em escala industrial. O processo de desnaturação das proteínas em função do binômio tempo/temperatura começa quando a β -lactoglobulina é aquecida a temperaturas superiores a 60°C , em razão da formação de pontes de enxofre entre moléculas da própria proteína e entre as moléculas da β -lactoglobulina e k-caseína, quando esta está presente (TETRA PAK..., 1995).

A α -lactoalbumina inicia o processo de desnaturação em temperatura acima de 65°C . No entanto, essa desnaturação é facilmente revertida em pH acima de 3,3 durante o resfriamento (DAMODARAN e PARAF, 1997). A obtenção de um soro de queijo estável à temperatura de esterilização é desejável para se evitar muitos transtornos, por exemplo, a necessidade de separar e descartar as proteínas precipitadas durante o processo de esterilização em autoclave (FIGUEIREDO, 1997).

O processo de esterilização mais recomendado para minimizar os efeitos deletérios no meio de cultivo é o sistema de esterilização UHT (Ultra High Temperature), no qual o produto é submetido à temperatura de 140° durante 4 a 6 segundos. Soro doce ou leite desnatado reconstituído (11%), processados a 140°C , pelo sistema UHT, não sofrem efeitos deletérios, como o escurecimento causado pela caramelização, comum quando esses produtos são submetidos à esterilização em autoclave (PEPPLER e PERLMAN, 1979).

Uma propriedade peculiar das proteínas do soro é a capacidade de se manterem solúveis mesmo no ponto isoelétrico, em valores de pH próximos de 4,8 a 5,0. Isto ocorre porque as superfícies expostas dessas proteínas contêm alta proporção de grupos hidrofílicos. A hidratação desses grupos eletricamente neutros ou carregados promove uma força de repulsão suficiente para evitar a agregação por interação hidrofóbica (DAMODARAN e PARAF, 1997).

A utilização de estabilizantes em alimentos é uma prática comum nas indústrias do setor. Os sais de citrato e o fosfato de sódio podem ser utilizados como estabilizantes para leite evaporado em quantidades não superiores a 0,10% (Nova Legislação..., 2002). O uso em conjunto desses sais no mesmo produto não pode ultrapassar o limite estabelecido. Da mesma forma, o creme de leite poderá ser adicionado de citrato de sódio, fosfato (mono, di ou tri) de sódio, potássio ou cálcio, cloreto de cálcio, bicarbonato de sódio em concentrações máximas de 0,20%, isoladamente ou em combinação. Monofosfato de sódio, difosfato de sódio ou trifosfato de sódio, separados ou em combinação, em uma quantidade não superior a 0.1g/100mL do produto são permitidos em leite UHT (Nova Legislação..., 2002).

Além de aumentar a estabilidade das proteínas, sais de fosfato e de citrato são quelantes de cálcio, o que o torna indisponível para bacteriófagos, dificultando a sua proliferação num sistema de produção de células (TETRA PAK..., 1995).

A adição de citrato de sódio na concentração de 0,15 M a uma proteína simples, como a denominada a legumina, comum em legumes, que apresenta características semelhantes à albumina do leite, aumenta a sua temperatura de desnaturação de 89°C para 108°C (DAMODARAN e PARAF, 1997).

O desenvolvimento de tecnologias de produção de células em soro de queijo estável ao tratamento térmico representa um estratégia para se eliminar a necessidade de processos como a ultrafiltração e adição de suplementos, os quais aumentam o custo da produção de células bacterianas e inviabilizam a produção em escala industrial. Outro fato relevante é de que o soro estável ao tratamento térmico pode ser facilmente esterilizado, eliminando-se a possibilidade de germinação de esporos, como ocorre em tratamentos térmicos convencionais (TETRA PAK..., 1995).

As células do probiótico devem ser veiculadas em produtos selecionados que sejam de fácil aceitação pelo consumidor e nos quais o microrganismo seja conservado na forma viável, caso este aspecto seja de interesse.

O leite e seus derivados ocupam uma grande fatia do mercado mundial de alimentos e por isso oferecem muitas possibilidades para serem utilizados como adjunto dietético. A previsão para o ano de 2004 era a que produção

mundial de leite atingisse 606 bilhões de litros, sendo que no Brasil a esperavam-se cerca de 24 bilhões de litros (Nova Legislação..., 2004).

Uma boa alternativa para se utilizar o leite pasteurizado como veículo para o *L. delbrueckii* UFV H2b20 seria a adição das células inativadas para evitar eventuais perdas no processo. A adição de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite pasteurizado promove uma rápida redução do pH pela produção de ácido láctico, o que compromete as características sensoriais do produto (FIGUEIREDO, 1997).

O leite pasteurizado no mercado é de baixo custo e de amplo consumo. Estima-se que o seu consumo no Brasil seja em torno de 1,5 bilhões de litros anuais (Nova Legislação..., 2004).

Leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural, submetido à temperatura entre 72°C e 75°C por 15 a 20 segundos e resfriado imediatamente à temperatura igual ou inferior a 4°C. Em estabelecimentos de laticínios de pequeno porte pode ser adotada a pasteurização lenta, na qual o leite é submetido a 65°C por 30 min. Este produto deve apresentar como requisitos mínimos 0,14 a 0,18 de acidez (g de ácido láctico por 100 mL), estabilidade em álcool a 72% (v/v), 8,4 g de sólidos não gordurosos por 100g do produto, índice crioscópico de -0,530°H, além de padrões microbiológicos específicos (Nova Legislação..., 2002).

Leite UHT contendo células inativadas de *Lactobacillus* representa um estratégia para se oferecer a um grande número de pessoas um produto saudável e com propriedades probióticas, principalmente no que se refere à imunestimulação. O consumo do leite UHT no Brasil foi de mais de 4 bilhões de litros em 2002 (Nova Legislação..., 2004).

Leite UHT é o leite homogeneizado que foi submetido durante 2 a 4 segundos a uma temperatura entre 130°C e 150°C, mediante processo térmico de fluxo contínuo, imediatamente resfriado a uma temperatura inferior a 32°C e envasado sob condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas. Entre os requisitos mínimos exigidos pela legislação, esse produto deve apresentar, acidez (g de ácidos lácticos por 100 g do produto) entre 14 e 0,18, estabilidade em álcool a 68% (v/v) e extrato seco desengordurado de 8,3% (m/m) (Nova Legislação..., 2002).

No Brasil cerca de 3,5 bilhões de litros de leite são destinados anualmente para a produção de leite em pó (FAEP, 2004). A produção do leite em pó contendo células viáveis ou inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode representar uma outra estratégia para se oferecer um produto fácil de ser transportado e estocado (HAAL e HEDRICH, 1975). No entanto a redução do número de células viáveis após o processo de secagem por *spray dryer* e, ainda, durante o período de estocagem do produto, são limitações que dificultam o seu uso em grande escala (FIGUEIREDO, 1997). No processo de secagem por *spray dryer* a temperatura do ar de entrada da câmara de secagem depende do sistema de produção e varia de 150°C a 260°C e de 70°C a 105°C na saída (HAAL e HEDRICH, 1975). Contudo o leite é aquecido a 70°C-80°C no interior da câmara, sendo o calor continuamente consumido pela evaporação da água do produto (TETRA PAK..., 1995). O tempo de residência do leite sob esta condição de temperatura varia de 25 a 35 segundos (EARLY, 1998). Temperaturas mais altas aumentam a taxa de morte das células bacterianas durante o processo de secagem (DESMOND et al., 2002) e também durante a estocagem do produto (FIGUEIREDO, 1997).

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 possui, relativamente a outros microrganismos, uma boa resistência térmica. O valor D encontrado a 73°C é de 4,8 min (FIGUEIREDO, 1997) e o valor z calculado de acordo com FRAZIER e WESTHOFF (1988) é de 14,5°C. Esta resistência associada à sua propriedade de responder a condições de estresse e de aquisição de termotolerância induzida quando exposto à temperatura de 50°C durante 30 min (MONTEIRO, 1999), suporta a inferência de que é viável a sua utilização em produtos desidratados como, por exemplo, o leite em pó.

Leite em pó é o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. Esse produto deve apresentar como requisitos físico-químicos, umidade máxima de 3,5 % (m/100 mL do produto), acidez titulável máxima igual a 18,0 (mL NaOH 0,1 N/10g de sólidos não gordurosos), solubilidade máxima (mL) igual a 1,0, entre outros (Nova Legislação..., 2002).

Os gelados comestíveis como sorvetes são muito apreciados no mundo por serem produtos saborosos, saudáveis e possuírem um custo relativamente

baixo (ARBUCKLE, 1977). A composição básica do produto varia, mas em média contém 12% de matéria gorda, 11% de sólidos não gordurosos do leite, 15% de açúcar, 0,3% de estabilizantes e emulsificantes, totalizando aproximadamente 38% de sólidos. Dessa forma, a veiculação das células viáveis por sorvete pode constituir em uma outra alternativa vantajosa, uma vez que o congelamento é rápido, em temperaturas que variam de -3 a -5°C no momento da fabricação, e a manutenção do produto estocado é realizada entre -10 e -25°C (ARBUCKLE, 1977), podendo ser um fator extremamente favorável para a manutenção do maior número possível de células na sua forma viável.

Gelados Comestíveis: são produtos alimentícios obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias, ou de uma mistura de água, açúcares e outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo (Nova Legislação..., 2002).

Atualmente existe no mercado grande variedade de produtos fermentados produzidos a partir de culturas *starters*. São os produtos fermentados por culturas mesofílicas, como manteiga e creme, por culturas termofílicas, como o iogurte, por leveduras, como o kefir e koumiss, por culturas terapêuticas, como o leite acidófilo, entre outros exemplos (VARNAM e SUTHERLAND, 1996).

Os produtos fermentados, como o iogurte, podem ser estocados por longos períodos a temperaturas entre 5°C a 10°C , em razão da acidez ($\text{pH} < 4,5$), embora nesse produto, a estocagem por mais de 3 semanas, pode resultar em desenvolvimento de sabor e odor indesejáveis, a exemplo da produção excessiva do ácido láctico (ICMS, 1980).

Leite fermentado, de maneira geral, é resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, o qual deve conter no mínimo 10^6 UFC/g de células viáveis (Nova Legislação..., 2002).

As propriedades do *L. delbrueckii* UFV H2b20 são desejáveis em produtos probióticos. Além das características especiais dessa estirpe, a probabilidade de desenvolvimento de um novo processo tecnológico com

células inativadas em produtos probióticos pode suportar a justificativa para o pedido de depósito e registro de registro.

Basicamente, existem dois modelos de patentes. A patente denominada Modelo de Utilidade, referente ao aperfeiçoamento de uma invenção já estabelecida, e a Patente de Invenção, referente a algo totalmente novo (INPI, 2004).

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO, e no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 – Estabelecimento dos processos para a produção de probióticos

Os trabalhos desenvolvidos em projetos financiados pela Finep “Estudo da produção de células e de produtos contendo células viáveis *L. delbrueckii* UFV H2b20” e pela Fapemig “Estudo do efeito do choque térmico sobre o microrganismo e na sua resistência em condições ambientais adversas” entre outros, geraram conhecimento quanto à otimização da produção de células viáveis, demonstraram o potencial probiótico dessa bactéria, conhecimento sobre a sua capacidade de responder a condições ambientais e de estimular o sistema imunológico do hospedeiro, além de outras características relevantes para o desenvolvimento técnico-científico. As alternativas de processo para a produção de concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e produtos lácteos, leite pasteurizado, leite UHT, leite fermentado, sorvete e leite em pó, foram preparadas em fluxogramas, etapa por etapa, considerando os conhecimentos gerados em projetos.

Todos os processos foram preparados levando-se em conta a obtenção de probióticos com células viáveis e de produtos com células inativadas, todos com o número de células suficiente para cumprir a Resolução 47/97 do Grupo de Mercado Comum (GMC), e a Resolução N° 5 de 13 de novembro de 2000 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) (Nova Legislação..., 2002). Em todos os casos foram consideradas as etapas de manutenção da cultura, ativação da cultura, preparo do meio de cultura para multiplicação em escala, processo para produção de células, concentração e separação, além dos tratamentos especiais para inclusão de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no processamento do produto probiótico.

As condições de otimização já determinadas em cada uma das etapas nos trabalhos anteriores foram consideradas frente às etapas precedentes e às subseqüentes, considerando o processo como um todo. Isso levou à definição de cada etapa do processo e à seleção das respectivas unidades operacionais, mesmo as que não tenham sido, necessariamente, as melhores opções no estudo de cada etapa individualizada. Elos do processo, não contemplados nos estudos anteriores, foram considerados.

Em cada processo foi ajustado o fluxograma de produção das células e sua inserção no respectivo fluxograma de processo de obtenção do produto probiótico. A descrição do processo permite a compreensão de todas as etapas e operações pelas quais passam os insumos até a obtenção do probiótico.

A representação do modelo para proposição de processos para ambos, células e produtos probióticos (Figura 1) foi elaborada de acordo com BVQI-<http://www.bvqi.com.br/bvqi/download/Gestao%20Processos.pdf> (2004) e BUARQUE (1984).

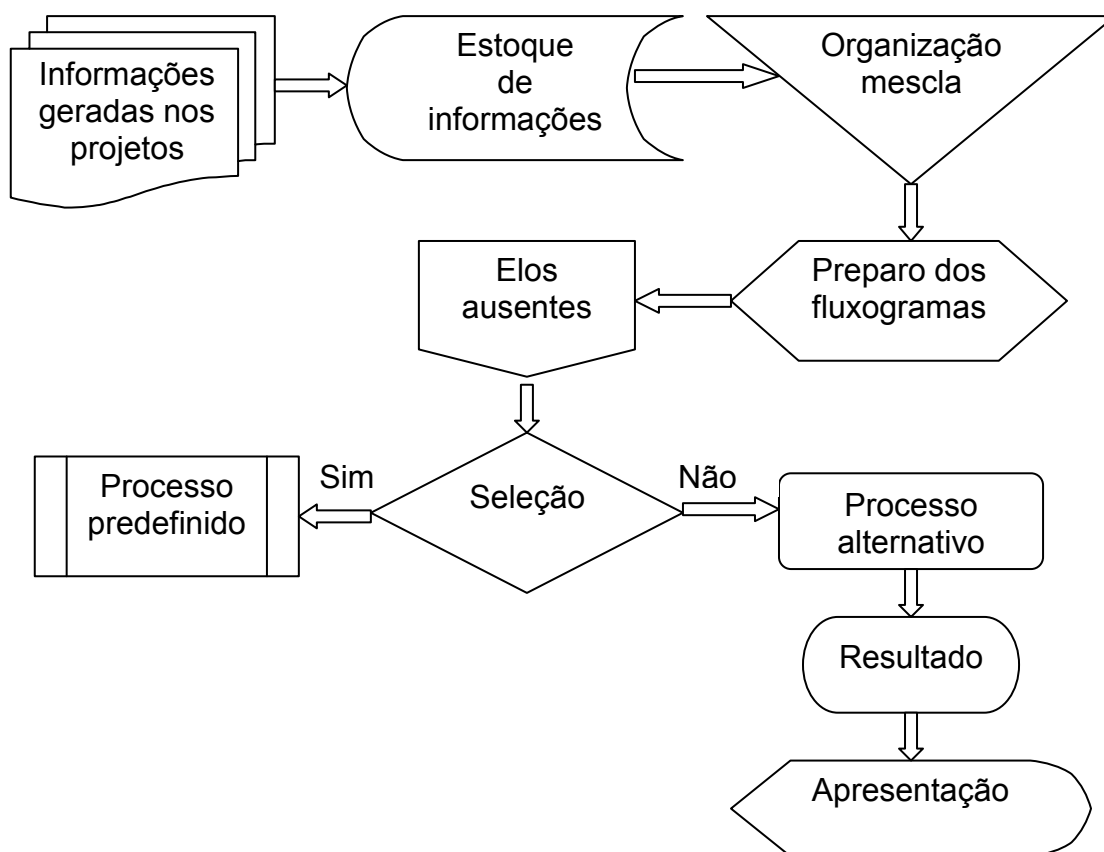


Figura 1 – Fluxograma de planejamento dos processos.

Os processos para obtenção do concentrado de células viáveis e inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 para uso industrial e de cada produto foram elaborados com base nos dados dos estudos realizados por AGOSTINHO (1988); GOMES (1996); FIGUEIREDO (1997); PASSOS (1997); MONTEIRO (1999); FURTADO (2001) e nos resultados do teste piloto realizado neste trabalho. Para a produção do concentrado de células, utilizou-se também o sistema de produção proposto por PEPLER e PERLMAN (1979).

Fez-se a descrição técnica do produto e dos subprodutos e as transformações evolutivas das matérias-primas e insumos até o produto final, o probiótico, incluindo:

- o que acontece em cada etapa do processo;
- a relação de uma etapa com a etapa anterior;
- os equipamentos e os insumos utilizados;

Análise da viabilidade tecnológica dos processos para uso industrial

Cada processo de produção de probiótico, suas etapas e respectivas unidades operacionais foram analisados do ponto de vista técnico de produto em processo e de equipamento, considerando a tecnologia disponível para a indústria de laticínios. Foram selecionados aqueles com melhores chances de transferência para a indústria, levando-se em conta a consistência tecnológica e análise das alternativas.

3.2 – Meio para produção das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20

3.2.1 – Caracterização físico-química do soro de Queijo Minas Frescal

O soro de queijo foi analisado quanto ao teor de lactose pelo método da cloramina-T, resíduo mineral fixo, acidez titulável (expressa % de ácido láctico) e cinzas, de acordo com a técnica descrita para leite fluido (PEREIRA et al., 2001). As concentrações de lactato, succinato e acetato foram determinadas em cromatógrafo HP 1050, detector de índice de refração HP 1047A a 60°C, fase móvel H₂SO₄ 5 mm, com fluxo 0,7 mL/min em coluna HPX87H Bio Red. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford, o qual se baseia na reação entre a proteína e o reagente Comassie-blue, comparando-se os valores da absorvância a 595nm em espectrofotômetro Shimadzu Uv-Vis 1240, a partir da curva-padrão de uma solução-padrão de BSA (SCOPES, 1987). O pH foi determinado em pH-metro Denver Instruments UB 10 Ultrabasic.

3.2.2 – Efeito de estabilizantes na precipitação de proteínas durante o tratamento térmico do soro de queijo Minas Frescal

Para aumentar a estabilidade térmica do soro de queijo foram testados os efeitos de três diferentes sais estabilizantes individualmente em diferentes concentrações. O soro de queijo foi adicionado de bicarbonato de sódio (NaHCO₃), citrato de sódio (C₃H₅O₇Na₃.2H₂O) e fosfato de potássio (K₂HPO₄), grau P.A, nas concentrações 0,05, 0,1, 0,15 e 0,2%, como mostra o esquema a seguir:

- Tratamento 1: Soro (Controle).
- Tratamento 2: Soro + Citrato de sódio.
- Tratamento 3: Soro + Fosfato de potássio.
- Tratamento 4: Soro + Bicarbonato de sódio.

O soro de cada tratamento foi distribuído em tubos de ensaio, cada um contendo 10 mL da amostra e submetidos a esterilização a 121°C durante 15 segundos em autoclave. Procedimento semelhante foi realizado a 140°C por 6 segundos em banho de óleo, distribuindo-se o soro em ampolas de vidro de 10 mL, cada qual contendo 6 mL da amostra. As ampolas foram vedadas pelo calor da combustão de gás butano e O₂ pressurizado sob vácuo a -200 mmHg. As ampolas contendo o soro foram pré-aquecidas a 80°C durante 15 segundos em banho-maria, transferidas para o banho de óleo onde receberam o tratamento térmico de 140°C durante 6 segundos, novamente resfriadas a 80°C e em seguida a 40°C, simulando as condições térmicas do processo UHT (TETRA PAK..., 1997). Para controle do binômio tempo/temperatura de exposição das ampolas no banho de óleo, um termopar Icel TD 750, tipo K, foi introduzido em uma ampola contendo 6 mL de soro, a qual recebeu o mesmo tratamento designado para as demais ampolas contendo as amostras de soro.

Para avaliar a eficiência dos estabilizantes, as proteínas precipitadas foram coletadas em papel de filtro Inlab nº 50, 2,0 µm de poro, 5,0 cm de diâmetro e secadas em estufa a 102°C durante 2 h, de acordo com metodologia para determinação de umidade em leite e derivados (IDF, 1993). Em seguida foi realizada a pesagem do precipitado em balança eletrônica Shimadzu, modelo AX 200, d = 0,1 mg.

Considerou-se o melhor tratamento o que apresentou a menor massa de proteínas precipitadas, ou seja, o maior número de nutrientes em suspensão.

3.2.3 – Efeito da concentração de sais estabilizantes no crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal

O efeito da concentração de sais estabilizantes foi avaliado retirando-se uma alíquota de 2 mL contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL da cultura do *L. delbrueckii* UFV H2b20 previamente ativada em leite, a qual foi distribuída

em recipientes contendo 100 mL de soro adicionado de sais estabilizantes (NaHCO_3), citrato de sódio ($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e fosfato de potássio (K_2HPO_4), nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,15 e 0,20%. Após incubação a 40°C durante 12 h, foi realizado o plaqueamento em agar MRS, e as placas foram incubadas na mesma temperatura por 48 h, para contagem do número de células viáveis.

3.2.4 – Produção da cultura estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal

A cultura congelada a -80°C foi ativada em leite desnatado reconstituído (LDR) a 10% por um período de 12 h, a 40°C. Após esse período foi inoculada em soro de queijo com estabilizante e incubada nas mesmas condições. Uma alíquota de 600 µL, contendo aproximadamente 10^8 UFC/mL da cultura ativa foi então inoculada em tubos de centrifuga de 50 mL, cada qual contendo 30 mL de soro com estabilizantes esterilizado e incubado novamente também nas condições anteriormente citadas.

Os tubos contendo o soro com as células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram centrifugados a 5000 g durante 10 min a 5°C em centrifuga Jouan, modelo MR23. O sedimento formado foi ressuspensionado em 5 mL de soro de queijo desnatado estéril e distribuído em volumes de 800 µL em tubos Eppendorf contendo 200 µL de glicerol. Em seguida, as células foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

A viabilidade da cultura foi constatada ao longo do experimento, ativando-se a cultura congelada para a produção dos probióticos em escala industrial.

3.3 – Produção do concentrado de células viáveis e inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em escala piloto

Para a produção das células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi utilizado como meio de cultivo o soro de queijo Minas Frescal desnatado e clarificado, proveniente de leite adicionado de 0,05% de uma solução de cloreto de cálcio a 50% (p/v) (FURTADO e L. NETO, 1994) e do estabilizante selecionado no teste em laboratório.

Uma alíquota de 200 mL da cultura contendo 10^9 UFC/mL do *L. delbrueckii* UFV H2b20, previamente ativado em LDR (10%) e em soro de queijo com estabilizante, foi transferida para um biorreator sob microaerobiose, contendo 10 L de soro e mantida durante 12 h a 40°C. Alíquotas de 200 mL foram distribuídas em tubos GSA de 250 mL, para concentração em centrífuga Sorvall Instruments, modelo RC5C, a 5000 g durante 10 min a 5°C. O sedimento foi ressuspensionado em 2 L de soro de queijo estéril.

Para a obtenção das células inativadas, o soro de queijo estéril contendo aproximadamente 10^9 UFC/mL de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ressuspensionadas, foi tratado a 80°C por 5 min.

3.4 – Produção de probióticos em escala piloto

Os processos para a produção do leite fermentado, sorvete e leite em pó contendo células viáveis e leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT contendo células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram ajustados em teste piloto em laboratório. Os testes foram elaborados de acordo com os resultados das etapas previamente definidas. Para a produção do concentrado de células, as etapas foram consideradas desde a recuperação das células até a forma de inserção no processamento do produto.

Nos produtos contendo células viáveis, a contagem de UFC/g foi feita sempre que se fez necessária, por plaqueamento em agar MRS contendo 30 µg/mL de ácido nalidíxico (AGOSTINHO, 1988) e FURTADO (2001), e incubação a 40°C por 48 h em condição microaeróbia.

3.4.1 – Produção de leite fermentado por *L. delbrueckii* UFV H2b20

A produção de leite fermentado contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi baseada no sistema de produção do Laticínios Funarbe-UFV e no modelo proposto pela TETRA PAK... (1995) para a produção de iogurte.

Para a produção do leite fermentado uma alíquota de 120 mL da cultura contendo 10^8 UFC/mL do *L. delbrueckii* UFV H2b20 cultura do estoque, previamente ativado em LDR (10%) foi inoculada em: 1) 6 L do leite

padronizado com 3% de matéria gorda, previamente aquecido a 90°C durante 10 min, resfriado a 40°C e incubado por 12 h nessa temperatura; 2) 6 L do leite padronizado com 3% de matéria gorda adicionado de 10% de açúcar, previamente aquecido a 90°C durante 10 min, resfriado a 40°C e incubado por 12 h nesta temperatura. Em seguida, os produtos fermentados foram resfriados a 5°C permanecendo estocados nesta temperatura.

Foi realizada a determinação do pH e a contagem de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 no início da fermentação, a partir de 6 h após a inoculação das células, e a cada duas h, até 12 h, e com 15 h de incubação.

O leite fermentado após atingir pH menor ou igual a 4,5 foi estocado a 5°C, determinando-se o tempo de fermentação e o possível efeito inibidor do açúcar. O produto foi mantido a 5°C para avaliação da variação do pH e da contagem do número de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante 45 dias em intervalo de 15 dias.

3.4.2 – Produção de sorvete probiótico contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A produção de sorvete contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi realizada de acordo com ARBUCKLE (1977) e com TETRA PAK... (1995).

O concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro proveniente da suspensão de 2 L da produção de culturas foi transferido para um recipiente contendo 20 L da mistura básica para sorvete. A mistura foi homogeneizada em homogeneizador Gaulin, duplo estágio de pressão com 100 Kgf/cm² no primeiro e 50 Kgf/cm² no segundo estágio, seguindo-se a transferência para um congelador vertical descontínuo Refriate Skynsen, modelo nº06, para a incorporação de ar e congelamento rápido a -6°C. O sorvete contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi armazenado em freezer a -20°C.

3.4.3 – Produção de leite em pó contendo células viáveis *L. delbrueckii* UFV H2b20

A produção de leite em pó foi realizada de acordo com TETRA PAK... (1995), HAAL e HEDRICH (1975) e com base no sistema de produção da fábrica de leite em pó da CCLSP – Cooperativa Central de Laticínios do Estado de São Paulo.

O concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro proveniente da suspensão de 2 L da produção de culturas foi aquecido a 50°C durante 30 min e transferido para um recipiente contendo 20 L de leite, o qual foi desidratado em *spray dryer* Niro Atomizer Copenhagen-Denmark, com a temperatura média do ar de entrada da câmara de secagem a 170°C e a 95°C na saída. O leite em pó contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi então coletado e estocado à temperatura ambiente e sob congelamento a – 20°C.

Foram realizadas determinações do pH no leite e do número de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 no leite antes e após a sua secagem.

3.4.4 – Produção de leite em pó contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Dois litros do concentrado de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, foram aquecidos a 80°C por 5 min para inativação do microrganismo, seguindo-se a transferência para o tanque de equilíbrio contendo 20 L de leite, o qual foi desidratado em *spray dryer* Niro Atomizer Copenhagen-Denmark. O leite em pó contendo células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi então coletado em embalagens de polietileno e estocado a temperatura ambiente.

3.4.5 – Produção de leite pasteurizado adicionado de células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Foi utilizado neste experimento o leite padronizado com 3% de gordura, clarificado, pasteurizado pelo sistema HTST a 72 – 75°C por 15 segundos, homogeneizado, resfriado a 5°C no Laticínios Funarbe-UFV.

Para a produção do leite pasteurizado, uma alíquota de 30 mL da suspensão contendo aproximadamente 10⁹ células de *L. delbrueckii* UFV

H2b20, proveniente de um volume de 200 mL do concentrado de células, foi aquecida a 80°C por 5 min.

As células inativadas foram assepticamente inoculadas diretamente em 1 L de leite pasteurizado envasado, através um septo de silicone aderido no polietileno da embalagem original do produto, utilizando-se uma seringa de 50 mL esterilizada.

O pH e a acidez do produto foram avaliados durante 7 dias no leite adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20.

3.4.6 – Produção de leite UHT adicionado de células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Para a produção do leite UHT, 30 mL da suspensão contendo aproximadamente 10^9 células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, proveniente de uma alíquota de 200 mL do concentrado de células, foi aquecidos a 80°C por 5 min.

As células inativadas foram assepticamente inoculadas diretamente em 1L de leite UHT envasado, através um septo de silicone aderido na embalagem cartonada, utilizando-se uma seringa de 50 mL esterilizada.

Foram realizadas determinações do pH e acidez de acordo com PEREIRA et al (2001) e a proteólise de acordo com HULL (1945), durante 30 dias, em intervalos de 15 dias, no leite UHT adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 estocado a temperatura ambiente.

3.5 – Morfologia celular de *L. delbrueckii* UFV H2b20 nos diferentes meios de propagação de células e nos produtos probióticos

As alterações morfológicas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 nos diferentes meios e produtos probióticos foram acompanhadas, em razão das observações efetuadas em estudos preliminares do microrganismo. Para visualizar a forma, as células foram fixadas em lâmina e coradas pela técnica de coloração de Gram (PELCZAR et al., 1980) e observadas em microscópio Leica DMLS. As imagens foram capturadas e convertidas em arquivos jpg, em um computador acoplado ao microscópio, utilizando o software gerenciador de imagens IM50, versão 1.20. Com base nestas observações, foi realizada uma seqüência de

transferência do *L. delbrueckii* UFV H2b20 nos diferentes produtos e meios de cultivo para comprovar tal alteração.

3.6 – Análise para decisão sobre a conveniência de registro de patente do processo

A constatação de novidades em cada etapa do processo/produto desenvolvida para a produção de probióticos, contendo células do *L. delbrueckii* H2b20, resultou dos estudos realizados e da consulta ao depósito de patentes do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), instituído pela lei 5.648 de 11 de dezembro de 1970, para proteger autores de invenção ou descoberta industrial de acordo com a lei 3129 de 14 de outubro de 1982.

As formalidades para o depósito de patentes no Brasil, bem como as informações inerentes aos tópicos da patente estão disponíveis em <http://www.cpqi.ufv.br/>, Comissão Permanente de Propriedade Intelectual da Universidade Federal de Viçosa (CCPI, 2004).

Os custos do requerimento e manutenção da patente no Brasil foram determinados conforme Portaria nº 468 do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior publicada no Diário Oficial da União de 25 de novembro de 2003 (INPI, 2004).

Com base nas informações sobre a existência ou não de processos similares, nos resultados dos cálculos de custo de registro e manutenção da reserva e na análise de custo/benefício financeiro e social, foram consideradas as seguintes alternativas:

- manter as informações em sigilo para uso posterior;
- negociação direta com a indústria da tecnologia e venda com “royalties” para a UFV;
- solicitação do registro de patente.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Fluxograma do processo de produção de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal

O processo contendo as etapas individualmente otimizadas para produção do concentrado de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 2) possibilita a produção de 10^9 UFC/mL. Contudo, o conjunto de etapas apresenta deficiências que inviabilizam a sua adoção em escala industrial. Na Etapa 1, objeto dos estudos desenvolvidos por PASSOS (1997) e por FIGUEIREDO (1997), são necessários dois processos onerosos para eliminar proteínas precipitadas do soro, a ultrafiltração e a centrifugação. A comercialização do concentrado protéico justificaria a ultrafiltração, mas uma indústria de laticínios típica não possui a tecnologia disponível para esta finalidade. A centrifugação foi empregada com o único propósito de retirar os resíduos precipitados do tratamento a 90°C por 3 min.

Na Etapa 2, a adição de proteose peptona para reposição de nutrientes indispensáveis ao crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 é questionável por duas razões: o aumento no custo da produção e o paradoxo da retirada e reposição dos mesmos nutrientes essenciais quase que simultaneamente. Em razão da instabilidade das proteínas do soro foram adicionados citrato de amônio (0,2%) e acetato de sódio (0,5%), para evitar perda dessas proteínas por precipitação em novo tratamento térmico a 90°C por 3 min, apesar do efeito

inibidor desses sais no crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 (PASSOS, 1997). O binômio tempo/temperatura utilizado na Etapa 2 não assegura a esterilidade do meio de cultivo. Esporos bacterianos podem resistir ao binômio empregado e, conseqüentemente, contaminar a cultura de interesse (PEPPLER e PERLMAN, 1979).

Na Etapa 3, a incubação a 40°C foi estabelecida por FIGUEIREDO (1997) quando utilizou soro como meio de cultivo. As demais condições foram definidas por GOMES (1996), tendo demonstrado que a atmosfera anaeróbia e o pH inicial, entre 6,0 e 6,5, favorecem o crescimento da bactéria. Os estudos de PASSOS (1997) demonstraram que a agitação do meio de cultivo deve ser evitada e o controle do pH após o início do crescimento é irrelevante, para o aumento da produção de células. Nenhum dos autores estudou o processo de separação/concentração de células (Etapa 4). PASSOS (1997) utilizou centrifugação a 10 000 g durante 10 min. NEUMANN et al. (1998), separaram células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 centrifugando a 2 000 g a 4°C. Na Etapa 5, AGOSTINHO (1988) avaliando métodos de preservação da viabilidade da célula, estudou o efeito das temperaturas de congelamento a -20°C, a -77°C e da liofilização na presença dos crioprotetores, arginina, tiouréia, glicerol e Tween 80, individualmente. Os resultados mostraram que o uso de crioprotetores, principalmente Tween 80 a 0,5%, e o congelamento rápido das células a -77°C favoreceram a manutenção da viabilidade celular durante 210 dias de estocagem a -20°C.

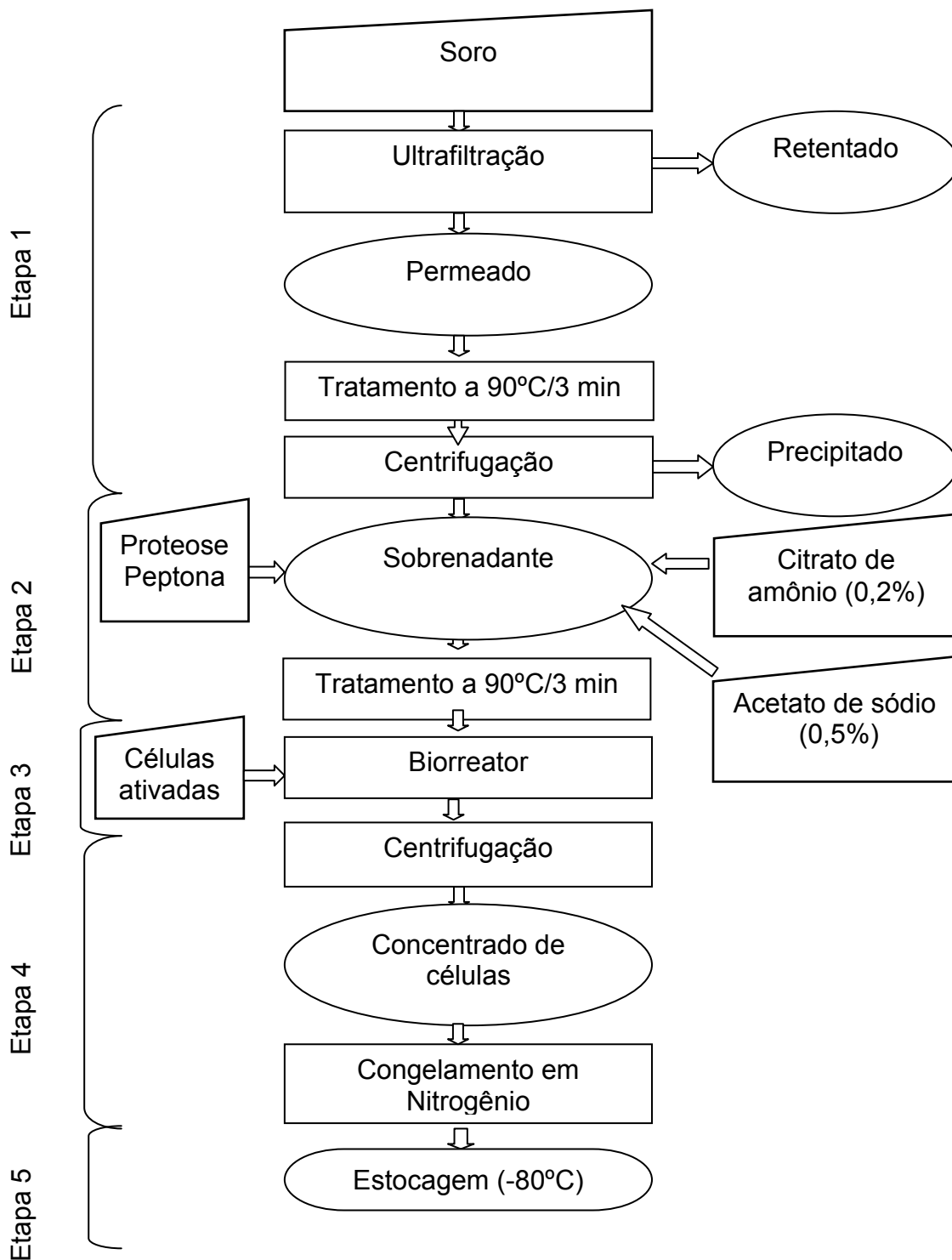


Figura 2 – Fluxograma do sistema de produção de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal.

4.2 – Meio de cultivo para produção de células de *L. delbrueckii* UFVH2b20

4.2.1 – Caracterização físico-química do soro de queijo Minas Frescal

O soro de queijo possui nutrientes tais como proteínas, lactose, entre outros (Quadro 1), os quais são importantes para o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 (GOMES, 1996).

O pH ótimo para início do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é de 6,0 a 6,5 (PASSOS, 1997). Uma grande variação do pH pela adição de um estabilizante pode retardar ou inibir o crescimento do microrganismo. A utilização do citrato de sódio é mais indicada porque promove menor variação do pH quando comparado aos demais estabilizantes (Quadro 2). A adição de estabilizantes resulta em alteração no pH e na concentração de ácido láctico do meio e, por esse motivo, é necessária a definição da concentração do estabilizante a ser adicionado para que as condições ótimas para o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 sejam preservadas.

Quadro 1 – Caracterização do soro de queijo Minas Frescal

Componente	Concentração
Lactose	5,19 %
Cinzas	0,53 %
Ácido láctico	0,10 %
Proteínas	0,63 %
Acetato	10 mg/L
Succinato	0,8 mg/L
Lactato	30 mg/L

Quadro 2 – Valores de pH e concentração do ácido láctico do soro de queijo determinados antes e após a adição de diferentes concentrações de sais estabilizantes

Tratamento	Concentração do estabilizante (%)	pH	Ácido láctico (%)
Soro (Controle)	0,00	6,40	0,100
Soro + fosfato de potássio	0,05	6,74	0,083
	0,10	6,86	0,075
	0,15	6,89	0,076
	0,20	6,92	0,079
Soro + citrato de sódio	0,05	6,56	0,078
	0,10	6,58	0,080
	0,15	6,58	0,078
	0,20	6,61	0,082
Soro + Bicarbonato de sódio	0,05	6,74	0,042
	0,10	6,90	0,045
	0,15	6,98	0,050
	0,20	7,09	0,052

4.2.2 – Efeito de estabilizantes na precipitação de proteínas durante o tratamento térmico

O resultado da análise de variância (Quadro 3) mostra o efeito da adição e da concentração de sais na estabilidade do soro tratado a 121°C por 15 min e a 140°C por 6 segundos, separadamente. A interação entre os fatores concentração e tipo de sal foi significativa ($p < 0,05$) para esterilização a 121°C.

Os valores do peso da massa seca (g) do precipitado de proteínas do soro tratado a 121°C por 15 min (Quadro 4) mostram que nas concentrações entre 0,05 e 0,10%, citrato de sódio e fosfato de potássio foram mais eficientes como estabilizantes quando comparados com bicarbonato de sódio. Na concentração de 0,15% todos os sais exerceram o mesmo efeito estabilizante. Na concentração de 0,20% o bicarbonato e o citrato de sódio foram mais eficientes que o fosfato de potássio.

Quadro 3 – Análise de variância do efeito de sais estabilizantes adicionado ao soro de queijo Minas Frescal tratado a 121 e a 140°C, separadamente

Fonte de variação	G.L	QM	
		121°C	140°C
Sais estabilizantes	2	0,00003282 *	0,0004128*
Concentração de sais	4	0,004218*	0,001163*
Interação (sais x concentração)	8	0,00002633*	0,00000654 ^{n.s}
Resíduo	30	0,00000627	0,00000790

*Significativo ($p < 0,05$).

n.s = não significativo ($p < 0,05$).

Embora os sais apresentem comportamentos diferentes de acordo com a quantidade adicionada no soro de queijo, as melhores concentrações para utilização dos sais como estabilizante para minimizar os efeitos do tratamento a 121°C por 15 min na precipitação de proteínas, é na faixa de 0,05 a 0,10% (p/v) (Figura 3).

Quadro 4 – Peso da massa seca (g) do precipitado protéico do soro de queijo, obtido após adição de diferentes sais estabilizantes em diferentes concentrações e esterilização a 121°C/15 min

Sais	Concentração				
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20
Fosfato	0,0533	0,0005 a	0,0003 a	0,0046 a	0,0151 a
Citrato	0,0532	0,0008 a	0,0011 a	0,0043 a	0,0088 b
Bicarbonato	0,0525	0,0083 b	0,0064 b	0,0064 a	0,0085 b
Média	0,0530	0,0032	0,0026	0,0051	0,0108

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

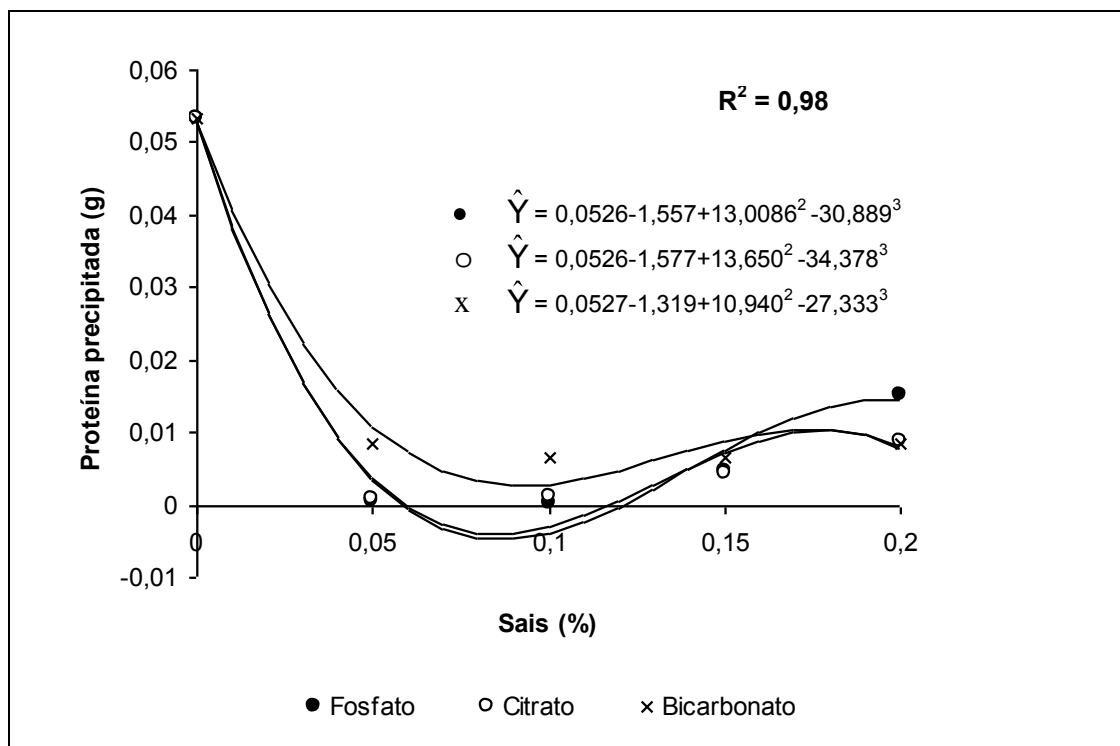


Figura 3 – Curva de regressão do efeito da concentração de sais estabilizantes na formação de precipitado protéico de soro de queijo tratado a 121°C por 15 min.

O citrato de sódio apresentou melhor efeito estabilizante no soro de queijo quando comparado com bicarbonato de sódio e com fosfato de potássio, os quais não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey (Quadro 5).

O Citrato de sódio apresenta um comportamento semelhante ao bicarbonato de sódio na concentração de 0,05% (p/v), os quais foram mais eficientes para estabilização das proteínas do soro de queijo Minas Frescal, durante o tratamento a 140°C por 6 segundos, em relação às suas próprias concentrações entre 0,10 e 0,20% ou quando comparados com o fosfato de potássio (Figura 4). Nas concentrações de 0,10% a 0,20% (p/v) a formação de precipitado protéico apresentou pouca variação no soro adicionado de citrato. Para o bicarbonato de sódio, houve aumento da precipitação a medida que a concentração aumentou. O soro adicionado de fosfato de potássio apresentou pouca variação na precipitação de proteínas em todas as concentrações testadas.

A estabilidade de proteínas em soro de queijo pode ser otimizada pela adição de sais dependendo da quantidade e do tipo de sal. A solubilidade de uma substância depende da afinidade entre moléculas do soluto. Quando ocorre o “Salting in” a solubilidade da proteína é favorecida porque os íons de sais interagem como grupos iônicos das moléculas de proteínas e reduzem a interação entre essas moléculas. Quando aumenta a concentração de sais ocorre competição entre estes e as moléculas de proteínas pelas moléculas do solvente. A quantidade de solvente disponível torna-se insuficiente para dissolver outros solutos. Conseqüentemente, a solubilidade das proteínas diminui e ocorre o “Salting out” (VOET e VOET, 1995).

Quadro 5 – Peso da massa seca (g) do precipitado protéico do soro de queijo, obtido após adição de diferentes sais estabilizantes em diferentes concentrações e esterilização a 140°C/6 segundos

Sais	Concentração					Média
	0,00	0,05	0,10	0,15	0,20	
Fosfato	0,0295	0,0062	0,0056	0,0056	0,0070	0,0061 a
Citrato	0,0297	0,0001	0,0022	0,0026	0,0032	0,0020 b
Bicarbonato	0,030	0,0017	0,0032	0,0056	0,0079	0,0046 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

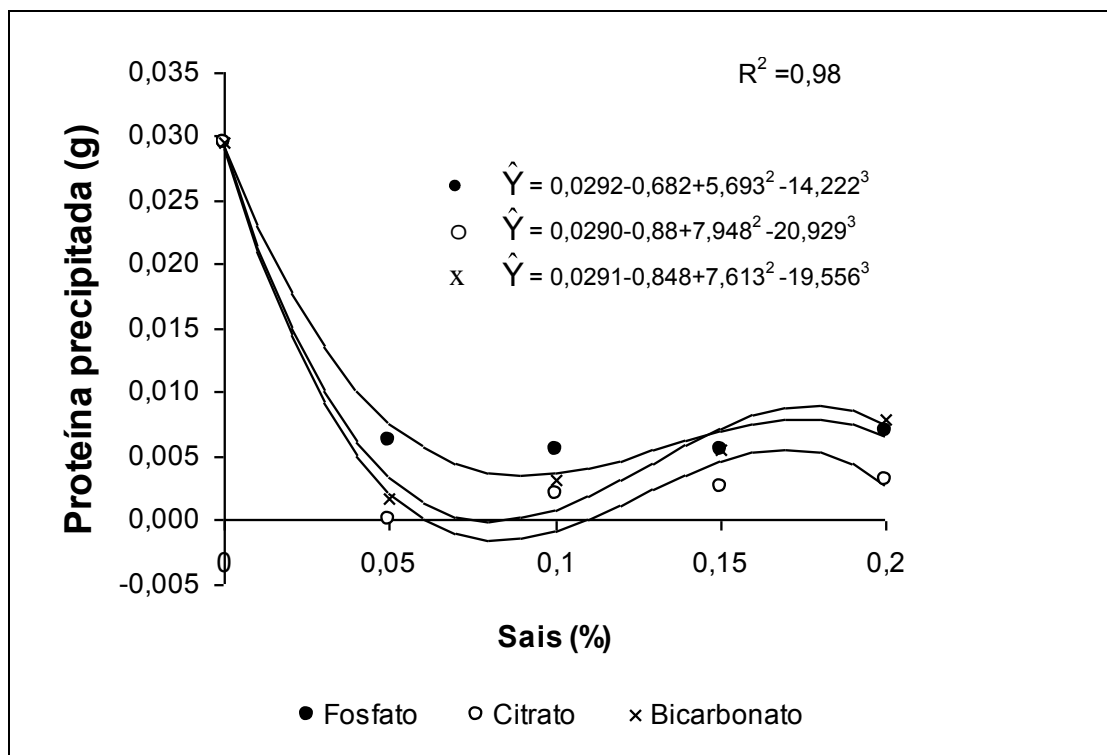


Figura 4 – Curva de regressão do efeito da concentração de sais estabilizantes na formação de precipitado protéico de soro de queijo tratado a 140°C por 6 segundos.

4.2.3 – Efeito da concentração de sais estabilizantes no crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal

A concentração ideal do sal estabilizante deve ser suficiente para evitar a precipitação das proteínas do soro e também a inibição do crescimento do microrganismo.

Os sais de fosfato de potássio e de citrato de sódio promoveram o crescimento de aproximadamente 10^9 células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 nas concentrações entre 0,05 a 0,15% , além da manutenção da estabilidade das proteínas do soro aos tratamentos térmicos a que foram submetidos (Quadro 6).

Número de células viáveis acima de 10^9 UFC/mL foi obtido somente quando o citrato de sódio foi utilizado como estabilizante no soro de queijo nas concentrações de 0,05 e 0,10%. Valores semelhantes foram obtidos por FIGUEIREDO (1997) e PASSOS (1997) quando utilizaram soro suplementado com alguma fonte de nitrogênio, confirmando a hipótese de que a manutenção

de proteínas em suspensão no soro de queijo suprime a utilização de suplementos como fontes de nitrogênio. Suplementos como a proteose peptona são caros e elevam o custo de produção.

O bicarbonato de sódio, apesar de ser um excelente estabilizante para o soro, inibiu consideravelmente o crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 quando foi adicionado ao soro em concentrações superiores a 0,05%. O aumento acentuado do pH após sua adição pode ter causado a inibição do crescimento do microrganismo.

Quadro 6 – Valores de pH e número de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20 inicial e após 12 h de incubação a 40°C

Tratamento	Concentração de estabilizantes (%)	pH inicial	pH após incubação	UFC/mL
Soro + fosfato de potássio	0,05	6,74	4,16	$9,1 \times 10^8$
	0,10	6,86	4,55	$8,5 \times 10^8$
	0,15	6,89	4,93	$7,3 \times 10^8$
	0,20	6,92	5,33	$3,0 \times 10^8$
Soro + citrato de sódio	0,05	6,56	4,35	$1,3 \times 10^9$
	0,10	6,58	4,60	$1,1 \times 10^9$
	0,15	6,58	5,07	$9,1 \times 10^8$
	0,20	6,61	5,19	$6,6 \times 10^8$
Soro + bicarbonato de sódio	0,05	6,74	4,91	$5,1 \times 10^8$
	0,10	6,90	5,54	$6,4 \times 10^7$
	0,15	6,98	6,94	$5,0 \times 10^6$
	0,20	7,09	7,20	$< 10^6$

O número inicial de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi de aproximadamente 10^6 UFC/mL.

4.2.4 – Estabelecimento do sistema de produção de células

A adição de sal estabilizante, citrato de sódio, no soro permitiu a elaboração de um modelo de processo simplificado pelo fato de eliminar várias etapas.

O soro estável ao tratamento térmico pode ser esterilizado pelo calor e utilizado como meio de cultivo para propagação da cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com células em número suficiente (10^9 UFC/mL) para a produção de probiótico.

As indústrias de laticínios que trabalham com pequenos volumes de leite e não possuem esterilizadores UHT podem utilizar autoclave para esterilização do soro (Figura 5). Depois de esterilizado, o soro com estabilizante é resfriado a 40°C no próprio biorreator, circulando-se água fria entre as paredes do equipamento, onde ocorre a inoculação da célula e incubação durante 12 h, em condição microaeróbia. O soro contendo as células pode ser resfriado a 10°C, circulando-se água gelada entre as paredes do biorreator para cessar o crescimento e facilitar a separação na etapa seguinte. As etapas onerosas de ultrafiltração e centrifugação, antes requeridas, foram reduzidas à centrifugação a 5000 g durante 10 min a 10°C, para separação das células, ou seja, metade da força gravitacional utilizada por PASSOS (1997).

Alternativamente, as indústrias de laticínios que possuem o sistema UHT, podem utilizá-lo para esterilizar o soro (Figura 6). A esterilização em sistema UHT é mais recomendada porque provoca menor efeito deletério ao meio. Depois de resfriado no próprio equipamento, o soro é transferido para o biorreator. As etapas seguintes são comuns em ambos os processos.

O processo da figura 6 pode ser utilizado por laboratórios de produção de culturas lácticas, implantando-se esterilizadores UHT projetados para trabalhar com volumes menores de produto.

Os processos representados nas figuras 5 e 6 resultam no produto concentrado contendo 10^9 UFC/mL de células viáveis, o qual pode ser apresentado pronto para o processamento de produtos probióticos ou congelado para estoque e uso posterior.

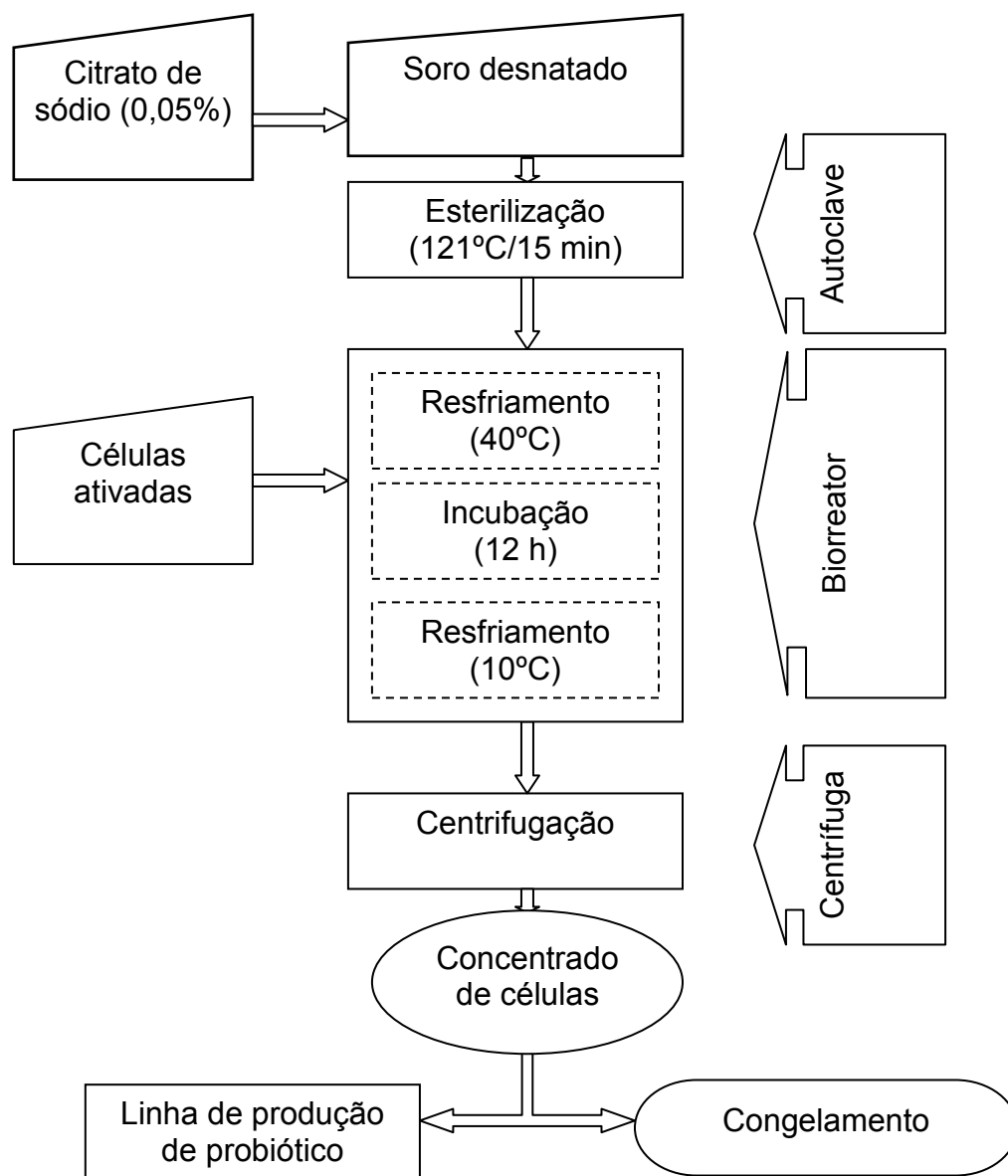


Figura 5 – Processo para a produção do concentrado de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal esterilizado em autoclave.

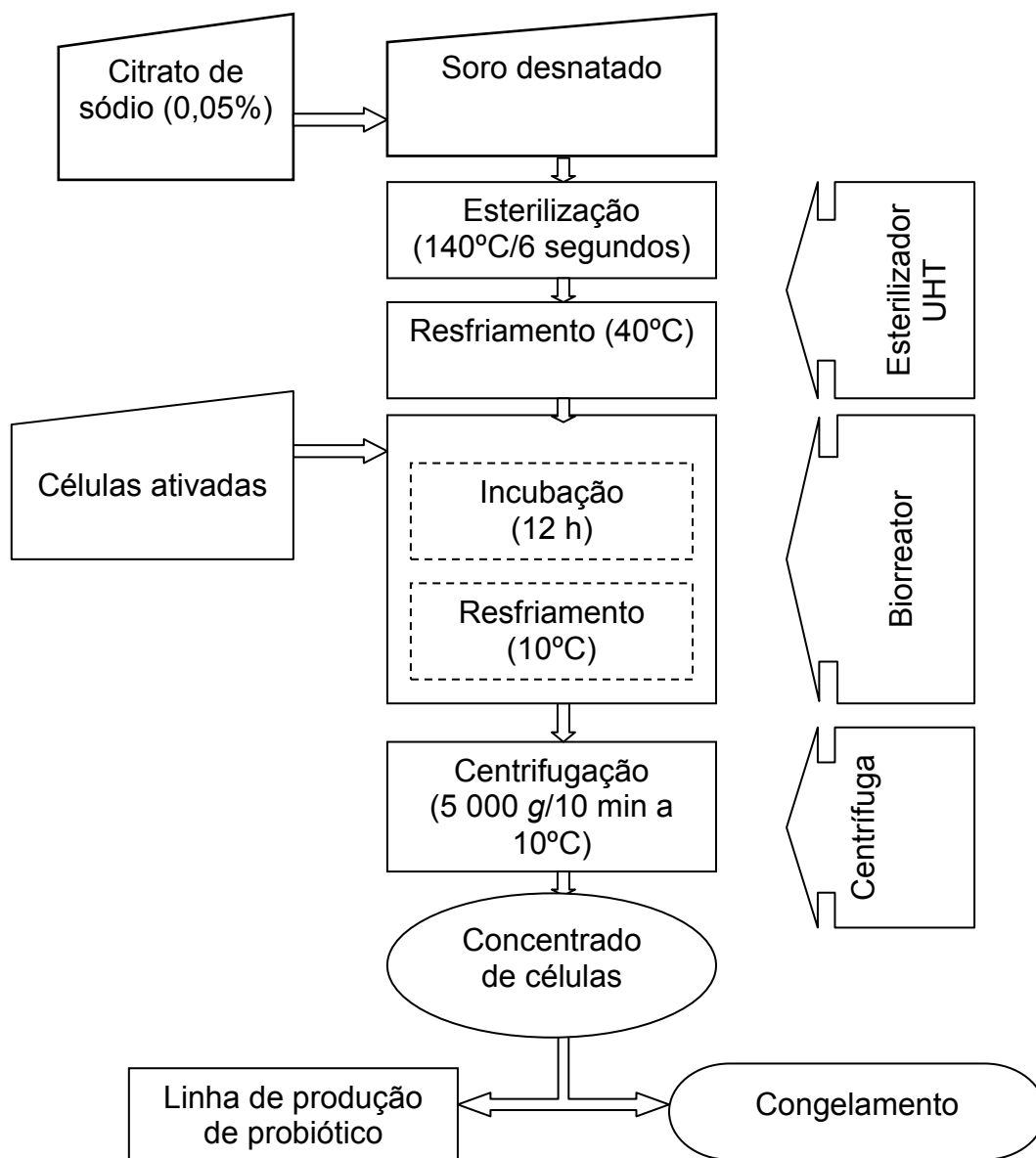


Figura 6 – Processo para a produção do concentrado de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em soro de queijo Minas Frescal esterilizado em sistema UHT.

4.3 – Processo de produção de probiótico

4.3.1 – Fluxograma de produção de leite fermentado por *L. delbrueckii* UFV H2b20

O processo de produção de leite fermentado contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 7) após a recepção do leite integral, o qual é estocado a 5°C no tanque isotérmico. O aquecimento do leite a 50°C facilita a padronização na centrífuga para o teor de gordura desejado. Em seguida o leite padronizado é bombeado para o biorreator de parede dupla. A adição de açúcar, o tratamento a 90°C para eliminar microrganismos que podem contaminar o produto, o resfriamento a 40°C para incubação das células, a adição do inóculo, a fermentação pelo *L. delbrueckii* UFV H2b20 até valores de pH 4,5, e o resfriamento a 10°C, podem ser realizados diretamente no biorreator. O aquecimento e o resfriamento são feitos pela circulação de vapor e água entre as paredes do equipamento, tornando o processo simples e eficiente. A adição de polpa de fruta e de aromatizantes ocorre no misturador e a recirculação pelo bombeamento do leite fermentado promove maior dispersão dos nutrientes. O produto final do processo (Figura 7) é o leite fermentado probiótico com células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20, resultante de sua fermentação no leite pasteurizado contendo na sua formulação básica, aproximadamente, 3% de proteínas, 2,5 de matéria gorda, 4,5% de lactose, 0,8% de sais minerais e 80% de água. As concentrações de sacarose, polpa de fruta e aromatizantes podem variar de 5 a 10%, 2 a 5% e 0,1 a 0,5%, respectivamente. O produto envasado é estocado em câmara fria a temperaturas não superiores a 5°C. A temperatura mínima de crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é de aproximadamente 11°C (MONTEIRO, 1999).

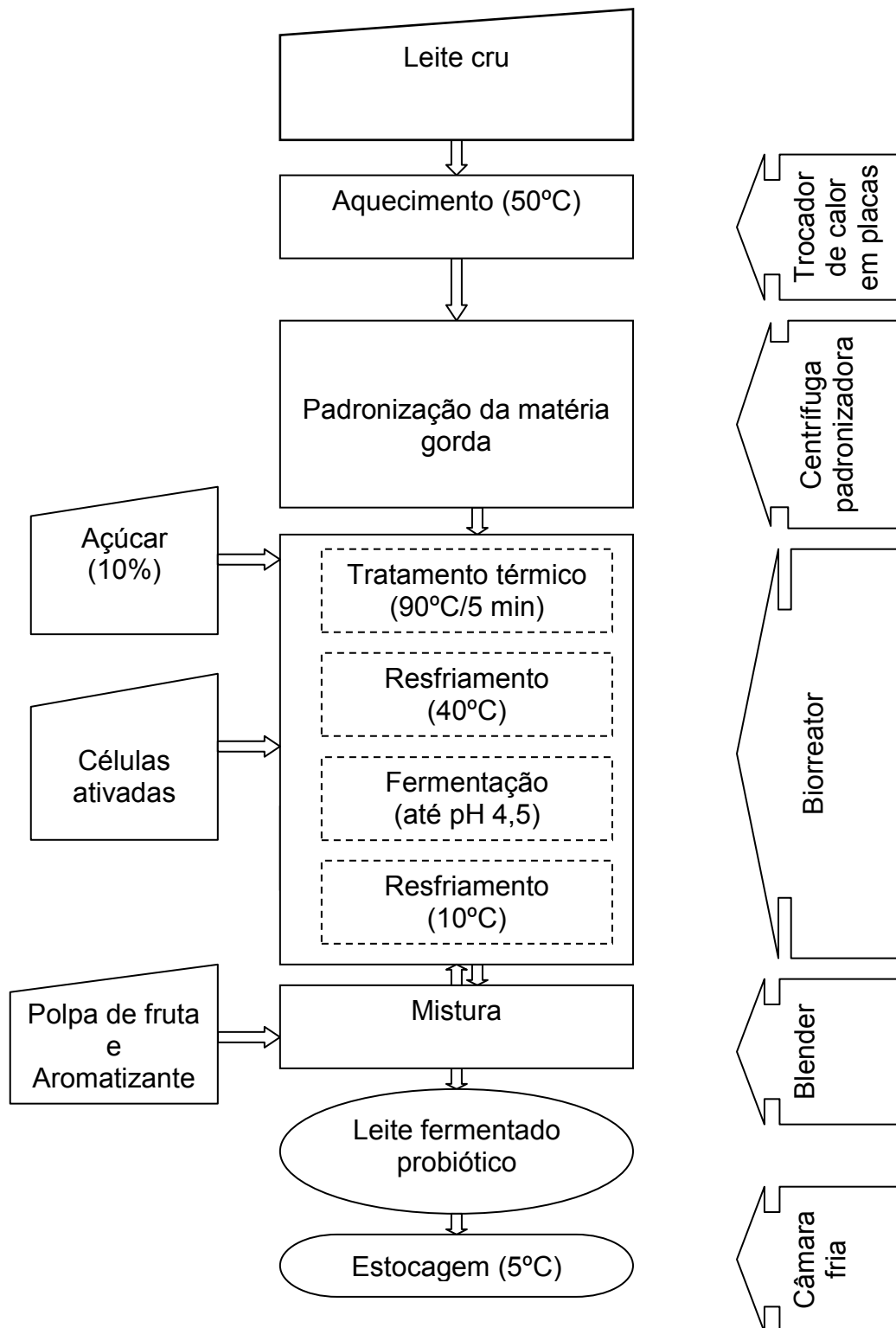


Figura 7 – Processo de produção do leite Fermentado probiótico contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.3.2 – Fluxograma de produção de sorvete contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A mistura para produção de sorvete de leite contém, basicamente, gordura láctea (11%), açúcar (18%), água (65%), estabilizante/emulsificante (0,3%), polpa de fruta e aromatizantes (3,5%) (ARBUCKLE, 1977).

A produção de sorvete contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 8) inicia com a pasteurização da mistura sem a polpa de fruta e sem aromatizante, a 80°C por 25 segundos, seguida de homogeneização, resfriamento a 5°C e transferência para o tanque de maturação, sendo mantida nessa temperatura por no mínimo 4 h para emulsificação e estabilização da mistura (maturação). A adição das células viáveis juntamente com a polpa de fruta e do aromatizante aproveita a unidade operacional da mistura dos componentes. A recirculação por bombeamento é necessária para a dispersão homogênea dos componentes. O congelamento a -5° é realizado em congelador contínuo horizontal onde, simultaneamente, ocorre incorporação de ar (overrun) aumentando o volume da mistura em aproximadamente 90% e resulta na textura característica do produto. O produto obtido é o sorvete probiótico com células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20, obtido a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com adição de açúcares e outros ingredientes, envasado e conservado congelado a -20°C.

Células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 podem ser adicionadas ao produto direcionando-o ao consumo para pessoas imunodeprimidas. A adição das células deve ser realizada na mistura para que a inativação ocorra no tratamento de pasteurização. Neste caso deve-se optar pela pasteurização lenta a 80°C por 5 min, respeitando-se o binômio tempo/temperatura necessário para assegurar a morte das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

No caso da produção de pó para preparo de congelados comestíveis, culturas liofilizadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 podem ser adicionadas ao produto e comercializadas pelo próprio fabricante.

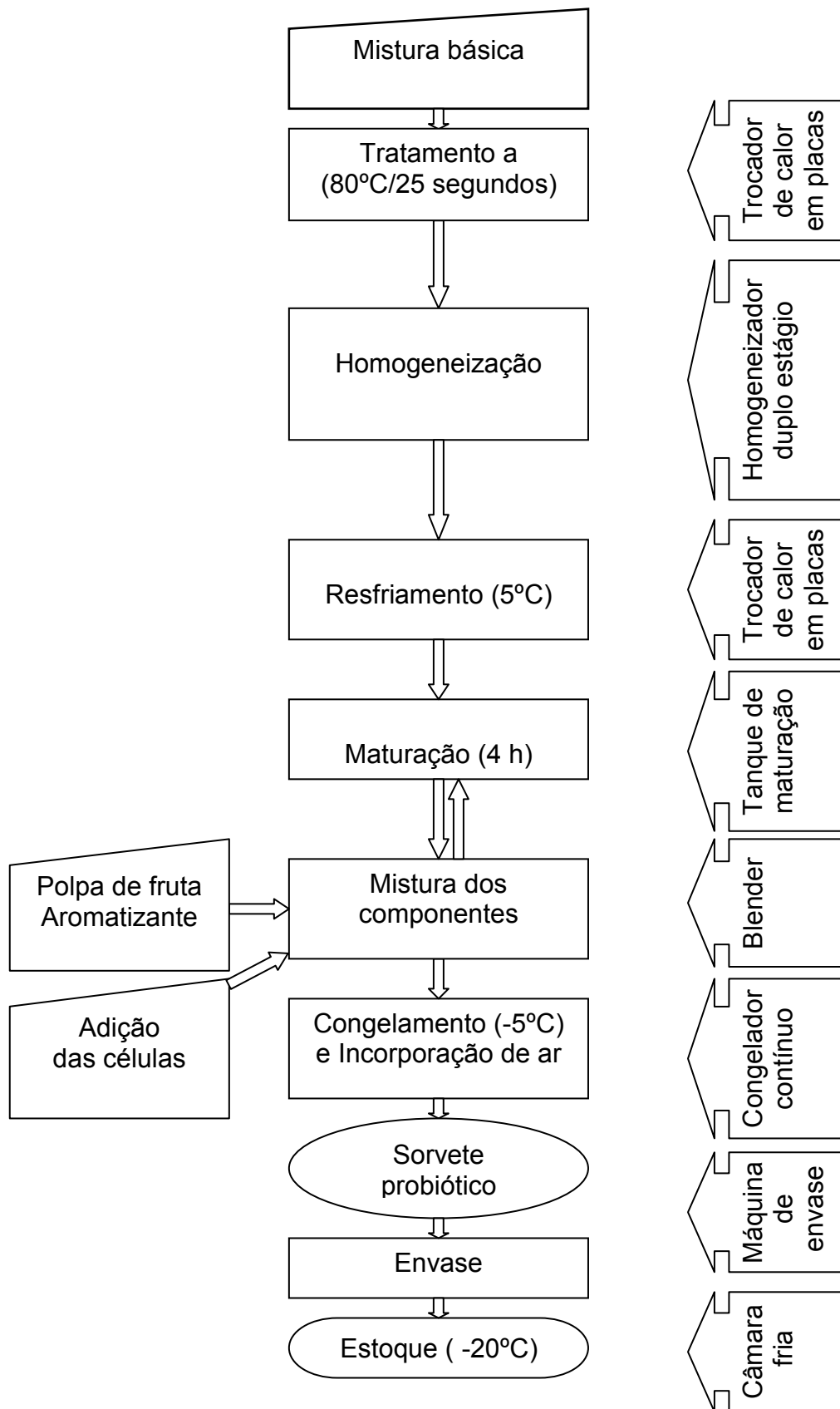


Figura 8 – Processo de Produção de sorvete probiótico contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.3.3 – Fluxograma de produção de leite em pó contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

O leite em pó integral é composto aproximadamente de proteína (26%), matéria gorda (27%), lactose (38%), água (3%) e sais minerais (6%) (HAAL e HEDRICH, 1975)

Para a produção de leite em pó contendo células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 9), o leite cru recebe tratamento térmico a 90°C por 8 segundos para eliminar microrganismos indesejáveis no produto. Em seguida é concentrado sob vácuo, eliminando-se aproximadamente 50% do volume inicial de água. O concentrador a vácuo é dotado pelo menos de 3 efeitos, ou seja, de 3 estágios de evaporação. A água do produto é retirada gradativamente aproveitando-se o vapor gerado em cada efeito para o efeito imediatamente posterior. A temperatura do produto no início da concentração é de aproximadamente 75°C e 50°C no final. No tanque de leite concentrado as células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 são adicionadas e mantidas a 50°C por 30 min para promover a resposta ao estresse térmico. O leite concentrado e homogeneizado segue para o *spray dryer* e o produto resultante é o leite em pó probiótico adicionado de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20, o qual é posteriormente envasado.

Este processo é proposto para a indústria que vá produzir permanentemente o leite em pó probiótico, devido à dificuldade de eliminar as células da linha pós-produção especialmente no interior dos dutos de leite em pó.

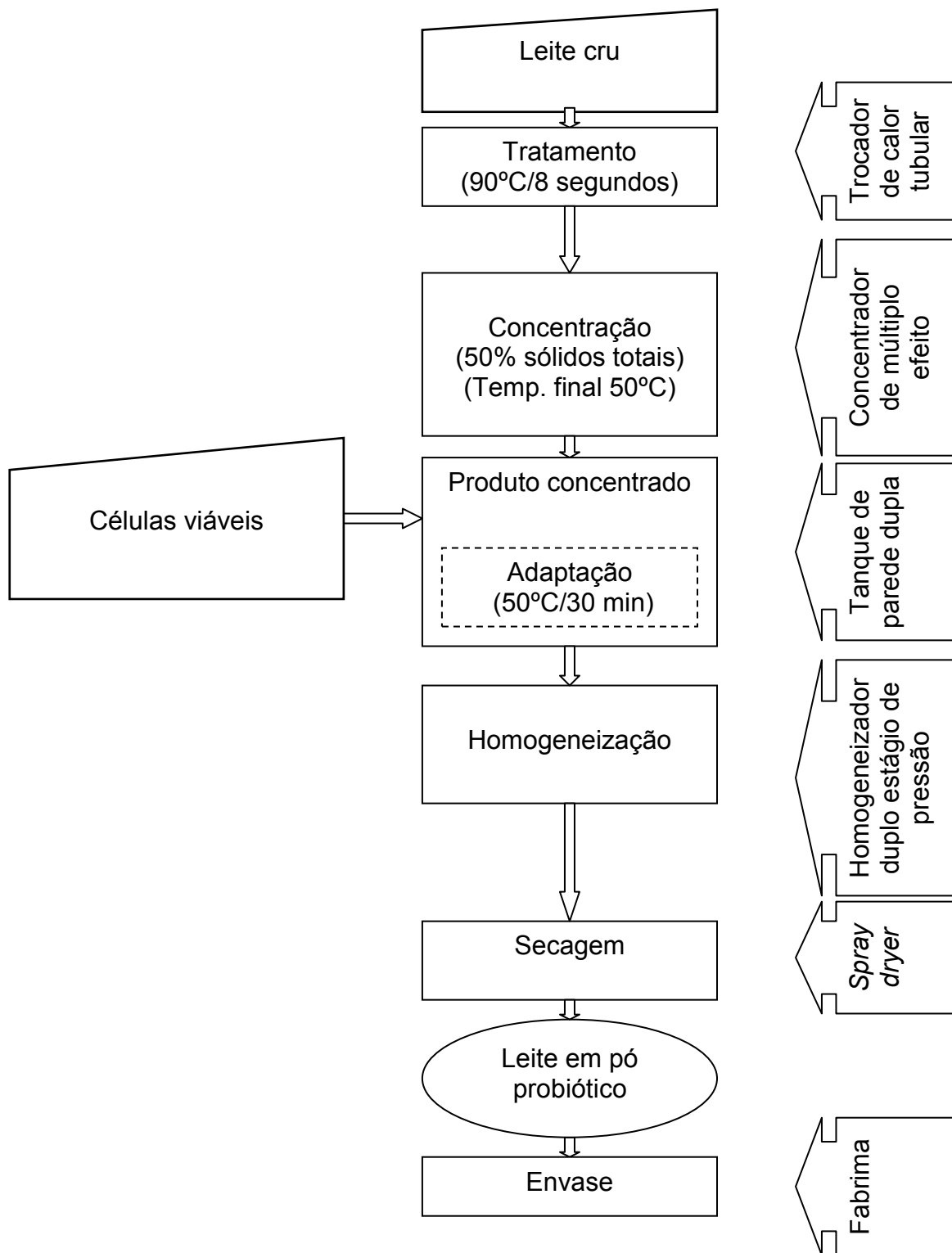


Figura 9 – Processo de produção de leite em pó probiótico com células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.3.4 – Fluxograma de produção de leite em pó contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

No sistema de produção de leite em pó contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 10) as etapas são semelhantes às aquelas mostradas no fluxograma anterior (Figura 9). As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 são inativadas a 80°C por 5 min para, posteriormente serem adicionadas no tanque de leite concentrado. O produto resultante é o leite em pó probiótico com células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20. A vantagem deste produto é a possibilidade de fabricação do probiótico sem contaminar a linha de produção, permitindo alternar a produção entre o leite em pó probiótico e o convencional, podendo ser implantado por qualquer indústria de leite em pó.

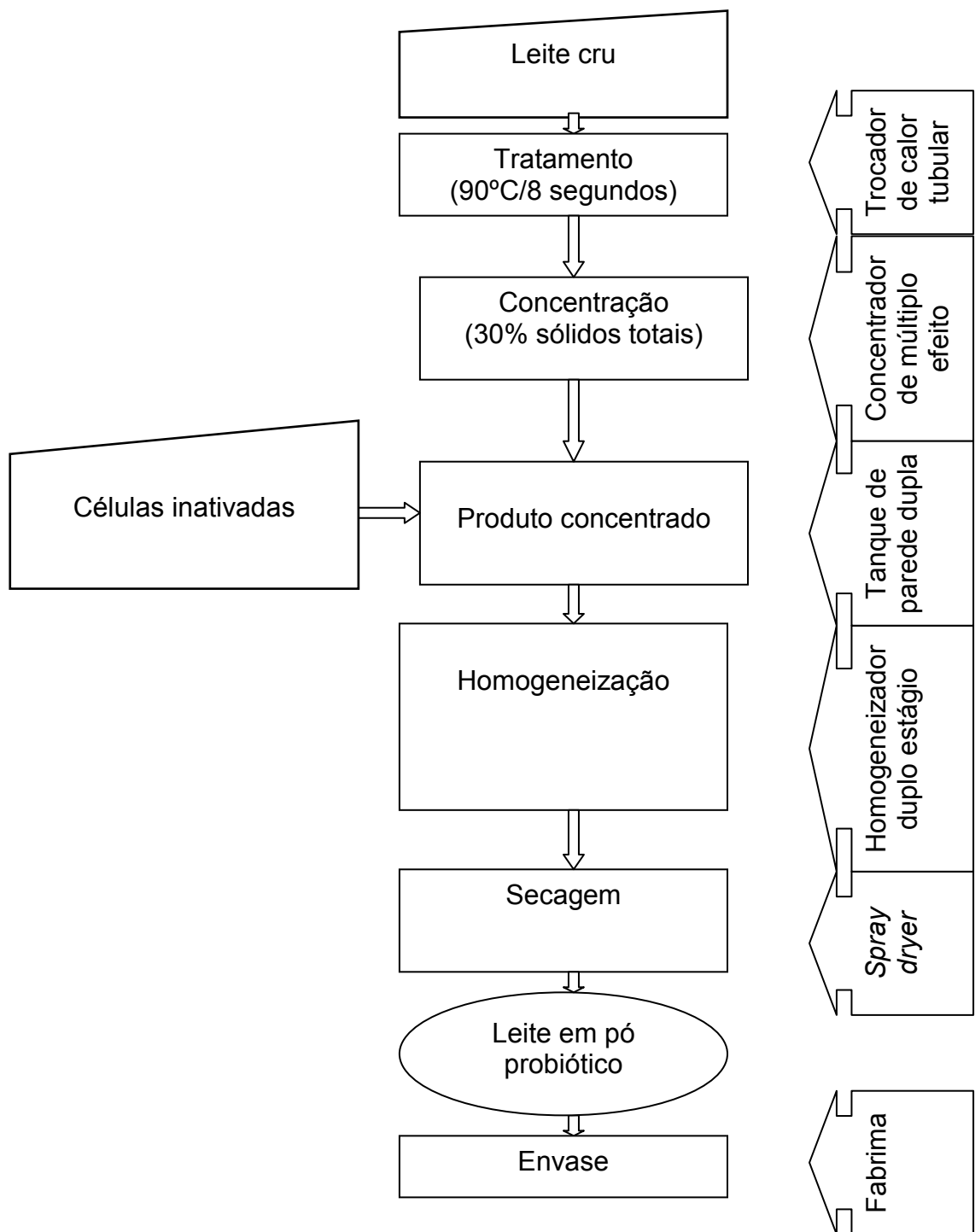


Figura 10 – Processo de produção de leite em pó probiótico contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.3.5 – Fluxograma de produção de leite pasteurizado contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

O leite pasteurizado é composto de aproximadamente 87% de água, 3,5% de proteína, 3,0% de matéria gorda, 4,5% de lactose e 0,7% de sais minerais (VARNAM e SUTHERLAND, 1996).

No sistema de produção de leite pasteurizado probiótico (Figura 11), o leite “in natura” é aquecido para padronização da matéria gorda e homogeneizado. A pasteurização a 75°C e o resfriamento rápido a 5°C ocorrem no mesmo trocador de calor. As células inativadas a 80°C por 5 min de *L. delbrueckii* UFV H2b20 são adicionadas no tanque de leite pasteurizado. O produto resultante é o leite pasteurizado probiótico contendo células inativadas, o qual é envasado e estocado em câmara fria a temperatura não superior a 5°C.

A única alternativa para a obtenção do leite pasteurizado probiótico, do ponto de vista técnico, é com células inativadas. A adição de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite pasteurizado provoca alterações nas suas características sensoriais e reduz a vida de prateleira, provavelmente em razão da produção de ácido láctico (FIGUEIREDO, 1997). Contudo, o estudo do comportamento desse microrganismo mostrou seu crescimento é inibido em temperaturas inferiores a 11°C (SANTOS, 1984).

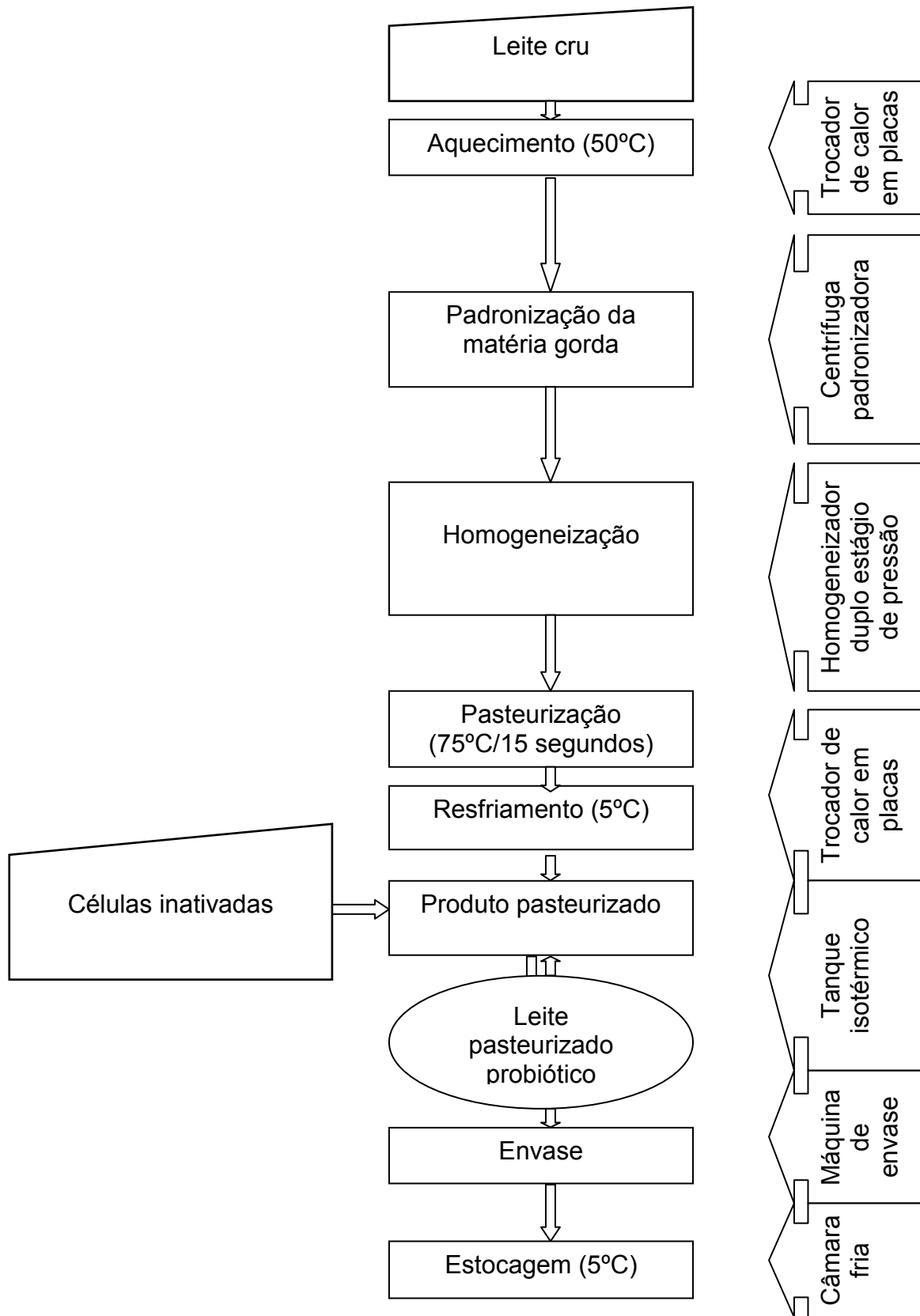


Figura 11 – Processo de produção de leite pasteurizado probiótico contendo células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.3.6 – Fluxograma de produção de leite UHT contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A composição do leite UHT é semelhante à do leite pasteurizado.

No sistema de produção de leite UHT contendo células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 12), o leite previamente pasteurizado é aquecido gradativamente até aproximadamente 80°C. Grande parte deste aquecimento ocorre pela troca indireta de calor entre leite quente e frio, gerando economia de energia. Em seguida o leite é esterilizado a 140°C por 6 segundos pelo vapor por aquecimento direto ou indireto. O efeito de vácuo e a circulação de água fria entre as paredes da câmara de expansão promovem o resfriamento do leite a 80°C. Depois de homogeneizado o produto estéril é resfriado a 32°C e bombeado para o tanque asséptico, no qual as células inativadas são adicionadas. O produto obtido do processo é leite UHT probiótico contendo células inativadas a 80°C por 5 min de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Depois de envasado, o produto é armazenado à temperatura ambiente.

A única alternativa para a obtenção de leite UHT probiótico contendo células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é pela adição de células inativadas, em razão da manutenção à temperatura ambiente e do período de validade do produto, que é de aproximadamente 120 dias.

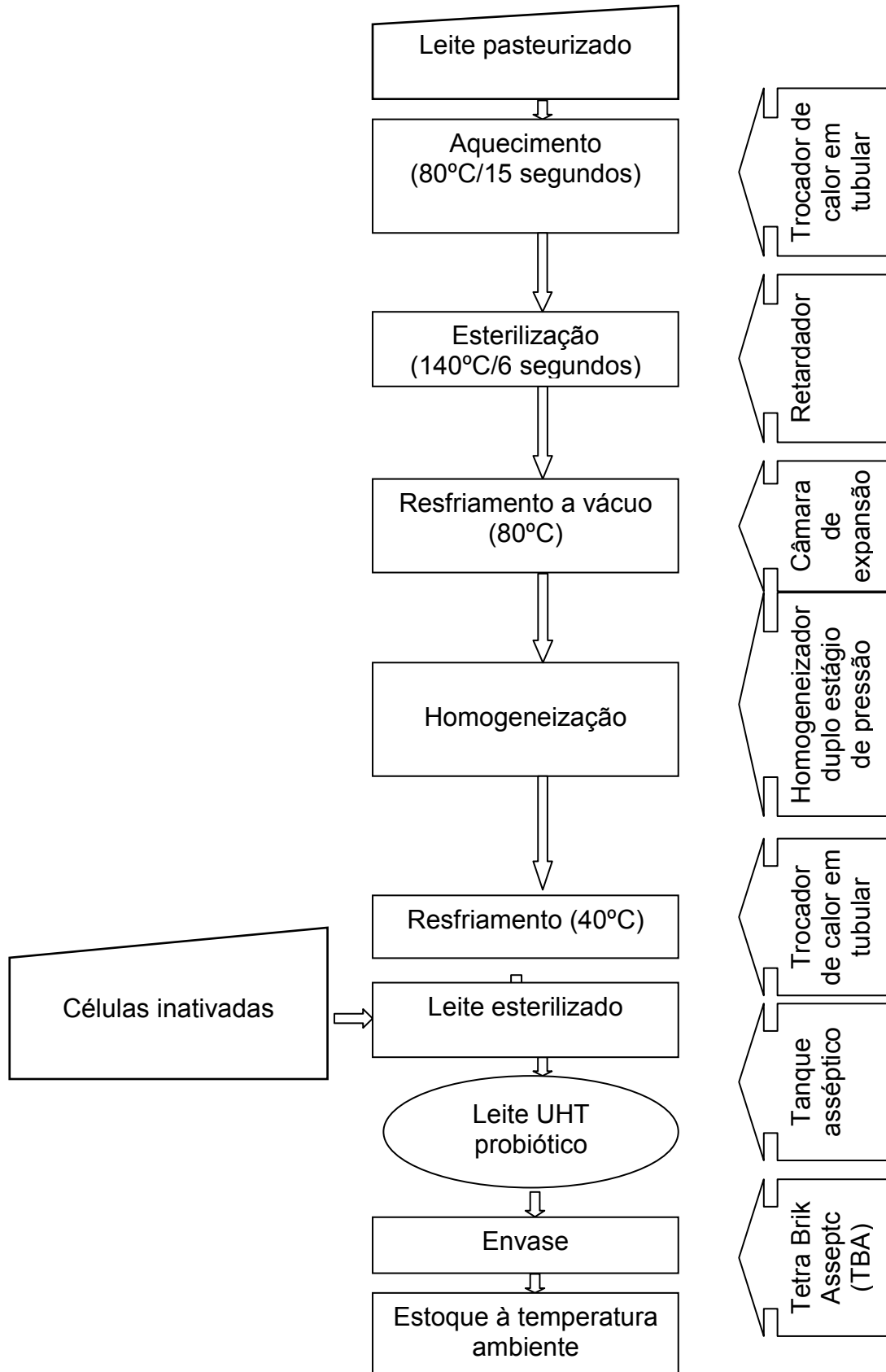


Figura 12 – Processo de produção de leite UHT probiótico contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.4 – Produção de probióticos em escala piloto

4.4.1 – Leite fermentado por *L. delbrueckii* UFV H2b20

A obtenção de cerca de 10^8 UFC/g de *L. delbrueckii* UFV H2b20, a partir de 10^6 UFC/mL da cultura ativa, ocorre em aproximadamente 8 h de fermentação de leite integral, contendo ou não sacarose (Figura 13). A redução do pH até valores de 4,5, ocorre apenas após 15 h de fermentação. A adição de 10% de sacarose não inibiu o crescimento do lactobacilo.

Números semelhantes foram encontrados em amostras de iogurtes. O número de células viáveis após a acidificação do leite por duas culturas *starters* comerciais, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* subsp. *Bulgaricus* variou de 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL para ambas as células. O pH variou de 4,30 a 4,52 (VINDEROLA et al., 1999).

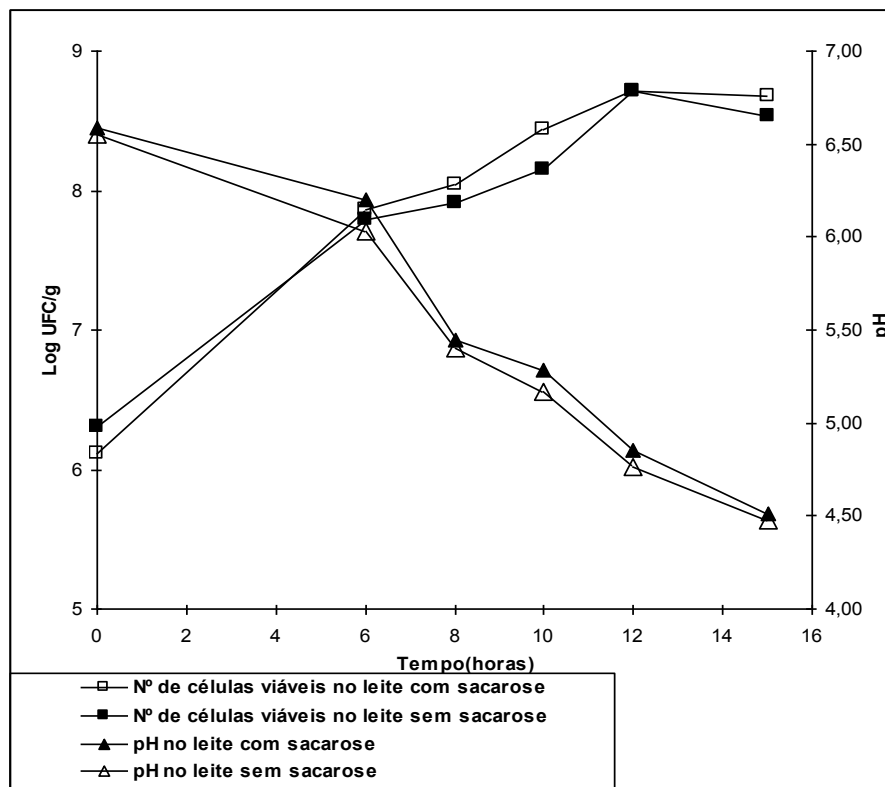


Figura 13 – Crescimento do *L. delbrueckii* UFV H2b20 e acidificação durante a produção de leite fermentado adicionado de 10% de sacarose e de leite sem sacarose.

FASOLI et al. (2003) avaliou o número de células viáveis em amostras de produtos probióticos de sete indústrias diferentes e encontrou variações de 10^5 a 10^7 UFC/mL de *Bifidobacterium* spp. O número de *L. acidophilus* foi <10 UFC/mL, embora tenha sido declarado no rótulo de dois dos produtos analisados. *L. casei* também não foi encontrado no produto que o declarava.

Os resultados apresentados na figura 14 mostram que o leite fermentado pelo *L. delbrueckii* UFV H2b20 poderá ser comercializado, mantido a 5°C por até 30 dias, período em que o pH permaneceu entre 4,0 a 4,5. Aos 45 dias houve redução do valor do pH para aproximadamente 3,7. A preferência do consumidor é pelo iogurte com valores de pH próximos de 4,0 (SELLARS e BABEL, 1970 apud MARTIN, 2002).

As alterações ocorridas em relação ao número de células viáveis e ao pH foram diferentes no leite fermentado pelo *L. delbrueckii* UFV H2b20 quando comparadas com o iogurte produzido por *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* e *S. thermophilus*, ambos estocados a 5°C. O número de células viáveis e o valor de pH permanecem praticamente inalterados no iogurte estocado até 30 dias, (VINDEROLA et al., 1999). O número de células do *L. delbrueckii* UFV H2b20 reduziu de 10^8 UFC/g para 10^7 UFC/g no leite fermentado no intervalo de 45 dias.

O número de células viáveis de *B. bifidum* e *L. acidophilus*, em leite acidificado com valor de pH igual a 4,5, estocado a 5°C reduziu de 10^7 UFC/mL para 10^5 UFC/mL e de 10^7 UFC/mL para 10^4 UFC/mL em 30 dias, respectivamente, (VINDEROLA et al., 1999).

O número de células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 no leite fermentado estocado a 5°C por 45 dias é superior ao número de mínimo de células viáveis exigido pela Resolução 47/97 do Grupo de Mercado Comum (GMC) para produtos probióticos, isto é, 10^6 UFC/g (Nova Legislação..., 2002), mas as alterações físico-químicas devem ser monitoradas para que o produto apresente as características desejáveis para o consumidor. Para isso é necessária a realização de testes de aceitação específicos para os produtos contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20.

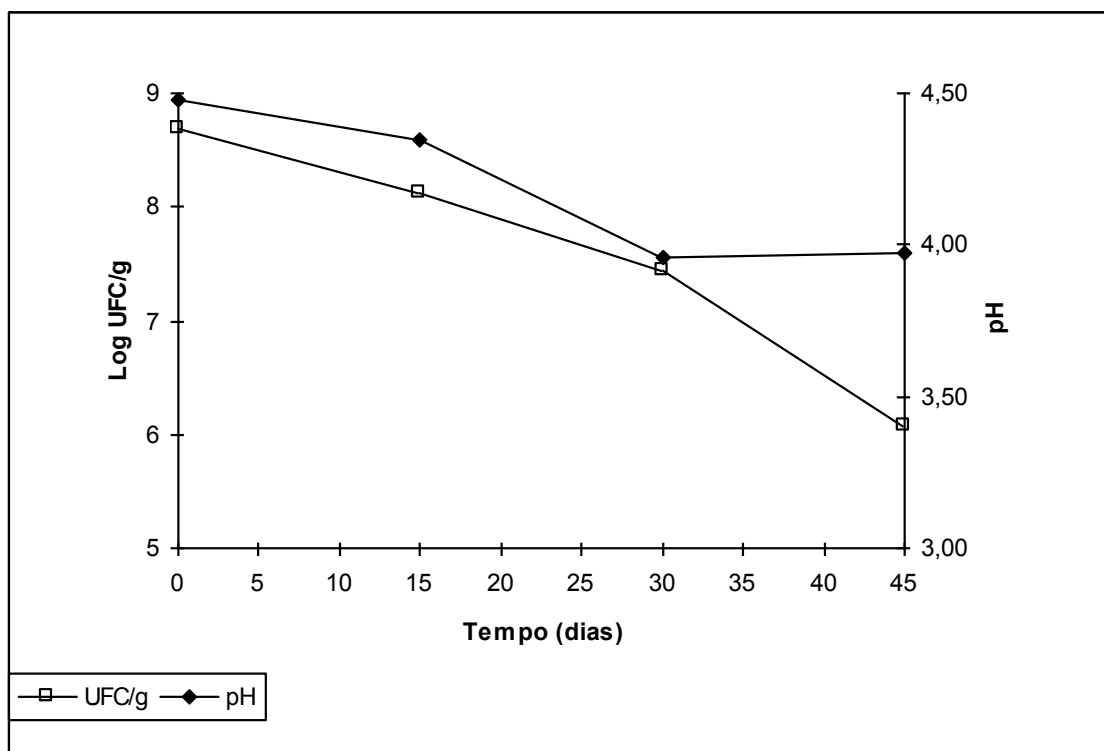


Figura 14 – Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite fermentado durante estocagem a 5°C por 45 dias.

4.4.2 – Sorvete probiótico com *L. delbrueckii* UFV H2b20

O resultado da contagem de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no sorvete ao longo do período de estocagem é mostrado na Figura 15. O número de células em suspensão no soro de queijo foi de $2,2 \times 10^9$ UFC/mL. A produção de sorvete contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 é outra estratégia para a produção de produtos probióticos. O congelamento rápido e a manutenção do produto à temperatura aproximada de -20°C favorecem a viabilidade celular (AGOSTINHO, 1988). O número de células viáveis variou de $3,1 \times 10^8$ a $1,1 \times 10^8$ UFC/mL no produto estocado durante 45 dias. Após 60 dias houve uma redução de aproximadamente um ciclo log e o número de células viáveis manteve-se estável variando de $3,5 \times 10^7$ a $4,1 \times 10^7$, pelo menos até 90 dias.

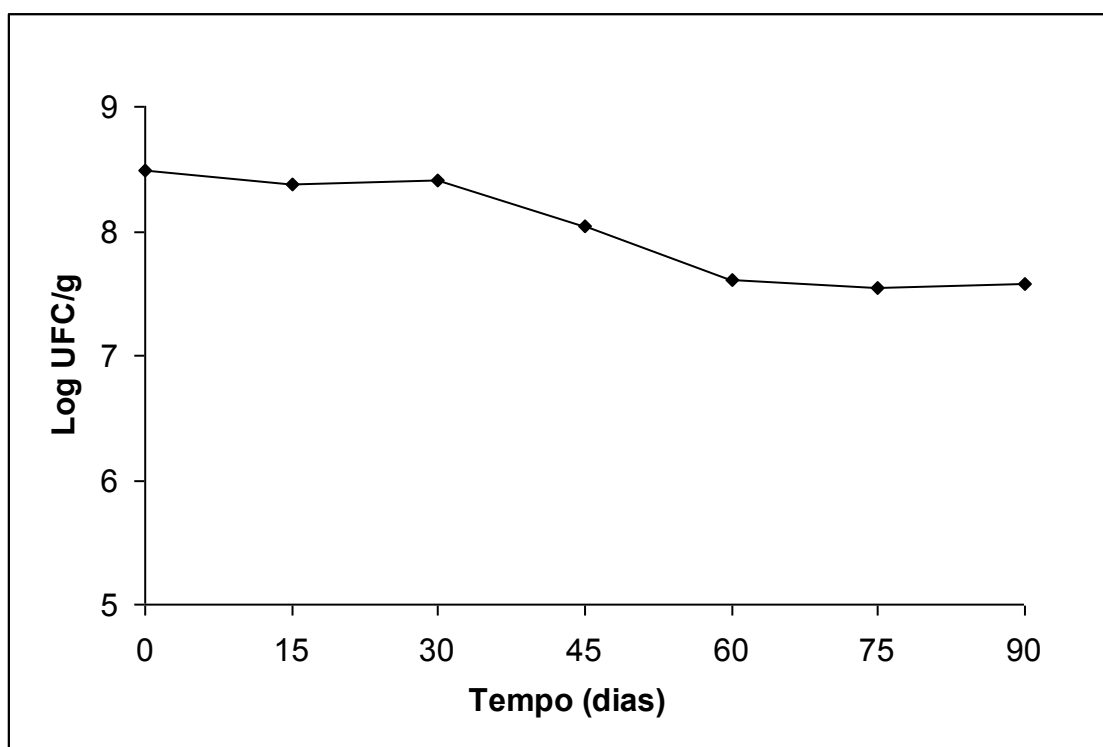


Figura 15 – Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em sorvete durante estocagem a -20°C por 90 dias.

4.4.3 – Leite em pó contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20

O número de células viáveis no leite antes da secagem era de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL e valor de pH era de 6,57. Após a secagem obtiveram-se os dados apresentados (Quadro 7) mostrando que é possível produzir leite em pó com número de células viáveis acima de 10^8 UFC/g e manter número acima de 10^6 UFC/g por até 60 dias. O número de células viáveis reduziu de $3,3 \times 10^8$ UFC/g para $2,5 \times 10^7$ UFC/g em 15 dias à temperatura ambiente. Após 30 dias houve nova redução do número de células viáveis, mas observou-se certa estabilidade na viabilidade celular até 60 dias com os números variando de $5,7 \times 10^6$ UFC/g a $1,5 \times 10^6$ UFC/g no período. Após 75 dias o número de células viáveis foi reduzido para valores na ordem de 10^5 UFC/g, abaixo do número aceitável.

A utilização de metade do volume do soro para a produção das células em relação ao volume de leite produzido provocou uma queda negligenciável do pH do leite após adição do soro ressuspenso com as células do *L.*

delbrueckii UFV H2b20, de 6,63 para 6,57. Considerando que não foi necessário lavar as células para a retirada do ácido láctico produzido e de outros produtos que podem estar presentes quando se utilizam meios de cultura formulados, a utilização de soro como meio de propagação elimina etapas no sistema que poderiam inviabilizar a produção em escala industrial.

Resultados semelhantes foram encontrados com o produto estocado à temperatura ambiente (FIGUEIREDO, 1997). No entanto, após a desidratação (*spray drying*) a sobrevivência das células neste experimento foi até 100 vezes superior ao resultado obtido por Figueiredo. Isto mostra que o pré-tratamento para a adaptação do *L. delbrueckii* UFV H2b20 às condições de estresse promoveu a resposta que aumentou sua resistência ao processo de secagem. O choque térmico promovido a 50°C por 30 min, conforme caracterizado por MONTEIRO (1999) e utilizado por FURTADO (2001), foi eficaz para a sobrevivência das células.

No leite em pó submetido ao congelamento após a desidratação, o número de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20, durante 90 dias, variou de $1,2 \times 10^6$ UFC/g a $3,1 \times 10^7$ UFC/g, o que pode ser uma estratégia para indústrias que possuem câmaras de congelamento para, manter o produto estocado nestas condições e distribuí-lo para de acordo com a demanda rápido.

Quadro 7 – Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em leite em pó estocado à temperatura ambiente e a -20°C

Tempo (dias)	Leite em pó	Leite em pó congelado
	UFC/g	UFC/g
1	$3,3 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$
15	$2,5 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$
30	$5,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$
45	$3,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^8$
60	$1,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^7$
75	$5,3 \times 10^5$	$1,1 \times 10^7$
90	$2,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$

4.4.4 – Leite em pó contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Na produção de leite em pó contendo células inativadas, a suspensão de células no soro com $2,2 \times 10^9$ UFC/mL de células viáveis foi tratada a 80°C por 5 min para inativação do *L. delbrueckii* UFV H2b20, sendo em seguida adicionada no leite antes da secagem no *spray dryer*. O leite em pó contendo as células inativadas foi estocado à temperatura ambiente.

A produção do leite em pó com células inativadas possibilita fornecer um produto com propriedades probióticas para estimular o sistema imunológico, principalmente de pessoas imunodeprimidas com a grande vantagem de facilitar o manuseio e o transporte, podendo alcançar várias regiões mantendo-se as características naturais do produto.

Estudos mostraram que células de *E. coli* B₄₁ foram totalmente eliminadas do sangue de camundongos monoassociados com células vivas ou mortas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 em 90 min após a administração oral. Em camundongos livres de germes, 0,1% do inoculo original ainda estavam presentes. Além disso, o número de células de Kupffer, as quais são responsáveis pela eliminação de microrganismos que circulam no sangue, foi 2 vezes superior nos camundongos monoassociados (NEUMANN et al.; 1998).

4.4.5 – Leite pasteurizado adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20

Os valores de pH e acidez expressa em % de ácido láctico (p/v) de leite pasteurizado após adição de 30 mL por L, de uma cultura contendo $9,0 \times 10^8$ UFC/mL de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 e durante o período de estocagem do produto (Figura 16) mostram que a adição de células inativadas concentradas a partir de um volume inicial de 200 mL no soro de queijo, não provocou alterações relevantes no pH e na quantidade de ácido láctico do leite pasteurizado. Os valores antes da adição das células eram de 6,8 e 0,17%, respectivamente. As alterações ocorridas são comuns em leite pasteurizado em razão, principalmente, da ação de microrganismos psicrotrofos acidificantes, proteolíticos e lipolíticos (THIELMANN, 1995), alguns dos quais não são eliminados pelo processo de pasteurização rápida

(HTST) (ALFENAS, 1994). Contudo, as características do produto foram mantidas durante 7 dias, período bem superior à validade praticada no Brasil que é, normalmente, de 4 dias.

A produção de leite pasteurizado com células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 é uma alternativa para oferecer ao consumidor um produto capaz de estimular o sistema imunológico sem comprometer as características sensoriais naturais do leite. Além disso, pessoas imunodeprimidas que não estejam aptas a ingerir microrganismos vivos em grandes números poderiam utilizar este tipo de produto para estimular seu sistema imunológico.

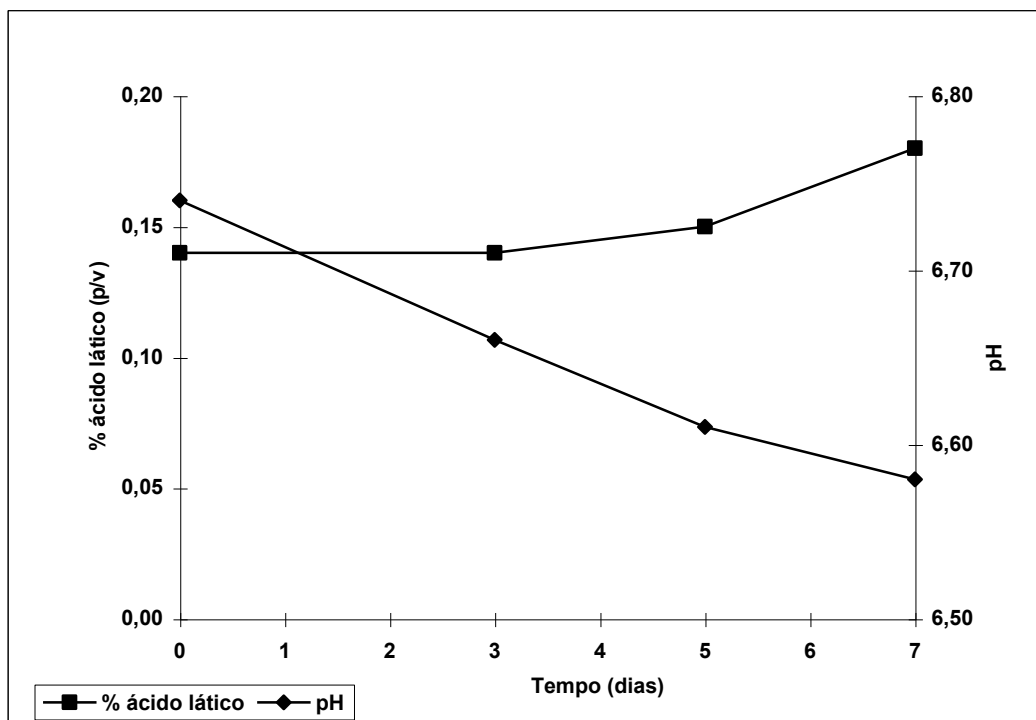


Figura 16 – pH e acidez titulável no leite pasteurizado adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante estocagem a 5°C por 7 dias.

4.4.6 – Leite UHT adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20

Os valores de pH e acidez expressa em ácido láctico do leite UHT determinados antes e após adição de 30 mL por L do produto, da suspensão com $6,8 \times 10^8$ UFC/mL células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20, apresentaram alterações durante o período de estocagem do produto (Figura 17). O pH do leite e o percentual de acidez titulável (p/v) antes da adição das células eram de 6,58 e 0,17%, respectivamente. Houve um aumento na concentração de ácido láctico após 15 dias de aproximadamente 0,17 para 0,22. Os fatores que normalmente contribuem para o aumento da acidez de leite tratado á temperatura de esterilização a 140°C por 4-6 segundos são a insolubilização do fosfato de cálcio, a degradação térmica da lactose que ocorre a temperaturas acima de 100°C, com conseqüente elevação da acidez; e desnaturação de soroproteínas, expondo grupos com caráter ácido (SILVA e ALMEIDA, 2005).

Na determinação do grau de proteólise, expresso em mg do aminoácido tirosina por 5 mL de leite (Figura 18) foi encontrado 0,16 mg de tirosina logo no início da adição das células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20. O leite longa vida comercial, no qual não foram adicionadas as células apresentou em média 0,12 mg do aminoácido. Isto provavelmente ocorreu devido da adição de soro de queijo contendo as células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20. O soro é obtido pela hidrólise K-caseína, a maior fração protéica do leite, em razão da ação de enzimas proteolíticas do coalho, ocorrendo a formação do precipitado ou coalhada que origina os queijos. Como conseqüência, ocorre a liberação de soro, o qual contém proteínas solúveis, peptídeos e aminoácidos livres. O composto enzimático extraído do abomasso de bezerros contém renina e pepsina, as quais são as enzimas coagulantes do leite (SABIONI, 2005). O mecanismo da hidrólise tem início com a ação do coalho que hidrolisa a ligação Phe105 – Met106 da K-caseína, induzindo a aglutinação e precipitação. A renina libera peptídeos de grande peso molecular, mas não produz aminoácidos livres. As mudanças sofridas K-caseína, são conhecidas como proteólise primária. Pela ação das endopeptidases e exopeptidases, produzidas por culturas lácticas, são formados os aminoácidos livres e

peptídeos, contribuindo para o aumento da fração protéica solúvel, fenômeno conhecido como proteólise secundária (SABIONI, 2005).

Trabalhos posteriores devem ser realizados para comparar as alterações no leite UHT contendo as células inativadas do *L. delbrueckii* com o produto disponível no mercado.

A proteólise teve continuidade durante o período de estocagem, apresentando 0,20, 0,28 mg de tirosina por 5 mL de leite após 15 e 30 dias, respectivamente, quando comparados com o controle, no qual os valores médios foram de 0,14 mg do aminoácido após o mesmo período. Após 45 dias estabeleceu-se certa estabilidade no grau de proteólise em ambos os produtos com pouca variação dos valores medidos sendo encontrados 0,28 e 0,29 mg de tirosina por 5 mL de leite no controle e na amostra de leite UHT com células viáveis, nesta ordem.

O resultado da determinação de proteólise no leite controle, onde não foram adicionadas células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, é semelhante ao encontrado por PINTO (2004) nos primeiros 15 dias e diferente após este período. Os estudos da autora mostraram que a proteólise aumentou consideravelmente durante a estocagem do produto. Neste trabalho as células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram adicionadas inativadas, mas que ainda assim, podem servir de fonte de proteases ativas.

A presença de proteínas precipitadas em suspensão foi observada no leite UHT adicionado do *L. delbrueckii* UFV H2b20 inativado após 30 dias, o que não ocorreu no controle. Após 60 dias no leite UHT foi possível visualizar a separação de soro no interior da embalagem cartonada Tetra Pak.

A provável explicação para este fato é a ação de enzimas endógenas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 liberadas após a morte das células, as quais podem quebrar a lactose e produzim ácido láctico. A alteração do pH e da acidez foi relativamente pequena no período, indicando a ausência de crescimento de células viáveis (Figura 18).

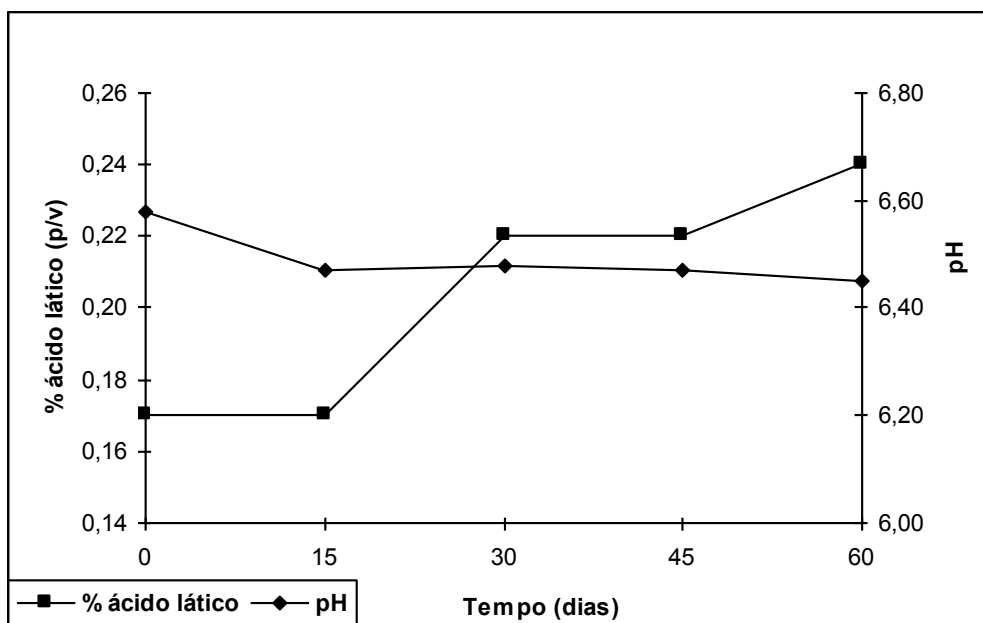


Figura 17 – pH e acidez no leite UHT adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 durante estocagem a 5°C por 60 dias.

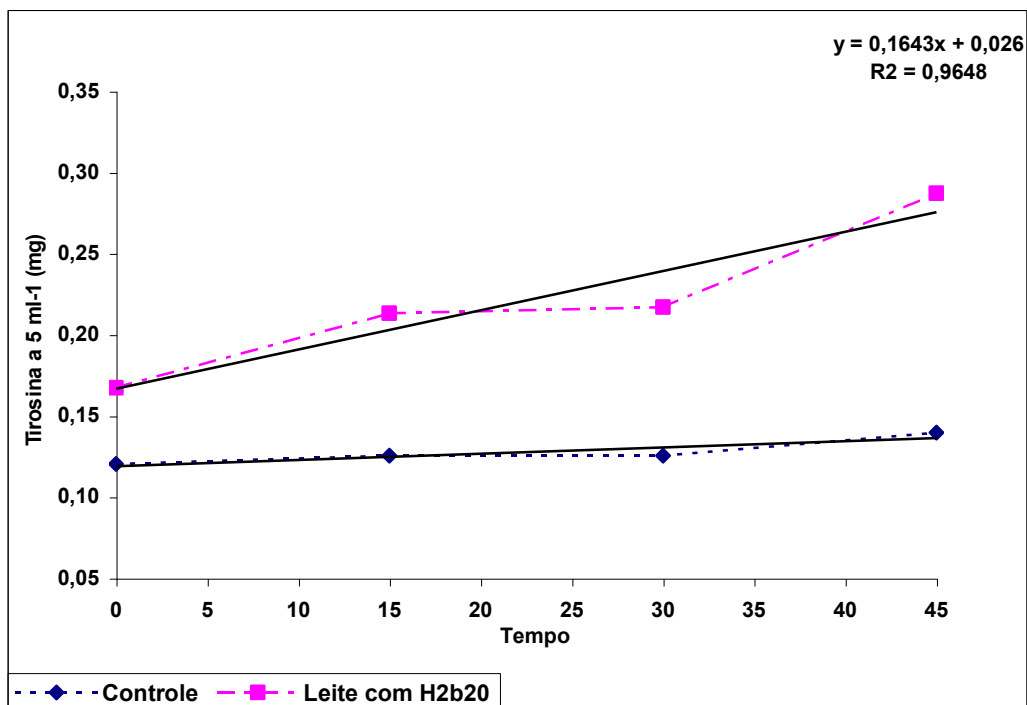


Figura 18 – Proteólise no leite UHT adicionado de células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 expressa em mg de tirosina por 5mL de leite durante estocagem à temperatura ambiente por 45 dias.

Viabilidade tecnológica dos processos para uso industrial

O processo proposto de produção do concentrado de células utiliza um insumo abundante e de baixo custo, o soro de queijo, permite a obtenção de células viáveis acima de 10^9 UFC/mL e utiliza equipamentos disponíveis nas indústrias de laticínios.

A estabilização das proteínas do soro de queijo com citrato de sódio, ao tratamento térmico (121°C por 15 min ou 140°C por 6 segundos), simplificou o processo porque elimina várias etapas onerosas na produção do concentrado de células. O estabilizante não interfere no crescimento da cultura de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e torna o sistema funcional para uso em escala industrial.

O concentrado pode ser congelado para comercialização por um laboratório de produção de células ou ser utilizado diretamente na produção de produtos probióticos nas próprias indústrias de laticínios.

No processo desenvolvido para o leite fermentado pelo *L. delbrueckii* UFV *L. delbrueckii* UFV H2b20 como probiótico não há necessidade de se utilizar o concentrado e sim aproximadamente 2% (p/v) do inóculo contendo células previamente ativadas, porque o leite é o meio de propagação e as transformações que ocorrem no produto durante a fermentação, como por exemplo, o desenvolvimento da acidez, são desejáveis como características do produto. O processo restringe-se ao uso de, basicamente, um único tanque de fermentação, onde ocorre o tratamento térmico, a multiplicação das células e o resfriamento para adicionar os ingredientes e armazenar o produto final. O tratamento térmico do leite com açúcar a 90°C por 5 min, empregado na fabricação do produto elimina microrganismos indesejáveis no leite, expulsa oxigênio dissolvido e promove a precipitação de 70 a 80% das proteínas do soro, particularmente a β -lactoglobulina. (TETRA PAK..., 1995). A condição microaeróbia resultante deste tratamento favorece o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20. As proteínas do soro interagem com a proteína não precipitada pelo calor, a κ -caseína, evitando a separação do soro e contribuindo para a manutenção da homogeneidade da textura do produto final. A estocagem do produto à temperatura de resfriamento auxilia na manutenção

da viabilidade celular. O processo em si é um facilitador para a produção de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em escala industrial.

O estabelecimento dos processos de produção do sorvete, leite em pó, leite UHT e leite pasteurizado com o *L. delbrueckii* UFV H2b20 obedece a alguns critérios em comum. A produção do microrganismo a partir de um sistema de produção de células que evita grandes modificações numa planta de laticínios previamente instalada e, principalmente, permite a incorporação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 nas etapas finais do processamento de forma que a maior parte da linha de produção continue livre de células bacterianas.

O sorvete é fornecido ao consumidor obrigatoriamente congelado, o que favorece a manutenção da viabilidade celular de *L. delbrueckii* UFV H2b20. O congelamento é realizado rapidamente através da troca indireta de calor com um líquido refrigerante como amônia. A textura característica do produto é resultante da incorporação de ar no momento do congelamento, podendo ocorrer um aumento aproximado de 90% do volume inicial (ARBUCKLE, 1977). Algumas limitações podem comprometer a sua utilização como, por exemplo, a necessidade de transportá-lo congelado e a redução do consumo no inverno.

O leite em pó possui vantagens para ser utilizado como produto probiótico em razão da facilidade de transporte de grandes volumes à temperatura ambiente. No estabelecimento do sistema de produção do leite em pó contendo células viáveis do *L. delbrueckii* UFV H2b20 a temperatura de entrada na câmara foi mantida a 170°C e da saída a 95°C, para assegurar o maior número possível de células viáveis durante a secagem (*spray drying*) e a estocagem do produto. As temperaturas elevadas usadas no processamento requerem período de adaptação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas por condições de estresse, para estimular a síntese de proteínas que promovem e aumentam a resistência das células.

A propriedade imunoestimuladora das células inativadas do *L. delbrueckii* UFV H2b20 conduziu ao desenvolvimento de um processo de produção no qual obteve-se um produto muito especial, o leite em pó com células inativadas. Ele é semelhante ao produto com células viáveis, porém podem-se suprimir algumas etapas, como a adaptação celular a temperaturas elevadas e o rigoroso controle da temperatura na fabricação do produto. O leite

em pó com células inativadas é direcionado para todas as pessoas, incluindo as imunodeprimidas. O processo pode ser conduzido numa planta convencional de leite em pó, o que o torna vantajoso quando comparado ao processo contendo células viáveis.

O sistema de produção de leite pasteurizado e leite UHT contendo o *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi elaborado exclusivamente com a adição de células inativadas do microrganismo. No caso do leite pasteurizado há desenvolvimento da acidez mesmo no produto refrigerado a 5°C, quando células viáveis são incorporadas (FIGUEIREDO, 1997). Em leite UHT é total impossibilidade técnica de se utilizar células viáveis, em razão da estocagem e da comercialização do produto à temperatura ambiente. Em ambos os produtos a adição de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é realizada na última etapa do processo antes do envase do produto, ou seja, no tanque de estocagem do produto processado. Desta forma, leite pasteurizado contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode ser comercializado como probiótico, tendo assegurado o seu prazo de validade. No caso de leite UHT, o desenvolvimento de proteólise inviabiliza o seu uso comercial.

Do exposto conclui-se pela viabilidade técnica dos processos desenvolvidos para a produção do concentrado de células em soro de queijo Minas Frescal, do leite fermentado, sorvete e leite em pó contendo células viáveis e, do leite em pó, sorvete e leite pasteurizado contendo células inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.5 – Morfologia de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em resposta a diferentes meios e condições de cultivo

Latobacillus são bastonetes Gram-positivos, curtos ou alongados dependendo da idade da cultura, da composição do meio e da tensão de oxigênio. O meio pode determinar ainda o grau de curvatura da célula. Algumas espécies exibem uma mistura de bastonetes longos e curtos em condições de cultivo idênticas. A fase de crescimento e o pH podem levar à formação de cadeias longas ou de anéis compostos por várias células (KANDLER e WEISS, 1986).

Na técnica de coloração de Gram de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, cultivadas em soro de queijo de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio (A), em caldo MRS (B) e em leite integral (C), são evidentes as diferenças de morfologia do microrganismo (Figura 19). A morfologia do lactobacilo transferido de soro de queijo para caldo MRS (E) confirma a identidade da bactéria cultivada no soro. A foto D mostra as células diretamente recuperadas do leite do leite em pó produzido com as células crescidas em soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio. A diferença de morfologia entre as células da foto A e da foto D pode ser devida às condições a que foram submetidas imediatamente antes da passagem pelo *spray dryer*: 30 min a 50°C no soro de queijo e adição ao leite. O tempo neste último, até a alimentação do *spray dryer*, é variável. O pH final do soro na produção de células era de 3,9 a 4,5. O pH no leite era de 6,52 a 6,57. A morfologia das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas do leite em pó e cultivadas em soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio (F) confirma o pleomorfismo dessas células. A morfologia demonstrada é a mesma das constantes na Figura 19 A. Fica demonstrado que as condições do meio levam às diferenças morfológicas, confirmando a identidade das células que se encontram no produto probiótico em questão. O mesmo controle foi efetuado para garantir que os demais produtos probióticos, sorvete e leite fermentado, também continham as células intencionadas. A diferença na morfologia não representava a presença de contaminantes.

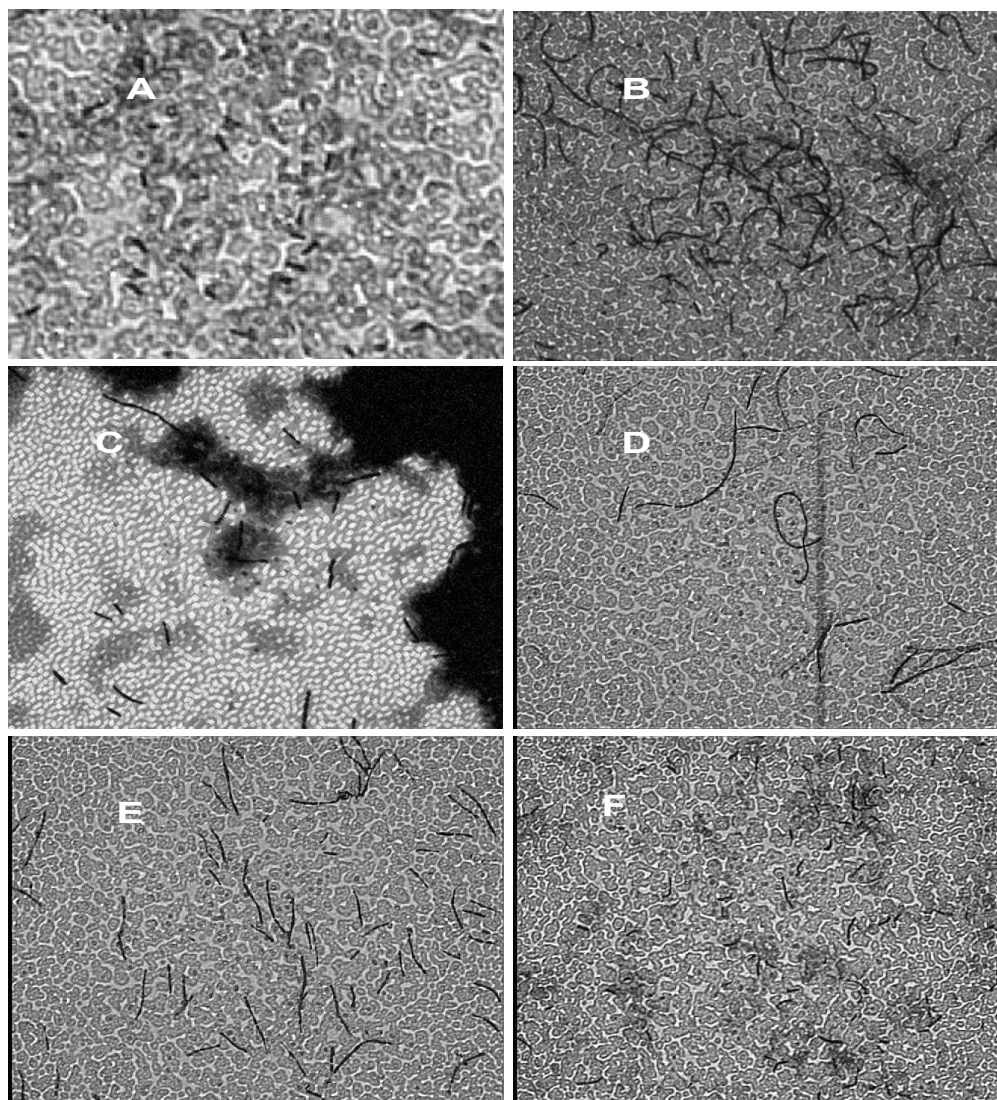


Figura 19 – Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 coradas pelo método de Gram. (A) Células cultivadas em soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio; (B) Células cultivadas em caldo MRS; (C) Células cultivadas em leite integral; (D) Células diretamente originadas de leite em pó probiótico. As células foram cultivadas em soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio; tratadas a 50°C por 30 min, adicionadas ao leite e submetidas à desidratação em *Spray dryer*; (E) Células originadas do soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio e cultivadas em caldo MRS; (F) Células originadas do leite em pó e cultivadas em soro de queijo Minas Frescal adicionado de citrato de sódio.

4.6 – Decisão sobre o registro de patente

A Comissão Permanente de Propriedade Intelectual (CCPI), da UFV recomenda que para a solicitação de registro de patente, inicialmente, seja feita uma busca por meio de carta endereçada à presidente da entidade, cujo objetivo é verificar o estado da técnica sobre a existência de produto ou processo. A etapa seguinte é a elaboração do relatório descritivo, resumos e/ou desenhos do(s) processo(s) descrevendo-se o produto ou processo desenvolvido e que se quer proteger. Posteriormente realiza-se o depósito de patente propriamente dito, junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

A publicação do depósito de patente é feita pelo INPI na sua revista de patentes (RPI) semanalmente. No Brasil o tempo médio para o exame técnico e publicação após o encaminhamento é de 18 meses e a duração da patente é de até 20 anos.

Iniciando-se pela busca no banco de patentes nos endereços eletrônicos <http://www.inpi.gov.br/>, do Brasil, <http://patft.uspto.gov/netahtml/searchbool.html>, dos Estados Unidos e http://ep.espacenet.com/search_97cgi/s97cgi.exe?Action=FormGen&Template=ep/en/quick.hts, da União Européia e <http://www19.ipdl.jpo.go.jp/PA1/cgi-bin/PA1INIT?1057171878423>, do Japão, disponíveis no site da CPPI, utilizando-se as palavras-chave “*L. delbrueckii* UFV H2b20, probióticos, processos para produção de concentrado de células, de probióticos e células inativadas” individualmente e com todas as combinações possíveis, o resultado foi: negativo para *L. delbrueckii* UFV H2b20 e para leite em pó probiótico em todos os endereços pesquisados. Nenhum registro foi encontrado para processo de produção de concentrado de células semelhante ao desenvolvido para o *L. delbrueckii* UFV H2b20. Para a palavra probiótico, foram encontrados 7 registros no Brasil e apenas 1 relacionado a processos de produção, o qual se baseia em um alimento contendo microrganismos probióticos inseridos em uma matriz gelatinizada a base de cereais. Os resultados encontrados na busca para “células inativadas” totalizaram 280 registros internacionais, embora nenhum estivesse relacionado à adição de lactobacilos a produtos lácteos para administração oral.

Caberia o registro de patente de invenção dos processos estabelecidos para a produção do concentrado de células e de produtos probióticos contendo *L. delbrueckii* UFV H2b20, considerando apenas a inexistência de patentes. O custo de manutenção de patente é mostrado no Quadro 8. O valor atribuído aos últimos 4 anos de depósito no banco de patentes é de 43,00 reais mensais.

Quadro 8 – Custo atual de solicitação e manutenção de patente

ETAPA	VALOR (R\$)
Solicitação de busca	25,00
Acesso ao assunto relacionado	5,00/assunto
Depósito da patente nacional	55,00
*Exame técnico (até 10 reivindicações)	160,00
Expedição da carta patente	40,00
Anuidade da solicitação	80,00
Anuidade de patente do 3º ao 6º ano	200,00
Anuidade de patente do 7º ano ao 10º ano	315,00
Anuidade de patente do 11º ao 15º ano	425,00
Anuidade de patente do 16º ao 20º ano	520,00

Fonte: INPI (2004).

* A partir da 11ª reivindicação uma taxa de 7,00 é acrescida para cada solicitação.

O custo de solicitação da patente internacional é equivalente a 305,00 reais e deve ser elaborada após o exame técnico da patente no Brasil, ou seja, após o período médio de 18 meses. Os valores dependem da variação do dólar e o custo é bem superior aos valores praticados no Brasil.

Considerando-se a incerteza do retorno do investimento para o registro de patente, as alternativas ao depósito da patente para proteger a invenção podem ser pela negociação direta da tecnologia com a indústria e venda com “royalties” para a UFV ou a manutenção do sigilo para uso posterior.

Nos 20 anos de pesquisas realizadas com o *L. delbrueckii* UFV H2b20, os recursos públicos investidos permitiram a formação de recursos humanos na área de microbiologia e de tecnologia de alimentos. O retorno social pode ser ainda maior considerando os benefícios que o *L. delbrueckii* UFV H2b20 pode trazer pela difusão da tecnologia.

Os processos desenvolvidos com o *L. delbrueckii* UFV H2b20 são tecnicamente viáveis, certamente, devem ser transferidos para o setor produtivo. Os processos desenvolvidos contêm etapas diferenciadas como a estabilização das proteínas do soro de queijo e o choque térmico na produção de leite em pó probiótico. A própria utilização de células inativadas é um procedimento inovador.

5 – RESUMO E CONCLUSÕES

Os estudos realizados com *L. delbrueckii* UFV H2b20, a partir de seu isolamento, demonstraram o seu potencial para ser utilizado em produtos probióticos.

O desenvolvimento da rota tecnológica viável para a produção de células e de produtos probióticos foi definido a partir da elaboração de fluxogramas, levando-se em conta os resultados de estudos anteriores sobre processos de propagação, concentração e separação de células, produção de produtos probióticos e de processo alternativo, até o produto final contendo células viáveis ou inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

O estudo da viabilidade tecnológica mostrou que os sistemas ajustados dentro da realidade das indústrias de laticínios e de produção de células, as quais já dispõem da maioria dos equipamentos e tecnologia necessários para a fabricação dos produtos, podem ser implantados por grandes e pequenas indústrias.

Os processos desenvolvidos foram testados em escala piloto. Para a produção do concentrado de células, o soro de queijo Minas Frescal foi utilizado como meio de cultivo em razão de sua disponibilidade, baixo custo, condições para suportar a produção de grande massa celular e pela facilidade de separar as células após o crescimento. A adição de sais estabilizantes ao soro de queijo Minas Frescal permitiu submetê-lo à temperatura de esterilização a 121°C por 15 min ou a 140°C por 6 segundos, mantendo-se as

proteínas em suspensão. No soro de queijo adicionado de citrato de sódio nas concentrações entre 0,05 e 0,10% (p/v), foi possível obter de número de células viáveis acima de 10^9 UFC/mL. O pH no soro de queijo estabilizado com citrato de sódio foi mantido próximo da faixa ótima para o início do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e a variação foi menor quando comparado ao soro de queijo estabilizado com fosfato de potássio ou bicarbonato de sódio.

Os produtos probióticos selecionados para carrear o *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram leite pasteurizado, leite UHT e leite em pó para células inativadas e, leite fermentado, leite em pó e sorvete para células viáveis. Os resultados do teste em escala piloto mostraram que, com exceção do leite UHT, todos os produtos podem ser produzidos em escala de indústria.

A sobrevivência das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 assegura número de células viáveis suficiente para atender à legislação para produtos probióticos por no mínimo 90 dias no sorvete e no leite em pó estocados a -20°C , pelo menos 45 dias no leite fermentado a 5°C e 60 dias no leite em pó estocado à temperatura ambiente.

O leite fermentado pelo *L. delbrueckii* UFV H2b20 poderá ser mantido a 5°C por até 30 dias, período em que o pH permaneceu entre 4,0 a 4,5. Após 30 dias houve redução do valor do pH para aproximadamente 3,7. O número de células viáveis reduziu de 10^8 UFC/g a 10^7 UFC/g no produto estocado durante 45 dias a 5°C , mantendo-se acima dos níveis estabelecidos pela legislação.

No sorvete probiótico o número de células viáveis variou de $1,1 \times 10^8$ a $3,1 \times 10^8$ UFC/mL no produto estocado durante 45 dias. Após 60 dias houve uma redução de aproximadamente um ciclo log e o número de células manteve-se estável variando de $3,5 \times 10^7$ a $4,1 \times 10^7$, pelo menos até 90 dias.

Na produção de leite em pó contendo células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi possível obter número de células viáveis acima de 10^8 UFC/g do produto após adaptação do microrganismo a 50°C durante 30 min para induzir a resposta a condições de estresse, o que aumentou a sobrevivência durante a secagem por *spray dryer*. O congelamento do leite em pó logo após o *spray drying* é uma estratégia para aumentar a validade do leite em pó probiótico.

A adição de células inativadas no leite pasteurizado não causou alterações no pH e na acidez do produto.

No leite UHT contendo células inativadas, o desenvolvimento de proteólise causou alterações após 30 dias tornando-o comercialmente inviável. A adição de células inativadas no leite em pó permite a produção do probiótico em qualquer indústria que possua o sistema de secagem por *spray dryer*, sem a necessidade de eliminar células viáveis da linha de produção, o que permite alternar a produção para a fabricação de leite em pó comum.

A observação microscópica do *L. delbrueckii* UFV H2b20 revelou que a sua morfologia é constantemente alterada de acordo com o meio. Um estudo minucioso da fisiologia do microrganismo já está sendo realizado e poderá revelar se estas alterações são influenciadas por fatores de resistência e sobrevivência da célula.

De posse dos resultados foi realizada análise tecnológica e busca nos registros de patentes. Foi constatado que há três pontos que se constituem em inovação tecnológica e que cabe solicitar a patente do processo de produção do concentrado de células e de produtos probióticos contendo células viáveis ou inativadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Outra alternativa para proteger e promover o retorno social do investimento público é através da negociação, diretamente com indústrias, da transferência da tecnologia com pagamento de “royalties” à UFV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R., MARTEAU, P. On the safety of lactic acid bacteria from food. **International Journal of Food b.** v. 27, p. 263-264, 1995.

AGOSTINHO, S.M.M. **Comportamento do *L.acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** Viçosa, UFV, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

AGROLINE. Disponível em <http://www.agroline.com.br/agronoticias>. Acesso em abril de 2004.

ALFENAS, R. C. G. **Efeito da temperatura no crescimento e determinação dos parâmetros de resistência ao calor de psicotrófico acidificante isolado do leite.** Viçosa, UFV, 1994. 55p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 1994.

ARBUCKLE, W. S. **Ice Cream.** v. 3, 517 p. Westport, 1977.

BATISTA, M. T. ***Lactobacillus* em culturas mistas para formulação de probiótico.** Viçosa: UFV, 1997. 43p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

BOUMBA, V. A., VOUTSINAS L.P., PHILIPOPOULOS, C. D. Composition and nutritional value of commercial dried whey products from feta cheese manufacture. **International Journal of Dairy Technology.** v. 54, p. 141, 2001.

BUARQUE, C. **Avaliação econômica de projetos.** 13. ed. Rio de Janeiro, Campus, 1984. 266 p.

BVQI – Disponível em <http://www.bvqi.com.br/bvqi/download/Gestao%20Processos.pdf>. Acesso em dezembro de 2004.

COPAM – Comissão de Política Ambiental. Deliberação Normativa 04/81. Artigo 5º, item 1, lei nº 7.772 de 08 de setembro de 1980.

CPPI – Comissão Permanente de Propriedade Intelectual. Disponível em <http://www.cppei.ufv.br/>. Acesso em novembro de 2004.

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, p. 245-253, 2002.

DAMODARAN, S., PARAF, A. Food proteins and their applications. v.1, 981p. New York, 1997.

DESMOND, C., STANTON, C., FITZGERALD, G. F., COLLINS, K., ROSS, R.P. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, v.12, p. 183-190, 2002.

EARLY, R. **The technology of dairy products**. v. 2, 446 p. London, 1998.

FAEP – Federação da Agricultura do Estado do Paraná: 2004. Disponível em: <http://www2.caep.com.br>. Acesso em setembro de 2004.

FASOLI, S., MARZOTTO, M., RIZZOTI, L., ROSSI, F., DELLAGLIO, F., TORRIANI, S. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 82, p. 59-70, 2003.

FIGUEIREDO, H. M. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo e sua estabilidade em leite em pó e leite fluido**. Viçosa: UFV, 1997. 78p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, UFV, 1997.

FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D.C. Food Microbiology. v. 4, p. 99-120, Singapore, 1988.

FURTADO, M. M., NETO, J. P. M. L. **Tecnologia de Queijos – Manual Técnico Para a Produção Industrial de Queijos**. 118 p. São Paulo, 1994.

FURTADO, W. C. A., **Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20**. Viçosa, UFV. 35p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

GUARNER, F., SHAAFSMA, G. J., Probiotics. **International Journal Food Microbiology**. v. 39, p. 237-238, 1998.

GOMES, C. P. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa: UFV, 1996. 114p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1996.

GONZALEZ-MARTÍNEZ, C., BECERRA, M., CHÁFER, M., A. ALBORS, A., CAROT, J. M., CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. **Trends in Food Science & Technology**. v. 13, p. 334-340, 2002.

HAAL, W. C., HEDRICH, T. I. **Drying of Milk and Milk Products**. v. 2, 338 p. Westport, 1975.

HOMEM, G. R., **Avaliação Técnico-Econômico e Análise Locacional de Unidade de Beneficiamento de soro de queijo em Minas Gerais**. Viçosa, UFV. 61p. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

HUIS IN'T VELD, J.H.J, HAVENAAR, R., MARTEAU, P. Establishing a Scientific Basis for probiotics R&D. **Tibtech**, v.12, p.6-8, 1994.

HULL, M. E., Studies on Milk Proteins. Colorimetric Determination of the Partial Hydrolysis of the Proteins in Milk. **Journal Dairy Science**. v. 11, p. 881-854, 1945.

IDF – **INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION**. 26A. Dried Milk and Ice cream. Determination of Water Content Brussels, 1993.

ICMS – **The International Commission on Microbiological Specifications For Foods** – Microbial Ecology of Foods. v. 2, p. 513-520. New York, 1980.

INPI – **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**. Disponível em <http://www.inpi.gov.br/>. Acesso em novembro de 2004.

KRASAEOOPT, W., BHANDARI, B., DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yogurt. **International Dairy Journal**, v.13, p.3-13, 2003.

KANDLER, O., WEISS, N. **Lactobacillus**. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N . S., SHARPE, M. E., HOLT, J. G. (Editores), Berguey's Manual of Systematic Bacteriology. v. 2, p.1208-1234, 1986.

MAJAMAA, H., ISOLAURI, E., SAXELIN, M., VESIKARI, T. Lactic acid bacteria In the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 20, p. 333-338, 1995.

MARTIN, A. F., Armazenamento de iogurte comercial e o efeito na proporção de bactérias lácticas. Piracicaba,2002. 50p. **Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Universidade de São Paulo, 2002.

MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLARINEM, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., SAARELA, M. Technological challenges for future probiotics Foods. **International Dairy Journal**, v.12. p.173-182, 2001.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa: UFV, 1999. 59p. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

NEUMANN, E., OLIVEIRA, M.A., CABRAL, C.M., MOURA, L.N., NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., CARA, D.C., PODOPRIGORA, G.I., VIEIRA, L.Q., Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **J. Med. Res.** 31, p.1565-1573, 1998.

NEVES, J.M.T. **Características Moleculares e Identificação de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. Viçosa: UFV, 2003. 59p. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

Nova Legislação de Produtos Lácteos. **Revista Indústria de Laticínios**. p. 171-207. São Paulo, 2002.

PAOLUCCI, A.A.P. **Formulação de meio de cultura à base de soro de Queijo para produção de *Lactococcus lactis ssp.lactis***. Viçosa: UFV, 1991. 59p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.

PASSOS, L. M. L. **Produção de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 em soro de queijo ultrafiltrado e suplementado**. Viçosa: UFV, 1997. 48p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiology**. v. 1. 566 p.1980.

PEPPLER, H. J., PERLMAN, D. Microbial Technology Microbial Process, **Academic Press**, New York, 1979. p. 59-92.

PEREIRA, D. D. C., SILVA, P. H. F., JÚNIOR, L. C. G. C., OLIVEIRA, L. L. Físico-química de Leite e Derivados - Métodos Analíticos. v. 2. 243 p. Juiz de Fora, 2001.

PINTADO, M.E., MACEDO, A. C., MALCATA, F. X. Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. **Food Science & Technology International**. v. 7, p.105-116, 2002.

PINTO, C. L. O. **Bactérias psicotróficas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção do leite UHT**. Viçosa: UFV, 2004. Dissertação (Doutorado em Microbiologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.

RIBEIRO, M.A. **Aspectos da Produção de Produção de Peróxido de Hidrogênio e Inibição de Bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20**. Viçosa, UFV. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

SABIONI, J.G., Contribuição da atividade lipolítica e proteolítica na formação de flavor em queijos e no desenvolvimento de produtos aromáticos de origem láctea. Informativo da Escola de Nutrição. Universidade Federal de Ouro Preto, Disponível em: <http://www.nutline.enut.ufop.br/artigos/artigo13/artigo13.html>. Acesso em janeiro de 2005.

SANDERS, M. E., Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic acid cultures: significance to fluid milk products containing cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 17, p.1819 -1828. July, 1993.

SANTOS, N.S. **Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, UFV, 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1984.

SAXELIN, M., GRENOV, B., SVENSSON, U., FONDÉN, R., RENIERO, R., SULLIVAN, A. NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.20, p.313-319, 1999.

SCOPES, R. **Protein purification principles and practice**. v. 2, New York: Springer Verlag, 392 p.

SIITONEM, S., VAPAATALO, H., SALMINEM, S., GORDIN, A., SAXELIN, M., WILKBERG, R., KIRKKOLA, A. L. Effect of Lactobacillus GG yogurt in Prevention of antibiotic associated diarrhea. **Annals of Medicine**. v. 22. p.57-59, February, 1990.

SILVA, P. H. F., ALMEIDA, M. C. F., Estabilidade térmica do leite. Disponível em <http://www.atruius.com.br/download/Estab.%20t%E9rmica%20-%20artigo.doc>. Acesso em janeiro de 2005.

TETRA PAK PROCESSING SYSTEM AB. **Dairy Process**. 442 p, S-221 86, Sweden, 1995.

TETRA PAK PROCESSING SYSTEM AB. **Dairy Systems**. Manual de esterilizadores UHT. 91 p. 1997.

THIELMANN, C. **Avaliação das características da qualidade e prazo de validade de leite tipo "A"**. Viçosa, UFV, 1995. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1995.

UETANABARO, A.P.T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. Viçosa, UFV. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

VARNAM, A. H., SUTHERLAND P. J. Milk and Milk Products. **Technology, Chemistry and Microbiology**. v., p. 346-380. London, 1996.

VINDEROLA, C. G., BAILO, N., REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic Microflora in Argentinian yogurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v.33, p. 97-102, 1999.

VOET, D., VOET, J. G. **Biochemistry**. v. 2. New York, 1995. 1361 p.

ZUÑIGA, A. D. G. **Proteínas do soro de leite: Tecnologias aplicadas ao seu processamento e propriedades funcionais e nutricionais**. Viçosa, UFV. 78p. Dissertação (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Viçosa, 2001.