

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

CAMILA SAMPAIO BEZERRA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE FERMENTO LÁTICO ENDÓGENO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO
DE COALHO COM CARACTERÍSTICAS DO SERTÃO ALAGOANO**

Maceió
2013

CAMILA SAMPAIO BEZERRA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE FERMENTO LÁTICO ENDÓGENO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO
DE COALHO COM CARACTERÍSTICAS DO SERTÃO ALAGOANO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Delgado Silva

Maceió

2013



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALAGOAS



PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA
QUALIFICAÇÃO

**PRODUÇÃO DE FERMENTO LÁTICO ENDÓGENO PARA PRODUÇÃO DE QUEIJO
DE COALHO COM CARACTERÍSTICAS DO SERTÃO ALAGOANO.**

por

CAMILA SAMPAIO BEZERRA DA SILVA

A Banca Examinadora, reunida no dia 25 do mês de novembro do ano de 2013,
considera o candidato: _____

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Escola de Enfermagem e Farmácia/Faculdade de Nutrição
Universidade Federal de Alagoas
(Orientador)

Profa. Dra. Camila Braga Dornelas
Escola de Enfermagem e Farmácia
Universidade Federal de Alagoas
(Examinador)

Profa. Dra. Ângela Froehlich
Instituto Federal de Alagoas/ Campus Satuba
(Examinador)

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S586p Silva, Camila Sampaio Bezerra da.
Produção de fermento láctico endógeno para produção de queijo de coalho com característica do sertão alagoano / Camila Sampaio Bezerra da Silva. – 2013.
70 f. : il.

Orientador: Irinaldo Diniz Basílio Júnior.
Coorientadora: Maria Cristina Delgado Silva.
Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 65-67.
Anexos: f. 68-70.

1. Bactérias lácticas – Imobilização. 2. *L. paracasei*. 3. *L. plantarum*. 4. Liofilização. 5. Spray-drying. .Queijo artesanal – Produção. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista, sem Ele nada seria possível.

A minha família, pelo apoio de todos, bem como, pela paciência e compreensão por minha ausência em alguns momentos.

Ao meu marido pela compreensão e apoio durante todo tempo. Por todo carinho e amor. Pelo companheirismo, pois em muitos momentos, não seria possível sem sua presença.

Ao meu orientador, professor Irinaldo Diniz Basílio Júnior pela confiança, disponibilidade, dedicação e suporte.

A minha co-orientadora, professora Maria Cristina Delgado Silva, pela confiança na realização deste trabalho, por toda disponibilidade, preocupação e dedicação e amizade.

Ao professor Dr. Carlos Jacinto pelo apoio na realização da Microscopia Eletrônica de Varredura.

As professoras Dra. Camila Dornelas e Dra. Ângela Froehlich por aceitarem participar da banca de qualificação e defesa, pela análise e intervenções que vem a contribuir na melhoria deste trabalho.

A todos os estagiários, bolsista e técnico do Laboratório do Controle de Qualidade de Alimentos (LCQA), que contribuíram de todas as formas, em especial a Juliana, pelo acolhimento, ensinamento, incentivo e amizade.

Ao Danilo pelo auxílio de suporte na utilização do spray-dryer e a Adélia pela contribuição na execução das atividades do laboratório.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram que seria possível concluir mais esta etapa da minha vida.

Muito obrigada!

RESUMO

A imobilização de bactérias lácticas (BAL) isoladas do queijo de coalho é uma alternativa para preservar e utilizar essas culturas como fermentos lácticos, principalmente pela grande aceitação do consumidor pelo queijo de coalho produzido a partir de leite cru, logo a utilização de BAL endógenas secas é um método para a obtenção de um produto sensorialmente aceitável e nos padrões higiênico-sanitários. A conservação destes micro-organismos pelas técnicas de liofilização e spray-drying tem sido bastante estudada e aprimorada, sendo a técnica de liofilização mais difundida comercialmente, porém a segunda tem sido vista como uma alternativa de imobilização. Com isto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das técnicas de secagem, spray-drying e liofilização, na viabilidade das BAL, *L. paracasei* e *L. plantarum*, isoladas do queijo de coalho do sertão alagoano. Para o preparo das culturas, as linhagens foram ativadas em caldo MRS (Man, Rogosa & Sharpe) e cultivadas para um aumento de massa celular. Para a obtenção do sedimento de células, o caldo foi centrifugado, descartando o sobrenadante e a biomassa ressuspensa em leite desnatado reconstituído (LDR) a 20%, para liofilização, e em LDR a 20% + 0,5 % de extrato de levedura, seguindo de fermentação, para o spray-drying. A solução submetida ao processo de secagem por spray-drying, teve seu pH previamente corrigido para ser submetida ao processo. A sobrevivência das BAL foi verificada pela contagem do número de células viáveis em unidades formadoras de colônia por mL e por grama antes e após a secagem, respectivamente, bem como na determinação do período de estocagem. As partículas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e avaliadas quanto sua capacidade de reidratação. As duas técnicas foram eficientes quanto à viabilidade após secagem e a manutenção das culturas em pó durante o período de estocagem. Na liofilização, a taxa de viabilidade obtida das linhagens foi mais expressiva, contudo, a técnica de secagem por spray-drying apresenta rapidez significativa na execução do processo em relação à liofilização. As partículas do spray-drying apresentam-se com formato arredondado com concavidades e sem rachaduras, na liofilização as partículas são de formatos irregulares, na forma de placas de elevada dimensão. Em ambas as técnicas, apresentaram-se com facilidade de reidratação. Ao avaliar as técnicas de secagem deve-se levar em consideração que a taxa de viabilidade é dependente também de cada cultura, bem como, o meio de cultivo, tipos de células, estado fisiológico e o processo utilizado. Cada cultura analisada é específica, e o estudo de imobilização deve ser tratado individualmente para obter a melhor taxa de sobrevivência.

Palavras-chave: Imobilização. *L. paracasei*. *L. plantarum*. Liofilização. Spray-drying.

GENERAL

Immobilization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from cheese curd is an alternative to preserve and use these cultures as lactic ferments, especially for large consumer acceptance of the curd cheese produced from raw milk, then the use of endogenous BAL dry is a method for obtaining a product sensorially acceptable and sanitary-hygienic standards. The conservation of these micro-organisms by lyophilization techniques and spray-drying has been studied and improved, and the freeze-drying technique most widespread commercially, but the second has been seen as an alternative. With this, the objective of this study was to evaluate the influence of the techniques of drying, spray-drying and freeze-drying on viability of BAL, *L. paracasei* and *L. plantarum* isolated from artisan cheeses. For the preparation of the cultures, the strains were activated in MRS broth (Man, Rogosa & Sharpe) and cultured for an increase in cell mass. To obtain a cell pellet, the broth was centrifuged and the biomass resuspended in reconstituted skim milk (LDR) 20% to lyophilization, and LDR 20% + 0.5% yeast extract, following fermentation for spray-drying. The solution subjected to the drying process by spray-drying, had its pH adjusted prior to being subjected to the process. The survival of the BAL was determined by counting the number of viable cells in colony forming units per mL and per gram before and after drying, respectively, as well as determining the storage period. The particles were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and evaluated their rehydration. Both techniques were effective for viability after drying and maintenance. Both techniques were effective in viability after drying and maintenance powder during storage. The lyophilization best values of the rate of viability of the strains were obtained, however, the drying technique has rapidly spray-drying process execution significant in relation to lyophilization. The particles of spray-drying are shown with rounded shape with no cracks and concavities, in the lyophilization particles are of irregular formats, in the form of higher dimension plates. In both techniques, showed-up with ease of rehydration. When evaluating drying techniques, it should be borne in mind that the viability rates also dependent from each culture, and the culture medium, cell, types, physiological state and the process used. Each specific culture is analyzed, and the study of immobilization should be treated individually for the best survival rate.

Keywords: Immobilization. *L. paracasei*. *L. plantarum*. Freeze-drying. Spray-drying.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de fases da água (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).....	26
Figura 2 - Esquema de secador spray-dryer (SILVA et al., 2011).....	28
Figura 3 - Avaliação da viabilidade durante a estocagem de <i>L. paracasei</i> e <i>L. plantarum</i> submetidos à secagem por spray-drying.....	48
Figura 4 - Avaliação da viabilidade durante a estocagem de <i>L. paracasei</i> e <i>L. plantarum</i> submetidos à secagem por liofilização.....	49
Figura 5 - Micrografia obtida por MEV das partículas de <i>L. plantarum</i> submetidas à secagem por spray-drying.....	52
Figura 6 - Micrografia obtida por MEV das partículas de <i>L. paracasei</i> submetidas à secagem por spray-drying.....	52
Figura 7 - Micrografia obtida por MEV das partículas de <i>L. plantarum</i> submetidas à secagem por liofilização.....	53
Figura 8 - Micrografia obtida por MEV das partículas de <i>L. paracasei</i> submetidas à secagem por liofilização.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.	18
Tabela 2 - Lista de parâmetros de secagem por spray-drying em relação às linhagens utilizadas.	33
Tabela 3 - Avaliação da viabilidade de <i>L. paracasei</i> e <i>L. plantarum</i> à secagem por spray-drying.....	46
Tabela 4 - Avaliação da viabilidade de <i>L. paracasei</i> e <i>L. plantarum</i> à secagem por liofilização.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT	Água Peptona Tamponada
BAL	Bactéria Ácido Láctica
B. CEPPA	Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos
FOS	Fruto-oligossacarídeo
GA	Goma Acácia
LDR	Leite Desnatado Reconstituído
LD	Leite Desnatado
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MRS	Meio de cultura Man, Rogosa e Shape
MSG	Glutamato Monossódico
NFSM	No Fat Skim Milk
NSLAB	No Starter Acid Lactic Bacteria
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Queijo de Coalho	16
2.2	Bactérias Lácticas	17
2.2.1	Lactobacillus	19
2.2.2	Culturas starters e culturas adjuntas	20
2.3	Fermento Láctico	22
2.4	Microbiota Láctica de Queijos Artesanais	24
2.5	Técnicas de Secagem de Bactérias Lácticas	25
2.5.1	Processo de liofilização	25
2.5.2	Processo de secagem por spray-drying	27
2.6	Imobilização de Bactérias Lácticas por Liofilização e Spray-drying	28
3	ARTIGO DE RESULTADO	39
3.1	Viabilidade de Bactérias Lácticas após Processo de Secagem por Spray Drying e Liofilização	39
4	INTRODUÇÃO	41
5	MATERIAS E MÉTODOS	42
5.1	Obtenção das Culturas	42
5.2	Preparo das Culturas	43
5.3	Secagem por Liofilização	43
5.4	Secagem por Spray-drying	43

5.5 Determinação do Teor de Umidade do Pó Obtido	44
5.6 Determinação da Viabilidade das Culturas Imobilizadas por Liofilização e Spray-drier	44
5.7 Determinação da Viabilidade das Culturas Imobilizadas por Liofilização e Spray-drying Durante a Estocagem.....	44
5.8 Caracterização da Estrutura do Pó por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	45
5.9 Avaliação da reidratação das culturas após secagem por liofilização e spray-drying.	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1 Viabilidade de <i>L. paracasei</i> e <i>L. plantarum</i> Após Secagem por Liofilização e Spray-drying.	45
6.2 Viabilidade de <i>L. paracasei</i> e do <i>L. plantarum</i> durante o Período de Estocagem	48
6.3 Determinação do teor de umidade do pó	50
6.4 Caracterização da estrutura do pó por MEV	51
6.5 Avaliação da reidratação das culturas após secagem por liofilização e spray-drying.....	53
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	57
APÊNDICE A	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

O queijo de coalho é um produto popular que faz parte da cultura da região nordeste. Apesar de sua importância econômica e grande popularidade na região, a fabricação do queijo não conta com tecnologia apropriada para a garantia de sua qualidade (LIMA et al., 1998). Não existe padronização do seu processo, sendo comum a utilização do leite cru, colocando em risco a saúde do consumidor (CAVALCANTE et al., 2007). A produção é encontrada, em sua maioria, em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias rurais e urbanas (CAVALCANTE et al., 2007). O processo geralmente artesanal e a partir de leite cru, necessita acompanhar a evolução das técnicas (LIMA et al., 1998) e se manter em vigor com as legislações vigentes, que preconiza a que o queijo de coalho deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 2001).

Vários pesquisadores têm relatado contaminação de queijos de coalho produzidos de forma artesanal na região nordeste (RAMOS, 2009), contudo alguns estudos comprovam a grande aceitação do consumidor pelo queijo de coalho produzido a partir de leite cru e uma rejeição deste produto quando produzido a partir de leite pasteurizado, no que se refere ao sabor, gerando assim, uma grande preocupação de saúde pública (ARAUJO et al., 2009).

No Brasil, é comum o uso de fermentos lácticos em produtos de laticínios industrializados, já que para atenderem a legislação em vigor são produzidos a partir de leite pasteurizado, e devido a uma diminuição da microbiota natural, são adicionados fermentos comerciais, que garantem a qualidade sanitária e o desenvolvimento do *flavor* do produto (BROLAZO, 2003). Porém, essa substituição da microbiota nativa resulta numa perda de características típicas do queijo regional. Preservar estes produtos, que fazem parte da cultura de muitas regiões é uma preocupação do Brasil (BRUNO; CARVALHO, 2009). Com isso, tem-se buscado isolar e selecionar cepas que façam parte da microbiota presente nos queijos artesanais, com o objetivo de se obter culturas lácticas iniciadoras e adjuntas, para elaborar fermentos lácticos, especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente destinado a produção de queijos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004; CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009).

O congelamento é amplamente utilizado na preservação em longo prazo da viabilidade e das propriedades tecnológicas de Bactérias lácticas (BAL) utilizadas pela indústria de alimentos, porém provoca uma perda de viabilidade e de atividade de acidificação das BAL (FONSECA; BEAL; CORRIEU, 2000). Assim, tendo em conta não só a estabilidade das culturas durante o armazenamento, mas também o custo final do processamento, a desidratação tem sido frequentemente vista como uma boa alternativa para preservar as linhagens industriais (ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

A liofilização é considerada um dos mais efetivos métodos de conservação para a maior parte dos micro-organismos, consistindo na remoção de vapor de água diretamente da amostra congelada e continuada secagem sob o vácuo, até obter o material estável (ALCARDE; BASSO, 1997). O processo de secagem por spray-drying é considerado um método alternativo de imobilização de micro-organismos (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006) e alguns autores consideram ser uma técnica promissora para produção de culturas probióticas secas (GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2001; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).

Alguns pesquisadores têm relatado que o processo de liofilização é mais adequado do que a secagem por spray-drying para algumas culturas (JOHNSON; ETZEL, 1995; COSTA et al., 2002). Porém, outros citam que não existe nenhuma diferença entre os métodos em termos de viabilidade das culturas (TEIXEIRA et al., 1995).

Em pesquisa recente realizada no Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos (Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas – LCQA/FANUT/UFAL) foram isoladas e identificadas BAL predominantes do queijo de coalho artesanal produzido a partir de leite cru no sertão de Alagoas e realizado estudo de suas propriedades tecnológicas com a finalidade de desenvolver um fermento láctico obtido por secagem, adequado para preservar as características originais deste produto quando o mesmo for produzido a partir de leite pasteurizado.

Portanto o objetivo deste trabalho é verificar a influência das técnicas de secagem, liofilização e spray-drying, na viabilidade de *L. paracasei* e *L. plantarum*

mantendo as culturas secas viáveis após secagem e durante estocagem, com a proposta posterior de utilizar estes micro-organismos como um fermento láctico desidratado para produção de um queijo de coalho obtido a partir de leite pasteurizado de acordo com os padrões higiênico-sanitários e com *flavor* do queijo de coalho artesanal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijo de Coalho

A produção do queijo de coalho remonta há mais de 150 anos, com a chegada do gado bovino trazido pelos portugueses. Originário do Nordeste do Brasil, seu nome advém do uso do coalho natural na sua fabricação. No nordeste está entre os principais tipos de queijos artesanais comprovadamente incorporados à cultura regional, fazendo parte dos hábitos alimentares da população dessa região, além de ser um produto de alto valor nutritivo e que vem ganhando espaço na região Sudeste (SEBRAE, 2008).

Em função do grande consumo deste queijo, em vários estados do Nordeste já existe uma legislação específica para sua produção. Nacionalmente, já está estabelecida a sua identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverão ser cumpridos, por meio do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (BRASIL, 2001), definindo como um produto obtido por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, sendo obrigatório o uso de leite pasteurizado. Apresenta consistência semidura, elástica, textura compacta, sem olhaduras ou com olhaduras mecânicas. A cor é uniforme, branca amarelada; o sabor é brando, ligeiramente ácido e salgado; o odor, ligeiramente ácido, como o de coalhada fresca e a casca é fina.

Pode ser encontrado na forma de “palito”, um palito espetado na barra de queijo, pronto para ser assado ou frito. É um produto muito consumido pelo nordestino, principalmente frito, no café da manhã é assado na brasa. Constitui-se em importante ingrediente no preparo de pratos típicos da região Nordeste, como baião-de-dois e tapioca (SEBRAE, 2008).

Na maioria das vezes é fabricado de forma artesanal com leite cru, o que lhe confere características sensoriais peculiares e apreciadas pelos consumidores (CARVALHO et al., 2005). Sua tecnologia de fabricação é que define a microbiota predominante dos queijos (BERESFORD; WILLIAMS, 2004), bem como as

características sensoriais do queijo de coalho variam de acordo com o local em que ele é produzido (CARVALHO, 2007).

Há uma grande aceitação do consumidor por este queijo produzido a partir de leite cru e uma rejeição deste produto quando produzido a partir de leite pasteurizado, no que se refere ao sabor, gerando assim, uma preocupação de saúde pública (ARAUJO et al., 2009).

2.2 Bactérias Lácticas

As bactérias lácticas (BAL) são um grupo que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Crescem em condição de anaerobiose, porém como toleram o oxigênio, são então conhecidas como microerófilas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002), assim as BAL são bem pouco afetadas pela presença ou ausência de oxigênio. Possuem capacidade de síntese extremamente limitada, logo são comumente cultivadas em meios complexos contendo peptona, extrato de levedura e outros componentes de matéria animal ou vegetal, suplementados com uma fonte de açúcar (SALOFF- COSTE, 1994).

As BAL pertencem a diversos gêneros, divididos em espécies, subespécies, variedades e linhagens. Essa divisão é feita baseada nas diversas propriedades como forma, temperatura ótima de crescimento, capacidade de fermentar diversos açúcares, necessidades nutricionais, presença de determinadas enzimas, além da informação genética (SALOFF- COSTE, 1994).

De acordo com o produto ou produtos finais da fermentação, as BAL podem ser agrupadas em homofermentativas, resultando como principal produto da fermentação da glicose, o ácido láctico, e as heterofermentativas, produzem além do ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL homofermentativas são capazes de fermentar mais diretamente a glicose em ácido láctico do que as heterofermentativas, já esta última é frequentemente utilizada na indústria de laticínio por sua capacidade de produzir

substâncias aromáticas, pois utiliza a via pentose monofosfato na fermentação da hexose, produzindo aldeído e diacetil, durante a conversão de hexose e pentose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Esses micro-organismos podem ainda ser divididos, de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, em mesofílicos e termofílicos, os quais crescem a uma temperatura ótima de 30 e de 42 °C, respectivamente (FOX et al., 2000).

Originalmente o grupo de bactéria láctica (BAL) incluía 4 gêneros de grande importância em alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Atualmente, as bactérias lácticas são divididas nos seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tretragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004) e ainda, segundo Fox et al. (2000), *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* são os 5 gêneros de BAL mais comumente encontrados em queijos. A tabela 1 apresenta a classificação de algumas BAL quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produto formado de seu metabolismo.

Tabela 1 - Diferenciação quanto à morfologia, temperatura de crescimento e produtos formados pelos gêneros de BAL presentes em queijos.

Gêneros	Morfologia	T _{ótima} de crescimento	Tipo de ác. Láctico formado	Fermentação de açúcar
<i>Lactococcus</i>	Cocos/cadeia	30°C	L(+)	Homo
<i>Streptococcus</i>	Cocos/cadeia	42°C	L(+)	Homo
<i>Enterococcus</i>	Cocos/cadeia	42°C	L(+)	Homo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos/pares	30°C	D(-)	Hetero
<i>Lactobacillus</i>	Bastões/pares	30 E 42°C	D(-),L(+) e DL	Homo e hetero

Fonte: Adaptado de Fox et al. (2000) e Carr, Chill e Maida (2002).

As BAL de diferentes espécies são utilizadas na produção da maioria dos queijos que utilizam leite pasteurizado, com o objetivo principal de produzir ácido láctico e, em alguns casos, compostos aromáticos, principalmente ácido acético,

acetaldeído e diacetil (FOX et al., 2000). O ácido láctico por sua vez, produzido pelas Bactérias lácticas (BAL), tem como funções principais, promover a acidificação do leite, facilitar o processo de expulsão do soro e prevenir o desenvolvimento de bactérias indesejáveis no queijo. As culturas lácticas que iniciam a produção de ácido láctico na produção de queijos são conhecidas como Culturas *Starter* (FOX et al., 2000).

As BAL além de serem bastante conhecidas por sua utilização como cultura *starters* na produção de produtos lácticos, como leites acidificados, queijos, iogurtes e manteiga são também importantes comercialmente no processamento de produtos cárneos, bebidas alcoólicas e vegetais (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

No seu isolamento e manutenção, o uso do meio de cultura ágar MRS ou caldo MRS, sigla originada da formulação desenvolvida pelos pesquisadores Man, Rogosa e Sharpe em 1960, tem sido bastante utilizado devido a sua capacidade de manter adequadamente uma grande variedade de espécies de bactérias lácticas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

2.2.1 Lactobacillus

Lactobacillus é um dos gêneros originais de BAL e várias espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros *Carnobacterium* e *Wissella*. São bactérias extremamente úteis, muitas delas reconhecidas como probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. A morfologia é de bastonetes, imóveis, usualmente regulares e de tamanho variado. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas, com uma temperatura ótima de 30-40° C, sendo que o seu crescimento varia de 15 ou 45 °C entre as espécies (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Foram originalmente classificados por Orla e Jensen como homofermentativos e heterofermentativos, baseado na quantidade de ácido láctico formado durante a fermentação da glicose; e divididos em 3 grupos: Thermobacteria, Streptobacteria e Betabacteria, baseado na temperatura de crescimento e das reações bioquímicas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Apesar desses três grupos, em sua maior parte terem sido substituídos, os nomes ainda são comumente utilizados

e definidos de acordo com a temperatura de crescimento, capacidade de fermentar pentose, capacidade de produzir CO₂ a partir da glicose ou gluconato, produção de ácido láctico, como um dos principais produtos de fermentação, tipo homofermentativo ou heterofermentativo, fermentação da frutose a manitol e hidrólise de arginina (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Segundo Fox et al. (2002), os *Lactobacillus* também podem ser divididos em 3 grupos baseados no produto final de sua fermentação: Termofílicos homofermentativos, Mesofílicos heterofermentativos facultativos e Mesofílicos heterofermentativos.

O primeiro grupo, Termofílicos homofermentativos, utiliza apenas hexoses como fonte de carbono para produção de ácido láctico. O segundo, Mesofílicos heterofermentativos facultativos, utiliza, além das hexoses, outras fontes de carbono, sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, CO₂, H₂O₂ e álcool. Inclui os *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e o *Lactobacillus casei*, os quais que não são comumente encontrados no fermento láctico, porém associados à fermentação secundária. Estes lactobacilos são chamados de NSLAB - *non starter acid lactic bacteria*, geralmente encontrados em fermentos lácticos artesanais (FOX et al., 2000; BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

O terceiro grupo é formado pelos *Lactobacillus* Mesofílicos heterofermentativos que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono. Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus fermentum*, os quais também não são encontrados no fermento láctico (FOX et al., 2000).

2.2.2 Culturas starters e culturas adjuntas

A microbiota associada à maturação dos queijos é muito diversa, porém pode-se convenientemente dividi-las em dois grupos, as culturas iniciadoras conhecidas como culturas *starters* e os micro-organismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas *starters* são responsáveis primeiramente pela produção de ácido durante a elaboração do queijo, e, portanto, devem produzir ácido suficiente para

reduzir rapidamente o pH do leite, ou seja, dependendo da variedade do queijo, como regra básica, atingir $\text{pH} < 5,3$ em 6 horas a $30\text{-}37^\circ\text{C}$. Além disso, também contribuem para o processo de maturação, desde que suas enzimas estejam envolvidas no processo de proteólise, lipólise e na conversão de aminoácidos em compostos flavorizantes. Estas enzimas intracelulares, em muitas culturas iniciadoras, são liberadas devido à autólise, decorrente da perda da viabilidade das culturas, este evento foi reportado inicialmente nos *Lactobacillus* (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas adjuntas podem ser definidas como culturas selecionadas de bactérias lácticas ou de outros micro-organismos relacionados com a maturação do queijo, que são adicionadas juntamente com as culturas *starters* (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al., 1996). Não tem contribuição significativa na produção de ácido (BERESFORD et al., 2001), porém, tem como objetivo principal a melhora das características sensoriais do produto (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al, 1996 ; BERESFORD et al., 2001).

Em muitas variedades de queijo, a ação das culturas adjuntas contribui significativamente para as características específicas dessa variedade (BERESFORD et al., 2001). Podem ser divididas em grupos primários, incluindo: (1) NSLAB - *non starter acid lactic bacteria* - *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (2) Bactérias propiônicas, (3) bolores e (4) bactérias e leveduras que se desenvolvem na superfície dos queijos (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas NSLAB são consideradas dentro das variedades de queijos maturados, a provável população microbiana de proporção mais significativa. Estão presentes tanto em queijos produzidos com leite cru como em leite tratado termicamente (BERESFORD; WILLIAN, 2004), pois apesar de alguns *Lactobacillus* serem inativados pela pasteurização (TUNER; LAWRENCE; Le LIEVRE, 1986), outras linhagens podem sobreviver e se desenvolver posteriormente no queijo durante a maturação (MCSWEENET et al, 1994). Porém a diversidade da população é maior em queijos oriundos de leite cru quando comparados com queijos produzidos com leite pasteurizado (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

De modo geral, a adição de culturas adjuntas resulta em um aumento da atividade da aminopeptidase, que é responsável pela redução do sabor amargo e pelo aumento da concentração de peptídeos de sabor desejável e precursores de sabor (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al., 1996).

2.3 Fermento Láctico

O leite quando ainda no úbere de animais saudáveis é essencialmente estéril. Durante a ordenha e posterior estocagem, o leite fica susceptível a contaminações, sendo a pasteurização, uma das etapas do processamento industrial de queijos, elimina a maior parte das bactérias presentes no leite cru (BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

De acordo com Brasil (1996), o leite utilizado na elaboração de queijo deverá ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, de forma que garanta a inocuidade do produto. Porém, a pasteurização reduz grande parte da microbiota láctica natural do leite, responsáveis pelo desenvolvimento das características sensoriais dos queijos, influenciando desfavoravelmente na qualidade e aceitação do produto (CARVALHO, 2007; GRAPPIN; BEUVIER, 1997), então, procura-se adicionar culturas selecionadas de bactérias lácticas (BAL), para garantir o controle das fermentações e as características de cada produto (ISEPON; OLIVEIRA, 1995).

Os fermentos lácticos são uma preparação microbiana contendo números elevados de células de um ou mais gêneros e espécies de BAL (BERESFORD; WILLIAMS, 2004). São constituídos por culturas iniciadoras e adjuntas (BERESFORD et al., 2001), com a finalidade de promover a acidificação, sendo a sua principal função, além de ser responsável pela formação de sabor e aroma, bem como, a formação de olhaduras nos queijos (FURTADO, 1991).

Os fermentos lácticos mesofílicos são utilizados largamente na fabricação de queijos frescos, de massa crua e de massa semicozida. Para obter o efeito desejado em cada queijo, o fermento poderá ter poder acidificante, aromatizante ou uma mistura dos dois (FURTADO, 1991). Podem ser agrupados de acordo com sua

composição: “B ou L”, “BD ou LD”, “D” e “O” (FURTADO, 1991; FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001).

Os fermentos do tipo “B” ou “L” contém o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*, produtores de ácido, e uma espécie de *Leuconostoc*, cultura produtora de aroma e pouca quantidade de gás (FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001). É muito utilizado na produção de queijo cottage e em queijos duros, nos quais se deseja a produção de pequenas olhaduras (FERREIRA, 2001).

Os do tipo “BD” ou “LD” contém além das mesmas culturas produtoras de ácidos do tipo “B”, as culturas produtoras de aroma, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris* (FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001). Na fabricação do queijo Prato tradicional, é ideal utilizar este fermento, pois provocaria a formação de olhaduras pequenas e regulares (FURTADO, 1991). Ao ser comparado, o fermento do tipo “BD” desenvolve maior quantidade de aroma e gás do que o do tipo “B” (FERREIRA, 2001; HASSAN; FRANK, 2001).

Os fermentos do tipo “D” são compostos pelas mesmas culturas produtoras de ácido dos outros tipos e o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, como produtor de aroma (HASSAN; FRANK, 2001). O fermento do tipo “O” contém apenas as culturas produtoras de ácido, no Brasil, tem sido comumente utilizado na fabricação de queijo Minas, Mozzarella e Saint-Paulin (FURTADO, 1991), queijos que se deseja uma textura compacta e sem olhaduras (FERREIRA, 2001).

No Brasil, é comum o uso de fermentos lácteos em produtos de laticínios industrializados, porém à medida que os fermentos lácteos comerciais são mais difundidos entre os produtores, devido à superioridade e eficiência das linhagens que os compõem, diminuem por outro lado, a diversidade bacteriana, e dificultam o isolamento das linhagens típicas brasileiras, uma vez que, a maioria dos fermentos é desenvolvida por empresas multinacionais (BROLAZO, 2003). Segundo Carvalho (2007), o uso de fermento lácteo comercial promove uma falsa padronização do queijo de coalho, pois não recupera as características sensoriais típicas ocasionadas pelo efeito do tratamento térmico.

2.4 Microbiota Láctica de Queijos Artesanais

Conhecer a composição da microbiota láctica do queijo artesanal e as propriedades tecnológicas das bactérias lácticas (BAL) isoladas é de grande importância quando se busca um fermento adequado para a produção do queijo de coalho produzido a partir de leite pasteurizado, considerando que os queijos artesanais apresentam uma população microbiana típica e diferente, dependente da região de origem do leite e com a sua tecnologia de fabricação (CARVALHO, 2007).

Com isso, tem-se buscado isolar e selecionar linhagens que façam parte da microbiota presente nos queijos artesanais, com o objetivo de se obter culturas lácticas iniciadoras e adjuntas, para elaborar fermentos lácticos, especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente destinado a produção de queijos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004).

No Brasil, queijos artesanais são referências culturais das culinárias regionais e representam, muitas vezes, a principal renda para o pequeno produtor. Por isso, com o intuito de preservar tais características, pesquisadores em diferentes regiões brasileiras, dentre elas, Alagoas, têm isolado bactérias lácticas de leite e queijo de coalho artesanais com o objetivo de selecionar micro-organismos de interesse para a fabricação de produtos lácteos de qualidade (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009).

Carvalho et al. (2005) isolaram 331 micro-organismo de 6 amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza-CE, sendo 270 identificadas como BAL. O gênero *Enterococcus* foi o de maior predominância quando isolados de queijos de coalho artesanal (COGNAN et al., 1997; CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009), bem como os *Streptococcus* (CARVALHO et al., 2005; RAMOS, 2009). A predominância de gêneros de *Enterococcus* e *Streptococcus* nos queijos elaborados com leite cru sugere uma seleção das BAL resistentes ao processo de cozimento da massa, o qual ocorre a elevadas temperaturas (CARVALHO et al., 2005).

Em outro estudo, Carvalho (2007) isolou 643 BAL a partir dos queijos de coalho artesanais produzidos no Ceará, com a prevalência das espécies de

Enterococcus faecium, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

Em três amostras de queijo de coalho artesanal de Feira de Santana/BA, Assis e Teshima (2006) isolaram 16 tipos de bactérias lácticas, com características proteolíticas, produção de aroma e sabor característicos do queijo de coalho.

Ramos (2009) isolou e identificou as bactérias lácticas (BAL) de 3 amostras de queijo de coalho artesanal do sertão alagoano. Dentre os 109 isolados, 87 foram caracterizados como BAL e destas, 43 como produtoras de ácido com características organolépticas aceitáveis para possível produção de fermento láctico, sendo as principais, as culturas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

2.5 Técnicas de Secagem de Bactérias Lácticas

2.5.1 Processo de liofilização

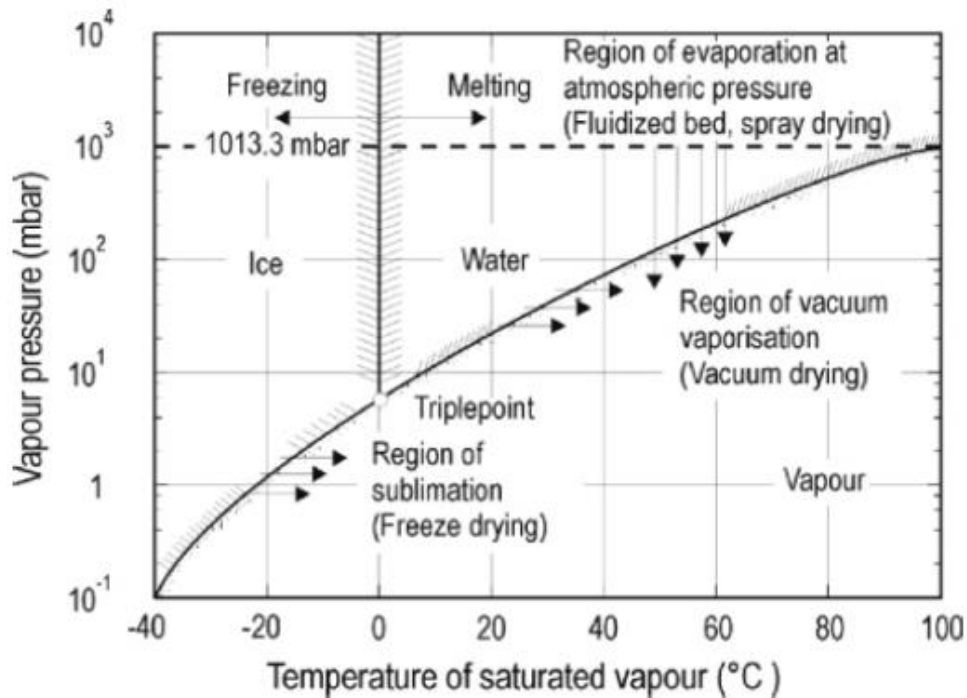
A liofilização é a operação comercialmente mais importante e usada para secar alimentos de alto custo que possuam aroma e textura delicados, como, por exemplo, café, sucos de fruta, ervas e especiarias, etc., pois é obtido um efeito conservante semelhante ao da desidratação com aplicação de calor pela redução da atividade de água, porém sem o aquecimento do alimento (FELLOWS, 2006).

É uma técnica comumente utilizada na obtenção de fermentos lácticos em laticínios e em indústrias de alimentos (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007) para estocagem de longo período, antes da geração do inóculo (FELLOWS, 2006). De acordo com Alcarde e Basso (1997) essa técnica é considerada um dos mais efetivos métodos de conservação para a maior parte dos micro-organismos, onde acontece uma remoção de vapor de água diretamente da amostra congelada e continuada secagem a vácuo, até obter o material estável.

O processo é baseado no princípio de que se a pressão de vapor da água de um alimento é mantida abaixo de 610, 5 Pa (6,105 mbar), a água está congelada. Quando o alimento é aquecido, o gelo sólido sublima diretamente para o vapor sem

se fundir (FELLOWS, 2006), como pode ser demonstrado no diagrama de fases (Figura 1).

Figura 1 - Diagrama de fases da água.



Fonte: Santivarangkna; Kulozik; Foerst, 2007.

Na liofilização, inicialmente o material é congelado em equipamentos de congelamento convencionais. O calor latente de sublimação necessário para promover a sublimação é conduzido ou produzido por micro-ondas. O vapor d'água sai através dos canais formados pelo gelo sublimado e é removido. O processo de desidratação ocorre em dois estágios, o primeiro, por sublimação até um teor de umidade de cerca de 15% e, então, por secagem por meio da evaporação (dessorção) da água não congelada até 2% de umidade (FELLOWS, 2006).

O resultado do produto obtido no processo é um tipo de esponja seca, que pode ser facilmente reduzida a pó (FODA; HAMED; ABD-ALLAH, 1970). Ainda, Segundo Araújo (2011) as cápsulas obtidas pelo processo, comumente, apresentam-se com formas irregulares, diferentemente de outras técnicas.

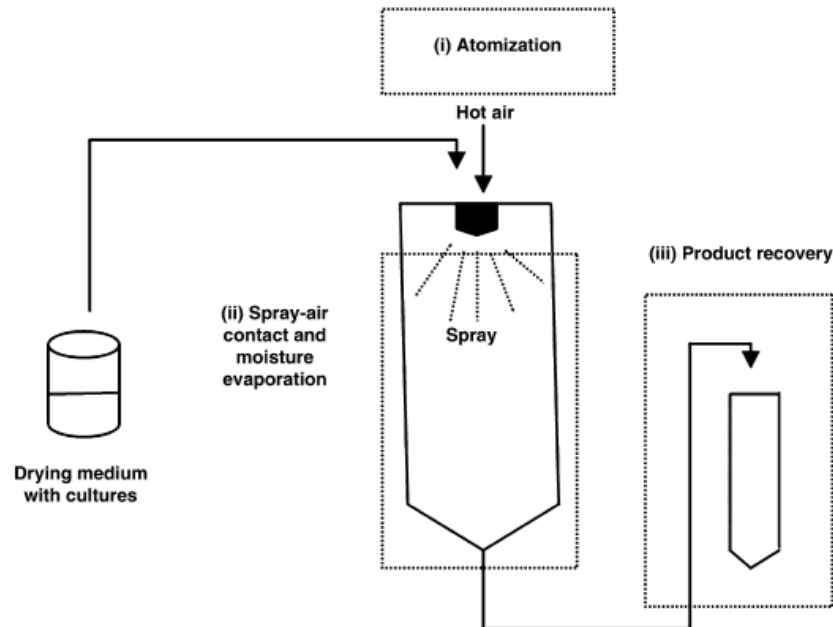
2.5.2 Processo de secagem por spray-drying

O processo de secagem por atomização ou *spray-drying* vem sendo utilizado há décadas em diversos processos industriais para a obtenção de materiais desidratados na forma de pós finos (ALVIM, 2005), essa técnica de microencapsulação é aplicável para materiais ativos termossensíveis devido à rápida evaporação do solvente que compõem as gotículas (RÉ, 1998).

Uma fina suspensão de um alimento inicialmente é atomizada para formar finas gotículas, sendo aspergida dentro de uma corrente de ar quente em paralelo ou contracorrente a altas temperaturas em uma grande câmara de secagem (Figura 2). Quando utilizado o atomizador de bico pressurizado, como neste trabalho, o líquido é submetido a uma alta pressão (700 a 2000 x 10³ Pa) através de uma pequena abertura para formar gotículas de 180 a 250 µm. Por possuir ranhuras em seu interior, o spray formado fica na forma cônica, utilizando todo o volume da câmara de secagem. O processo de secagem é rápido, de 1 a 10 segundos, sendo a temperatura de saída do produto controlada pela adequação da taxa de alimentação, produzindo assim, poucos danos pelo calor à amostra (FELLOWS, 2006).

As principais vantagens desse tipo de equipamento de secagem rápida é a produção contínua em larga escala, baixos custos de mão-de-obra e operação, além de manutenção consideravelmente simples. Contudo possui a limitação de um custo inicial elevado e necessidade de um teor de umidade inicial relativamente alto de alimentação para garantir que o alimento ou outro produto seja bombeado até o atomizador (FELLOWS, 2006). Porém segundo Alvim (2005) quando comparado com a liofilização, o processo é relativamente de baixo custo, além da alta produtividade e rapidez para instalações industriais e aplicabilidade para produtos sensíveis.

Figura 2 - Esquema de secador spray-dryer (SILVA et al., 2011).



Fonte: Silva et al., 2011.

2.6 Imobilização de Bactérias Lácticas por Liofilização e Spray-drying

O congelamento é amplamente utilizado na preservação, em longo prazo, da viabilidade e das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas (BAL) utilizadas pela indústria de alimentos, porém o congelamento provoca uma perda de viabilidade e de atividade de acidificação das BAL (FONSECA; BEAL; CORRIEU, 2000). Assim, tendo em conta não só a estabilidade das culturas durante o armazenamento, mas também o custo final do processamento, a desidratação é frequentemente vista como uma boa alternativa para preservar as linhagens industriais (GARDINER et al.; 2000; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

Dentre as várias aplicações industriais das BAL, uma condição necessária é a manutenção da alta viabilidade durante a imobilização e estocagem, com isso, o principal obstáculo é o desenvolvimento de uma formulação para obtenção de culturas secas que mantenha a viabilidade e atividades iniciais dessas culturas (STRASSER et al., 2009).

O processo de liofilização vem sendo, durante muito tempo, utilizada como o processo principal de obtenção de culturas em pó (ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), porém durante o processo e posterior estocagem ocorre uma ocasional perda da viabilidade celular, na qual a extensão dependerá de alguns fatores, como as propriedades de cada cultura, bem como as condições e fase de crescimento (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007). Bergenholtz et al. (2012) consideram que o rendimento máximo alcançado no processo também é específico de cada cultura e está relacionado por exemplo, pelo meio de cultivo, tipo de célula, estado fisiológico e o processo utilizado.

A liofilização possui a vantagem de não ser um método agressivo, porém é demorado e de alto custo (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), além dos equipamentos, em escala comercial, serem caros e de baixo rendimento de produção (ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

A secagem por spray-drying é considerada um método alternativo de imobilização de micro-organismos, no qual se obtém um alto rendimento em um menor custo operacional (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006). Pode ser uma alternativa de produzir grandes quantidades de culturas probióticas (GRADINER et al., 2000).

Na secagem das culturas por spray-drying, a maior limitação é a perda de viabilidade durante o processo e posterior estocagem devido principalmente à aplicação de elevadas temperaturas (GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2001). Neste processo, os micro-organismos precisam resistir às altas temperaturas utilizadas (GARDINER et al., 2000).

A perda de viabilidade durante a liofilização é atribuída ao choque osmótico e as injúrias na membrana celular, causadas pela formação do gelo intracelular e pela reidratação (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007). A membrana é o primeiro alvo do congelamento e das lesões da dessecação e os danos na mesma possuem um efeito catalítico da morte celular durante a secagem e posterior armazenamento (ANATA; VOLKERT; KNORR, 2005). Prasad, Mcjarrow e Gopal (2003) ao analisarem culturas de *L. rhamnosus* HN001 verificaram que a redução da

viabilidade durante o armazenamento tem sido atribuída aos danos promovidos na membrana pela oxidação e lipólise.

Com o objetivo de melhorar a taxa de sobrevivência, ou seja, reduzir ou prevenir a morte das células bacterianas, crioprotetores, são utilizados, adicionados antes do congelamento. O efeito dos agentes protetores na viabilidade celular está relacionado ao seu efeito na integridade da membrana e a interação com a mesma (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007).

Uma menor viabilidade e integridade da membrana em células de *Lactobacillus reuteri* TMW1 106, liofilizadas, sem agentes protetores foi verificada quando comparadas com a adição individual de 7.5% de sacarose, frutotolosacarídeo (FOS), inulina e leite desnatado (LD) a 5 %, e ainda, que esses protetores obtiveram um efeito similar ou superior ao LD, este é um tipo de agente protetor geralmente utilizado em fermentos lácticos (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007).

De acordo com Gardiner et al. (2000) a secagem por spray-drying de *L. paracasei* e *L. salivarius* em leite desnatado reconstituído (LDR) a 20% foi considerada uma forma de preservação destas culturas. Quando comparadas, o *L. paracasei* mostrou-se mais resistente à secagem e a testes com vários tratamentos térmicos, especificamente a 59°C.

Na ausência de informações relevantes sobre uma bactéria láctica (BAL) específica, é aconselhável utilizar o LDR como o agente protetor de secagem (CARVALHO et al., 2004), sendo selecionado por fatores tais como, prevenir as injúrias na célula por estabilizar os constituintes da membrana celular (CASTRO et al., 1996), possuir proteínas que fornecem uma camada protetora para as células, além de, facilitar a reidratação dos produtos liofilizados por criar uma estrutura porosa (ABADIAS et al., 2001).

Ao liofilizar BAL utilizando grânulos de gel de Ca-alginato e k-carragena como agentes protetores, Denkova; Krastanov e Murgov (2004) observaram que nas linhagens de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei* quando utilizado Ca-alginato, houve um aumento no número de células viáveis, de 2,7 e 2 log, do valor inicial,

respectivamente; utilizando a k-carregena, foi observado uma redução de 0,2 log e um aumento de 1 log , respectivamente.

Ao avaliar duas técnicas de secagem, liofilização e leite fluidizado, e diferentes agentes protetores, carboidratos, na sobrevivência das culturas de *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*, Strasser et al. (2009) verificaram uma maior viabilidade das culturas liofilizadas com os carboidratos trealose e sacarose. A cultura de *L. plantarum* obteve um taxa de viabilidade relativa de 40,1% e 34,1 %, na presença da trealose e sacarose, respectivamente.

Carvalho et al. (2002) liofilizaram linhagens de *L. plantarum* e o *L. rhamnosus* em uma formulação controle de leite desnatado reconstituído (LDR) a 11% e em formulação contendo também, trealose, sorbitol, frutose e glutamato monossódico (MSG). Verificaram que a adição desses compostos influenciou significativamente na viabilidade das culturas durante a estocagem, o que não foi observado durante o processo de liofilização. O MSG foi o agente que apresentou maior efeito protetor durante a estocagem. No período de 4 meses, houve uma redução inferior a 2 log, já com a formulação controle, LDR a 11%, houve uma redução 2 vezes maior.

Quando o agente protetor MSG é utilizado sozinho, observa-se um ótimo resultado na liofilização de células *Candida sake*, o que não se observa quando o MSG é combinado com o LDR (ABADIAS et al., 2001). Os agentes de proteção utilizados durante a secagem de bactérias láctica (BAL) são específicos de cada espécie e devem ser analisados individualmente (CARVALHO et al., 2004; STRASSER et al., 2009; BERGENHOLTZ et al., 2012).

Zamora, Carretero e Parés (2006) avaliaram o efeito das duas técnicas de secagem, liofilização e spray-drying, na viabilidade de BAL isoladas de sangue suíno, utilizando uma solução a 20% de leite desnatado sem gordura (NFMS). Obtiveram 100 % de viabilidade de seis das dez culturas liofilizadas (*L. garviae*, *Ent. raffinosus* e *L. murinus*), mantendo 100% da viabilidade durante os 60 dias de estocagem a 5 °C. Dez das doze culturas secas por spray-drying foram 100% viáveis após a secagem, e mantiveram 80% da viabilidade durante a estocagem.

Alguns estudos reportados sobre a secagem por spray-drying de BAL estão listados na tabela 2 com os principais parâmetros utilizados.

A temperatura de saída do pó, a qual as bactérias lácticas (BAL) ficam submetidas após o processo de secagem é um dos fatores determinantes na sobrevivência das BAL, como já citado em vários estudos (ANATA; VOLKERT; KNORR, 2005; DESMOND et al., 2002; GARDINER et al., 2000). Bergenholtz et al. (2012) citam que a eficiência máxima dos processos utilizado também é específico do tipo de células, seu estado fisiológico e meio de cultivo.

De acordo com Anata, Volkert e Knorr (2005) a sobrevivência do *L. rhamnosus* com goma acácia (GA) submetido à secagem por pulverização é inversamente proporcional a temperatura de saída (70-100°C), corroborando com o estudo de Desmond et al. (2002) quando utilizaram GA (10%) + LDR (10%) como agentes protetores durante a secagem do *L. paracasei* NFBC 338 por spray-drying.

Gardiner et al. (2000) determinou a temperatura de saída que obtivesse uma ótima viabilidade das linhagens de *L. paracasei* e *L. salivarius* durante a secagem por spray-drying. Verificando que a 80-85°C é a temperatura de saída necessária para manter um teor de umidade que não excedesse o nível requerido de 4%, para manter o pó por um longo período de estocagem. Masters (1985) cita que o teor de umidade adequado para o leite em pó desnatado é de 4 %.

Quanto à manutenção na taxa de viabilidade das culturas secas, vários estudos observaram que ao avaliar a manutenção da viabilidade durante a estocagem à temperatura de refrigeração (0-9°C) e em temperaturas mais elevadas (~20 °C), verificaram que uma maior taxa era obtida em temperaturas de refrigeração (DENKOVA; KRASTANOV; MURGOV, 2004; DESMOND et al., 2002; GARDINIER et al., 2000; STRASSER et al., 2009).

Ao se analisar as duas metodologias utilizadas para imobilizar BAL, deve-se levar em consideração a rentabilidade do processo. Segundo Strasser et al. (2009) a taxa de viabilidade, o tempo de duração e consumo de energia são parâmetros que avaliam a rentabilidade do processo industrial de produção de fermentos lácticos.

Tabela 2 - Lista de parâmetros de secagem por spray-drying em relação às linhagens utilizadas.

Cultura	T (°C) saída	T(°C) entrada	Meio de crescimento	Meio de Secagem	Taxa de viabilidade	Referência
<i>L. paracasei</i> NFBC 3338	95-100 100-105	170	MRS	LDR ^a (20% m/v) GA ^b (10% m/v) + LDR (10% m/v)	1,7 % 1,4 % 0,01 % 0,9 %	Demond et al.(2002)
<i>L. paracasei</i> NFBC 3338	85--90 95-100 100-105	170	MRS	LDR (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	49 % 4,3% 0,5%	Demond et al. (2001)
<i>L. paracasei</i> NFBC338	60-65 70-75	170	MRS	LDR (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	11% 97%	Gardiner et al. (2000)
<i>L. salivarius</i> UCC 118	80-85				66%	
<i>L. garviae</i> PS14/ PS22/ S23/ P48/ PS60/ PS95/ PS85/PS86	80-85°	170	MRS	NFSM ^c (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	100%	Zamora, Carretero e Páres (2006)
<i>L. murinus</i> PS87/ PS85					100%	
<i>L. murinus</i> PS86					66,2%	
<i>L. raffinosus</i> PS7					100%	
<i>L. raffinosus</i> PS99					55,6%	
<i>L. reuteri</i> PS77					100%	

^a Leite desnatado reconstituído

^b Goma acácia

^c leite desnatado sem gordura

REFERENCIAS

- ABADIAS, M. et al. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**, v.65, p. 173-182, 2001.
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, set., 1997.
- ALVIM, I. D. **Produção e caracterização de micropartículas obtidas por spray-drying e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes**. 2005. 243 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2005.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.
- ARAÚJO, M. C. G. et al. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de Currais Novos. **Holos**, v.4, n. 25, 2009.
- ARAUJO, A. L. **Microencapsulação do ferro através da técnica de coacervação complexa**. 2011. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ASSIS, M. M. S.; TESHIMA, E. **Determinação da Composição de Culturas Láticas do Fermento para Produção de Queijo Coalho**. Relatório de Iniciação Científica. PROBIC/UEFS, Feira de Santana, p. 39, 2006.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. IN: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**, 3 ed., New York: Maercel Decker, v.1, p. 1-63, 2004.
- BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3 ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, v.1, p. 287-292. 2004.
- BERESFORD, T. P. et al. Recents advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, jul., 2001.
- BERGENHOLTZ, A. S. et al. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. **Cryobiology**, 2012. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário oficial da União, Brasília, 11 de março de 1996. Secção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001**. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 de Junho de 2001. Secção 1.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados**. 2003. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J.D.G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Embrapa Agroindustrial Tropical, documentos, Dez. 2009. ISSN 1677-1915,124. 30 p.

COGAN, T. M. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.

CARVALHO A. S. et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1587-1591, 2002.

CARVALHO, A. S. et al. Relevant factor for preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 835-847, 2004.

CARVALHO, J. D. G. et al. Bactérias ácidas lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ago., 2005.

CARVALHO, J. D. G.. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007, 153 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

CARR, J. C.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Changes in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 99–104, 1996.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 205-214 jan.-mar. 2007.

DENKOVA Z.; KRASTANOV, A.; MURGOV I. Immobilized lactic acid bacteria for application as dairy starters and probiotic preparations. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, p. 107-114, 2004.

DRAKE, M. A.; SWANSON, B. G. Reduced and low-fat cheese technology: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 366-369, 1995.

DRAKE, M. A. et al. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in cheddar cheese. **Food Research International**, v. 29, n. 3-4, p. 381-387, 1996.

DESMOND, C. et al. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 801-808, 2001.

DESMOND, C. et al. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1003-1011, 2002.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. Cadernos didáticos 43, 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 112 p.

FODA, Y. H.; HAMED, M. G. E.; ABD-ALLAH, M. A. Preservation of orange and guava juices by freeze-drying. **Food Technology**, v. 24, n. 12, p. 74-80, 1970.

FONSECA, F.; BEAL C.; CORRIEU G. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starter during freezing and frozen storage. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 83-9, 2000.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Cap. 5. p. 54-97, 2000.

FURTADO, M. M. **A Arte e a Ciência do Queijo**. São Paulo: Globo, 1991.

GARDINIER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* Strains during Heat treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p. 2605-2612, 2000.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2 ed., New York: Marcel Decker, 2001.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência do Emprego de Culturas Lácticas nas Características do Queijo Tipo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 1995.

JOHNSON, J. A. C.; ETZEL, M. R. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 761–768, 1995.

LIMA, M. H. P. et al. Elaboração de queijo coalho a parti de leite pasteurizado e inoculado com *Streptococcus thermophyllus* E *Lactobacillus bulgaricus*: Aspectos bioquímicos e sensoriais. **Boletim do Centro de pesquisa de processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 16, n. 1, p. 37-44, jan./jun.1998.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Science Technology**, v. 9, p. 295–306, 1998.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**. London. v. 21, p. 233-240, 2004.

MASTERS, K. Analytical methods and properties of dried dairy products. In R. Hansen (ed.), Evaporation, membrane filtration and spray drying in milk powder and cheese production. **North European Dairy Journal**. Vanlose, Denmark., p. 393-403, 1985.

McSWEENEY, P. L. H. et al. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v. 33, p. 183-192, 1994.

PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 69, p. 917–925, 2003.

RAMOS, A. C. S. **Caracterização e seleção tecnológica de culturas lácticas isoladas de queijo de coalho do sertão alagoano**. 2009, 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição, Maceió, 2009.

TUNER, K. W.; LAWRENCE, R. C.; Le LIEVRE, J. A microbiological specification for milk for aseptic cheese making. New Zealand. **Journal of Dairy Science and Technology**, v. 21, p. 249–254, 1986.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray-drying. **Drying Technology**, v. 6, n.6, p.1195-1236, 1998.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.;FOERST, P. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-315, 2007.

SCHWAB, C.; VOGEL, R.; GÄNZLE, M. G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.160 during freeze-drying. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-114, 2007.

SEBRAE. **Queijos Nacionais**, Estudo de Mercado SEBRAE/ESPM. Setembro, 2008. Disponível em:<
[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/\\$File/NT0003909A.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/$File/NT0003909A.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela; 2007. 317 p.

SILVA, J. et al. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, n. 3, 2011.

STRASSER, S, et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 167-177, 2009.

SCHUCK, P., DOLIVET, A., HERVÉ, C., JEANTET, R. Spray-drying of dairy bacteria: new opportunities to improve the viability of bacteria powers. **International dairy Journal**, v. 31, p. 12-17, 2013.

TEIXEIRA, P. C. et al. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray drying. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 1025–1031, 1995.

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blond, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 77- 84, 2006.

3 ARTIGO DE RESULTADO

3.1 Viabilidade de Bactérias Láticas após Processo de Secagem por Spray Drying e Liofilização

RESUMO

O desenvolvimento de culturas concentradas e secas tem eliminado muitos problemas na manutenção e preparação de culturas lácticas nas indústrias de laticínio. A liofilização é uma técnica comumente empregada e a técnica de spray-drying tem sido considerado uma alternativa de imobilização. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de técnicas de secagem, spray-drying e liofilização, na viabilidade das bactérias lácticas (BAL), *L. paracasei* e *L. plantarum*, isoladas do queijo de coalho do sertão alagoano. Foi determinada a taxa de viabilidade das culturas após secagem e durante a estocagem de 90 dias e os pós foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Na liofilização a taxa de viabilidade foi mais expressiva após a secagem das duas culturas. Na secagem por spray-drying a viabilidade da linhagem de *L. paracasei* manteve-se estável, mostrando-se mais resistente que o *L. plantarum*, observado que a eficiência do processo de secagem também é dependente da resistência do micro-organismo. As partículas do spray-drying apresentam-se com formato arredondado com concavidades e sem rachaduras, na liofilização as partículas são de formatos irregulares, na forma de placas de elevada dimensão. Em ambas as técnicas, apresentaram-se com facilidade de reidratação. As duas técnicas foram eficientes quanto à viabilidade após secagem e a manutenção das culturas em pó durante o período de estocagem. Na liofilização, foi verificada uma concentração mais expressiva na taxa de viabilidade das linhagens, contudo, à técnica de secagem por spray-drying apresenta rapidez significativa na execução do processo em relação à liofilização.

Palavras-chave: spray-drying, liofilização, imobilização, queijo de coalho, *L. paracasei*, *L. plantarum*.

ABSTRACT

The development of concentrated and dried cultures have eliminated many problems in the maintenance and preparation of lactic cultures in the dairy industry. Freeze drying is a technique commonly employed and the spray-drying technique has been considered as an alternative of immobilization. The aim of this study was to evaluate the influence of drying techniques, spray-drying and freeze-drying on the viability of two strains of lactic acid bacteria (LAB), *L. paracasei* and *L. plantarum* isolated from cheese curd the hinterland of Alagoas. We determined the rate of viability of the cultures after drying and during storage of 90 days. It was observed that drying efficiency is also dependent on the resistance of the microorganism. Lyophilization was obtained in a high rate of viability after drying for two cultures. The particles of spray-drying are shown with rounded shape with no cracks and hollows in the lyophilization particles are of irregular formats, in the form of higher dimension plates. In both techniques, showed-up with ease of rehydration. Both techniques were effective in viability after drying and crop maintenance powder during storage. In lyophilization, the best values were obtained viability of the strains with regard to drying technique by spray-drying. However, this latter presents significant speed in the execution of the process in relation to lyophilization.

Keywords: spray-drying, freeze drying, immobilization, queijo de coalho, *L. paracasei*, *L. plantarum*.

4 INTRODUÇÃO

A utilização de bactérias lácticas (BAL) como culturas iniciadoras na produção de produtos lácticos, como leite acidificado, queijos, iogurtes e manteiga é bastante conhecida, como também são importantes comercialmente no processamento de produtos cárneos, bebidas alcoólicas e vegetais (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL de diferentes espécies são utilizadas na produção da maioria dos queijos que utilizam leite pasteurizado, com o objetivo principal de produzir ácido láctico e, em alguns casos, compostos aromáticos, principalmente ácido acético, acetaldeído e diacetil (FOX et al., 2000).

O desenvolvimento de culturas concentradas tem eliminado muitos problemas envolvidos na preparação e manutenção de culturas iniciadoras nas indústrias de laticínios (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), como um dos principais riscos, a contaminação por bacteriófagos (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007; DESMOND et al., 2001).

Dois métodos de preservação de culturas concentradas podem ser utilizados industrialmente: armazenamento por congelamento ou o armazenamento das culturas desidratadas, na forma de pó (CARVALHO et al., 2004; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). O congelamento é amplamente utilizado na preservação, em longo prazo, da viabilidade e das propriedades tecnológicas das BAL utilizadas pela indústria de alimentos, porém provoca uma perda de viabilidade e de atividade de acidificação (FONSECA; BEAL; CORRIEU, 2000), além dos altos custos de armazenamento e transporte (CARVALHO et al., 2004; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Assim, levando em consideração não só a estabilidade das culturas durante o armazenamento, mas também o custo final do processamento, a desidratação é frequentemente vista como uma boa alternativa para preservar as linhagens industriais (GARDINER et al., 2000), para estocagem de longo período, antes da geração do inóculo (FELLOWS, 2006).

A liofilização é uma técnica comumente utilizada na obtenção de fermentos lácticos em laticínios e em indústria de alimentos (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE,

2007), sendo um dos mais efetivos métodos de conservação para a maior parte dos micro-organismos (ALCARDE; BASSO, 1997), com uma certa quantidade de culturas lácticas comercialmente disponíveis (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). O processo de secagem por spray-drying é considerado um método alternativo de imobilização (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006), alguns autores consideram ser um técnica promissora para produção de culturas probióticas secas (GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2001; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), no qual se obtém uma alta produção com um menor custo operacional (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

Vários estudos reportam a aplicação de diferentes técnicas de secagem na preservação de bactérias lácticas (BAL) (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1996; CARVALHO et al., 2002; COSTA et al., 2002; DEKOVA et al., 2004; SCHWAB; VOGEL; GÄNZLE, 2007). Alguns pesquisadores têm relatado que o processo de liofilização é mais adequado do que a secagem por spray-drying para algumas culturas (JOHNSON; ETZEL, 1995; COSTA et al., 2002). Porém, outros citam que não existe nenhuma diferença entre os métodos em termos de viabilidade das culturas (TEIXEIRA et al., 1995).

Com isto, o objetivo deste estudo foi analisar a influencia das técnicas de liofilização e spray-drying quanto à manutenção da viabilidade de BAL, isoladas do queijo de coalho do sertão alagoano, com a pretensão de produzir um fermento láctico endógeno em pó.

5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Obtenção das Culturas

As BAL *Lactobacillus paracasei sbs. paracasei* e *Lactobacillus plantarum* utilizadas neste trabalho foram obtidas do banco de dados do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas – UFAL. Estas linhagens foram obtidas em pesquisa anteriormente realizada por Ramos (2009) que isolou BAL de amostras de queijos de coalho artesanais produzidos no sertão alagoano – AL.

5.2 Preparo das Culturas

As linhagens estocadas a -18°C foram inicialmente incubadas por 16 horas a 37°C , seguido da ativação pela inoculação de 0,06 mL em 3 mL de caldo MRS (Difco TM) por 16 horas a 37°C (Ramos, 2009). Para um aumento de volume celular, foi inoculado 1% (v/v) das BAL em 300 mL de caldo MRS, incubados por 24 horas na mesma temperatura, para crescimento das culturas na fase estacionária, conforme sugerido por Zamora; Carretero e Pares (2006). O sedimento de células foi obtido por centrifugação do fermentado, utilizando 4000 rpm x 20 minutos a 4°C , e posterior descarte do sobrenadante.

5.3 Secagem por Liofilização

Os sedimentos de células obtidos por centrifugação de cada cultura foram ressuspensos no agente protetor: leite desnatado reconstituído (LDR) (Molico, Nestlé®) a 20% (m/v), esterilizado a $90^{\circ}\text{C}/30$ minutos, como sugerido por Zamora; Carretero e Pares (2006), modificado na substituição do agente protetor Leite Desnatado Sem Gordura (NFSM). Cada formulação foi padronizada a 10 % (m/v) de sedimento de células em LDR a 20%. A formulação foi previamente congelada em refrigerador doméstico (temperatura aproximada de -18°C) por um período de 48-72 horas. Em seguida foi liofilizada em liofilizador de bancada (Modelo LD1500 – Terroni®) conectado a bomba de vácuo (Platinum®) por 21 horas.

5.4 Secagem por Spray-drying

Para ressuspensão das células foi utilizado o agente protetor LDR a 20% suplementado com 0,5% de extrato de levedura, adicionado para auxiliar no crescimento da cultura, e esterilizado a $90^{\circ}\text{C}/30$ minutos (GARDINIER et al., 2000). O sedimento de cada cultura foi inoculado em 400 mL da solução de material de parede e incubado a temperatura a 37°C por um período de 3-4 horas, quando o pH estava aproximadamente em 5,8, a fermentação foi então encerrada para prevenir a coagulação do leite, ajustando então, o pH para 6,8 com NaOH 4N antes da secagem por spray-drying (ZAMORA;CARRETERO;PARES, 2006; GARDINIER et al., 2000).

A secagem foi realizada no equipamento Mini spray-dryer B-290, Buchi®. Foram utilizados os seguintes parâmetros do processo de secagem: Temperatura de entrada do ar 170°C, temperatura de saída 80-85°C e fluxo de entrada da amostra 670 mL/h (GARDINIER et al., 2000; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

5.5 Determinação do Teor de Umidade do Pó Obtido

O teor de umidade foi determinado por infravermelho, em balança analítica com infravermelho (MOISTURE BALANCE MOC-120H – SHIMADZU). Foi utilizada uma amostra do pó superior a 0,5 g.

5.6 Determinação da Viabilidade das Culturas Imobilizadas por Liofilização e Spray-drier

Para avaliação da viabilidade das culturas foram realizadas contagens antes e depois da secagem. Antes da secagem 1 mL da dispersão foi diluída em 9 mL de água peptonada tamponada (APT) e homogeneizada em vortex. Em seguida foram realizadas diluições seriadas para a contagem em placa por profundidade com sobre camada em ágar MRS (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Na determinação da viabilidade depois da secagem 1g de pó foi diluído em 9 ml de APT e homogeneizado em vortex. Em seguida foi incubado a 25°C por 1 h para completa reidratação da cultura, como sugerido por Gardiner et al. (2000) e Zamora; Carretero e Pares (2006), realizando em seguida diluições seriadas e a contagem por profundidade com sobre camada em ágar MRS (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A viabilidade foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) antes da secagem (UFC/mL) e depois da secagem em (UFC/g).

5.7 Determinação da Viabilidade das Culturas Imobilizadas por Liofilização e Spray-drying Durante a Estocagem

Após a secagem pelos dois métodos, as culturas em pó foram armazenadas em placas de petri vedadas com película flexível parafilm, para evitar o acúmulo de umidade e ficaram estocadas sob refrigeração entre 7- 9°C.

A determinação da estabilidade das culturas em pó, obtidas por liofilização e spray-drying, durante a estocagem foi realizada nos tempos 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento, seguindo a mesma metodologia da contagem do pó, descrita anteriormente.

5.8 Caracterização da Estrutura do Pó por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos pós obtidos pela secagem por spray-drying e liofilização das duas culturas objeto de estudo foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. Uma pequena quantidade do pó foi fixado á uma fita adesiva dupla-face, revestido com grafite 40 mA, sob vácuo e analisado no equipamento Hitachi, modelo TM 3000.

5.9 Avaliação da reidratação das culturas após secagem por liofilização e spray-drying.

Os pós obtidos em ambas as técnicas foram avaliados quanto a facilidade de reidratação em leite desnatado reconstituído (LDR) (Molico, Nestlé®) . 1 g do pó foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 9 ml de LDR e homogeneizado em Vortex durante 1 minuto. Após esse período foi avaliado a facilidade de dissolução dos pós, verificado pela ausência de pó nas paredes do tudo de ensaio.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Viabilidade de *L. paracasei* e *L. plantarum* Após Secagem por Liofilização e Spray-drying.

Ao analisar a viabilidade das duas culturas deste estudo, antes e após a secagem por spray-drying (Tabela 3) observa-se uma redução de 0,9 log do *L. paracasei*; no *L. plantarum* foi verificado que a secagem por atomização não exerceu influencia sobre a sua viabilidade.

Tabela 3 - Avaliação da viabilidade de *L. paracasei* e *L. plantarum* à secagem por spray-drying

Cultura	Viabilidade das células a secagem	
	Antes spray-drying	Depois spray-drying
	(log UFC/mL)	(Log UFC/g)
<i>L. paracasei</i>	9,2	8,3
<i>L. plantarum</i>	9,7	9,7

Gardiner et al. (2000) e Desmond et al. (2001) utilizando similar metodologia a utilizada neste estudo, ao secarem por spray-drying linhagens de *L. paracasei* NFBS 338, obtiveram uma redução da viabilidade de aproximadamente 0,2 log e 0,3 log, respectivamente. Estes resultados, quando comparados ao obtido (Tabela 3), demonstram que a espécie de *L. paracasei* foi menos resistente ao processo de secagem. Corroborando com Zamora; Carretero e Páres (2006) ao observarem uma variação da viabilidade de linhagens da mesma espécie de *Lactobacillus* secas por spray-drying.

Na cultura de *L. plantarum*, não houve comprometimento de sua viabilidade, sugerindo que esta cultura é mais resistente ao estresse da secagem. De acordo com Santivarangkna; Kulozik e Foerst (2007) há uma variação considerável na viabilidade de diferentes espécies de culturas secas de BAL. Segundo Bergenholtz et al. (2012) a eficiência máxima do processo utilizado também é específico do tipo de células, seu estado fisiológico e meio de cultivo.

Alguns fatores mostram-se gerais para certas culturas enquanto que, alguns se mostram mais específicos para determinada espécie e, como por exemplo: a morfologia das células, a sensibilidade à desidratação, a tolerância intrínseca das mesmas, bem como, condições individuais próprias utilizadas por diferentes estudos (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).

Ao utilizar temperaturas de saída de 95-105 °C e 100-105 ° C na secagem por spray-drying do *L. paracasei* NFBC 338, Desmond et al. (2002) obtiveram uma redução de 1,3 e 2,3 log da contagem inicial, respectivamente. Corroborando com Teixeira et al. (1995), ao citar que a taxa de sobrevivência ou destruição das

bactérias durante a secagem por spray-drying depende da combinação de tempo e temperatura utilizada, e a resistência do micro-organismo ao calor.

A temperatura de saída do pó, a qual as BAL ficam submetidas após o processo de secagem é um dos fatores determinantes na sobrevivência das mesmas, como já citado em vários estudos (ANATA; VOLKERT; KNORR et al., 2005; DESMOND et al., 2002; GARDINER et al., 2000). Estes resultados sugerem que a temperatura de saída de 80-85°C utilizada neste estudo, influenciou de forma direta na viabilidade das linhagens, porém uma comparação seria limitada, pois diferentes protocolos foram utilizados.

No processo de liofilização (Tabela 5) pode-se verificar que houve uma concentração no número de células viáveis do *L. paracasei* e do *L. plantarum* em 0,1 e 0,8 log, respectivamente, o que demonstra que este método de secagem garantiu a integridade das células durante a secagem.

Tabela 4 - Avaliação da viabilidade de *L. paracasei* e *L. plantarum* à secagem por liofilização.

Cultura	Viabilidade das células a secagem	
	Antes Liofilização	Depois Liofilização
	(log UFC/mL)	(Log UFC/g)
<i>L. paracasei</i>	9,6	9,7
<i>L. plantarum</i>	9,4	10,2

Carvalho et al. (2002) ao liofilizar o *L. plantarum*, utilizando metodologia similar a este estudo, modificando o meio de secagem por leite desnatado reconstituído (LDR) a 11% com a adição de trealose obtiveram um concentração de ~ 1,7 log inferior ao obtido neste estudo.

Os resultados obtidos (tabela 5) assemelham-se ao reportado por Zamora, Carretero e Parés (2006) que obtiveram 100 % de viabilidade de seis das dez culturas liofilizadas (*L. garviae*, *Ent. raffinosus* e *L. murinus*), ao utilizar uma solução a 20% de leite desnatado sem gordura (NFSM), seguindo a metodologia deste estudo.

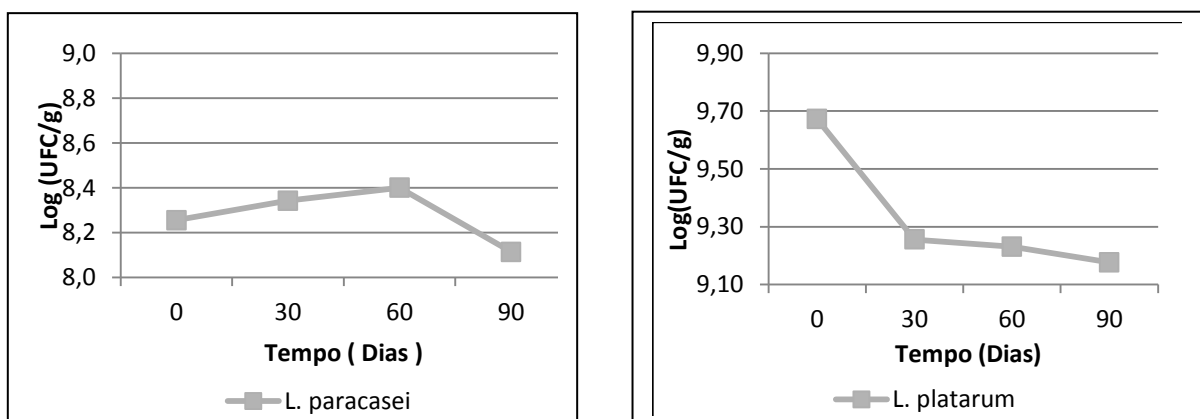
Sugere-se que o leite desnatado reconstituído (LDR) a 20% utilizado como agente protetor foi essencial na proteção das células contra as injúrias durante a secagem das culturas estudadas. Segundo Gardiner et al. (2000) o leite em pó desnatado (LD), da maneira utilizada neste estudo, pode ser utilizado para incorporar micro-organismos probióticos numa vasta gama de alimentos e de produtos farmacêuticos. Ainda, segundo Abadias et al. (2001) o LDR possui proteínas que fornecem uma camada protetora para as células, além de, facilitar a reidratação dos produtos liofilizados por criar uma estrutura porosa.

Embora haja uma perda esperada na viabilidade do pó, a técnica de spray-drying oferece vantagens como ser de baixo custo e de facilidade considerável para ampliação em escala industrial, sendo possível a obtenção de grandes quantidades de produto seco, bem como, a utilização de uma grande variedade de agentes protetores (RÉ, 1998). Já em relação à liofilização, a mesma representa atualmente o método mais empregado na preservação de micro-organismos, visto que, as culturas de bactérias lácticas comerciais são liofilizadas para manter sua viabilidade e atividade (CARDONA et al., 2002). No entanto, a liofilização apesar de muito eficaz, é um processo de custo elevado e sua escala de produção é relativamente baixa.

6.2 Viabilidade de *L. paracasei* e do *L. plantarum* durante o Período de Estocagem

A viabilidade do *L. paracasei* e do *L. plantarum*, submetidos à secagem por spray-drying, durante o período de estocagem de 1, 30, 60 e 90 dias pode ser verificado na figura 3.

Figura 3 - Avaliação da viabilidade durante a estocagem de *L. paracasei* e *L. plantarum* submetidos à secagem por spray-drying.

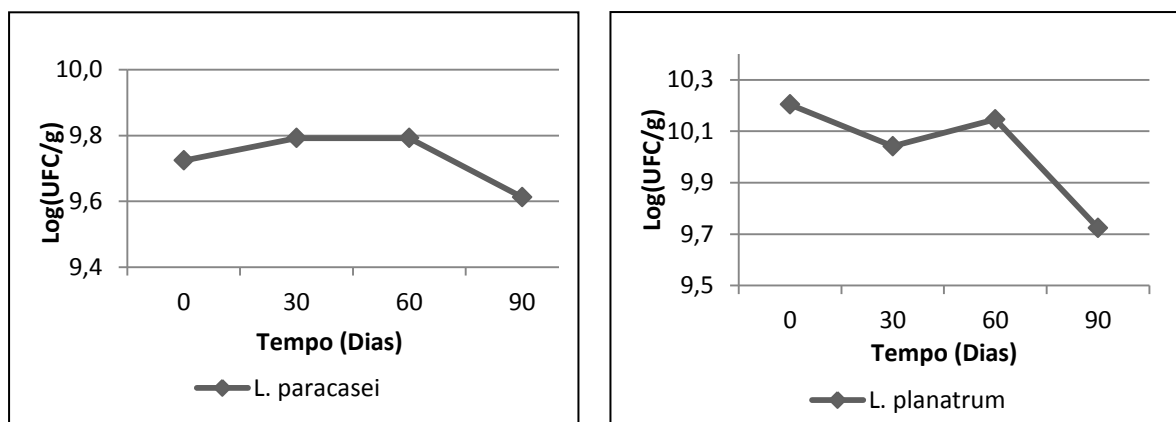


O número de células viáveis do *L. paracasei* durante a estocagem foi mantido durante os 60 primeiros dias de estocagem, havendo uma redução de 0,5 log ao final do período de estocagem. Quanto ao *L. plantarum*, observa-se uma redução de 0,4 log nos primeiros 30 dias, porém manteve-se estável até o final do período avaliado.

Gardinier et al. (2000), utilizando metodologia similar, verificaram que após 60 dias de estocagem uma redução de ~ 1 log, nas cultura de *L. paracasei* secos por spray-drying.

Na figura 4 pode-se observar a viabilidade das culturas liofilizadas. O número de células viáveis do *L. paracasei* manteve-se constante durante todo período de estocagem, não sendo verificada redução em sua viabilidade. Na cultura de *L. plantarum* foi observado uma redução de 0,5 log ao final do período de estocagem.

Figura 4 - Avaliação da viabilidade durante a estocagem de *L. paracasei* e *L. plantarum* submetidos à secagem por liofilização.



Zamora, Carretero e Parés (2006) obtiveram, aproximadamente, 100% e 80% na manutenção da viabilidade durante 60 dias de estocagem das BAL secas por liofilização e spray-drying, respectivamente, utilizando leite desnatado sem gordura (NFSM) a 20%, seguindo a metodologia deste estudo. Corroborando com os resultados obtidos.

De acordo com as figuras 4 e 5, observa-se que as duas culturas secas por spray-drying e por liofilização, mantiveram a viabilidade durante o período de

estocagem, demonstrando que os métodos de secagem utilizados na imobilização das culturas foram eficientes, já que na recomendação de consumo de produtos lácteos (ANVISA, 2008), a quantidade mínima de culturas viáveis deve estar situada na faixa de 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/g ou mL). Neste estudo a contagem de células de BAL obtida atingiu valores compreendidos nesta faixa, como também, situados acima deste.

6.3 Determinação do teor de umidade do pó

Na secagem por spray-drying as culturas em pó *L. paracasei* e *L. plantarum* tiveram o seu teor de umidade de 3,78 % e 6,59 % de água e na liofilização 6,07 % e 6,56%, respectivamente.

Zamora, Pares e Carretero (2006) obtiveram um teor de umidade entre 5.75-6,7%, nas culturas de *Lactobacillus* secas por spray-drying, utilizando Leite desnatado sem gordura a 20% (NFSM), e nas culturas liofilizadas de 6,5 – 7%. Corroborando com os com valores obtidos neste estudo em ambas as culturas liofilizadas e na linhagem de *L. paracasei* seco por spray-drying.

Foi observado que a linhagem do *L. plantarum*, apresentou um teor de umidade 2,81% superior ao *L. paracasei*, supostamente deve-se ao início do processo, onde a câmara de secagem provavelmente continha um teor de umidade residual não desejado.

De acordo com Zayed e Roos (2004) o teor de umidade residual está diretamente relacionado com o tipo de meio utilizado durante a secagem e ainda que um certa quantidade de água deva permanecer no estado desidratado para manutenção da cultura. Segundo Oliveira (2006) e Anata, Volkert e Knorr (2005) o teor de umidade residual aumenta com a diminuição da temperatura de saída.

Gardiner et al. (2000) citam que a temperatura de saída necessária para manter um teor de umidade residual que não excedesse a 4% é de 80-85°C, quando utilizado o leite desnatado reconstituído (LDR) a 20%, para manutenção do pó por um longo período de estocagem. De acordo com Brasil (1996), 4% é o teor de umidade mínimo para leite em pó desnatado. Um teor de umidade residual de 4% é considerado um parâmetro de qualidade de produtos de leite desidratados

(MASTERS, 1985). Divergindo do observado, pois foi obtida uma melhor manutenção da viabilidade durante a estocagem com o teor de umidade residual superior a 6 %. Resultado similar ao reportado por Zamora, Pares e Carretero (2006).

6.4 Caracterização da estrutura do pó por MEV

As figuras 5 e 6 mostram as micrografias eletrônicas de varredura das partículas contendo *L. paracasei* e o *L. plantarum* secas por spray-drying. Ambas apresentaram um formato arredondado, com concavidades aprofundadas, sem poros ou rachaduras, apresentando paredes contínuas. O mesmo efeito foi reconhecido por Riordan et al. (2001), citando tais características como o efeito “donut”. Pôde-se observar, também, uma variedade de tamanho de partículas.

A análise das características morfológicas das culturas secas por spray-drying estão de acordo com os obtidos por Desmond et al. (2002) e Gardiner et al. (2000) nas amostras secas com LDR a 20% e por Riordian et al. (2001) ao utilizar amido como agente protetor, utilizando temperaturas de entrada entre 140 e 170 °C, respectivamente. Esse formato arredondado com concavidades sugere-se ser devido à baixa temperatura de entrada utilizada. O aspecto dos pós obtidos é o esperado para este processo, no qual a amostra é atomizada, formando finas gotículas que são aspergidas em uma corrente de ar quente (FELLOWS, 2006).

Figura 5 - Micrografia obtida por MEV das partículas de *L. plantarum* submetidas à secagem por spray-drying.

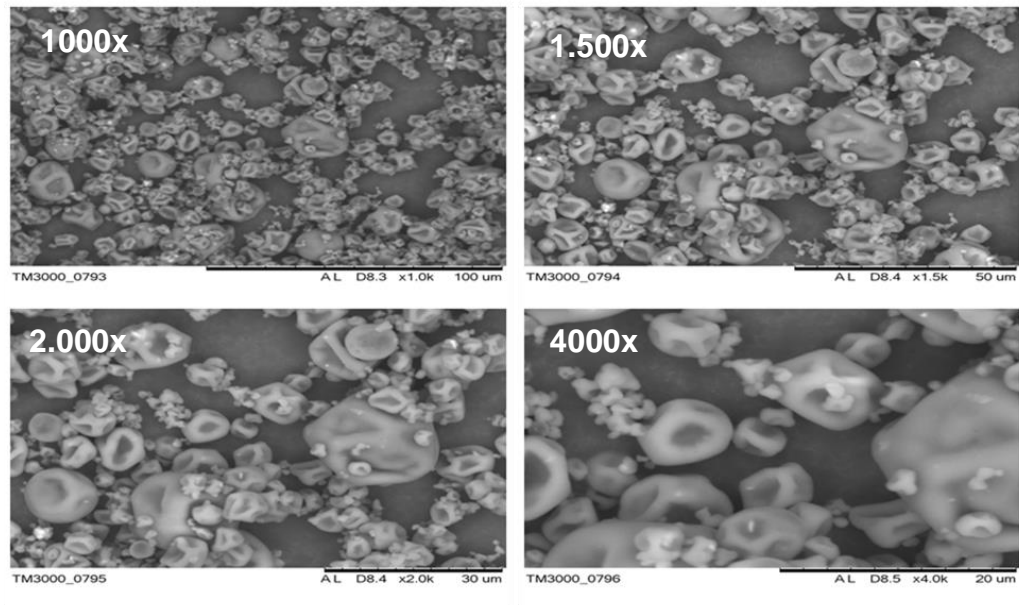
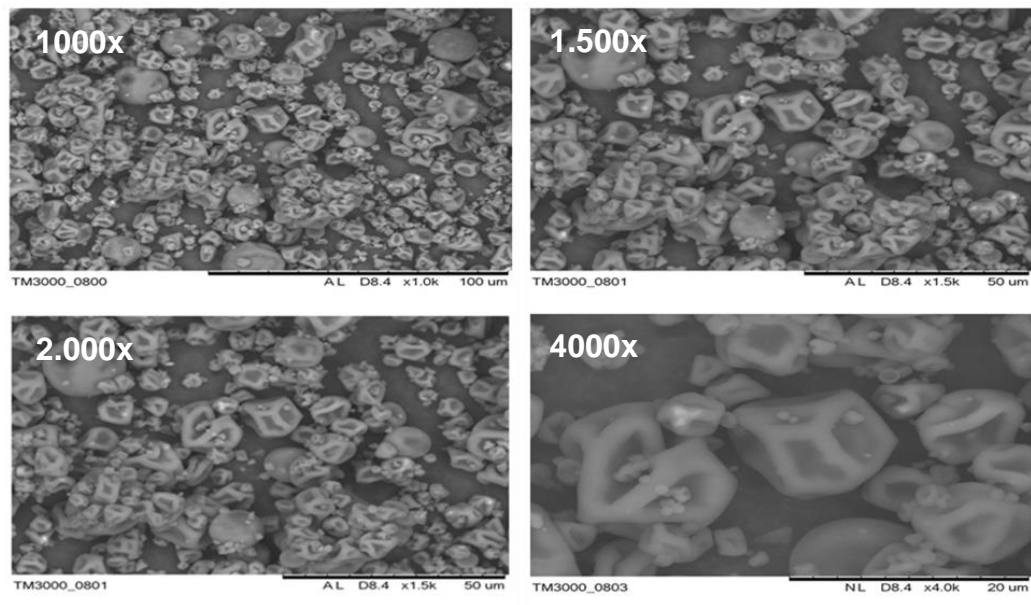


Figura 6 - Micrografia obtida por MEV das partículas de *L. paracasei* submetidas à secagem por spray-drying.



As micrografias das culturas liofilizadas são mostradas nas figuras 7 e 8. Diferentemente das partículas obtidas pela técnica de secagem por spray-drying, as

partículas obtidas por liofilização apresentam-se com formatos irregulares, na forma de placas de elevada dimensão, formadas pela coalescência de partículas individuais. As microcápsulas sofrem processo de fusão, ou seja, unem-se em placas formando grandes agregados, que são macerados para obtenção do pó, com isso, uma grande variedade do tamanho das partículas é observado. Características similares foram obtidas por Oliveira (2006). Segundo Bergenholtz et al. (2012) o formato do pó obtido no processo de secagem de liofilização também é dependente da formulação utilizada.

6.5 Avaliação da reidratação das culturas após secagem por liofilização e spray-drying.

Foi observado que os pós obtidos ao serem ressuspensos em Leite desnatado reconstituído (LDR) apresentaram facilidade de reidratação, independente da técnica de secagem utilizada.

Figura 7 - Micrografia obtida por MEV das partículas de *L. plantarum* submetidas à secagem por liofilização.

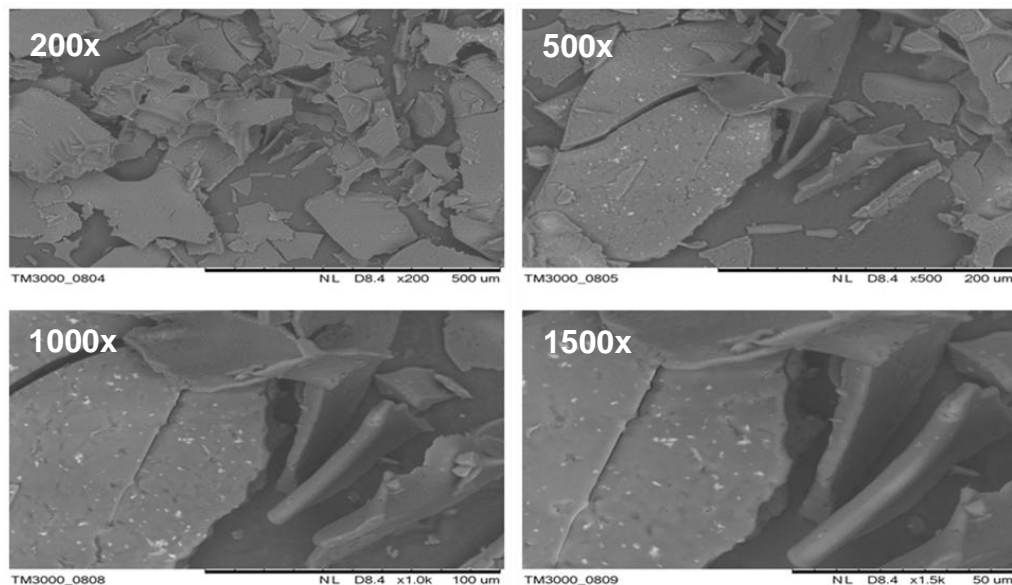
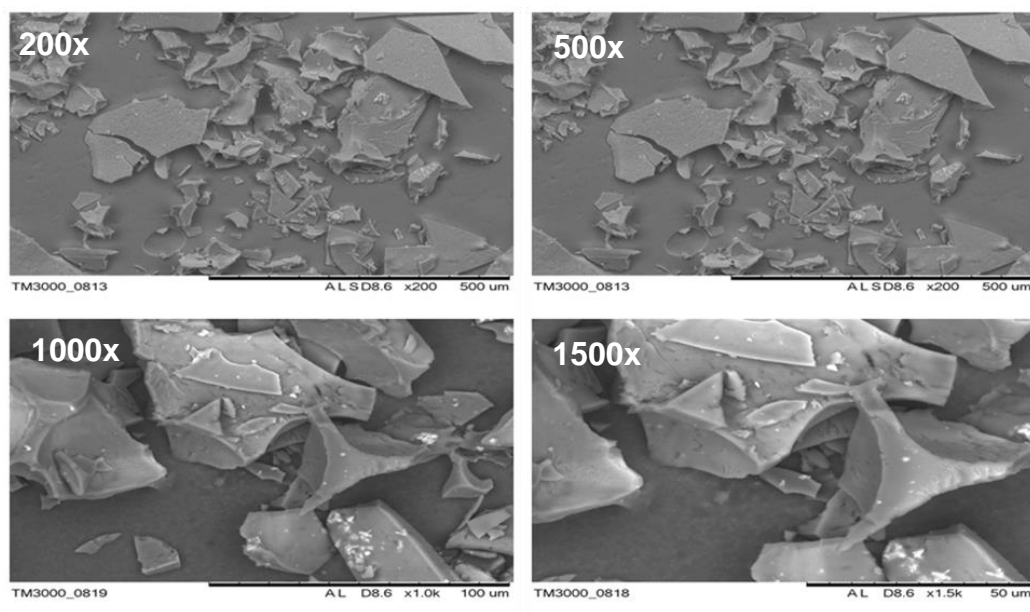


Figura 8 - Micrografia obtida por MEV das partículas de *L. paracasei* submetidas à secagem por liofilização.



7 CONCLUSÃO

Na secagem das bactérias lácticas, *L. paracasei* e *L. plantarum*, aos processos, liofilização e spray-drying, pôde-se observar que as técnicas foram eficientes na imobilização desses micro-organismos. A liofilização manteve a maior viabilidade após a secagem, para as duas culturas. No spray-drying, a redução de viabilidade após a secagem foi compensada pela manutenção da viabilidade durante a estocagem.

Ambas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas na escolha do método para cada micro-organismo. A liofilização é considerada a técnica mais comumente empregada na imobilização de micro-organismos em geral, por ser uma técnica menos agressiva, obtendo uma alta taxa de viabilidade. A técnica de spray-drying vem sendo considerada uma alternativa de imobilização das culturas lácticas, com a vantagem de poder ser utilizada tanto para produtos termolábeis ou termoresistentes, porém como demonstrado neste trabalho, a eficiência da técnica também é dependente de cada micro-organismo, pois o tratamento com ar quente pode levar a uma substancial perda de viabilidade, sendo uma das dificuldades encontradas na utilização da técnica.

Ao avaliar as duas técnicas, deve-se levar em consideração o custo do processo, bem como o seu tempo de execução, superior na liofilização. Segundo Silva et al.(2011) o consumo de energia para o processo de sublimação é mais alto que para o processo de evaporação, bem como o custo de uma planta de instalação de liofilização é mais alto que do spray-dryer.

O sucesso de obtenção de bactérias lácticas em pó, quando submetidas a processos de secagem, como a liofilização e o spray-drying, não depende somente da viabilidade das células após o processo de secagem, mas também da manutenção da viabilidade durante o período de estocagem, pois são características essenciais das culturas lácticas para serem utilizadas na elaboração de fermento láctico com o objetivo de produção de queijo de coalho. Desta forma, será possível obter um queijo de coalho elaborado com leite pasteurizado e fermento láctico endógeno em condições higiênico-sanitárias, com o *flavor* característico do sertão

alagoano. Ainda, por estar no estado físico em pó, o manuseio e estocagem será facilitado para ser distribuído a pequenos produtores.

Contudo, estudos posteriores para a otimização das técnicas de secagem para o aumento da taxa de viabilidade e manutenção durante estocagem das culturas lácticas estudadas é sugerido, como a seleção criteriosa e específica para cada cultura das temperaturas utilizadas, agentes protetores e meios de crescimento, gerando assim uma maior termotolerância aos processos de secagem.

REFERÊNCIAS

- ABADIAS, M. et al. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**. v.65, p. 173-182, 2001
- ALCARDE, A. R.; BASSO, L. C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, set., 1997.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.
- ANVISA. **Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e, ou, de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Jul. 2008. Disponível:<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 01 out. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de março de 1996**. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. . Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11 de março de 1996. Seção 1.
- BERGENHOLTZ, A. S. et al. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. **Cryobiology**, 2012. doi:10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
- CARVALHO A. S. et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1587-1591, 2002.
- CARVALHO, A. S. et al. Relevant factor for preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 835-847, 2004.
- CARR, J. C.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Changes in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. **Biotechnology Letter**, v.18, p. 99–104, 1996.
- COSTA, E. et al. Survival of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 in a spray-drying process. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 185–191, 2002.
- CARDONA, T. D. et al. Optimizing conditions for heat pump dehydration of Acid Lactic Bacteria. **Drying Technology**, v. 20, n.8, p.1611-1632, 2002.

DENKOVA Z.; KRASTANOV, A.; MURGOV I. Immobilized lactic acid bacteria for application as dairy starters and probiotic preparations. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, p. 107-114, 2004.

DESMOND, C. et al. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 801–808, 2001.

DESMOND, C. et al. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 1003–1011, 2002.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos: Princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FODA, Y. H.; HAMED, M. G. E.; ABD-ALLAH, M. A. Preservation of orange and guava juices by freeze-drying. **Food Technology**, v. 24, n. 12, p. 74-80, 1970.

FONSECA, F.; BEAL C.; CORRIEU G.. Method of quantifying the loss of acidification activity of latic acid starter during freezing and frozen storage. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 83-9, 2000.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Cap. 5. p. 54-97, 2000.

GARDINIER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p. 2605-2612, 2000.

JOHNSON, J. A. C.; ETZEL, M. R. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 761–768, 1995.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Science Technology**, v. 9, p. 295–306, 1998.

MASTERS, K. Analytical methods and properties of dried dairy products. *In* R. Hansen (ed.), Evaporation, membrane filtration and spray drying in milk powder and cheese production. **North European Dairy Journal**. Vanlose, Denmark, p. 393-403, 1985.

McSWEENEY, P. L. H.; WALSH, E. M.; FOX, P. F.; COGAN, T. M.; DRINAN, F. D.; CASTELO-GONZALEZ, M. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v. 33, p. 183-192, 1994.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifodobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray-**

drying e leite de jorro. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2006.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray-drying. **Drying Technology**, v. 6, n. 6, p.1195-1236, 1998.

RAMOS, A. C. S. **Caracterização e seleção tecnológica de culturas lácticas isoladas de queijo de coalho do sertão alagoano**. 2009, 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição, Maceió, 2009.

RIORDAN, K. et al. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 1059-1066, 2001.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.;FOERST, P. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-315, 2007.

SCHWAB, C.; VOGEL, R.; GÄNZLE, M. G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.160 during freeze-drying. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-114, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo; Varela; 2007. 317 p.

SILVA, J., et al. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, 2011.

SALOFF-COSTE C. J. **Lactic acid bacteria** Danone World Newsletter ,1994.

STRASSER, S, et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 167-177, 2009.

TEIXEIRA, P. C. et al. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray drying. **Journal Dairy Science**, v. 78, p. 1025–1031, 1995.

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blond, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 77- 84, 2006.

ZAYED, G; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p.1081–1086, 2004.

APÊNDICE A – Artigo Revisão de Literatura: Submetido na Revista Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (B.CEPPA).

BACTÉRIAS LÁTICAS E IMOBILIZAÇÃO POR LIOFILIZAÇÃO E SPRAY-DRYING: UMA REVISÃO

CAMILA SAMPAIO BEZERRA DA SILVA*
ADÉLIA MARIA ALMEIDA ANDRADE**
MARIA CRISTINA DELGADO SILVA***
IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR****

Esta revisão de literatura teve por objetivo apresentar informações relacionadas à imobilização de bactérias lácticas (BAL). Além das BAL, especialmente *Lactobacillus*, foram abordados os aspectos relacionados à microbiota nativa dos queijos artesanais, sua identificação e importância, bem como os fatores relacionados na preservação, em longo prazo, destes micro-organismos. Os temas revisados evidenciaram a importância das bactérias lácticas endógenas, pertencentes à microbiota nativa dos queijos artesanais, quando estes passam a ser produzidos com leite tratado termicamente. A conservação destes micro-organismos pelas técnicas de liofilização e spray-drying tem sido bastante estudada e aprimorada, sendo a técnica de liofilização mais difundida comercialmente, porém a segunda tem sido vista como uma alternativa de imobilização, em um menor custo operacional. Ambos os processos podem causar algumas perdas na viabilidade das células, e agentes protetores são utilizados para minimizá-las. Contudo, deve-se levar em consideração que o rendimento máximo é dependente também de cada cultura e estão relacionados, pelo meio de cultivo, tipo de células, estado fisiológico e o processo utilizado. Cada cultura analisada é específica, e o estudo de imobilização deve ser tratado individualmente para obter a melhor taxa de sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: BACTÉRIAS LÁTICAS, *LACTOBACILLUS*, MICROBIOTA NATURAL, LIOFILIZAÇÃO, SPRAY-DRYING, IMOBILIZAÇÃO.

*Mestranda em Nutrição. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Maceió, AL (e-mail: camilasampaio.al@gmail.com).

**Graduanda em Farmácia. Escola de Enfermagem e Farmácia. (UFAL).Maceió, AL.(e-mail: almeidaadelia@gmail.com).

***Doutora em Ciências-Microbiologia. Professora Associada. Faculdade de Nutrição. (UFAL). Maceió, AL (e-mail: mcdelgado@gmail.com).

****Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Professor Adjunto II. Escola de Enfermagem e Farmácia e Faculdade de Nutrição. (UFAL). Maceió, AL.(e-mail: irinaldodiniz@yahoo.com.br).

1 INTRODUÇÃO

As Bactérias lácticas (BAL) de diferentes espécies são utilizadas na produção da maioria dos queijos que utilizam leite pasteurizado, com o objetivo principal de produzir ácido láctico e, em alguns casos, compostos aromáticos, principalmente ácido acético, acetaldeído e diacetil (FOX et al., 2000).

No Brasil, é comum o uso de fermentos lácticos em produtos de laticínios industrializados, devido a uma diminuição da microbiota natural, já que para atenderem a legislação em vigor são produzidos a partir de leite pasteurizado (BROLAZO, 2003). Porém, essa substituição da microbiota nativa resulta numa perda de características típicas do queijo regional. Preservar estes produtos, que fazem parte da cultura de muitas regiões é uma preocupação do Brasil (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Vários pesquisadores tem buscado isolar e selecionar cepas que façam parte da microbiota presente nos queijos artesanais, como o queijo de coalho, com o objetivo de se obter culturas lácticas iniciadoras e adjuntas, para elaborar fermentos lácticos, especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente destinado à produção de queijos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004; CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009).

Dois métodos de preservação de culturas podem ser utilizados industrialmente: armazenamento por congelamento ou o armazenamento das culturas desidratadas, na forma de pó (CARVALHO et al., 2004; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Embora o congelamento seja amplamente utilizado na preservação, em longo prazo, das BAL, este provoca uma perda de viabilidade e de atividade de acidificação (FONSECA; BEAL; CORRIEU, 2000), além dos altos custos de armazenamento e transporte (CARVALHO et al., 2004; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007). Com isto, a desidratação é frequentemente vista como uma boa alternativa para preservar as linhagens industriais (GARDINER et al., 2000; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

Dentre as várias técnicas de secagem, a liofilização é uma técnica comumente utilizada na obtenção de fermentos lácticos em laticínios e em indústria de alimentos (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007), sendo um dos mais efetivos métodos de conservação para a maior parte dos micro-organismos (ALCARDE; BASSO, 1997), com certa quantidade de culturas lácticas comercialmente disponíveis (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).

O processo de secagem por spray-drying é considerado um método alternativo de imobilização de micro-organismos (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006) e alguns autores consideram ser um técnica promissora para produção de culturas probióticas secas (GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2001; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007).

O objetivo deste trabalho foi efetuar uma revisão sobre as BAL, apresentando os aspectos relevantes sobre a microbiota de queijos artesanais e sua importância na fabricação de queijo, assim como a imobilização destes micro-organismos pelas técnicas de liofilização e spray-drying.

2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

As BAL são um grupo que tem como principal característica a produção de ácido láctico pela fermentação de carboidratos. São Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidases negativas e anaeróbias facultativas (SILVA;

JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Crescem em condição de anaerobiose, porém como toleram o oxigênio, são então conhecidas como microaerófilas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002), assim, são bem pouco afetadas pela presença ou ausência de oxigênio. Possuem capacidade de síntese extremamente limitada, logo são comumente cultivadas em meios complexos contendo peptona, extrato de levedura e outros componentes de matéria animal ou vegetal, suplementados com uma fonte de açúcar (SALOFF- COSTE, 1994).

As bactérias lácticas (BAL) pertencem a diversos gêneros, divididos em espécies, subespécies, variedades e linhagens. Essa divisão é feita baseada nas diversas propriedades como forma, temperatura ótima de crescimento, capacidade de fermentar diversos açúcares, necessidades nutricionais, presença de determinadas enzimas, além da informação genética (SALOFF- COSTE, 1994).

De acordo com o produto ou produtos finais da fermentação, as BAL podem ser agrupadas em homofermentativas, resultando como principal produto da fermentação da glicose, o ácido láctico, e as heterofermentativas, produzem além do ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL homofermentativas são capazes de fermentar mais diretamente a glicose em ácido láctico do que as heterofermentativas, já esta última é frequentemente utilizada na indústria de laticínios por sua capacidade de produzir substâncias aromáticas, pois utiliza a via pentose monofosfato na fermentação da hexose, produzindo aldeído e diacetil, durante a conversão de hexose e pentose (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Esses micro-organismos podem ainda ser divididos, de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, em mesofílicos e termofílicos, os quais crescem a uma temperatura ótima de 30 e de 42 °C, respectivamente (FOX et al., 2000).

Originalmente o grupo de BAL incluía 4 gêneros de grande importância em alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007). Atualmente, são divididas nos seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tretragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004) e ainda, segundo Fox et al. (2000), *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* são os 5 gêneros de BAL mais comumente encontrados em queijos.

As BAL de diferentes espécies são utilizadas na produção da maioria dos queijos que utilizam leite pasteurizado, com o objetivo principal de produzir ácido láctico e, em alguns casos, compostos aromáticos, principalmente ácido acético, acetaldeído e diacetil (FOX et al., 2000). O ácido láctico por sua vez, produzido pelas BAL, tem como funções principais, promover a acidificação do leite, facilitar o processo de expulsão do soro e prevenir o desenvolvimento de bactérias indesejáveis no queijo. As culturas lácticas que iniciam a produção de ácido láctico na produção de queijos são conhecidas como Culturas *Starter* (FOX et al., 2000).

As BAL além de serem bastante conhecidas por sua utilização como cultura *starters* na produção de produtos lácticos, como leites acidificados, queijos, iogurtes e manteiga são também importantes comercialmente no processamento de produtos cárneos, bebidas alcoólicas e vegetais (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

No seu isolamento e manutenção, o uso do meio de cultura ágar MRS ou caldo MRS, sigla originada da formulação desenvolvida pelos pesquisadores Man, Rogosa e Sharpe em 1960, tem sido bastante utilizado devido a sua capacidade de

manter adequadamente uma grande variedade de espécies de BAL. (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

2.1 LACTOBACILLUS

Lactobacillus é um dos gêneros originais de bactérias lácticas (BAL) e várias espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros *Carnobacterium* e *Wissella*. São bactérias extremamente úteis, muitas delas reconhecidas como probióticas, incluindo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. A morfologia é de bastonetes, imóveis, usualmente regulares e de tamanho variado. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas, com uma temperatura ótima de 30-40° C, sendo que o seu crescimento varia de 15 ou 45 °C entre as espécies (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2007).

Foram originalmente classificados por Orla e Jensen como homofermentativos e heterofermentativos, baseado na quantidade de ácido láctico formado durante a fermentação da glicose; e divididos em 3 grupos: Thermobacteria, Streptobacteria e a Betabacteria, baseado na temperatura de crescimento e das reações bioquímicas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Apesar desses três grupos, em sua maior parte terem sido substituídos, os nomes ainda são comumente utilizados e definidos de acordo com a temperatura de crescimento, capacidade de fermentar pentose, capacidade de produzir CO₂ a partir da glicose ou gluconato, produção de ácido láctico, como um dos principais produtos de fermentação, tipo homofermentativo ou heterofermentativo, fermentação da frutose a manitol e hidrólise de arginina (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Segundo Fox et al. (2002), os *Lactobacillus* também podem ser divididos em 3 grupos baseados no produto final de sua fermentação: Termofílicos homofermentativos, Mesofílicos heterofermentativos facultativos e Mesofílicos heterofermentativos.

O primeiro grupo, Termofílicos homofermentativos, utiliza apenas hexoses como fonte de carbono para produção de ácido láctico. O segundo, Mesofílicos heterofermentativos facultativos, utiliza, além das hexoses, outras fontes de carbono, sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, CO₂, H₂O₂ e álcool. Inclui os *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e o *Lactobacillus casei*, os quais não são comumente encontrados no fermento láctico, porém associados à fermentação secundária. Estes lactobacilos são chamados de NSLAB - *non starter acid lactic bacteria*, geralmente encontrados em fermentos lácticos artesanais (FOX et al., 2000; BERESFORD; WILLIAMS, 2004).

O terceiro grupo é formado pelos *Lactobacillus* Mesofílicos heterofermentativos que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono. Neste grupo estão incluídos *Lactobacillus brevis* e o *Lactobacillus fermentum*, os quais também não são encontrados no fermento láctico (FOX et al., 2000).

2.2 CULTURAS STARTERS E CULTURAS ADJUNTAS

A microflora associada à maturação dos queijos é muito diversa, porém pode-se convenientemente dividi-las em dois grupos, as culturas iniciadoras conhecidas como culturas *starters* e os micro-organismos secundários que também são denominados de culturas adjuntas (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas *starters* são responsáveis primeiramente pela produção de ácido durante a elaboração do queijo, e, portanto, devem produzir ácido suficiente para reduzir rapidamente o pH do leite, ou seja, dependendo da variedade do queijo, como regra básica, atingir pH < 5,3 em 6 horas a 30-37°C. Além disso, também contribuem para o processo de maturação, desde que suas enzimas estejam envolvidas no processo de proteólise, lipólise e na conversão de aminoácidos em compostos flavorizantes. Estas enzimas intracelulares, em muitas culturas iniciadoras, são liberadas devido à autólise, decorrente da perda da viabilidade das culturas, este evento foi reportado inicialmente nos *Lactobacillus* (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas adjuntas podem ser definidas como culturas selecionadas de bactérias lácticas (BAL) ou de outros micro-organismos relacionados com a maturação do queijo, que são adicionadas juntamente com as culturas *starters* (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al., 1996). Não tem contribuição significativamente na produção de ácido (BERESFORD et al., 2001), porém, tem como objetivo principal a melhora das características sensoriais do produto (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al., 1996; BERESFORD et al., 2001).

Em muitas variedades de queijo, a ação das culturas adjuntas contribui significativamente para as características específicas dessa variedade (BERESFORD et al., 2001). Podem ser divididas em grupos primários, incluindo: (1) NSLAB - *non starter acid lactic bacteria* - *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (2) Bactérias propiônicas, (3) bolores e (4) bactérias e leveduras que se desenvolvem na superfície dos queijos (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

As culturas NSLAB são consideradas dentro das variedades de queijos maturados, a provável população microbiana de proporção mais significativa. Estão presentes tanto em queijos produzidos com leite cru como em leite tratado termicamente (BERESFORD; WILLIAN, 2004), pois apesar de alguns *Lactobacillus* serem inativados pela pasteurização (TUNER; LAWRENCE; Le LIEVRE, 1986), outras linhagens podem sobreviver e se desenvolver posteriormente no queijo durante a maturação (MCSWEENET et al., 1994). Porém a diversidade da população é maior em queijos oriundos de leite cru quando comparados com queijos produzidos com leite pasteurizado (BERESFORD; WILLIAN, 2004).

De modo geral, a adição de culturas adjuntas resulta em um aumento da atividade da aminopeptidase, que é responsável pela redução do sabor amargo e pelo aumento da concentração de peptídeos de sabor desejável e precursores de sabor (DRANKE; SWANSON, 1995; DANKER et al., 1996).

2.3 MICROBIOTA LÁTICA DE QUEIJOS ARTESANAIS

Conhecer a composição da microbiota láctica do queijo artesanal e as propriedades tecnológicas das (BAL) isoladas é de grande importância quando se busca um fermento adequado para a produção do queijo de coalho produzido a partir de leite pasteurizado, considerando que os queijos artesanais apresentam uma população microbiana típica e diferente, dependente da região de origem do leite e com a sua tecnologia de fabricação (CARVALHO, 2007).

Com isso, tem-se buscado isolar e selecionar linhagens que façam parte da microbiota presente nos queijos artesanais, com o objetivo de se obter culturas lácticas iniciadoras e adjuntas, para elaborar fermentos lácticos, especificamente preparados para adição ao leite tratado termicamente destinado a produção de queijos (MACEDO; TAVARES; MALCATA, 2004).

No Brasil, queijos artesanais são referências culturais das culinárias regionais e representam, muitas vezes, a principal renda para o pequeno produtor. Por isso, com o intuito de preservar tais características, pesquisadores em diferentes regiões brasileiras, dentre elas, Alagoas, têm isolado bactérias lácticas de leite e queijo de coalho artesanais com o objetivo de selecionar micro-organismos de interesse para a fabricação de produtos lácteos de qualidade (CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009).

Carvalho et al. (2005) isolaram 331 micro-organismo de 6 amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Fortaleza-CE, sendo 270 identificadas como bactérias lácticas (BAL). O gênero *Enterococcus* foi o de maior predominância quando isolados de queijos de coalho artesanal (COGNAN et al., 1997; CARVALHO et al., 2005; CARVALHO, 2007; RAMOS, 2009), bem como os *Streptococcus* (CARVALHO et al., 2005; RAMOS, 2009). A predominância de gêneros de *Enterococcus* e *Streptococcus* nos queijos elaborados com leite cru sugere uma seleção das BAL resistentes ao processo de cozimento da massa, o qual ocorre a elevadas temperaturas (CARVALHO et al., 2005).

Em outro estudo, Carvalho (2007) isolou 643 BAL a partir dos queijos de coalho artesanais produzidos no Ceará, com a prevalência das espécies de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis subsp. Lactis*.

Em três amostras de queijo de coalho artesanal de Feira de Santana/BA, Assis e Teshima (2006) isolaram 16 tipos de BAL, com características proteolíticas, produção de aroma e sabor característicos do queijo de coalho.

Ramos (2009) isolou e identificou as (BAL) de 3 amostras de queijo de coalho artesanal do sertão alagoano. Dentre os 109 isolados, 87 foram caracterizados como BAL e destas, 43 como produtoras de ácido com características organolépticas aceitáveis para possível produção de fermento láctico, sendo as principais, as culturas de *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

3 IMOBILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS POR LIOFILIZAÇÃO E SPRAY-DRYING

O congelamento é amplamente utilizado na preservação, em longo prazo, da viabilidade e das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas (BAL) utilizadas pela indústria de alimentos, porém o congelamento provoca uma perda de viabilidade e de atividade de acidificação das BAL (FONSECA; BEAL; CORRIEU, 2000). Assim, tendo em conta não só a estabilidade das culturas durante o armazenamento, mas também o custo final do processamento, a desidratação é frequentemente vista como uma boa alternativa para preservar as linhagens industriais (GARDINER et al., 2000; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

Dentre as várias aplicações industriais das BAL, uma condição necessária é a manutenção da alta viabilidade durante a imobilização e estocagem, com isso, o principal obstáculo é o desenvolvimento de uma formulação para obtenção de culturas secas que mantenha a viabilidade e atividades iniciais dessas culturas (STRASSER et al., 2009).

O processo de liofilização vem sendo, durante muito tempo, utilizado como o processo principal de obtenção de culturas em pó (ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), porém durante o processo e posterior estocagem ocorre uma ocasional perda da viabilidade celular,

na qual a extensão dependerá de alguns fatores, como as propriedades de cada cultura, bem como as condições e fase de crescimento (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007). Bergenholtz et al. (2012) consideram que o rendimento máximo alcançado no processo também é específico de cada cultura e está relacionado por exemplo, pelo meio de cultivo, tipo de célula, estado fisiológico e o processo utilizado.

A liofilização possui a vantagem de não ser um método agressivo, porém é demorado e de alto custo (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2007), além dos equipamentos, em escala comercial, serem caros e de baixo rendimento de produção (ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006).

A secagem por spray-drying é considerada um método alternativo de imobilização de micro-organismo, no qual se obtém um alto rendimento em um menor custo operacional (KNORR, 1998; ZAMORA; CARRETERO; PARES, 2006). Pode ser uma alternativa de produzir grandes quantidades de culturas probióticas (GRADINER et al., 2000). De acordo com Knorr (1998) o custo da secagem por spray-drying, por quilograma de água removida, pode ser seis vezes menor do que a secagem por liofilização.

Na secagem das culturas por spray-drying, a maior limitação é a perda de viabilidade durante o processo e posterior estocagem devida principalmente à aplicação de elevadas temperaturas (GARDINER et al., 2000; DESMOND et al., 2001). Neste processo, os micro-organismos precisam resistir às altas temperaturas utilizadas (GARDINER et al., 2000).

A perda de viabilidade durante a liofilização é atribuída ao choque osmótico e as injúrias na membrana celular, causadas pela formação do gelo intracelular e pela reidratação (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007). A membrana é o primeiro alvo do congelamento e das lesões da dessecação e os danos na mesma possuem um efeito catalítico da morte celular durante a secagem e posterior armazenamento (ANATA; VOLKERT; KNORR, 2005). Prasad, Mcjarrow e Gopal (2003) ao analisarem culturas de *L. rhamnosus* HN001 verificaram que a redução da viabilidade durante o armazenamento tem sido atribuída aos danos promovidos na membrana pela oxidação e lipólise.

Com o objetivo de melhorar a taxa de sobrevivência, ou seja, reduzir ou prevenir a morte das células bacterianas, crioprotetores, são utilizados, adicionados antes do congelamento. O efeito dos agentes protetores na viabilidade celular está relacionado ao seu efeito na integridade da membrana e a interação com a mesma (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007).

Uma menor viabilidade e integridade da membrana em células de *Lactobacillus reuteri* TMW1.106, liofilizadas, sem agentes protetores foi verificada quando comparadas com a adição individual de 7.5% de sacarose, frutotolosacarídeo (FOS), inulina e leite desnatado (LD) a 5 %, e ainda, que esses protetores obtiveram um efeito similar ou superior ao LD, este é um tipo de agente protetor geralmente utilizado em fermentos lácticos (SCHAWAB; VOGEL; GANZLE, 2007).

De acordo com Gardiner et al. (2000) a secagem por spray-drying de *L. paracasei* e *L. salivarius* em leite desnatado reconstituído (LDR) a 20% foi considerada uma forma de preservação destas culturas. Quando comparadas, o *L. paracasei* mostrou-se mais resistente à secagem e a testes com vários tratamentos térmicos, especificamente a 59°C.

Na ausência de informações relevantes sobre uma bactéria láctica (BAL) específica, é aconselhável utilizar o LDR como o agente protetor de secagem

(CARVALHO et al., 2004), sendo selecionado por fatores tais como, prevenir as injúrias na célula por estabilizar os constituintes da membrana celular (CASTRO et al., 1996), possuir proteínas que fornecem uma camada protetora para as células, além de, facilitar a reidratação dos produtos liofilizados por criar uma estrutura porosa (ABADIAS et al., 2001).

Ao liofilizar bactérias lácticas utilizando grânulos de gel de Ca-alginato e k-carragena como agentes protetores Denkova; Krastanov e Murgov (2004) observaram que nas linhagens de *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus casei* quando utilizado Ca-alginato, houve um aumento no número de células viáveis, de 2,7 e 2 log, do valor inicial, respectivamente; utilizando a k-carregena, foi observado uma redução de 0,2 log e um aumento de 1 log , *respectivamente*.

Ao avaliar duas técnicas de secagem, liofilização e leite fluidizado, e diferentes agentes protetores, carboidratos, na sobrevivência das culturas de *Lactobacillus plantarum* e *Enterococcus faecium*, Strasser et al. (2009) verificaram uma maior viabilidade das culturas liofilizadas com os carboidratos trealose e sacarose. A cultura de *L. plantarum* obteve um taxa de viabilidade relativa de 40,1% e 34,1 %, na presença da trealose e sacarose, respectivamente

Carvalho et al. (2002) liofilizaram linhagens de *L. plantarum* e o *L. rhamnosus* em uma formulação controle de leite desnatado reconstituído (LDR) a 11% e em formulação contendo também, trealose, sorbitol, frutose e glutamato monossódico (MSG). Verificaram que a adição desses compostos influenciou significativamente na viabilidade das culturas durante a estocagem, o que não foi observado durante o processo de liofilização. O MSG foi o agente que apresentou maior efeito protetor durante a estocagem. No período de 4 meses, houve uma redução inferior a 2 log , já com a formulação controle, LDR a 11% houve uma redução 2 vezes maior.

Quando o agente protetor MSG é utilizado sozinho, observa-se um ótimo resultado na liofilização de células *Candida sake*, o que não se observa quando o MSG é combinado com o LDR (ABADIAS et al., 2001). Os agentes de proteção utilizados durante a secagem de bactérias láctica (BAL) são específicos de cada espécie e devem ser analisados individualmente (CARVALHO et al., 2004; STRASSER et al., 2009; BERGENHOLTZ et al., 2012).

Zamora, Carretero e Parés (2006) avaliaram o efeito das duas técnicas de secagem, liofilização e spray-drying, na viabilidade de BAL isoladas de sangue suíno, utilizando uma solução a 20% de leite desnatado sem gordura (NFSM). Obtiveram 100 % de viabilidade de seis das dez culturas liofilizadas (*L. garviae*, *Ent. raffinosis* e *L. murinus*), mantendo 100% da viabilidade durante os 60 dias de estocagem a 5°C. Dez das doze culturas secas por spray-drying foram 100% viáveis após a secagem, e mantiveram 80% da viabilidade durante a estocagem.

Em muitas espécies de bactérias, a entrada na fase estacionária vem acompanhada de acentuadas alterações fisiológicas e estruturais, referente às mudanças de níveis de stress relacionados às proteínas, a composição da membrana e na estrutura da parede celular, resultando na melhora da resistência ao choque osmótico, à oxidação, ao stress osmótico e ácido, além da alta pressão (PRASAD; McJARROW; GOPAL, 2003).

Ao liofilizar células de *Lactobacillus reuteri*, Schawab, Vogel e Ganzle (2007) observaram que as culturas liofilizadas na fase estacionária de crescimento obtiveram menor redução de viabilidade (<0,5 log), especialmente quando foi utilizado fruto-oligossacarídeo (FOS), porém as culturas liofilizadas na fase exponencial tiveram uma redução de 3,5 e 2 logs na ausência e na presença dos agentes protetores, respectivamente. Porém Zamora, Carratero e Páres (2006)

mostram que ao secar por spray-drying bactérias ácidas lácticas (BAL) na fase exponencial de crescimento, obtiveram uma recuperação após secagem de aproximadamente 100% das culturas avaliadas.

Alguns estudos reportados sobre a secagem por spray-drying de bactérias lácticas (BAL) estão listados na tabela 2 com os principais parâmetros utilizados.

A temperatura de saída do pó, a qual as BAL ficam submetidas após o processo de secagem é um dos fatores determinantes na sobrevivência das BAL, como já citado em vários estudos (ANATA; VOLKERT; KNORR, 2005; DESMOND et al., 2002; GARDINER et al., 2000). Bergenholtz et al. (2012) citam que a eficiência máxima dos processos utilizado também é específico do tipo de células, seu estado fisiológico e meio de cultivo.

De acordo com Anata, Volkert e Knorr (2005) a sobrevivência do *L. rhamnosus* com goma acácia (GA) submetido à secagem por pulverização é inversamente proporcional a temperatura de saída (70-100°C), corroborando com o estudo de Desmond et al. (2002) quando utilizaram GA (10%) + LDR (10%) como agentes protetores durante a secagem do *L. paracasei* NFBC 338 por spray-drying.

Gardiner et al. (2000) determinou a temperatura de saída que obtivesse uma ótima viabilidade das linhagens de *L. paracasei* e *L. salivarius* durante a secagem por spray-drying. Verificando que a 80-85°C é a temperatura de saída necessária para manter um teor de umidade que não excedesse o nível de requerido de 4%, para manter o pó por um longo período de estocagem. Masters (1985) cita que o teor de umidade adequado para o leite em pó desnatado é de 4 %.

Quanto à manutenção na taxa de viabilidade das culturas secas, vários estudos observaram que ao avaliar a manutenção da viabilidade durante a estocagem à temperatura de refrigeração (0-9°C) e em temperaturas mais elevadas (~20 °C). Verificaram que uma maior taxa era obtida em temperaturas de refrigeração (DENKOVA; KRASTANOV; MURGOV, 2004; DESMOND et al., 2002; GARDINIER et al., 2000; STRASSER et al., 2009).

Ao se analisar as duas metodologias utilizadas para imobilizar BAL, deve-se levar em consideração a rentabilidade do processo. Segundo Strasser et al. (2009) a taxa de viabilidade, o tempo de duração e consumo de energia são parâmetros que avaliam a rentabilidade do processo industrial de produção de fermentos lácticos.

Tabela 5: Lista de parâmetros de secagem por spray-drying em relação às linhagens utilizadas.

Cultura	T (°C) saída	T(°C) entrada	Meio de crescimento	Meio de Secagem	Taxa de viabilidade	Referência
<i>L. paracasei</i> NFBC 3338	95-100 100-105	170	MRS	LDR (20% m/v) GA(10% m/v) + LDR (10% m/v)	1,7 % 1,4 % 0,01 % 0,9 %	Demond et al.(2002)
<i>L. paracasei</i> NFBC 3338	85-90 95-100 100-105	170	MRS	LDR (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	49 % 4,3% 0,5%	Demond et al. (2001)
<i>L. paracasei</i> NFBC338 <i>L. salivarius</i> UCC 118	60-65° 70-75° 80-85°C	170	MRS	LDR (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	11% 97% 66%	Gardiner et al. (2000)
<i>L. garviae</i> PS14/ PS22/ S23/ P48/ PS60/ PS95/ PS85/PS86 <i>L. murinus</i> PS87/ PS85 <i>L. murinus</i> PS86 <i>L. raffinosus</i> PS7 <i>L. raffinosus</i> PS99 <i>L. reuteri</i> PS77	80-85°	170	MRS	NFSM (20% M/V) + extrato de levedura (0,5% m/v)	100% 100% 66,2% 100% 55,6% 100%	Zamora, Carretero e Páres (2006)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da conservação e estocagem de linhagens de bactérias lácticas (BAL) vem crescendo e se mostrando cada vez mais importante para o campo das pesquisas e na produção em escala industrial alimentícia. O sucesso de obtenção de bactérias lácticas em pó, quando submetidas a processos de secagem, como a

liofilização e o spray-drying, não depende somente da viabilidade das células após o processo de secagem, mas também da manutenção da viabilidade durante o período de estocagem, bem como da atividade das culturas, pois são características essenciais das culturas lácticas para serem utilizadas na elaboração de fermento láctico.

As duas técnicas apresentam vantagens e desvantagem que devem ser analisadas individualmente para cada espécie, bem como o agente protetor que será utilizado para minimizar as perdas. Assim como os custos do processo e de equipamentos, que irão também definir qual técnica será mais adequada para secagem dos micro-organismos a serem estudados.

ABSTRACT

LACTIC BACTERIA BY LYOPHILIZATION AND SPRAY-DRYING IMMOBILISATION: A REVIEW

This literature review aimed to present information related to immobilization of lactic bacteria (LAB). Besides the LAB, especially *Lactobacillus*, were addressed aspects related to the native macrobiotic of artisan cheeses, identification and importance as well as the related factors in the preservation, long-term, these micro-organisms. The revised subjects revealed the importance of endogenous lactic bacteria belonging to the native macrobiotic of artisan cheeses, when they start to be produced with heat-treated milk. The conservation of these micro-organisms by lyophilization techniques and spray-drying has been studied and improved, and the freeze-drying technique most widespread commercially, but the second has been seen as an alternative to detention, in a minor short operating. Both processes may cause some loss in cell viability and protective agents are used to minimize them. However, the maximum yield also depends on each culture and is related by culture medium, cell type, physiological state and the process used. Each culture is analyzed specific, and the study of immobilization should be treated individually for the best survival rate.

KEY-WORDS: LACTIC ACID BACTERIA, *LACTOBACILLUS*, NATURAL MICROBIOTA, LYOPHILIZATION, SPRAY-DRYING, IMMOBILIZATION.

REFERENCIAS

- 1 ABADIAS, M. et al. Effect of freeze-drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. **International Journal of Food Microbiology**. v.65, p. 173-182, 2001.
- 2 ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.
- 3 ASSIS, M. M. S.; TESHIMA, E. **Determinação da Composição de Culturas Lácticas do Fermento para Produção de Queijo Coalho**. Relatório de Iniciação Científica. PROBIC/UEFS, Feira de Santana, p. 39, 2006.

- 4 AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. IN: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**, 3 ed, New York: Maercel Decker, v.1, p. 1-63, 2004.
- 5 BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3^a ed., Amsterdam: Elsevier Academic Press, v.1, p. 287-292. 2004.
- 6 BERESFORD, T. P. et al. Recents advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, jul., 2001.
- 7 BERGENHOLTZ, A. S. et al. A case study on stress preconditioning of a *Lactobacillus* strain prior to freeze-drying. **Cryobiology**, 2012, doi:10.1016/j.cryobiol.2012.01.002.
- 8 BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados**. 2003. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.
- 9 BRUNO, L. M.; CARVALHO, J.D.G. **Microbiota láctica de queijos artesanais**. Embrapa Agroindustrial Tropical, documentos, Dez. 2009. ISSN 1677-1915,124. 30p
- 10 COGAN, T. M. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997.
- 11 CARVALHO A. S. et al. Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1587-1591, 2002.
- 12 CARVALHO, A. S. et al. Relevant factor for preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 835-847, 2004.
- 13 CARVALHO, J. D. G. et al. Bactérias ácidas lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ago., 2005.
- 14 CARVALHO, J. D. G.. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007, 153 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.

- 15 CARR, J. C.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- 16 CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Changes in the membrane of *Lactobacillus bulgaricus* during storage following freeze-drying. **Biotechnology Letters**. V.18, p. 99–104, 1996.
- 17 DENKOVA Z.; KRASTANOV, A.; MURGOV I. Immobilized lactic acid bacteria for application as dairy starters and probiotic preparations. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, p. 107-114, 2004.
- 18 DRAKE, M. A.; SWANSON, B.G. Reduced and low-fat cheese technology: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 366-369, 1995.
- 19 DRAKE, M. A. et al. Chemical and sensory effects of a *Lactobacillus* adjunct in cheddar cheese. **Food Research International**, v. 29, n. 3-4, p. 381-387, 1996.
- 20 DESMOND, C. et al. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 801–808, 2001.
- 21 FONSECA, F.; BEAL C.; CORRIEU G.. Method of quantifying the loss of acidification activity of latic acid starter during freezing and frozen storage. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 83-9, 2000.
- 22 FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc., Cap. 5, p. 54-97, 2000.
- 23 GARDINIER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus salivarius* Strains during Heat treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605-2612, 2000.
- 24 KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends Food Science Technology**, v. 9, p. 295–306, 1998.
- 25 MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. **Food Microbiology**. London. v. 21, p. 233-240, 2004.
- 26 MASTERS, K. Analytical methods and properties of dried dairy products. *In* R. Hansen (ed.), *Evaporation, membrane filtration and spray drying in milk powder and cheese production*. **North European Dairy Journal**. Vanlose, Denmark., p. 393-403.1985

- 27 McSWEENEY, P. L. H. et al. A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. **Irish Journal of Agriculture and Food Research**, v. 33, p. 183-192, 1994.
- 28 PRASAD, J.; MCJARROW, P.; GOPAL, P. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 917–925, 2003.
- 29 RAMOS, A. C. S. **Caracterização e seleção tecnológica de culturas lácticas isoladas de queijo de coalho do sertão alagoano**. 2009, 109 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Nutrição, Maceió, 2009.
- 30 SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative Drying Processes for the Industrial Preservation of Lactic Acid Starter Cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-315, 2007.
- 31 SCHWAB, C.; VOGEL, R.; GÄNZLE, M. G. Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.160 during freeze-drying. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-114, 2007.
- 32 SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo; Varela; 2007. 317 p.
- 33 SALOFF-COSTE C. J. **Lactic acid bacteria** Danone World Newsletter (1994).
- 34 STRASSER, S. et al. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 167-177, 2009.
- 35 TUNER, K. W.; LAWRENCE, R. C.; Le LIEVRE, J. A microbiological specification for milk for aseptic cheesemaking. New Zealand. **Journal of Dairy Science and Technology**, v. 21, p. 249–254, 1986.
- 36 ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blond, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, v. 12, p. 77- 84, 2006.