

# Aplicação da Liofilização na Obtenção de Microrganismos Viáveis para a Elaboração de Iogurtes

Cristiane Spagnol  
Escola Agrotécnica Federal de Concórdia  
SC 283, km 8, Cx. Postal 58,  
CEP 89700-000, Concórdia, SC  
*cristianespagnol@ibest.com.br*

Diego Márlon Ferro  
Douglas Soares  
Tiago Fuchina Konski  
Luciano Cuchi  
Winston Xaubet Olivera (PQ)  
Sheila Mello da Silveira (PQ)

*(Recebido: 27 de outubro de 2004)*

**Resumo:** Este estudo baseia-se na liofilização de diversos tipos de iogurte, bem como na posterior verificação da viabilidade/sobrevivência das bactérias lácticas, visando a obtenção de um produto em pó para utilização como cultura para fabricação de iogurtes. Probióticos são lactobacilos vivos benéficos ao aparelho digestivo de humanos. Para obter os probióticos na forma de pó, a partir de iogurte natural ou de lactobacilos geneticamente selecionados, optamos pelo processo de liofilização. Após as análises físicas, químicas e microbiológicas pode-se concluir que é possível obter bactérias lácticas viáveis através da liofilização de vários tipos de iogurte. Os produtos liofilizados, tanto previamente centrifugados como na sua forma integral, são capazes de reconstituir o iogurte líquido, podendo ser utilizados como culturas para a produção de iogurte.

**Palavras-chave:** liofilização, probióticos, iogurte.

**Abstract:** This study is based on the lyophilization of different types of yogurt, as well as in the subsequent verification of the viability/survival of lactic acid bacteria, aiming to obtain a product in powder form to be used as a culture to produce yogurt. Probiotics are live lactic bacilli which are benefic to the humans digestive system. In order to obtain the probiotics in powder form from natural yogurt or from genetically selected lactic bacilli, we chose the

lyophilization process. After had done the physical, chemical and microbiological analyses, it was concluded that it is possible to obtain viable lactic bacilli through the lyophilization of various kinds of yogurt. The lyophilized products, both previously having been under centrifuge and in their whole form are capable of reconstituting the liquid yogurt, and, in this way, they can be used as cultures for the production of yogurt.

**Key-words:** liofilization, probiotics, yoghurt.

## 1 Introdução

O iogurte é um leite coagulado obtido por fermentação ácido - láctica, resultante da ação do *Lactobacillus bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus* sobre o leite pasteurizado ou concentrado (SABOYA *et al.* 1997).

Sabe-se que os leites fermentados, entre os quais incluem-se o iogurte e o leite acidófilo, provêm muitos benefícios à saúde. Os microrganismos utilizados para a obtenção destes produtos são capazes de influir positivamente sobre a flora intestinal, produzindo efeitos anticarcinogênicos e hipocolesterêmicos, entre outros (SABOYA *et al.* 1997).

Segundo Rausch (2002), os produtos comercializados que contém lactobacilos vivos são o iogurte e os chamados probióticos: que são alimentos especialmente destinados a ajudar nosso sistema digestivo pela introdução de microrganismos benéficos.

O termo probiótico foi proposto pela primeira vez em 1965. Atualmente, utiliza-se este termo para designar “suplemento alimentar composto de cultura pura ou composta de microrganismos vivos com a capacidade de se instalar e proliferar no trato intestinal, beneficiando a saúde do hospedeiro” (SABOYA *et al.* 1997).

Dave (1998) esclarece a respeito dos mecanismos de ação dos probióticos, que estão relacionados com a adesão e colonização na mucosa intestinal, estímulo da imunidade, produção de substâncias antimicrobianas e competição com bactérias.

O objetivo geral deste trabalho foi obter lactobacilos viáveis (iscas) para a elaboração de iogurtes. Especificamente buscou-se: i) obtenção de extrato seco, através da liofilização, a partir de diferentes tipos de iogurtes e ii) confirmação da sobrevivência/viabilidade dos microrganismos após o processo de liofilização, através de análises microbiológicas e da tentativa de reconstituição do iogurte a partir do produto desidratado. Paralelamente, buscou-se avaliar a eficiência da separação do soro do iogurte por centrifugação, de forma a acelerar o processo de desidratação da fase sedimentada, comparando com o produto não centrifugado.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Material**

Para a produção dos iogurtes foram utilizados três tipos de cultura: iogurte natural e leite fermentado adquiridos no comércio local e cultura selecionada obtida através de uma empresa.

Foram analisados dois litros de cada tipo de iogurte produzido, os quais foram divididos em duas partes de um litro. Assim, um litro foi centrifugado e liofilizado e o outro somente liofilizado.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Elaboração dos iogurtes**

Os materiais utilizados para elaboração dos iogurtes foram todos esterilizados em autoclave, para evitar o desenvolvimento de outros microrganismos no iogurte.

Os iogurtes foram preparados utilizando-se 3 porções de 2 litros de leite UHT desnatado, adicionados de (1) 150g de iogurte natural, (2) um envelope de cultura selecionada de bactérias lácticas e (3) 150mL de leite fermentado, respectivamente.

Após a determinação do pH inicial das misturas, estas foram levadas à estufa por 90 minutos a 38°C. Após esse período, aumentou-se a temperatura da estufa para 42°C, permanecendo os produtos por mais 240 minutos até redução do pH para 4,8. Durante todo o processo foi determinado o pH das amostras em intervalos de 90 minutos.

#### **2.2.2 Centrifugação**

Amostras de cada tipo de iogurte foram centrifugadas por 10 minutos, a uma velocidade de 3.000 RPM (rotação por minuto), e o sobrenadante retirado com auxílio de pipetador automático.

Observou-se visualmente, após centrifugação, a separação de duas fases: uma de sedimentos e a outra sobrenadante de soro. Este procedimento teve por objetivo retirar o soro para acelerar e aumentar o rendimento do posterior processo de liofilização.

#### **2.2.3 Liofilização**

Amostras de iogurte, centrifugadas ou não, foram colocadas nas bandejas no liofilizador e, em seguida, acionado o congelamento da amostra. Após um período de 24 horas acionou-se o vácuo e, quando a temperatura das amostras atingiu aproximadamente 20°C, desligou-se o aparelho e retiraram-se as bandejas do

liofilizador. O produto desidratado foi embalado em sacos de polietileno, com a maior hermeticidade possível.

#### **2.2.4 Análise microbiológica**

A fim de verificar a viabilidade dos lactobacilos após o processo de liofilização, foi realizada a contagem de bactérias lácticas nas amostras utilizando-se o meio de cultura MRS.

Pesou-se 25g da amostra e adicionou-se 225mL de água peptonada a 0,1%. Após homogeneização em *bag mixer*, procedeu-se a preparação de uma série de diluições, inoculando-se em seguida 1ml de cada diluição em placas de petri estéreis, em duplicata. Após a adição do meio de cultura (com sobre-camada) e solidificação do mesmo, as placas foram incubadas a 30°C por cinco dias. Após este período, procedeu-se a contagem das placas de mesma diluição que contivessem entre 25 e 250 colônias, com auxílio de um contador de colônias.

#### **2.2.5 Teste de reconstituição do iogurte**

Utilizando os iogurtes liofilizados, fez-se a reconstituição deles para verificar a viabilidade das bactérias lácticas e a sua capacidade em reconstituir os iogurtes na forma líquida.

Para proceder ao processo de reconstituição, foram pesados, em balança analítica, 2 e 6g de cada iogurte liofilizado, adicionando-se cada amostra em 300 mL de leite UHT desnatado e incubando-se a 38°C por 90 minutos. Após esse tempo elevou-se a temperatura para 42°C por 240 minutos até o pH chegar a 4,8. A cada intervalo de 90 minutos mediu-se o pH.

#### **2.2.6 Determinação de extrato seco**

O extrato seco é representado pela gordura, açúcar, proteínas e sais minerais. Quanto maior esse componente no leite, maior será o rendimento dos produtos. Fizeram-se as determinações dos extratos secos liofilizados dos iogurtes naturais a partir de leite UHT integral e leite UHT desnatado utilizando metodologia descrita por Furtado (1975).

#### **2.2.7 Determinação da densidade**

Fizeram-se as determinações das densidades dos extratos secos do leite integral e do sedimento, utilizando um decímetro.

### 3 Resultados e Discussões

#### 3.1 Rendimento comparativo dos extratos secos obtidos por liofilização

A tabela 1 apresenta um estudo comparativo entre os liofilizados obtidos a partir de iogurtes naturais feitos a partir de leites UHT integral (conteúdo de gordura de 3%) e desnatado (conteúdo de 0,1% de gordura). Na referida tabela verifica-se que a percentagem de extrato seco liofilizado de iogurte natural obtido a partir do leite UHT integral é 2,48% superior ao extrato seco liofilizado de iogurte natural obtido a partir do leite UHT desnatado. Isto se deve ao fato de que a gordura é em grande parte transformada em pó durante o referido processo.

A tabela 1 evidencia, numa comparação direta entre os dois extratos secos acima citados, que a diferença entre ambos corresponde a exatamente 20,82% da massa seca. Esta diferença pode ser de gordura pura, o que pode comprometer a durabilidade e a estabilidade do produto liofilizado, pela susceptibilidade aumentada devido à oxidação lipídica. Assim, podemos indicar o uso de leite UHT desnatado para fabricar iogurtes que a seguir serão liofilizados para obter o produto em pó.

*Tabela 1. Diferenças percentuais comparativas entre os extratos secos de iogurtes liofilizados*

% de extrato	% de extrato	% de diferença	% de diferença
seco de iogurte	seco de iogurte	direta entre	comparativa
natural a partir	natural a partir	os dois extratos	entre os dois
de leite UHT	de leite UHT	secos	extratos
integral	desnatado		secos
11,86	9,38	2,48	20,82

#### 3.2 Ensaios e resultados da centrifugação do iogurte

Foi observada visualmente a separação de duas fases, uma fase de sedimentos, e a outra fase sobrenadante de soro. A Tabela 2 abaixo evidencia a quantidade de sedimentos e soro que pode ser separada por centrifugação, sendo possível separar de 40% a 61% de soro, dependendo do tipo de iogurte.

Tabela 2. Porcentagem das fases separadas pelo processo de centrifugação

	Iogurte Natural	Cultura Seleccionada	Leite Fermentado
% de sedimentos	58,90	39,23	53,14
% de soro	41,10	60,77	46,86

### 3.3 Ensaios de densidade dos extratos secos de iogurtes

Na Tabela 3, verifica-se que as densidades do extrato seco do sedimento liofilizado, para todos os iogurtes estudados, são maiores quando comparadas àquelas dos iogurtes liofilizados sem a prévia centrifugação. Este fato pode estar relacionado a um “empacotamento” maior das bactérias no iogurte submetido à centrifugação.

Tabela 3. Densidade comparativa dos extratos secos

	Iogurte Natural	Cultura Seleccionada	Leite Fermentado
Densidade em g/ml	Integral 0,30	0,23	0,32
	Sedimento 0,31	0,35	0,34

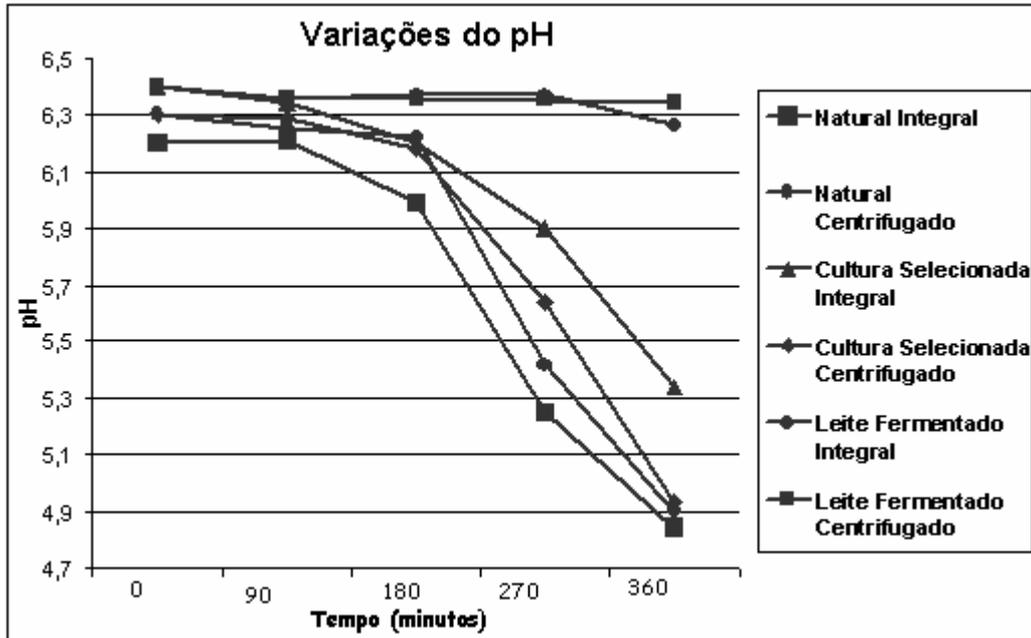
### 3.4 Reconstituição dos iogurtes a partir do produto liofilizado

Com o objetivo de verificar a viabilidade/sobrevivência das bactérias lácticas após a liofilização, procedeu-se a reconstituição dos iogurtes a partir dos produtos liofilizados.

As bactérias viáveis fermentam a lactose, produzindo ácido láctico, o que resulta em uma queda no pH do produto.

A figura 1 evidencia esta queda de pH, indicando a viabilidade das bactérias lácticas.

Figura 1. Variação do pH, durante o período de incubação, dos diferentes iogurtes liofilizados e reconstituídos



Podemos observar que, na reconstituição do iogurte natural a partir do seu liofilizado, a queda de pH ocorreu mais rapidamente do que nas outras amostras, indicando uma maior atividade (produção de ácido láctico) das bactérias lácticas presentes no iogurte natural.

O liofilizado proveniente do iogurte obtido a partir de uma cultura seleccionada também proporcionou uma queda satisfatória do pH, embora não tão expressiva como no iogurte natural. Já a reconstituição do leite fermentado a partir do seu liofilizado não foi bem sucedida, como podemos verificar através do pH, que não teve a queda esperada.

As figuras 2, 3 e 4 ilustram a variação do pH de cada amostra individualmente, reconstituídas.

Figura 2. Variação do pH em função do tempo para amostras do iogurte natural

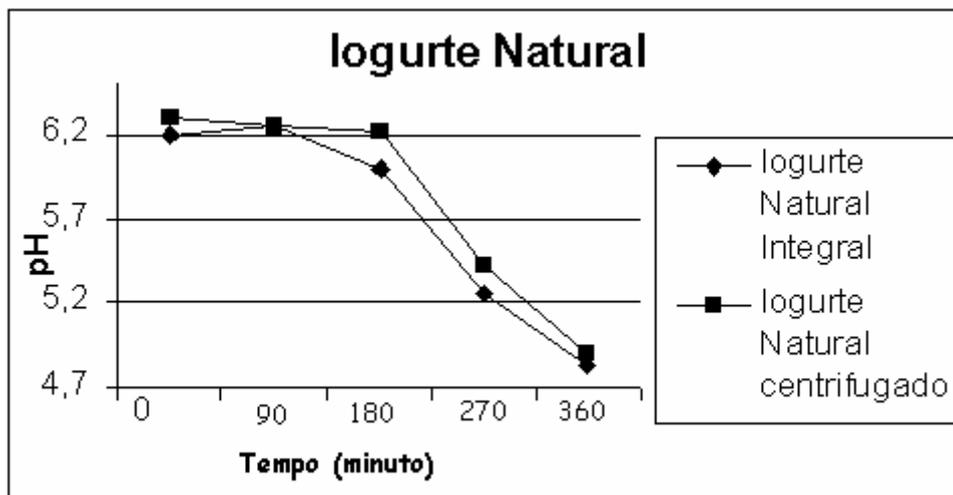


Figura 3. Variação do pH em função do tempo para amostras da cultura selecionada

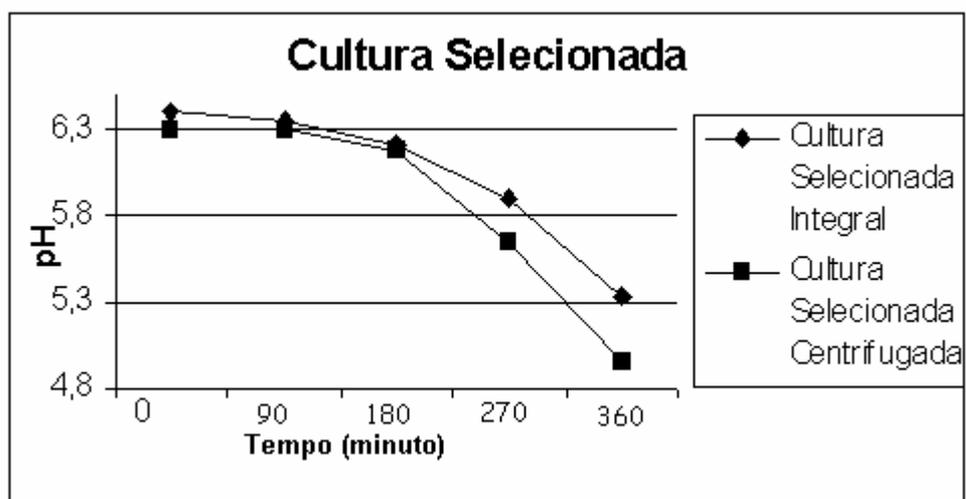
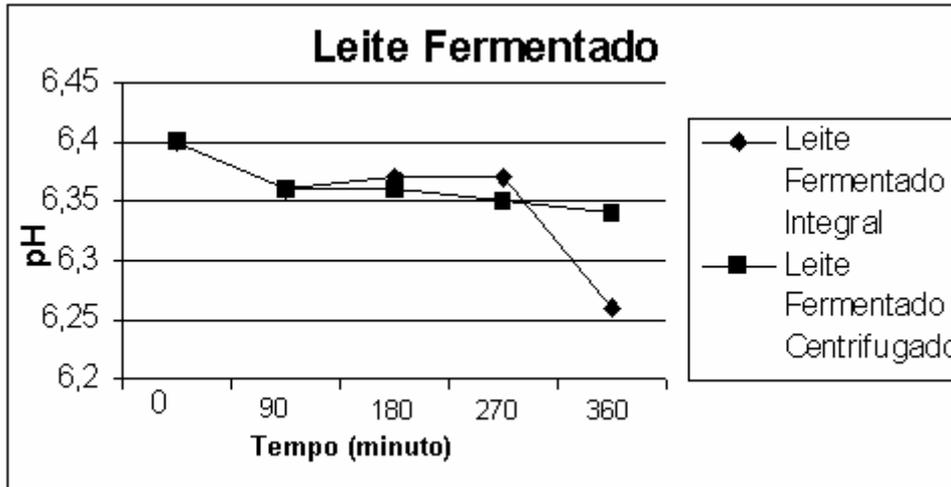


Figura 4. Variação do pH em função do tempo para amostras de leite fermentado

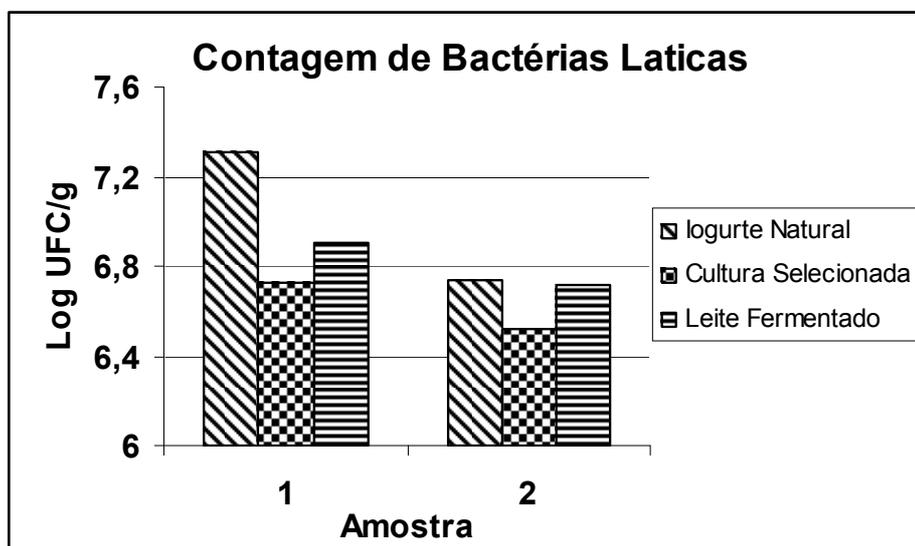


### 3.5 Contagem de bactérias lácticas nos iogurtes liofilizados

A figura 5 mostra as contagens de bactérias lácticas obtidas nos seis grupos de iogurtes liofilizados. Podemos observar que, de maneira geral, as contagens de bactérias lácticas foram superiores nos iogurtes liofilizados em que não houve a centrifugação antes da liofilização. Isto é um indicativo de que parte das bactérias lácticas possam ter permanecido no sobrenadante resultante do processo de centrifugação, porção esta que foi desprezada.

As contagens de bactérias lácticas foram maiores no iogurte natural, em comparação ao iogurte obtido de leite fermentado, que por sua vez foi superior aquele obtido de cultura selecionada. No liofilizado de iogurte natural não centrifugado, esta contagem foi superior a sete (7) ciclos logarítmicos ( $\text{Log UFC/g} = 7,31$ ), enquanto no liofilizado de iogurte obtido a partir de cultura selecionada este valor foi de 6,73 ( $\text{Log UFC/g}$ ).

Figura 5. Contagem de bactérias lácticas (Log UFC/g) no liofilizado obtido a partir de: Iogurte Natural, Cultura Seleccionada, Leite Fermentado, amostras (1) centrifugado e amostras (2) não centrifugado



#### 4 Conclusões

Tendo em vista os objetivos propostos no planejamento dos ensaios e baseando-se nos resultados obtidos, podemos concluir que:

É possível obter bactérias lácticas viáveis através da liofilização de vários tipos de iogurte.

Os produtos liofilizados, tanto previamente centrifugados como na sua forma integral, são capazes de reconstituir o iogurte líquido, podendo ser utilizados como culturas para a produção de iogurte, na proporção de 2 gramas para cada 300 mililitros de leite. Esta conclusão é válida somente para o iogurte natural e para o iogurte obtido a partir de cultura seleccionada. A reconstituição do iogurte a partir do leite fermentado não foi possível, provavelmente devido à necessidade de multiplicação por repicagens sucessivas, anteriores à reconstituição do leite fermentado.

O liofilizado de iogurte natural foi o que apresentou as maiores contagens de bactérias lácticas e a melhor reconstituição do iogurte na sua forma líquida. Isso é particularmente interessante, já que o iogurte natural pode ser facilmente adquirido, a baixo custo.

A centrifugação prévia dos iogurtes foi capaz de separar grande parte do líquido presente, cerca de 50%, e isto se traduz em um melhor aproveitamento do espaço físico no liofilizador.

Ainda, através dos resultados obtidos nos estudos com iogurte, abre-se uma perspectiva para novas pesquisas, visando o estudo da viabilidade da aplicação dos liofilizados, especialmente aquele obtido do iogurte natural, na ração de frangos, como probióticos.

## 5 Agradecimentos

À Escola Agrotécnica Federal de Concórdia, EMBRAPA Suínos e Aves de Concórdia – SC, BATAVIA S.A Unidade Industrial de Concórdia – SC.

## 6 Referências

- [1] EVANGELISTA, JOSÉ. *Tecnologia de Alimentos*. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
- [2] RAUSCH, CLEITON. O que são os lactobacilos vivos. *Revista Superinteressante*, Agosto de 2002. Edição 179. p. 27.
- [3] DAVE, R.I.; SHAH, N.P. *Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt*. J. Dairy Science, v. 81, p. 2804-2816, 1998.
- [4] SABOYA, V. LUCIANA; ET AL. *Propriedades Profiláticas e Terapêuticas de Leites Fermentados - Uma Revisão*. Artigo Técnico. Bol. SBCTA, 31 (2): Julho a Dezembro. 1997. p. 176-185.
- [5] FURTADO, J.P. *Análises bromatológicas*. Juiz de Fora, Universidade Federal de Juiz de Fora, 1975. 79p.
- [6] SAAD, Susana Marta Isay. *Probióticos e prebióticos: o estado da arte*. Rev. Bras. Cienc. Farm. [online]. jan./mar. 2006, vol.42, no.1 [citado 14 Julho 2006], p.1-16. Disponível na World Wide Web:<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S151693322006000100002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151693322006000100002&lng=pt&nrm=iso)>. ISSN 1516-9332.