



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018007657-4 A2



(22) Data do Depósito: 16/04/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 29/10/2019

(54) Título: PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR

(51) Int. Cl.: A23C 9/127.

(52) CPC: A23C 9/127.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ELIZANDRA DOS SANTOS SILVA; ERILANE DE CASTRO LIMA MACHADO; CELIANE GOMES MAIA DA SILVA.

(57) Resumo: PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR. A presente patente de invenção refere-se a um processo de adição de agente crioprotetor, a partir da sacarose, em Kefir de leite fermentado, exclusivamente, por grãos de Kefir e produção do pó deste Kefir. Isto pode ser obtido através da liofilização do Kefir de leite crioprotetado por sacarose, caracterizando um produto com boa viabilidade celular, maior estabilidade e flexibilidade para consumo, vida útil prolongada, e de fácil transporte e armazenamento, quando comparado a bebida in natura. Esta invenção está situada na área de biotecnologia e engenharia dos alimentos. O pó obtido apresentou baixos valores de atividade de água e umidade, permitindo a sua classificação como um produto desidratado. Quanto aos parâmetros físico-químicos os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios (cinzas 3,06 g.100 g⁻¹, pH 3,46, acidez 5,439 g.100 g⁻¹ de ácido láctico, lactose 12,193 g.100 g⁻¹, proteína 13,97 g.100 g⁻¹, lipídeos 10,10 g.100 g⁻¹ e carboidratos 68,61 g.100 g⁻¹). Em relação a contagem de micro-organismos, o Kefir liofilizado apresentou elevadas taxas de sobrevivência tanto de bactérias (de 97 % à 97,71 %) quanto de leveduras (89,63 %), elucidando o potente efeito crioprotetor da sacarose na manutenção da viabilidade celular de micro-organismos do Kefir, além (...).

“PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E
PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se a um produto composto por Kefir de leite liofilizado com potencial efeito probiótico, a partir da crioproteção por sacarose. Este produto é obtido através da liofilização de kefir advindo de leite pasteurizado fermentado por grãos de Kefir adicionado de sacarose como agente crioprotetor, caracterizando um produto com boa viabilidade celular, maior estabilidade e flexibilidade para consumo, vida útil prolongada, e de fácil transporte e armazenamento, quando comparado a bebida *in natura*. Esta invenção se situa na área de biotecnologia e engenharia dos alimentos.

Antecedentes da Invenção

[002] O Kefir é uma bebida fermentada probiótica composta por uma simbiose de bactérias e leveduras envolvidas em uma matriz polissacarídica solúvel, denominada Kefiran. O processo fermentativo do Kefir de leite ocorre, exclusivamente, pelos grãos de Kefir em leite reconstituído a 20-25 °C durante 24h. Após a fermentação, a bebida apresenta consistência cremosa e sabor ligeiramente ácido (LOPITZ-OTSOA et al., Rev Iberoam Micol, 23: 67-74, 2006; MAGALHÃES et al., Braz J Microbiol, 42: 693–702, 2011; KÖK-TAS et al., J Dairy Sci, 96: 780-789, 2013). Entretanto, por se tratar de micro-organismos vivos, alimentos probióticos, como o Kefir, são instáveis e para minimizar tal instabilidade e manter a viabilidade celular, procedimentos de secagem têm sido utilizados objetivando aumentar a estabilidade e a concentração celular, maior flexibilidade para o consumo e menor custo de armazenamento, entre estas a secagem por liofilização (SOUZA et al., Alimentos e Nutrição, 22: 231-237, 2011; PRISCO; MURIELO, Trends Food Sci. Technol., 48: 27-39, 2016).

[003] A liofilização é o meio mais eficaz de se obter produtos desidratados com alta qualidade sensorial e com boa viabilidade celular (ATALAR; DERVISOGLU, LWT – Food Sci. Technol., 60: 751-757, 2015). Embora seja um processo de alto custo, a compensação vem pela facilidade da manutenção e do armazenamento das culturas e garantia da estabilidade das características morfológicas e bioquímicas das células estocadas (muitas de alto valor agregado), além da não necessidade de manuseamento e estocagem do produto em local refrigerado. Entretanto, a etapa que antecede a liofilização consiste no congelamento da amostra a baixas temperaturas, o que pode causar lioinjúrias celular irreversíveis, contudo, é possível fazer uso da crioproteção para minimizar tais efeitos negativos, sendo um dos maiores desafios da criopreservação realizar um congelamento com menores danos celulares (AGUIAR et al., Acta Vet. Bras., 6: 80-93, 2012).

[004] Os agentes crioprotetores atuam prevenindo a cristalização ao reduzir a atividade de água. Na criomicrobiologia, o glicerol é o principal álcool utilizado que atua penetrando na membrana celular através da difusão passiva. Todavia, alguns açúcares, como a sacarose, a maltose, a frutose e a maltodextrina, têm se mostrado capazes de atuar como agentes crioprotetores (AGUIAR et al., Acta Vet. Bras., 6: 80-93, 2012).

[005] A sacarose tem sido frequentemente utilizada para a criopreservação de micro-organismos em concentrações variando de 1 a 68%, crioprotegendo o produto através de alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática (AGUIAR et al., Acta Vet. Bras., 6: 80-93, 2012). Ademais, se o alimento puder ser formulado ou acrescido com carboidratos, a temperatura de transição vítrea aumenta e, sendo este aumento acima da temperatura de estocagem, a estabilidade e a vida de prateleira dos produtos aumentarão. Suportando ainda mais o uso de carboidratos típicos como sacarose com agente crioprotetor (KENNEDY, Managing frozen foods. Cambridge: CRC Press, pp. 263-278, 2000).

[006] A literatura apresenta documentos de patente compreendendo processos e métodos de preparo e obtenção de Kefir como EP 0148300 B1, AU 611163 B2, EP 0346884 B1, RU 2098976 C1, JP S60164433 A. Estes documentos diferem da presente

invenção por não apresentarem um processo para produção de um produto em pó estável por um maior período de tempo.

[007] As patentes US 0221469 A1, WO 097820 A2, US 0028696 A1, US 0281904 A1 descrevem o efeito do Kefir, como probiótico, na prevenção e recuperação de condições patológicas. Estes documentos diferem da presente invenção por não apresentarem o uso de Kefir em pó nem apresentam um processo para obtenção de um produto em pó.

[008] A patente PI 0905590-8 descreve o processo de imobilização de micro-organismos de Kefir a partir da formação de microcápsulas de alginato de cálcio. O documento difere da presente invenção por não apresentar um processo de obtenção de um produto em pó liofilizado.

[009] A patente PI 1001541-8 descreve o processo de preparo de um produto simbiótico a partir de soro de leite em pó, grãos de Kefir, cultura de Kefir liofilizada e bagaço de laranja, obtendo um produto desidratado em estufa. O documento difere da presente invenção por apresentar uma bebida que não foi fermentada exclusivamente por grãos de Kefir e não apresenta um produto em pó liofilizado.

[010] US 4797290 A descreve o processo de produção de iogurte de Kefir liofilizado a partir da inoculação do leite com uma cultura iniciadora fúngica de Kefir. O documento difere da presente invenção por não apresentar o uso de crioprotetores e pelo produto submetido a liofilização não caracterizar uma bebida fermentada por grãos de Kefir, mas sim por uma cultura iniciadora.

[011] A patente WO 087722 A1 descreve a obtenção de pó de Kefir de soja produzido pela fermentação de leite de soja com grãos de Kefir, utilizando o método de secagem por *spray drying*. O documento difere da presente invenção por além de referir um Kefir fermentado em leite de soja, o pó obtido foi pelo método de atomização e não por sublimação sob vácuo.

[012] O artigo científico publicado por Kok-Tas (Int. J. Dairy Technol., 68: 434-440, 2015) descreve a liofilização de grãos de Kefir sem a adição de crioprotetores. O

documento difere da presente invenção pela liofilização dos grãos de Kefir e não da bebida fermentada, como também pela ausência do uso de agentes crioprotetores.

[013] O artigo científico publicado por Atalar et al. (LWT – Food Sci. Technol., 60: 751-757, 2015) descreve a secagem de Kefir por atomização, onde no final o produto obtido não apresentou sobrevivência celular de leveduras pela alta temperatura empregada nesta metodologia. O documento difere da presente invenção por tratar-se de um produto desidratado por atomização e não por liofilização.

[014] Baseado no apresentado no estado da técnica, se observa que a matéria que se pretende proteger neste documento de patente se apresenta como nova.

Descrição da Invenção

[015] Primeiramente, o leite integral pasteurizado foi aquecido preferencialmente a 90 °C por pelo menos 5 minutos, em seguida, houve o resfriamento do mesmo até se atingir a temperatura de pelo menos 25 °C, temperatura na qual foi realizada a inoculação dos grãos de Kefir, na concentração de, pelo menos, 5% (p/v). O processo de fermentação ocorreu sem agitação com temperatura entre 20 e 27 °C, preferencialmente a 25 °C, entre 18 e 24h, preferencialmente 24h. Após este período, o Kefir foi maturado sob refrigeração (8 ± 2 °C) por pelo menos 24 horas antes da liofilização.

[016] Para a obtenção do Kefir em pó, o agente crioprotetor (sacarose) foi esterilizado por 15 minutos, e adicionado ao Kefir fermentado (concentração de 5 a 10% (p/v), preferencialmente a 10%). A mistura foi homogeneizada, em seguida, congelada em *overnight* (durante 12 h), posteriormente foi realizada a secagem que pode ser preferencialmente em liofilizador, com temperatura de -50 °C e vácuo de 100 mT. O Kefir em pó foi obtido e armazenado em ambiente estéril pronto para consumo. A taxa de sobrevivência celular foi obtida através da reidratação dos pós e posterior contagem em placas contendo meios MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) e M17 para bactérias e em meio YGC (Extrato de leveduras, glicose e cloranfenicol) para leveduras.

[017] Dependendo das características do produto a ser desidratado, diferentes tipos de agentes crioprotetores podem ser utilizados para evitar a lioinjúria celular

incluindo os penetrantes ou intracelulares, como metanol, etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilformaldeído, metilacetamida, DMSO e glicerol e crioprotetores não penetrantes ou extracelulares, como os mono, oligo e polissacarídeos, manitol, sorbitol, dextrana, metilcelulose, polietilenoglicol. Além de trealose, leite desnatado, inositol, rafinose, glicose e lactose, entre outros. Salientando que, as diferenças de permeabilidade afetam os mecanismos pelos quais ocorre a proteção ao material biológico (AGUIAR et al., Acta Vet. Bras., 6: 80-93, 2012).

[018] Em relação a sacarose, esta encontra-se entre os principais agentes crioprotetores utilizados para a criopreservação de micro-organismos, sua eficácia se dá devido a promoção de alterações na permeabilidade ao induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do meio interno da célula para o externo. Além disso, promove o aumento da transição vítrea que ao tornar-se acima da temperatura de estocagem, a estabilidade e a vida de prateleira dos produtos aumentam, além de apresentar custo relativamente baixo e ser comercialmente disponível (AGUIAR et al., Acta Vet. Bras., 6: 80-93, 2012).

Exemplo 1. Caracterização físico-química do Kefir em pó e viabilidade celular

[019] O Kefir de leite liofilizado apresentou valores para A_w (0,291) e umidade (4,25 %) que permitem que o pó obtido seja classificado como um produto desidratado. Vale salientar que, baixos valores de atividade de água são importantes na preservação de alimentos, pois significa que o produto dispõe de pouca água livre para a ocorrência de reações químicas e biológicas indesejáveis (OLIVEIRA; BRANDÃO; SILVA, Food Eng. Rev., 8:134-163, 2016).

[020] Houve um declínio do pH (3,46). Os demais parâmetros analisados: cinzas (3,06 g.100 g⁻¹), acidez (5,439 g.100 g⁻¹ de ácido láctico), lactose (12,193 g.100 g⁻¹), proteína (13,97 g.100 g⁻¹), lipídeos (10,10 g.100 g⁻¹) e carboidratos (68,61 g.100 g⁻¹) apresentaram valores mais elevados do que a bebida fermentada *in natura*, sendo estes resultados esperados devido a retirada de água e consequente concentração dos constituintes do produto durante a secagem, elucidando o potencial efeito de manutenção da qualidade de alimentos submetidos a liofilização.

[021] A contagem de células viáveis de bactérias foi de 7,24 e 9,17 UFC/g nos meios MRS e M17, respectivamente, o que representa uma taxa de sobrevivência celular de 97,71 % e 97 %, elucidando o potente efeito crioprotetor da sacarose na manutenção da viabilidade celular de bactérias do Kefir. Já a contagem de células viáveis de leveduras em meio YGC apresentou valores de 5,79 UFC/g, ou seja, 89,63 % de sobrevivência à liofilização, Atalar et al. (2015) ao promoverem secagem de Kefir por *spray drying* não observaram sobrevivência de leveduras, demonstrando que a secagem por atomização exerce efeito negativo na viabilidade destes micro-organismos devido a sua sensibilidade térmica. O resultado obtido no presente pedido de patente demonstra que a liofilização é um processo adequado para desidratação de produtos contendo leveduras.

[022] Estes resultados sugerem que o produto desenvolvido apresenta boa composição centesimal e viabilidade celular satisfatória para desempenhar potenciais efeitos probióticos com boas perspectivas de mercado caso fosse comercializado.

REIVINDICAÇÕES

1. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR” **caracterizado pela** obtenção de grãos de Kefir de leite, fermentado em leite integral, pasteurizado para obtenção de uma bebida probiótica fermentada, em seguida, esta bebida foi maturada sob refrigeração e crioprotegida para ser congelada e submetida ao processo de secagem por liofilização para obtenção de um Kefir em pó com potencial efeito probiótico.
2. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** aquecimento do leite integral pasteurizado a 90 °C por pelo menos 5 minutos e resfriado até pelo menos 25 °C, sendo fermentado, sem agitação, por grãos de Kefir na concentração de pelo menos 5 % (p/v), entre 18 e 24 horas com temperatura entre 20 e 27 °C.
3. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** homogeneização da bebida fermentada com o crioprotetor, esterilizado, na concentração entre 5 e 10 %, sendo congelado por pelo menos 24 horas.
4. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo de secagem para a obtenção de um Kefir de leite em pó.
5. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”, de acordo com a reivindicação 1 e 4, **caracterizado pelo** agente crioprotetor compreender a sacarose.
6. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”, de acordo com a reivindicação 1 e 4, **caracterizado pelo** processo de secagem compreender liofilização conforme descrito no relatório descritivo para obtenção do pó.
7. “PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR” **caracterizado pelo** produto ser um Kefir em pó

com potencial efeito probiótico a partir da manutenção da viabilidade celular de uma simbiose de bactérias e leveduras.

RESUMO

“PROCESSO DE ADIÇÃO DE AGENTE CRIOPROTETOR EM KEFIR DE LEITE E PRODUÇÃO DO PÓ DO KEFIR”. A presente patente de invenção refere-se a um processo de adição de agente crioprotetor, a partir da sacarose, em Kefir de leite fermentado, exclusivamente, por grãos de Kefir e produção do pó deste Kefir. Isto pode ser obtido através da liofilização do Kefir de leite crioprotetido por sacarose, caracterizando um produto com boa viabilidade celular, maior estabilidade e flexibilidade para consumo, vida útil prolongada, e de fácil transporte e armazenamento, quando comparado a bebida *in natura*. Esta invenção está situada na área de biotecnologia e engenharia dos alimentos. O pó obtido apresentou baixos valores de atividade de água e umidade, permitindo a sua classificação como um produto desidratado. Quanto aos parâmetros físico-químicos os resultados obtidos apresentaram-se satisfatórios (cinzas 3,06 g.100 g⁻¹, pH 3,46, acidez 5,439 g.100 g⁻¹ de ácido láctico, lactose 12,193 g.100 g⁻¹, proteína 13,97 g.100 g⁻¹, lipídeos 10,10 g.100 g⁻¹ e carboidratos 68,61 g.100 g⁻¹). Em relação a contagem de micro-organismos, o Kefir liofilizado apresentou elevadas taxas de sobrevivência tanto de bactérias (de 97 % à 97,71 %) quanto de leveduras (89,63 %), elucidando o potente efeito crioprotetor da sacarose na manutenção da viabilidade celular de micro-organismos do Kefir, além de demonstrar que a liofilização é um processo adequado para desidratação de produtos contendo um complexo simbiótico de bactérias e leveduras, como o Kefir, dada a sobrevivência das mesmas durante o processo.