UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Luciana Cecília Maganha

Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado

Pirassununga
2010

Luciana Cecília Maganha

Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Pirassununga

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

M188e

Maganha, Luciana Cecília
Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado / Luciana Cecília Maganha. -- Pirassununga, 2010.
62 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira.

1. Leite fermentado 2. Sólidos totais 3. Probióticos 4. Qualidade 5. Leite. I. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Reinaldo e Ana Cecília, pelo amor, dedicação e todo apoio que sempre me deram, por sempre terem sido um exemplo para mim em todos os aspectos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela minha vida e por ter me fortalecido e guiado durante todos os momentos mais importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela orientação e oportunidade.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

À Pesquisadora Patrícia Blumer Zacharchenco, por toda a ajuda, conselhos e paciência que teve comigo. Sua colaboração foi essencial.

À Profa. Dr. Carmen Sílvia Fávaro Trindade, pela ajuda em algumas análises e concessão de alguns materiais.

À Profa. Judite Lapa Guimarães pela colaboração e orientação quanto as análises sensoriais.

Aos funcionários do Laticínio da Universidade de São Paulo – USP Pirassununga, Fábio e Sr. Osvaldo, pela colaboração e ajuda na produção dos leites fermentados experimentais.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga – USP, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À Diane, Keliane, Carolina e Estela pelo companheirismo e ajuda na realização deste projeto.

Às minhas irmãs Cristiane e Patrícia, por estarem sempre presentes na minha vida, compartilhando angústias e felicidades.

Às minhas queridas amigas Rebeka Tomasin e Patrícia Braga pela amizade mais do que sincera, essencial e imprescindível, que sobreviveu mesmo a distância, e que se fortalece a cada dia que passa. Obrigada por tudo.

À Roice Eliana Rosim, técnica do LMMA, por sua paciência, amizade e essencial ajuda nas análises laboratoriais.

Ao Marcelo Thomazini, técnico do Laboratório de Produtos Funcionais, pela ajuda em algumas análises laboratoriais.

Aos professores e funcionários dos departamentos de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela amizade e convívio durante todos esses anos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho o mais profundo agradecimento.

RESUMO

MAGANHA, L.C. **Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inclusão de leite em pó desnatado e de açúcar sobre a viabilidade de microrganismos probióticos e a qualidade do leite fermentado desnatado. Para isso, foram constituídos 8 tratamentos, a saber: 1. leite desnatado (LD) e padronizado com 0,2% de gordura (LD 0,2%G); 2. LD 0,2%G + 5% de leite em pó (Lp); 3. LD 0,2%G + 10% de Lp; 4. LD 0,2%G + 15% de Lp; 5. LD 0,2%G + 5% de Lp + 10% de açúcar (A); 6. LD 0,2%G + 10% de Lp + 10% de A; 7. LD 0,2%G + 15% de Lp + 10% de A; 8. LD 0,2%G + 10% de A. Foi preparada a cultura láctea mista DVS ABT-4 (Chr-Hansen) contendo *Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium animalis e Lactobacillus acidophilus*, que foi aplicada em todos os tratamentos para a fermentação e produção do leite fermentado. O produto foi então envasado e armazenado a 5ºC para as análises subseqüentes. Os leites fermentados foram submetidos à avaliação físico-química, microbiológica e sensorial nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. Os resultados mostraram que todos os tratamentos permaneceram de acordo com a legislação brasileira no que diz respeito aos aspectos físico-químicos, além de os mesmos terem permanecido constantes durante os 21 dias de armazenamento, com exceção do pH, que diminuiu nos dias seguintes a fabricação em decorrência da pós-acidificaçao dos leites fermentados. Quanto às características microbiológicas, observou-se maiores contagens nos tratamentos com maior teor de leite em pó (tratamentos 3, 4, 6 e 7), principalmente para as bactérias probióticas, com diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos. Entretanto, a adição de açúcar não interferiu nas contagens de probióticos dos leites fermentados. As contagens microbiológicas permaneceram constantes durante todos os 21 dias de armazenamento. O tratamento 6 (LD 0,2%G + 10% de Lp + 10% de A) foi o que obteve melhores notas na avaliação sensorial nos dias 1, 10 e 21 de armazenamento, indicando ser esta formulação a melhor dentre as estudadas para a aceitação do produto com maior viabilidade de bactérias probióticas.

Palavras-chave: Leite fermentado; sólidos totais; probióticos; qualidade; leite.

ABSTRACT

MAGANHA, L.C. **Effect of milk powder and sugar inclusion on the viability of probiotic bacteria in fermented skim milk.** MSc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

The aim of this study was to evaluate the effect of skimmed milk powder and sugar inclusion on the viability of probiotic microorganisms and on the quality of skimmed fermented milk. Eight different treatments were prepared: 1. Skimmed and standardized milk (SM) at 0,2% of fat (SM 0,2%F); 2. SM 0,2%F + 5% of milk powder (MP); 3. SM 0,2%F + 10% MP; 4.SM 0,2%F + 15% MP; 5. SM 0,2%F + 5% MP + 5% of sugar (S); 6. SM 0,2%F + 10% MP + 5% S; 7. SM 0,2%F + 15%MP + 10%S; 8. SM 0,2%F + 10%S. The mixed lactic culture DVS ABT-4 (Chr-Hansen) containing *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* was prepared and placed in all the treatments for the fermented milk fermentation and production. The product was bottled and stored at 5°C for the subsequent analyses. The fermented milks were submitted to physical-chemical, microbiological and sensory analyses on the 1st, 10th and 21st days after production. Results for the physic-chemical analyses showed that all the treatments comprised the requirements as adopted in Brazilian regulations. All the physical-chemical variables were constant during the 21 days of storage, except for the pH, which decreased during storage because of the fermented milks post-acidification. For the microbiological analyses, greater numbers, especially the probiotic bacteria, were obtained in treatments with higher milk powder content (treatments 3, 4, 6 and 7), with significant statistical differences among all the treatments. However, the sugar addition did not interfere with the recovery of probiotic bacteria in the fermented milks. The microbiological data were constant during the 21 days of storage. Results obtained in the sensory analyses showed that treatment 6 was the one with higher grades on days 1, 10 and 21 of storage, hence indicating that this composition is the best one among those studied for acceptability of the product with greater viability of probiotic bacteria.

Keywords: fermented milk; total solids; probiotics; quality; milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Leites fermentados armazenados a 5°C em camara fria. 31

Figura 2. Leites fermentados sendo envasados. 31

Figura 3. Preparaçao dos materiais necessários para sequencia das análises microbiológicas.32

Figura 4. Modelo de ficha utilizada durante a análise sensorial. 34

Figura 5. Entrega de amostras dos leites fermentados a um provador durante a análise sensorial. 35

Figura 6. Médias obtidas para as contagens de *Streptococcus thermophilus* para os oito tratamentos, nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. 41

Figura 7. Foto de placa de petri contendo colônias de *Streptococcus thermophilus* 42

Figura 8. Médias obtidas para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* para os oito tratamentos, nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. 43

Figura 9. Foto de placa de petri contendo colônias de *Lactobacillus acidophilus*. 44

Figura 10 Médias obtidas para a contagem de *Bifidobacterium animalis* para os oito tratamentos, nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. 46

Figura 11. Foto de placa de petri contendo colônias de *Bifidobacterium animalis*. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físico-químicas definidas para leites fermentados. 21

Tabela 2. Médias físico-químicas obtidas nos oito tratamentos avaliados,assim como o erro padrão médio para estas variáveis nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação..... 37

Tabela 3. Médias das contagens microbiológicas obtidas nos oito tratamentos avaliados, assim como o erro padrão médio para estas variáveis, nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. 40

Tabela 4. Médias das notas atribuídas pelos provadores aos leites fermentados nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Açúcar
AOAC	Association of Official Analitycal Chemists
BA	*Bifidobacterium animalis*
EPM	Erro padrão médio
FZEA	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g	Grama
G	Gordura
IDF	International Dairy Federation
IN 46	Instrução Normativa n. 46
IN 51	Instrução Normativa n. 51
LA	*Lactobacillus acidophilus*
LFD	Leite Fermentado Desnatado
LMMA	Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos
L	Litros
log	logarítmo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
NNC	Nitrogenio nao-caseinoso
NNP	Nitrogenio nao-protéico
NT	Nitrogenio Total
USP	Universidade de São Paulo
UHT	Ultra High Temperature
UFC	Unidade formadora de colônia
ST	*Streptococcus thermophilus*
T1	Tratamento 1

T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
T5	Tratamento 5
T6	Tratamento 6
T7	Tratamento 7
T8	Tratamento 8

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus centígrados
m	Massa
µ	Micro
v	volume
=	Igual
>	Maior
®	Marca Registrada
±	Mais ou menos
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01

2. REVISÃO DA LITERATURA 04

2.1 . Leites Fermentados: Definições e Aspectos Históricos 04

2.2. Tecnologia de produção de leites fermentados 05

2.3. Probióticos : Definições e aspectos mercadológicos 07

2.4. Características das bactérias ácido-lácticas 09

2.4.1 Culturas Iniciadoras (*Starters*) 09

2.4.2 Bifidobactérias 11

2.4.3. *Lactobacillus acidophilus* 13

2.5 Efeitos terapêuticos de probióticos e mecanismos de ação 15

2.6. Interações entre culturas de bactérias ácido-lácticas 17

2.7. Normas legais referentes aos leites fermentados e probióticos 19

2.8. Viabilidade das bactérias probióticas em leite fermentado 22

3. OBJETIVOS 28

3.1 Objetivo Geral 28

3.2 Objetivos Específicos 28

4. MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1. Delineamento experimental 29

4.2. Matérias-primas utilizadas no experimento 29

4.3. Preparação das culturas lácteas 30

4.4. Preparação do iogurte 30

4.5. Caracterização da população de bactérias ácido-lácteas (BAL) no iogurte 32

4.6. Avaliação físico-química do Leite Fermentado 33

4.7. Avaliação sensorial dos leites fermentados 33

4.8. Análise dos Resultados 35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

5.1 Análise físico-química 36

5.2 Análise Microbiológica 39

5.3 Análise Sensorial 50

6. CONCLUSÕES 53

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

1. INTRODUÇÃO:

Entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substancias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição de pH do leite, ou reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante ação de microrganismos específicos. Estes microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007).

O leite fermentado é um produto comprovadamente reconhecido como de alta qualidade organoléptica, e é considerado um ”produto vivo” uma vez que contém até cinco bilhões de células por grama. As bebidas lácteas com baixo grau de acidez são as que se adaptam melhor ao paladar brasileiro e foram responsáveis pelo crescimento de cerca de 17% no mercado de iogurtes em 2005, tendo movimentado cerca de R$ 2 bilhões neste segmento (AZEVEDO, 2006; TEIXEIRA, 2002).

A tecnologia de fabricação do leite fermentado envolve várias etapas de elaboração: obtenção da matéria-prima, padronização do teor de gordura do leite e ajuste dos sólidos não gordurosos (SNG), se necessário, homogeneização, tratamento térmico, inoculação e por último o envasamento do produto final. É importante destacar que a matéria-prima deve apresentar alta qualidade bacteriológica, para que possa proporcionar um meio inócuo ao desenvolvimento da cultura. Está deve conter baixa concentração microbiana, inexistência de enzimas ou substâncias químicas interferentes e antimicrobianas (BRANDÃO, 1995).

A produção em condições assépticas é essencial para evitar riscos de contaminação por microorganismos patogênicos ou deteriorizantes. Para a sua produção, rotineiramente emprega-se um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp*., *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e/ou outras bactérias

ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007).

Relativamente aos aspectos do consumo de leites fermentados, um dos fatores que mais contribuíram para a crescente aceitação do produto é atribuição de efeitos benéficos à saúde humana, desde que foi postulados pelo pesquisador Elie Metchnikoff no início dos anos 1900 (SPREER, 1991). A vantagem mais concreta sobre a saúde associada ao consumo de leites fermentados é a redução da má absorção da lactose em casos de pessoas alérgicas a este componente do leite. Outro fator de igual relevância é a influência sobre parâmetros imunológicos, além de indícios no auxílio ao funcionamento do intestino (SAAD, 2006).

Tais vantagens à saúde trazidas pela ingestão de leites fermentados podem ser confirmadas e/ou potencializadas através da incorporação de microrganismos probióticos. Os probióticos eram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos que afetam beneficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal. Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (SANDERS, 2003). Entretanto, a definição atualmente aceita internacionalmente é que eles são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). Os Produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e considerados prioridade de pesquisa em diversos países. A valorização dos alimentos funcionais no mercado mundial está estimulando a inovação de produtos alimentícios, gerando, deste modo, uma grande oportunidade para incentivar o consumo de alimentos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas. (SACCARO, 2008).

No estudo das bactérias probióticas e de seus benefícios, destaca-se o uso da *Bifidobacterium* spp. O uso de *Bifidobacterium* spp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leites

fermentados tornou-se popular no final da década de 70, como resultado dos avanços científicos na área de taxonomia e ecologia das bifidobactérias. Sua popularidade também aumentou devido a sua característica de baixa capacidade de acidificação durante a estocagem. Muitas patentes surgiram principalmente devido aos desenvolvimentos ocorridos na produção de fermentos e de novos produtos (GOMES *et al*., 1999).

Diversos fatores afetam a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado (DAVE & SHAH, 1997). Altas concentrações de sacarose adicionadas ao leite antes da fermentação podem inibir as bactérias do iogurte, requerendo um longo tempo de fermentação e levando a um baixo desenvolvimento de acidez (SHAH & RAVULA, 2000). Isto se deve aos efeitos osmóticos dos solutos no leite e à baixa atividade de água. Segundo GARDINI *et al*. (1999), a composição do produto em termos de conteúdo de sólidos totais afeta a viabilidade dos probióticos. SHAH *et al*., (2000) demonstraram que as bactérias probióticas têm baixa viabilidade em produtos fermentados.

Segundo GOMES & MALCATA (1999), a qualidade da matéria-prima utilizada para a produção de leites fermentados é de suma importância para o desenvolvimento dos probióticos. Neste contexto, o leite deve conter nutrientes essenciais, aminoácidos e pequenos peptídeos em quantidades suficientes para garantir o desenvolvimento das bífidobactérias. Deste modo, é possível melhorar as condições de multiplicação das bifidobactérias no leite pela adição, por exemplo, de fontes de nitrogênio (ZACARCHENCO & MASSAGUER-ROIG, 2004).

Tendo em vista as considerações acima, a finalidade do presente trabalho foi avaliar a produção de leite fermentado produzido com inclusão de leite em pó e açúcar (como fonte de sacarose), aumentando desta forma a quantidade de sólidos totais, e seus efeitos sobre a viabilidade de probióticos e a qualidade do leite fermentado.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 – Leites Fermentados: Definições e Aspectos Históricos

O leite fermentado é um alimento lácteo conhecido desde os primórdios da civilização. Algumas referências deste alimento são encontradas na Bíblia: Abraão acreditava que sua longevidade estava relacionada ao consumo de leite fermentado. Cientistas conhecidos, como Hipócrates, consideravam o leite fermentado não somente como um alimento, mas também como um remédio, prescrevendo-o no distúrbio nos tratamentos de distúrbios estomacais e intestinais. (OBERMAN, 1985).

No início do século 20, o bacteriologista russo Metchnikoff (Instituto Pasteur, França), foi o primeiro cientista a apresentar uma explicação sobre os efeitos benéficos das bactérias ácido-lácticas presentes no leite fermentado (HUGHES, HOOVER, 1991). Ele atribuiu à ótima saúde e longevidade dos povos búlgaros ao consumo elevado e prolongado de leite fermentado (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

De acordo com a IN n° 46 de 23/10/2007 (MAPA), que estabelece os “Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados”, estes são os produtos resultantes da fermentação do leite ou leite reconstituído, por fermentos lácteos próprios, sendo que estes devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade.

Dentre os diversos tipos de leite fermentado existentes, o iogurte é provavelmente o mais popular. O início da produção de iogurte data do século II a.C. e ocorreu provavelmente no Oriente, o que explica a origem do próprio nome (jugurt). Uma das teorias a respeito da descoberta do iogurte é de que quando o leite dos diferentes rebanhos começou a ser utilizado para a alimentação humana, passou a ser armazenado em marmitas de barro; as altas temperaturas do deserto, que chegavam a atingir 43°C, propiciavam o crescimento das bactérias lácticas termofílicas presentes no leite, resultando num produto consistente e aromático.

Originalmente, o processo de fermentação envolvia a coagulação do leite por microrganismos presentes naturalmente no alimento, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria-prima original (ALM,1991). Atualmente, o leite fermentado pode ser definido como um produto adicionado ou não de substancias alimentícias e fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos, responsáveis pela coagulação e acidificação do leite (PIARD et al., 1997).

2.2 – Tecnologia de Produção de leites Fermentados:

O leite fresco é fornecido para a produção de iogurtes e leites fermentados em tanques refrigerados. Uma avaliação prévia é realizada e, em seguida, o leite é filtrado para a retirada dos resíduos sólidos e armazenados a 5°C. O controle da qualidade do leite é realizado de acordo com as seguintes condições:

- Condições sanitárias: a temperatura de transporte, o número total de microrganismos e células somáticas presentes e o grau de acidificação do produto;

- Características tecnológicas: análise do conteúdo de gordura e nitrogênio e detecção dos antibióticos presentes.

O preparo do leite para a fermentação envolve várias etapas:

- Padronização

A qualidade do leite depende da dieta alimentar e do estágio de lactação do animal, assim como da época do ano em que foi coletado. Esses fatores são os principais motivos pelo qual o leite deve ser padronizado, a fim de igualar o conteúdo de gordura e proteína para a produção de leite fermentado. A padronização permite a regulação da composição do leite segundo as especificações nutricionais e sensoriais do produto.

Assim que o leite chega à fábrica é aquecido até 45°C e a seguir, centrifugado. O conteúdo de gordura no leite deve ser menor que 7% e o teor de sólidos totais deve ser ajustado para 14%.

- Homogeneização

A homogeneização é realizada para reduzir os glóbulos de gordura e impedir a separação do creme sobre a superfície do leite durante a fermentação, resultando no aumento da viscosidade do leite e conseqüente estabilidade do leite fermentado durante a estocagem (ALAIS, 1984).

- Tratamento térmico

O leite é submetido à pasteurização para eliminar microrganismos patogênicos ou agentes deteriorantes do produto, e para aprimorar as características físicas do produto, como viscosidade e capacidade de retenção de água.

O tratamento térmico é realizado, na maioria das indústrias, através de um sistema tubular contínuo entre 92-95°C, equipamento no qual o leite é aquecido durante alguns minutos. O tratamento térmico provoca a desnaturação de mais de 85% das proteínas solúveis do soro, elementos responsáveis pela coagulação do leite.(CASALIS, 1985).

- Fermentação:

O leite fermentado é o produto obtido da fermentação do leite através de um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, e/ou outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. A degradação da lactose favorece a redução do pH e, conseqüentemente, a precipitação das proteínas do leite. A fermentação é finalizada quando o pH desejado é atingido. O gel obtido é quebrado através de um sistema de bombeamento e imediatamente resfriado a 20° C, temperatura que facilita a adição do produto nas embalagens e limita as mudanças na estrutura

do gel. O produto é posteriormente é posteriormente resfriado a 4° C, mantendo-se a esta temperatura durante a estocagem, transporte e distribuição.

2.3- Probióticos: Definições e Aspectos Mercadológicos:

O interesse por alimentos saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento pelo consumidor tem aumentado mundialmente. O uso destes produtos para a promoção do bem-estar e da saúde e, ao mesmo tempo, como redutor de risco de algumas doenças, esta incentivando o desenvolvimento de novos ingredientes e, assim, estimulando a inovação dos produtos alimentícios e formando novos nichos de mercado (MATSUBARA, 2001).

Os produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e considerados prioridade de pesquisa em diversos países. A valorização dos alimentos funcionais no mercado mundial está estimulando a produção de produtos alimentícios, gerando, deste modo, uma grande oportunidade para incentivar o consumo de alimentos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas.

Os lactobacilos e as bifidobactérias são considerados agentes probióticos porque são encontrados naturalmente no corpo humano, sobrevivendo à acidez do estomago e, assim sendo, são capazes de colonizar o intestino (MARSHALL, 1991). Contudo diversas publicações mostraram que as culturas probióticas apresentam crescimento lento no leite. A presença de bactérias viáveis e em alto número no produto lácteo durante sua estocagem, é condição essencial para assegurar o efeito probiótico (OLIVEIRA et al., 2001).

Os produtos compostos por bactérias probióticas integram três grandes grupos comerciais: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Os produtos lácteos representam o grupo mais representativo, constituído por iogurtes, leites fermentados, sorvetes e queijos, nos quais de utilizam freqüentemente culturas iniciadoras e bifidobactérias (ou lactobacilos) como aditivo ou suplemento (GOMES; MALCATA, 1999).

O crescimento do setor de alimentos lácteos fermentados representa uma grande oportunidade para o aprimoramento de produtos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas, características altamente valorizadas pelas empresas do ramo alimentício. Outro benefício relacionado ao setor lácteo é o baixo custo tecnológico necessário a produção dos alimentos fermentados (SIENKIEWICZ; RIEDEL, 1990).

Novas descobertas relacionadas a diversos aspectos científicos voltados a nutrição, especialmente ao estudo da dieta alimentar para a promoção da saúde, tem ampliado a aplicação dos probióticos *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. lactis* em alimentos (SANDERS; HUIS IN'T, 1999; HELLER, 2001).

A definição de probiótico esta relacionada à importância de células vivas como componentes essenciais e efetivos para a manifestação de efeitos benéficos. Huis In't Velt e Havenaar (1991) definiram os probióticos como uma cultura pura ou mista composta por microrganismos vivos que beneficiam a microbiota endógena intestinal de humanos e animais.

Segundo a Legislação Brasileira, probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA, 2008). Os microrganismos probióticos podem ser inoculados a partir de uma preparação que deve conter estirpes definidas e viáveis em numero suficiente para alterar a microbiota do consumidor, por implantação ou colonização, e exercer efeitos benéficos a saúde (SCHEREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

2.4 – Características das Bactérias Ácido-Lácticas:

2.4.1 – Culturas Iniciadoras (*Starters*)

As culturas do iogurte são compostas por *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, que são bactérias Gram-positivas, homofermentativas e termofílicas, cujo crescimento ótimo é obtido a 42°C. (SPREER; MIXA, 1998).

O *S. thermophilus* tem a morfologia de cocos unidos, geralmente em cadeias curtas, e ótimo crescimento entre 37°C e 45°C, mas pode tolerar até 50°C. Algumas estirpes de *S. thermophilus* sintetizam exopolissacarídeos, polímeros bastante úteis na produção de leites fermentados firmes, responsáveis pela manutenção da textura e da viscosidade adequadas mesmo após a fermentação. (COLLET, 2005).

Lactobacillus delbruecki subsp. *bulgaricus* é uma bactéria homofermentativa, ou seja, libera ácido láctico durante a fermentação, Gram-positiva e anaeróbia facultativa. É uma das bactérias iniciadoras mais empregadas na fabricação de iogurtes e produtos lácteos.(KLEIN *et. al*, 1998). Ainda, o *L. bulgaricus* apresenta-se em forma de bastonetes unidos em cadeias longas, com crescimento ótimo entre 45-50°C, embora resista a temperaturas até -15°C. (DELLAGIO; TORRIANI; VLAEMINCK, 1992; SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

As bactérias do iogurte são agentes importantes na produção e conservação de produtos lácteos, especialmente iogurtes, leites fermentados e queijos (MOREIRA; ABRAHAM; ANTONI, 2000).

As culturas iniciadoras *S. Thermophilus* e *L. bulgaricus* apresentam relação proto-simbiótica no leite na qual este lactobacilo produz enzimas que degradam a caseína liberando peptídeos tais como metionina, treonina e valina que agem como fatores de crescimento para *S. thermophilus*; este, por sua vez, libera ácido fórmico e CO_2 proporcionando melhor

desenvolvimento *L. bulgaricus*. (MARTIN, 2002; OLIVEIRA, DAMIN, 2003). Ao final da fermentação, *L. bulgaricus* produz acetaldeído e ácidos graxos, compostos que contribuem para o desenvolvimento do sabor característico do iogurte. (BÉAL, CORRIEU, 1994; HIGASHIO; YOSHIOKA; KIKUCHI, 1997; SPREER; MIXA, 1998).

Segundo Rajagopal e Sandine (1990), a quantidade de aminoácidos e peptídeos disponíveis no leite deve ser suficiente para auxiliar no crescimento das bactérias iniciadoras e na degradação do leite. As bactérias devem possuir um eficiente sistema proteolítico, que estimule seu crescimento e realize a rápida conversão da lactose em ácido láctico.

A análise da atividade proteolítica das bactérias iniciadoras é um fator importante para a avaliação do crescimento destas culturas. Renz e Puhan (1975) relataram que a atividade proteolítica realizada pelas bactérias iniciadoras pode apresentar alguns efeitos adversos em iogurtes e leites fermentados, tais como produção de sabor amargo devido ao acúmulo de peptídeos, resultado relacionado à intensa atividade proteolítica do *L. bulgaricus*.

Laye, Karleskind e Mor (1993) sugeriram que, de acordo com as concentrações e as proporções das culturas iniciadoras utilizadas, o sabor e a textura do iogurte podem ser prejudicados. As mudanças químicas observadas durante o armazenamento incluem diminuição do teor de lactose e acetaldeído, formação de ácido láctico e, pequena, mas potencialmente importante, mudança nas concentrações de outros compostos voláteis.

As culturas iniciadoras são normalmente adicionadas aos leites fermentados probióticos com o intuito de reduzir o tempo de fermentação, entretanto, *L. bulgaricus* tende a pós-acidificaçao no leite fermentado, o que afeta a viabilidade das bactérias probióticas (OLIVEIRA et al.,2001; KLAVER, KINGMA & WEERKAMP, 1993; DAVE & SHAH; 1998).

2.4.2 – Bifidobactérias:

As bifidobactérias foram primeiramente isoladas a partir de fezes de crianças recém-nascidas em 1899 por Tissier, sendo descritas como microrganismos anaeróbios de morfologia bífida (Instituto Pasteur, França) (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993). Tissier recomendou a administração de bifidobactérias em crianças com diarréia com o objetivo de combater esse distúrbio intestinal e restabelecer seu domínio na microbiota (O'SULLIVAN et al, 1992). Esses microrganismos são Gram-positivos, anaeróbicos, em forma de bastonetes, não-esporulantes, sem mobilidade e não-resistentes a ácido. Atualmente, o gênero *Bifidobacterium* é classificado na família *Actinomycetaceae*, na qual estão presentes trinta espécies (KHEADR, 2007).

Bifidobacterium sp. produzem ácido láctico e acético sem produzir CO_2 , exceto durante a degradação do gluconato. Segundo Itsaranuwat et. al. (2003), existem diferenças morfológicas, havendo o formato de "Y" e membrana em forma de cocos, dependendo das condições de crescimento e/ou da espécie. As bifidobactérias apresentam relevante importância, sendo aplicadas em muitos fermentados lácteos devido as suas propriedades tecnológicas e aos seus efeitos, e por estarem associadas com a diminuição de incidência de alergias (BJORKSTEN et. al. 2001), e também com a prevenção de alguns tipos de câncer (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

De acordo com Sanchéz (2006) e D'aimmo (2006), as bifidobactérias fermentam glicose, galactose, lactose e frutose como fonte de carbonos benéficos a promoção da saúde. Ainda, promovem a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal e protegem os organismos dos patógenos e bactérias putrefativas.

Bifidobacterium sp. possuem diversos habitats, como o intestino humano, a cavidade bucal e o TGI animal. A temperatura ideal de crescimento para as bifidobactérias varia de 37°C a 42°C (DONG et. al., 2000). Ainda, nenhum crescimento é obtido acima de 46°C ou abaixo de 20°C (GAVINI et al, 1991). O pH ótimo para as bifidobactérias varia entre 6,5 e 7,0 e nenhum crescimento é observado acima de 8,5. Esse microrganismo faz parte da microbiota humana e possui uma relação simbiótica com o hospedeiro, sendo capaz de inibir o crescimento de *Candida albicans*, *E. coli* e outras bactérias patogênicas. (BIAVATI et.al., 2000).

Meghrous et al. (1990) foram os primeiros pesquisadores a provar que as bifidobactérias produzem substancias antimicrobianas. Ações inibitórias promovidas por bifidobactérias foram descritas por Gibson e Wang (1994) contra *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Vibrio cholerae*.

A comprovação dos efeitos clínicos benéficos relacionados às bifidobactérias incentivou a utilização destes probióticos em produtos alimentícios como iogurtes e leites fermentados. Entretanto, as bifidobactérias apresentam pouco crescimento no leite, pois estão submetidas a situações de estresse no processo de fermentação, especialmente devido à elevação da acidez do meio, a baixa disponibilidade de fontes de nitrogênio e a sensibilidade ao oxigênio (NAGAWA; NAKABAYASHE; FUJINO, 1988,COLLINS; HALL, 1984).

Apenas estripes de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* tem demonstrado habilidades para sobreviver em ambientes ácidos. Estas culturas são os probióticos preferencialmente utilizados comercialmente em produtos a base de iogurte (JAYAMANNE; ADAMS, 2006).

Segundo Matto et al. (2006), a *Bifidobacterium lactis* é a espécie mais utilizada em aplicações probióticas, já que o crescimento deste probiótico após a fermentação forneceu produtos com maior estabilidade durante a estocagem.

Gueimonde et al. (2004), relataram que as estirpes de *B. lactis* são bastante utilizadas em produtos probióticos na Europa devido à grande resistência deste espécie em meios ácidos e sob condições de estresse oxidativo. Contudo, mesmo as bactérias *B. lactis* consideradas estáveis podem apresentar limitações e deficiências tecnológicas para aplicações na indústria (MATTILA-SANDHOLM et al.,2002) Por conta desses fatores, Yolanda (2007) sugere um método alternativo para aumentar a estabilidade e viabilidade das bifidobactérias, que pode ser desenvolvido através de aplicações prolongadas destes microrganismos em meios altamente ácidos. As mudanças fenotípicas e o aperfeiçoamento das propriedades biológicas estimularão o aumento da resistência das bifidobactérias à acidez do meio e possibilitarão o desenvolvimento de novas estirpes probióticas para utilização comercial.

2.4.3 – *Lactobacillus acidophilus*:

O *Lactobacillus acidophilus* foi isolado a partir de fezes de crianças lactentes em 1900 pelo pesquisador Moro e nomeado *Bacillus acidophilus*. Posteriormente foi designado Lactobacillus, e anos depois, devido às vantagens de ingestão, a indústria de alimentos iniciou a produção de iogurtes com elevadas contagens deste microrganismo. (ITSARANUWAT, HAL HADDAD, ROBINSON, 2003).

O *L. acidophilus* é descrito como um bacilo circular, Gram-positivo, imóvel e não-esporulante. Este probiótico pertence ao grupo dos microrganismos homofermentativos restritos, comporta as espécies mais acidificantes (2,7% de ácido láctico), e as mais termofílicas (40-52°C). O crescimento a 16°C é raro ou muito lento; já em temperaturas superiores o crescimento depende da estirpe, sendo que algumas podem crescer a 45°C e outras a 48°C (DU PLESSIS et al., 1996).

Encontrado naturalmente na microbiota intestinal e no trato urogenital humano, o *L. acidophilus* apresenta como principais funções a proteção contra patógenos, auxílio na

digestão da lactose, elevação no padrão nutricional dos alimentos, elevação da resposta imune intestinal, e regulação dos níveis de colesterol no organismo (GILLILAND; 1990).

Alguns pesquisadores sugeriram que o *L. acidophilus* poderia substituir o *L. bulgaricus* na produção do iogurte. Porém, o *L. acidophilus* apresenta baixo crescimento no leite, mesmo quando suplementado com nutrientes, além de produzir um leite fermentado menos saboroso quando comparado ao iogurte tradicional (TRAMER, 1973). Contudo, *L. acidophilus* começou a ser incorporado no iogurte tradicional a fim de aumentar a popularidade deste alimento, através da perspectiva de que apenas este microrganismo sobreviveria no trato gastrointestinal (DAVIS, 1970; VEDAMUTHU, 1974).

Diversos produtos probióticos estão em desenvolvimento com o objetivo de permitir o consumo de *L. acidophilus* em quantidades elevadas. De acordo com a literatura a concentração mínima de células viáveis de *L. acidophilus* para produção dos efeitos terapêuticos é de 10^6 log UFC/ml ou grama do produto (KURMANN; RASIC, 1988).

Gilliland, Stanley e Bush (1984) relataram que o *L. acidophilus* pode crescer em concentrações fisiológicas de alta acidez e estabelecer-se no trato gastrointestinal, promovendo efeitos terapêuticos. Outros estudos demonstraram os efeitos benéficos deste microrganismo na estimulação da resposta imune intestinal, em experimentos com ratos, e na redução dos níveis de colesterol em porcos (LIN et al., 1989; PERDIGON,1989). Apesar destes estudos, se faz necessário maiores estudos para comprovação dos efeitos benéficos dos Lactobacillus, especialmente *L. acidophilus*, em humanos e animais.

O crescimento de *L. acidophilus* pode ser inibido no produto probiótico de acordo com a composição do meio e a disponibilidade de nutrientes. As principais substâncias inibidoras do *L. acidophilus* são os ácidos láctico, acético e benzóico, além do peróxido de hidrogênio (COLLINS; ARAMAKI, 1980; GILLILAND; SPECK, 1977).

2.5 - Efeitos Terapêuticos de Probióticos e Mecanismos de Ação:

As bactérias ácido-lácticas atualmente utilizadas atualmente na produção de iogurtes e leites fermentados pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium* e *Proprionibacterium* (GOLDIN; GORBACH, 1992). As espécies de maior interesse são *Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. crispatus, L. johnsonii, L. murinus, L. intestinalis, L. rhamnosus, L. plantarum, L. reuteri, L. salivarius, Bifidobacterium bifidum, B. infantis, B. longum, B. brevis* e *B. lactis* (BARRETO, 2003).

Os probióticos normalmente utilizados em leites fermentados e iogurtes geralmente são espécies isoladas do intestino humano, como as bifidobactérias e os lactobacilos, que realizam a fermentaçao láctica do leite. A fermentação provoca a conversão dos carboidratos em ácidos orgânicos, possibilitando a melhoria do sabor e da textura do alimento (DRIESSEN; LOONES, 1992).

As bifidobactérias sintetizam vitaminas do complexo B, elevando seu teor no produto fermentado. O teor de lactose é diminuído em aproximadamente 20 a 25% devido a sua degradação e utilização por esses microrganismos durante a fermentação do leite (TAMIME; MARSHALL;ROBINSON, 1995).

Mesmo com a sugestão de vários mecanismos com atuações independentes ou associadas, o modo de ação dos probióticos ainda não está completamente esclarecido. A exclusão competitiva é um dos processos mais considerados em diversos estudos sobre a atuação dos probióticos, que competem por nutrientes e sítios de fixação com outros patógenos ou mesmo com outras bactérias da microbiota intestinal (OUWEHAND et al, 1999). A exclusão competitiva demonstra a necessidade da ingestão de doses elevadas de

probióticos, assim como a realização de administração contínua para manifestação de suas propriedades funcionais.

As principais atuações das bactérias ácido-lácticas na defesa da microbiota intestinal são: síntese de bacteriocinas (NAIDU, BIDLACK; CLEMENS, 1999) produção de ácidos orgânicos voláteis (JIN, MARQUARDT;BAIDOO, 2000), liberação de peróxido de hidrogênio (HAVENAAR, HUIS IN'T VELD, 1992), ação direta sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (KOSAZA, 1986), e liberação de enzimas hidrolíticas (DE VRESE et al, 2001).

A adição de probióticos no leite ou em outros produtos fermentados beneficia a microbiota intestinal; tais benefícios já estão amplamente descritos na literatura e podem ser definidos como o aumento da modulação imunológica (defesas do organismo) e a prevenção de certas doenças e/ou incômodos em humanos; como diarréia, devido à infecção com *Helicobacter pylori*, má digestão de lactose, síndrome do intestino irritável, constipação, elevado crescimento bacteriano no intestino, câncer cervical, câncer de bexiga, colesterol, hipertensão, infecção do trato urinário e infecções relacionadas ao trato respiratório (GOLDIN, 1998; HOLPZAPFEL et al., 1998; OUWEHAND et al, 2003).

Os aspectos funcionais dos microrganismos probióticos devem ser estabelecidos através de estudos in vivo comprovadamente seguros aos humanos.

Segundo Fukushima et al. (1998), Donnet-Hughes et al. (1999) e Foschino, Cafaro, Ottogalli (1997), os requisites para a seleção de uma estirpe são:

- Tolerância a acidez do estomago.
- Aderência ao epitélio intestinal.
- Resistência no trato gastrointestinal.
- Estimulação imunológica.

- Atividade antagonística contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium dificile*.
- Viabilidade e estabilidade durante a produção e estocagem do produto.
- Produção de boas características sensoriais ao produto.

A estirpe selecionada deve realizar a fermentação do leite em cultura pura ou quando associada, além de ser viável durante todo o processamento e estocagem refrigerada do produto, assegurando a manifestação dos efeitos probióticos durante o consumo.

O produto probiótico deve ter vida média variando de 15 a 30 dias e propriedades sensoriais aceitáveis, tais como cor, aroma, sabor e textura.

Os microrganismos devem estar viáveis, apresentando-se em número elevado (> 10^6 UFC/ml) durante toda a estocagem do produto (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

2.6 - Interações entre Culturas de Bactérias Ácido-Lácticas:

A composição química do produto lácteo é influenciada diretamente pela atividade metabólica da bactéria, que interage intensamente com o meio ao converter determinados componentes em produtos metabólicos durante o crescimento. Os carboidratos disponíveis e as proteínas do leite, especialmente aminoácidos livres, são os componentes mais utilizados pelo metabolismo bacteriano.

Variadas espécies ou subespécies de bactérias ácido-lácticas podem conferir distintas características aos produtos alimentícios. Os compostos metabólicos finais de determinadas culturas, puras ou mistas, podem contribuir para a elaboração de produtos com características sensoriais indesejáveis (HELLER, 2001).

Diferentes combinações de bactérias iniciadoras e probióticas acrescentaram aos alimentos lácteos fermentados características tecnológicas, nutricionais e terapêuticas (JUILIARD et al, 1987). Contudo, as interações microbianas podem ser benéficas

(protocooperação) ou desfavoráveis (antagonismo), ou seja, podem ocorrer mudanças indesejáveis na composição da flora bacteriana durante a produção e estocagem refrigerada do produto (BELLENGIER; RICHARD; FOCAUD, 1997).

Segundo Vinderola, Mochuitti e Reinheimer (2002), diversos tipos de interações foram detectados entre as bactérias ácido-lácticas, como estimulação, inibição e ausência de efeitos, sendo que, no geral, as bactérias probióticas foram as mais inibidas nesse estudo. A seleção da melhor combinação de estirpes deve ser uma medida adotada para aperfeiçoar o desempenho tecnológico e favorecer a sobrevivência bacteriana durante a estocagem refrigerada dos produtos lácteos.

As bactérias probióticas apresentam crescimento lento no leite devido a sua baixa atividade proteolítica, sendo prática comum a adição de bactérias do iogurte para reduzir o tempo de fermentação. Entretanto, *L. bulgaricus* produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada (pós-acidificação), o que afeta a viabilidade das bactérias probióticas. A fim de superar o problema da pós acidificação, a tendência é usar fermentos que contenham *S. Thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium sp.* (OLIVEIRA et al.,2001; KLAVER, KINGMA & WEERKAMP, 1993 DAVE; SHAH, 1998).

Gomes e Malcata (1999) sugeriram que, devido à baixa velocidade de multiplicação de culturas probióticas em relação às bactérias lácticas tradicionais, o controle da assepsia e a adição de fatores promotores de crescimento devem ser pré-requisitos para obtenção de contagens elevadas de células probióticas viáveis durante a estocagem do produto.

No geral, a estabilidade das bactérias ácido-lácticas é assegurada principalmente devido a três fatores:

- Disponibilidade de carboidratos e aminoácidos.
- Degradação de componentes tóxicos, como o peróxido de hidrogênio.
- Limitação da concentração de íons hidrogênio no meio.

As bactérias ácido-lácticas crescem mais devagar sob pH ácido, pois a acidez do meio provoca a danificação celular, diminuindo a viabilidade durante a estocagem. Em alimentos fermentados, como o iogurte, as bactérias ácido-lácticas em culturas mistas são injuriadas devido ao ácido-lático produzido pelas demais bactérias presentes, assim como pela acidificação crescente do produto durante a estocagem (HUTKINS; NANNEN, 1993).

As atividades metabólicas das culturas iniciadoras e dos probióticos provocam mudanças específicas nas características químicas do produto, afetando suas qualidades sensoriais.

Componentes carbônicos, como acido acético e lático, acetaldeído, acetona e diacetil, são produtos metabólicos resultantes da fermentação da lactose e proteínas (CHANDAN, 1992).

Alguns fatores importantes utilizados para minimizar as dificuldades de produção são a seleção da cultura adequada, o tratamento térmico rigoroso e o controle da acidez do produto. O estado fisiológico dos organismos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo e temperatura) e a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água e conteúdo de oxigênio) devem ser considerados. As possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas iniciadoras são fatores que devem ser priorizados, pois podem influenciar a viabilidade das bactérias probióticas no produto elaborado (HELLER, 2001).

2.7 – Normas Legais Referentes aos Leites Fermentados e Probióticos:

Segundo a IDF (International Dairy Federation), as principais normas internacionais relacionadas ao leite fermentado e iogurtes são as seguintes:

- Produção:

O termo iogurte só pode ser utilizado quando as culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são adicionadas no produto. Os probióticos *L. acidophilus* e *Bifidobacterium spp.*, assim como bactérias com propriedades tecnológicas particulares, são consideradas culturas seguras e podem ser adicionadas nos alimentos.

- Viabilidade das culturas:

A legislação de diversos países considera que a microbiota bacteriana deve ser viável durante toda a estocagem do produto, mas os níveis mínimos estabelecidos para a quantificação efetiva variam de 10^6 a 10^8 UFC/g, segundo a regulamentação do local.

GOMES & MALCATA (1999) enfatizaram que os fabricantes devem observar se os bio-produtos fermentados contêm número mínimo satisfatório de células ativas no momento do consumo de, pelo menos, 10^6UFC/mL devido à dose mínima terapêutica diária ser de 10^8 – 10^9 células viáveis em 100g do bio-produto fermentado.

Outros autores (SHAH et.al., 1995) sugerem que para efeito terapêutico o produto deve conter $\geq 10^5$células/mL. A legislação brasileira fixa o limite mínimo em 10^6UFC/mL (BRASIL, MAPA., 2007).

- Critérios analíticos:

A quantidade de gordura, segundo o Codex Alimentarius, deve ser de pelo menos 3%, em iogurtes integrais, entre 0,5% e 3% em iogurtes com pouca gordura (a base de leite semi-desnatado),e até 0,5% em relação aos iogurtes sem gordura (a base de leite desnatado).

O conteúdo protéico do iogurte deve ser de pelo menos 2,8% no produto final, valor equivalente a 33% do conteúdo de sólidos totais no leite desnatado.

A IDF recomenda o limite máximo de 0,7% de ácido láctico no iogurte, mas sua quantificação varia entre 0,6% e 15% em alguns países. De acordo com algumas normas

nacionais, que utilizam o pH para expressar esse critério, este se apresenta geralmente entre 4,5 e 4,6.

As principais características físico-químicas definidas para leites fermentados estão indicadas na Tabela 1:

Tabela 1: Requisitos físico-químicos definidos para o leite fermentado.

Produto	Gordura (g/100g)	Acidez (g/100g)	Proteína (g/100g)
Com creme	Min. 6,0	0,6 – 2,0	Mín. 2,9
Integral	3,0 – 5,9	0,6 – 2,0	Mín. 2,9
Parcialmente desnatado	0,6 – 2,9	0,6 – 0,2	Mín. 2,9
Desnatado	Máx. 0,5	0,6 – 0,2	Mín. 2,9

Fonte: Lerayer et al. (2002).

Com relação às normas brasileiras, as alegações sobre os alimentos funcionais são definidas da seguinte forma:

- A alegação de propriedade funcional a qual se refere o papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou o não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.
- Alegação de propriedade de saúde, que sugere ou implica na existência de uma relação entre o alimento ou o ingrediente com a doença ou condição relacionada à saúde.

De acordo com o regulamento técnico do MERCOSUL, de Identidade e Qualidade do leite fermentado, aprovado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela Secretaria de Vigilância do Brasil (LERAYER et. al., 2002), o leite fermentado é definido

como um produto adicionado ou não de outras substancias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, através de fermentação láctica mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade.

A fermentação do leite pode ser realizada com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp*., *S. thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

Os requisitos sensoriais definidos para leites fermentados são:

- Aspecto: consistência firme, pastosa, semi-sólida ou líquida.
- Cor: branca, de acordo com adição ou não de substancias alimentícias e/ou corantes adicionados.
- Odor e Sabor: característicos, de acordo com a(s) substancia(s) alimentícia(s) e/ou substancia(s) aromatizantes/saborizante(s) adicionadas.

2.8 - Viabilidade das bactérias probióticas em leite fermentado:

A população de bactérias láticas depende da linhagem utilizada, interação entre as espécies presentes, condições da cultura, composição química do meio (fonte de carboidrato), acidez final, conteúdo de sólidos do leite, disponibilidade de nutrientes, promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcar (pressão osmótica), oxigênio dissolvido (especialmente para a *Bifidobacterium*), quantidade inoculada, temperatura de incubação, tempo e temperatura de estocagem (Kailasapathy, Rybka, 1997; Hatting, Viljoen, 2001; Shah, 2001).

A adição de bactérias probióticas aos produtos lácteos apresenta uma série de dificuldades, sendo as principais, a pouca palatabilidade e o longo tempo de fermentação. De um modo geral as bactérias bífidas crescem pouco no leite, produzindo pouco ácido resultando em um tempo de fermentação prolongado. Essas bactérias exigem um baixo potencial de oxi-redução (Eh) para iniciar crescimento além de fatores de crescimento. A produção de ácido é crítica e irá definir as características de qualidade e vida de prateleira esperada para o produto. Para isso é importante que um produto lácteo fermentado probiótico, atinja pH 4,6 no máximo em 24 horas, e as culturas probióticas geralmente não têm essa capacidade. Nesta situação são empregados ajustadores biológicos. As culturas que tem sido empregadas para esse fim são mesofílicas e termofílicas (*Streptococcus/Lactobacillus*). O emprego de bioajustadores em produtos probióticos tem como finalidade básica resolver problemas de sabor, aroma e textura; aumentar a taxa de crescimento e diminuir o tempo de fermentação; além de garantir o processo fermentativo evitando problemas de contaminação (FERREIRA, 2001).

Dos vários estudos de sobrevivência dos microrganismos probióticos realizados por diversos pesquisadores, existe consenso geral de que produtos com acidez elevada (por exemplo o iogurte) conduzem a maior perda de viabilidade do que produtos com baixa acidez (por exemplo iogurte gelado, gelado tradicional e queijo), sendo necessário efetuar uma seleção cuidadosa das estirpes a utilizar. Na tentativa de melhorar a viabilidade em longo prazo das estirpes probióticas, foram executados diversos estudos sobre novas metodologias, que englobam quer a substituição do vetor alimentar quer a proteção de estirpes sensíveis ao ácido por microencapsulação com acetatoftalato de celulose ou com alginato de cálcio (GOMES, MALCATA, 1999).

Além da acidez dos produtos e da acidez produzida durante a estocagem refrigerada, o nível de oxigênio nos produtos e sua permeabilidade através das embalagens, a sensibilidade

às substâncias produzidas pelas bactérias do iogurte e a falta de nutrientes no leite, são fatores responsáveis pela perda de viabilidade dos microrganismos probióticos (SHAH, 2001).

VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER (2000b) afirmaram que a adição de bactérias probióticas ao leite fermentado é prática amplamente adotada pelos laticínios.

Contudo, fatores como acidez do iogurte, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem condicionar a sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados (VINDEROLA, PROSELLO, GHIBERTO, REIHEINMER, 2000a) (VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER, 2000b). Sobre condições de estocagem destes produtos, os mesmos autores (VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER, 2000b) concluíram não haver estudos suficientes sobre a sobrevivência dos probióticos durante a estocagem refrigerada.

As bifidobactérias são usadas em fermentações de leite de modo limitado devido ao lento crescimento.

Embora o leite seja um meio satisfatório por conter nutrientes essenciais, aminoácidos e pequenos peptídios estão presentes em quantidades insuficientes para o crescimento de bifidobactérias. Há, contudo, relatos de casos de adaptação das bifidobactérias ao leite após sucessivas transferências (GOMES, MALCATA, 1999).

De acordo com KLAVER, KINGMA & WEERKAMP (1993) as bactérias probióticas se desenvolvem lentamente no leite devido a sua baixa atividade proteolítica, sendo prática comum a adição de bactérias do iogurte para reduzir o tempo de fermentação. Contudo, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, uma das bactérias do iogurte, produz ácido lático durante a estocagem refrigerada (pós-acidificação) o que afeta, segundo estes autores, a viabilidade das bactérias probióticas.

A fim de superar o problema da pós-acidificação, de acordo com DAVE & SHAH (1998), a atual tendência é usar fermentos chamados ABT, que contém *Lactobacillus*

acidophilus, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus thermophilus*. Também OLIVEIRA et al. (2002) afirmaram que bactérias láticas podem ser adicionadas durante a mistura final do produto diminuindo os custos da produção de leite fermentado contendo probióticos.

Ainda, diversos fatores afetam a viabilidade das bactérias probióticas em leite fermentado. Altas concentrações de sacarose adicionadas ao leite antes da fermentação podem inibir as bactérias do iogurte levando a longos tempos de fermentação e a um baixo desenvolvimento de acidez. (SHAH, N. P.; RAVULA, R. R.; 2000). Isto se deve aos efeitos osmóticos dos solutos no leite e a baixa atividade de água (VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A., 2000). GARDINI et al. demonstraram que a composição do produto em termos de conteúdo de sólidos totais afeta a viabilidade dos probióticos. SHAH & RAVULA (2000) demonstraram que as bactérias probióticas tem baixa viabilidade em produtos fermentados.

Em geral, bifidobactérias se desenvolvem melhor em meios sintéticos do que em leite. Contudo, estes meios são caros para multiplicação de bifidobatérias em grande escala, além de causarem sabores desagradáveis nos produtos finais. Assim, há melhora das condições de multiplicação para diferentes linhagens de bifidobactérias no leite, por exemplo, pela adição de fontes de nitrogênio ou substâncias que abaixem o potencial redox do meio e a seleção de linhagens menos fastidiosas são alternativas propostas para superar esses problemas (GOMES, MALCATA, 1999). Ainda, de acordo com MATTILASANDHOLM, MÄTTÖ & SAARELA (1999) a seleção cuidadosa das linhagens empregadas e o monitoramento do processo de fabricação são necessários para controlar os produtos de metabolismo e o pH final.

Em trabalho realizado por THAMER, K.G.; PENNA, A. L. B. (2005), analisou-se o efeito de teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. Dessa forma, determinaram-se as populações de

Streptococcus thermophilus, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*. As maiores populações de microrganismos probióticos foram observadas nas bebidas com baixa acidez e maior teor de sólidos totais, além de haver predominância de *Streptococcus thermophilus* sobre os demais microrganismos.

VINDEROLA et al. (2000a, 2000b) relataram que o sucesso da adição de culturas probióticas é dependente das espécies e linhagens usadas, das interações metabólicas com bactérias láticas, das condições de fermentação, do pH do produto, da presença de oxigênio e da temperatura de estocagem. Outros autores (MATTILA-SANDHOLM, MATTO, SAARELA, 1999) citam ainda a resistência a fagos e viabilidade durante o processamento e estocagem.

Como as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácidos acético (SAMONA, MARAKIS, ROBINSON, 1996) e lático a taxa de 3:2, seu desenvolvimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma “a vinagre”, dificultando a aceitação do produto pelos consumidores. Assim, uma combinação de linhagens específicas deve ser determinada para evitar esse problema, selecionando-se aquelas que promovam as propriedades sensoriais e de sobrevivência mais vantajosas (MATTILA-SANDHOLM et. al., 2002).

Em trabalho realizado por OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R.; (2003), avaliou-se o efeito do teor de sólidos (12 a 15%) e da concentração de sacarose (0 a 8%) na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. Para o experimento, utilizaram das seguintes culturas: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* (STLB); *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* (STLA); *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacilus rhamnosus* (STLR). Como resultados, notou-se que os leites fermentados por STLA apresentaram uma acidificação mais acentuada; já aqueles fermentados por STLR foram mais estáveis, enquanto os leites contendo maiores teores de sólidos totais foram aqueles que obtiveram maior acidez total, independente

da co-cultura utilizada, além do número de bactérias probióticas ter ficado acima do sugerido pela literatura.

De acordo com GOMES & MALCATA (1999), em função da baixa velocidade de multiplicação das culturas probióticas em relação às bactérias láticas tradicionais, controle da assepsia e adição de fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para se obter altas contagens iniciais de células probióticas viáveis. Caso contrário, esta população ficaria muito abaixo daquela do fermento.

Segundo GOMES & MALCATA (1999), a matéria-prima utilizada para a produção de leites fermentados são de suma importância para o desenvolvimento dos probióticos. Assim, o leite pode conter nutrientes essenciais, aminoácidos e pequenos peptídeos em quantidades insuficientes para o desenvolvimento das bifidobactérias. Em geral, bifidobactérias se desenvolvem melhor em meios sintéticos do que em leite. Contudo, tais meios podem proporcionar sabores desagradáveis como resultado da fermentação. Assim, pode-se melhorar as condições de multiplicação das bifidobactérias no leite pela adição, por exemplo, de fontes de nitrogênio (ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S.; 2004).

3 – OBJETIVOS:

3.1 - Objetivos Gerais:

O objetivo geral do projeto foi avaliar o efeito da inclusão de leite em pó desnatado e de açúcar sobre a viabilidade de microrganismos probióticos adicionados ao leite fermentado.

3.2 - Objetivos Específicos:

a) Determinar as características físico-químicas (pH, matéria seca, gordura, proteína, nitrogênio não-caseinoso, nitrogênio não-proteico, caseína), microbiológicas (viabilidade de bactérias ácido-láticas) e sensoriais do iogurte desnatado contendo 0, 5, 10 ou 15% de leite em pó e/ou 0 ou 10% de açúcar e mantido a 5ºC por 21 dias;

b) Avaliar as possíveis diferenças entre as características dos tipos de leite fermentado produzidos, e desse modo verificar a formulação mais adequada para viabilizar a adição de bactérias probióticas no iogurte e sua estabilidade ao armazenamento.

4 – MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 – Delineamento Experimental:

O experimento constituiu-se de 8 tratamentos, ou seja, foram produzidos 8 tipos de leite fermentado partindo-se do leite bovino previamente desnatado contendo no máximo, 0,1% de gordura. Os tratamentos encontram-se relacionados abaixo:

- Tratamento 1: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%).
- Tratamento 2: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 5% de leite em pó.
- Tratamento 3: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 10% de leite em pó.
- Tratamento 4: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 15% de leite em pó.
- Tratamento 5: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 5% de leite em pó + 10% de açúcar.
- Tratamento 6: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 10% de leite em pó + 10% de açúcar.
- Tratamento 7: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 15% de leite em pó + 10% de açúcar.
- Tratamento 8: leite fermentado produzido a partir de leite desnatado (gordura = máx. 0,1%) + 10% de açúcar.

4.2 - Matérias-Primas Utilizadas no Experimento:

O leite utilizado no experimento foi o tipo longa-vida (UHT – *ultra high temperature*) desnatado (Shefa®), adquirido em embalagens de 1 L, sendo todas provenientes

de um mesmo lote de fabricação com vistas a facilitar a padronização da composição do produto em todos os tratamentos experimentais. Utilizou-se, também, leite em pó desnatado (Molico®) e açúcar refinado (União®) para a composição dos leites fermentados dos tratamentos 2 a 8.

4.3-Preparação das Culturas Lácteas:

A cultura mista DVS ABT-4 (Chr-Hansen) contendo *Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus,* liofilizada e de uso direto, foi dissolvida assepticamente em um litro de leite desnatado esterilizado e resfriado a 5°C, sendo em seguida distribuída em frascos esterilizados, conforme descrito por THAMER & PENNA, 2005. Os frascos foram, então, mantidos em freezer à temperatura de -18°C, sendo descongelados no momento do preparo para inoculação da cultura diretamente no leite destinado à fabricação dos leites fermentados.

4.4-Preparação do Iogurte:

O preparo dos leites fermentados foi realizado de acordo com o tratamento a ser analisado, tendo como matéria-prima o leite longa-vida. O leite em pó desnatado e o açúcar foram misturados conforme a porcentagem específica de cada tratamento e reconstituídos em água, sob agitação constante e vigorosa. Esta mistura foi aquecida até 85°C e mantida por 20 minutos em banho termostatizado. Em seguida, seguiu-se ao resfriamento em banho de água e gelo até atingir 42°C. O tempo de fermentação do iogurte foi calculado a partir do início da inoculação, até obter-se o valor de pH próximo de 4,7. Terminada a fermentação, foi feito resfriamento em banho de água e gelo e os leites fermentados foram então embalados em garrafas de 1L e armazenados em refrigerador à temperatura de aproximadamente 5°C.

Todos os procedimentos foram repetidos uma vez ao mês, durante 3 meses, no período de janeiro a março/2010, totalizando 3 lotes de leite fermentado elaborado para cada tratamento. Cada lote foi constituído por 05 litros/tratamento, perfazendo aproximadamente 120 litros de iogurte processado ao longo do experimento. As Figuras 1 e 2 apresentam os leites fermentados no momento do envase e armazenados em câmara fria a 5°C, respectivamente.

Figura 1: Envasamento dos leites fermentados experimentais.

Figura 2: Leites fermentados armazenados em camara fria.

4.5- Caracterização da População de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) no Iogurte:

Os leites fermentados processados foram armazenados em câmara fria à temperatura de 5°C, por 21 dias. Foram colhidas amostras/tratamento do produto nos dias 1°, 10° e 21°, para a execução das análises laboratoriais.

Para a determinação de BAL, foram feitas as diluições decimais seriadas, em que 10 mL de amostra foram transferidas para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de água destilada estéril. Essa solução foi então homogeneizada e em seguida foram feitas as diluições subseqüentes até 10^{-6}, seguindo-se então do plaqueamento por profundidade.

Os leites fermentados foram avaliados em duplicata com inoculação por profundidade. A população de *Streptococcus termophilus* foi determinada utilizando-se ágar M 17, seguido de incubação em aerobiose a 37°C por 48 horas (IDF, 1997). A determinação da população de *Bifidobacterium animalis* foi feita utilizando-se de ágar MRS-IM com glicose e adicionado de soluções de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloreto de cisteína, seguida de incubação em anaerobiose a 37°C por 72 horas (CHR. HANSEN, 1999), e a de *Lactobacillus acidophilus* utilizando-se o agar MRS-IM com maltose, seguida de incubação de anaerobiose a 37°C por 72 horas (IDF, 1999).

A figura 3 mostra a preparação dos materiais necessários para seqüência das análises microbiológicas.

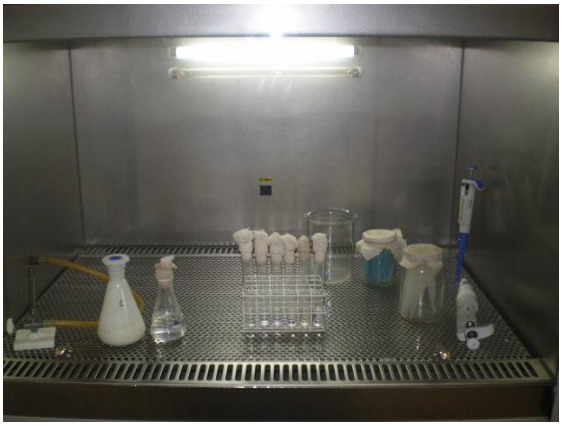

Figura 3: Preparo de materiais para realização das análises microbiológicas

4.6- Avaliação Físico-Química do Iogurte:

Os leites fermentados foram submetidos à análise de matéria seca, gordura e pH nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação, de acordo com as técnicas descritas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

O teor de proteína total dos leites fermentados, expresso em nitrogênio total (NT), foi determinado através do método de Kjeldahl, conforme metodologia descrita pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1995). A determinação do nitrogênio não protéico (NNP) foi efetuada após prévia precipitação das proteínas do leite fermentado com ácido tricloroacético a 15%, seguido de filtração e análise do filtrado através do método de Kjeldahl (AOAC, 1995). A determinação do nitrogênio não caseinoso (NNC) foi efetuada através do procedimento descrito por LYNCH e BARBANO (1998), os quais preconizam a precipitação da caseína com solução de ácido acético e acetato de sódio (pH = 4,6), seguida de filtração e análise da concentração de N no filtrado mediante o método de Kjeldahl. O resultado final (NNC) foi subtraído do valor de NT, fornecendo assim a concentração de caseína na amostra.

As variáveis NT, NNP, NNC e concentração de caseína foram também determinadas nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação.

4.7- Avaliação Sensorial dos leites fermentados:

Para este procedimento, foram empregados os critérios estabelecidos por AMERINE *et al*. (1967) e ajustados de acordo com SPREER (1991), para a avaliação sensorial de produtos lácteos fermentados. Para isto, as amostras de leite fermentado foram submetidas a um painel não treinado de 30 provadores, os quais atribuíram valores aos produtos, numa escala hedonística de 9 pontos (Figura 4) para cada uma das seguintes características: aspecto (peso 0,5); consistência (peso 1,0); odor (peso 0,5); e, sabor (peso 2,0). O valor final de cada amostra correspondeu à média ponderada de pontos atribuídos pelos provadores para cada

característica. As amostras foram submetidas ao painel em sua forma natural, sem acréscimo de outros ingredientes. Ainda, as provas foram realizadas nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. As provas foram realizadas no Laboratório de Análises Sensoriais do Departamento de Engenharia de Alimentos da FZEA/USP.

A Figura 4 mostra o modelo de uma ficha utilizada pelos provadores para avaliação de cada amostra de leite fermentado:

Data:	**Provador Nº:**		**Amostra Nº:**	
Classificação do Produto	**Aspecto**	**Consistência**	**Odor**	**Sabor**
Características de referência	*Branco a ligeiramente amarelado*	*Homogeneamente espesso; ausência de sinérise*	*Puro; ácido; típico aroma de iogurte*	*Puro, com bouquet; ácido; típico sabor de iogurte*
Excelente (9)				
Muito bom (8)				
Bom (7)				
Moderadamente bom (6)				
Indiferente (5)				
Moderadamente ruim (4)				
Ruim (3)				
Muito ruim (2)				
Péssimo (1)				
Nota Final:				
Observações:				

Figura 4: Modelo de Ficha de Avaliação Sensorial das amostras de leite fermentado.

A Figura 5 mostra a entrega de amostras dos leites fermentados a um provador durante a análise sensorial.

Figura 5: Apresentação de amostras aos provadores durante a análise sensorial.

4.8- Análise dos Resultados:

Os resultados obtidos nos exames laboratoriais foram submetidos à ANOVA de acordo com os procedimentos estabelecidos no g*eneral linear model* do SAS (SAS, 2004). As contagens de bactérias foram convertidas para log. A análise estatística das características avaliadas, que envolveram medidas repetidas no tempo, foi realizada utilizando-se os procedimentos *proc glm* e *proc mixed* do programa SAS (SAS, 2004) para obtenção do estudo de regressão através de contrastes ortogonais, sendo as diferenças testadas pelo teste de Tukey. Todas as inferências estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 – Avaliação Físico-Química:

A Tabela 2 apresenta as médias obtidas nas análises físico-químicas realizadas nos leites fermentados dos oito tratamentos avaliados nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. O teor de gordura obtido nos leites fermentados de todos os tratamentos foi fixo (0,2%), portanto esta variável não consta na Tabela 2 e nem foi avaliada estatisticamente.

Não houve efeito significativo ($P>0,05$) dos tratamentos sobre o pH dos leites fermentados, porém os valores diminuíram ($P<0,05$) similarmente em todos os tratamentos durante o armazenamento, possivelmente devido à pós-acidificação dos leites fermentados, que ocorreu independentemente da maior porcentagem de matéria seca observada em alguns tratamentos.

Segundo Collins et al. (1980) o aumento da acidez em leites fermentados pode ocorrer principalmente em decorrência da produção de ácido láctico, acético e benzóico, durante o armazenamento. O aumento da acidez pode também ocorrer devido à ação das bifidobactérias que podem produzir, durante a fermentação, ácido acético e láctico na proporção de 3:2 (Samona, Marakis, Robinson, 1996).

O incremento de sólidos totais nas formulações dos tratamentos foi evidenciada nos valores obtidos para matéria seca, assim como pela diferença estatisticamente significativa observada entre os tratamentos analisados, sobretudo nos tratamentos 6 e 7, nos quais houve adição de 10% e 15% de leite em pó, respectivamente, além de 10% de açúcar. Coerentemente, observou-se também maiores concentrações de proteína total e caseína ($P<0,05$) nos tratamentos com adição de 10 ou 15% de leite em pó (T3 a T7). Entretanto, aparentemente não houve influencia da adição de açúcar nos teores de proteína total e caseína dos leites fermentados.

Tabela 2: Resultados das análises de pH, matéria seca, proteína, nitrogênio não-proteico (NNP), nitrogênio não-caseinoso (NNC) e caseína dos leites fermentados durante o armazenamento por 21 dias.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	EPM
pH									
Dia 01	4.53^{Aa}	4,82^{Aa}	4,65^{Aa}	4,69^{Aa}	4,41^{Aa}	4,76^{Aa}	4,66^{Aa}	4,55^{Aa}	0,059
Dia 10	4,61^{Ba}	4,44^{Ba}	4,60^{Ba}	4,49^{Ba}	4,46^{Ba}	4,39^{Ba}	4,88^{Ba}	4,38^{Ba}	0,078
Dia 21	4,27^{Ca}	4,30^{Ca}	4,34^{Ca}	4,36^{Ca}	4,11^{Ca}	4,24^{Ca}	4,49^{Ca}	4,10^{Ca}	0,029
EPM	0,115	0,098	0,091	0,096	0,119	0,117	0,121	0,094	
Matéria Seca					%				
Dia 01	8,41^{h}	12,97^{f}	15,97^{e}	18,66^{d}	19,28^{c}	21,27^{b}	24,15^{a}	15,58^{e}	0,982
Dia 10	8,37^{h}	12,63^{f}	15,42^{e}	18,24^{d}	19,69^{c}	21,81^{b}	25,55^{a}	16,59^{e}	1,063
Dia 21	8,41^{h}	12,63^{f}	15,43^{e}	18,73^{d}	19,16^{c}	22,17^{b}	24,095^{a}	16,95^{e}	0,990
EPM	0,148	0,353	0,268	0,249	0,359	0,315	0,430	0,434	
Proteína					%				
Dia 01	4,15^{b}	4,43^{b}	8,05^{a}	8,72^{a}	7,33^{a}	7,24^{a}	6,81^{a}	5,02^{b}	0,3665
Dia 10	4,41^{b}	4,89^{c}	6,92^{a}	7,81^{a}	7,51^{a}	8,19^{a}	6,73^{a}	4,60^{b}	0,347
Dia 21	4,913^{d}	4,893^{c}	7,876^{a}	7,69^{a}	7,76^{a}	7,96^{a}	7,74^{a}	4,83^{b}	0,338
EPM	0,186	0,093	0,755	0,782	0,391	0,851	0,479	0,354	

Continua...

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A; EPM: Erro padrão da média.

^{A,B} Médias na mesma coluna com a mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

$^{a-h}$ Médias na mesma linha com a mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 2 (Continuação...): Resultados das análises de pH, matéria seca, proteína, nitrogênio não-proteico (NNP), nitrogênio não-caseinoso (NNC) e caseína dos leites fermentados durante o armazenamento por 21 dias.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	EPM
NNC					%				
Dia 01	0,0049[a]	0,0051[a]	0,0042[a]	0,0030[a]	0,0047[a]	0,0050[a]	0,0028[a]	0,0023[a]	0,00025
Dia 10	0,0043[a]	0,0019[a]	0,0033[a]	0,0027[a]	0,0040[a]	0,0032[a]	0,0022[a]	0,0019[a]	0,00024
Dia 21	0,0039[a]	0,0020[a]	0,0014[a]	0,0012[a]	0,0015[a]	0,0017[a]	0,0018[a]	0,0017[a]	0,00020
EPM	0,00200	0,00056	0,00047	0,00034	0,00062	0,00056	0,00015	0,00027	
NNP					%				
Dia 01	0,081[a]	0,048[b]	0,067[a]	0,073[a]	0,060[a]	0,066[a]	0,071[a]	0,041[b]	0,0030
Dia 10	0,064[a]	0,048[b]	0,052[a]	0,066[a]	0,054[a]	0,062[a]	0,082[a]	0,041[b]	0,0029
Dia 21	0,051[a]	0,050[b]	0,051[a]	0,066[a]	0,057[a]	0,063[a]	0,095[a]	0,048[b]	0,0037
EPM	0,0047	0,0008	0,0049	0,0062	0,0036	0,0018	0,0041	0,0015	
Caseína					%				
Dia 01	4,14[b]	4,43[b]	8,05[a]	8,72[a]	7,32[a]	7,55[a]	6,81[a]	5,02[b]	0,3665
Dia 10	4,40[b]	4,89[b]	8,46[a]	7,81[a]	7,50[a]	8,19[a]	6,73[a]	4,60[b]	0,3473
Dia 21	4,91[b]	4,89[b]	7,87[a]	7,69[a]	7,76[a]	7,96[a]	7,74[a]	4,83[b]	0,3378
EPM	0,187	0,093	0,755	0,782	0,392	0,851	0,479	0,354	

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A; EPM: Erro padrão da média.

[A,B] Médias na mesma coluna com a mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

[a-h] Médias na mesma linha com a mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Durante o período de armazenamento por 21 dias, os percentuais de proteína e caseína mantiveram-se semelhantes em todos os tratamentos, havendo somente um pequeno aumento (não significativo) nos dias seguintes a fabricação. Não foram constatadas diferenças (P>0,05) nos percentuais de NNC entre os tratamentos, sendo que os valores de NNP foram menores (P<0,05) somente nos leites fermentados dos tratamentos 2 e 8. Os resultados obtidos permitem considerar que os leites fermentados experimentais apresentaram parâmetros físico-químicos relativamente estáveis durante o armazenamento por 21 dias.

Ainda, de acordo com Lerayer et al. (2002) e a Instrução Normativa n. 46 do MAPA de 2007, os leites fermentados desnatados devem possuir nível de gordura máxima de 0,5%, pH por volta de 4,5 a 4,6 e conteúdo protéico mínimo de 2,9%. Também, segundo Kurmann (1997), o pH ideal para leites fermentados é próximo de 4,5, porquanto valores inferiores podem levar à rejeição por parte dos consumidores e favorecer a contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, causando dessoramento. Desta forma, pode-se afirmar que todos os leites fermentados avaliados encontraram-se dentro das normas brasileiras previstas para este tipo de alimento, no que diz respeito aos quesitos físico-químicos.

5.2 – Avaliação Microbiológica:

As análises microbiológicas foram efetuadas separadamente para a quantificação de cada microrganismo supostamente presente no leite fermentado. As contagens obtidas para *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* nas amostras dos diferentes tratamentos encontram-se na Tabela 3. Conforme observado em relação aos parâmetros físico-químicos, exceto o pH, não houve efeito (P>0,05) do tempo de armazenamento dos leites fermentados sobre as contagens de microrganismos obtidas nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação. Deste modo, ficou evidenciada a estabilidade dos microrganismos analisados durante toda a vida de prateleira dos oito tratamentos avaliados.

Tabela 3: Resultados das contagens de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* nos leites fermentados durante o armazenamento por 21 dias.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	EPM
Streptococcus thermophilus					Log UFC/ml				
Dia 01	8,23^{ab}	8,11^{d}	8,22^{ab}	8,12^{c}	8,18^{b}	8,18^{ab}	8,04^{e}	7,92^{f}	0,022
Dia 10	8,28^{ab}	8,10^{d}	8,20^{ab}	8,17^{c}	8,12^{b}	8,19^{ab}	8,03^{e}	7,92^{f}	0,023
Dia 21	8,26^{a}	8,11^{d}	8,27^{a}	8,17^{c}	8,16^{b}	8,19^{ab}	8,01^{e}	7,88^{f}	0,026
EPM	0,009	0,011	0,016	0,021	0,016	0,014	0,019	0,015	
Lactobacillus acidophilus					Log UFC/ml				
Dia 01	6,44^{a}	6,17^{b}	6,49^{a}	6,49^{a}	6,47^{a}	6,42^{a}	6,54^{a}	6,16^{b}	0,003
Dia 10	6,46^{a}	6,24^{b}	6,46^{a}	6,52^{a}	6,46^{a}	6,35^{a}	6,52^{a}	6,24^{b}	0,027
Dia 21	6,47^{a}	6,25^{b}	6,55a	6,56^{a}	6,52^{a}	6,46^{a}	6,52^{a}	6,22^{b}	0,029
EPM	0,022	0,028	0,027	0,019	0,029	0,029	0,009	0,031	
Bifidobacterium animalis					Log UFC/ml				
Dia 01	6,08^{dg}	6,07^{ef}	6,31^{b}	6,51^{a}	6,06^{ef}	6,24^{c}	6,58^{a}	6,04^{dg}	0,043
Dia 10	6,08^{dg}	6,16^{ef}	6,33^{b}	6,48^{a}	6,05^{f}	6,23^{c}	6,55^{a}	6,03^{dg}	0,041
Dia 21	6,07^{dg}	6,14^{ef}	6,37^{b}	6,56^{a}	6,12^{f}	6,25^{c}	6,61^{a}	6,05^{g}	0,045
EPM	0,030	0,021	0,014	0,016	0,034	0,026	0,033	0,024	

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A; EPM: Erro padrão da média.

$^{a-f}$ Médias na mesma linha com a mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Não foram constatadas diferenças (P>0,05) entre as médias em uma mesma coluna.

Observou-se, porém, diferença significativa (P<0,05) entre as contagens microbiológicas obtidas entre os tratamentos, sendo que, de modo geral, os tratamentos com maior teor de sólidos totais (T3, T4, T6 e T7) foram os que apresentaram maiores contagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*, indicando a provável influencia do percentual de leite em pó nestas contagens.

A Figura 6 mostra uma típica placa de Petri contendo colônias de *Streptococcus thermophilus* obtidas nas amostras de leite fermentado.

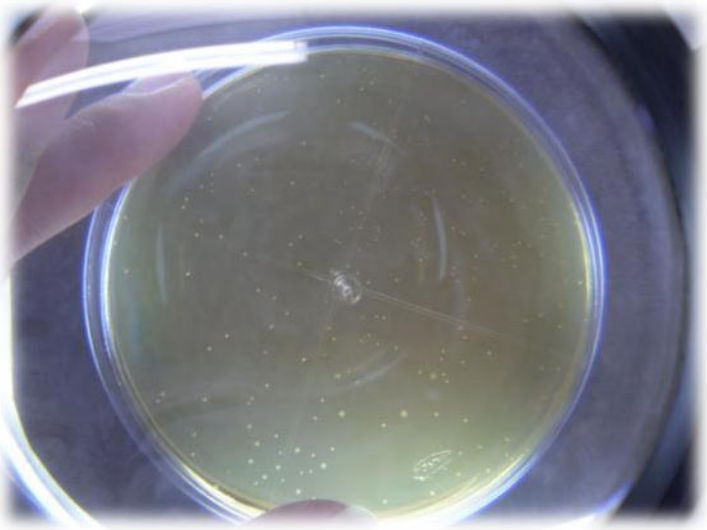

Figura 6: Colônias de *Streptococcus thermophilus* isoladas em Agar M17.

A contagem média de *S. thermophilus* variou de $7{,}21 \times 10^8$ UFC/ml a $8{,}23 \times 10^8$ UFC/ml (7,88 a 8,23 Log UFC/mL) (Tabela 3). As maiores contagens de *S. thermophilus* foram encontradas nos tratamentos com maior porcentagem de sólidos totais, especialmente naqueles suplementados com 10% de leite em pó (T3 e T6), mas também no tratamento 1 (T1), que não foi suplementado com leite em pó e/ou açúcar. Estes tratamentos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, Ainda, a adição de açúcar parece não influenciar na contagem final de *Streptococcus thermophilus* quando se compara os tratamentos 3 e 6 (T3 e T6).

A Figura 7 apresenta as médias globais obtidas para as contagens de *Streptococcus thermophilus* para os oito tratamentos, permitindo observar mais claramente que as maiores contagens foram encontradas nos tratamentos com maior adição de leite em pó (T3 e T6), além de T1, que não sofreu adições.

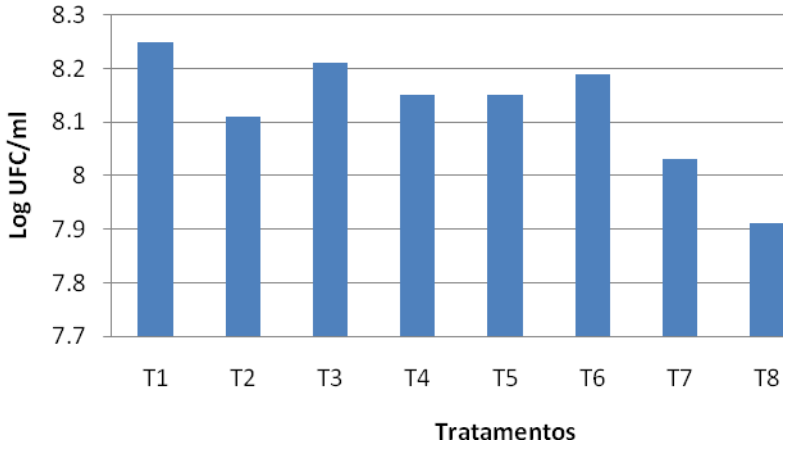

Figura 7: Contagem de *Streptococcus thermophilus* nos oito tipos de leites fermentados experimentais. Valores expressam a média dos resultados obtidos nos dias 1,10 e 21 após a fabricação.

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A.

Em trabalho realizado por Thamer e Penna (2005), no qual se avaliou o efeito do teor de soro, açúcar e frutooligossacarídeos sobre a viabilidade de bactérias ácido-lácticas, constatou-se maior contagem de bactérias lácticas nas bebidas com menor acidez e elevado teor de sólidos totais.

Observou-se, por outro lado, que os tratamentos 7 (T7) e 8 (T8) obtiveram menores contagens de *Streptococcus thermophilus*. Tais resultados podem estar relacionados com a alta concentração de nutrientes no tratamento 7, além da presença de açúcar (sacarose), fatores estes que podem prejudicar a atividade de água e a conseqüente viabilidade de bactérias ácido-lácticas.

Em trabalho realizado por Oliveira e Damin (2003), no qual se avaliou o efeito do teor de sólidos totais na firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte, constatou-se que leites contendo maior teor de sólidos totais obtiveram maior acidez total, independente da co-cultura utilizada.

Ainda, segundo Shah & Ravula (2000), altas concentrações de sacarose adicionadas ao leite antes da fermentação podem inibir as bactérias do iogurte levando a longos tempos de fermentação e a um baixo desenvolvimento de acidez. Isto se deve aos efeitos osmóticos dos solutos no leite e a baixa atividade de água (VINDEROLA; REIHEINMER, 2000). Desta forma, tais citações podem corroborar os resultados obtidos no presente estudo, ainda que os tratamentos 7 e 8 tenham apenas 10% de açúcar, porcentagem esta que não prejudicou o crescimento de *S. thermophilus* nos tratamentos T5 e T6.

A Figura 8 mostra uma típica placa de Petri contendo colônias de *Lactobacillus acidophilus* obtidas nas amostras de leite fermentado.

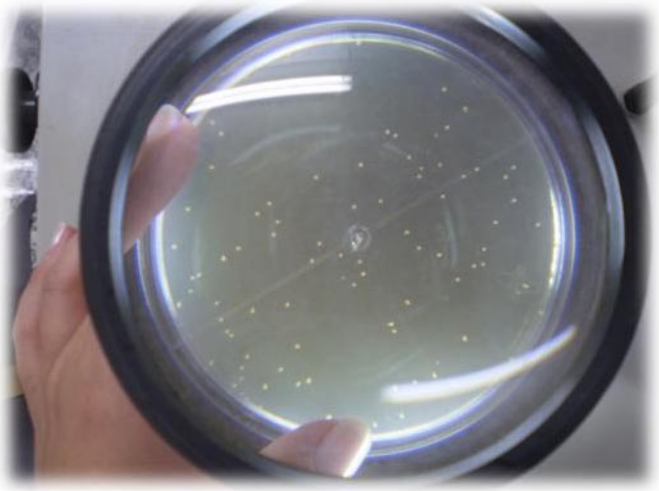

Figura 8: Colônias de *Lactobacillus acidophilus* isoladas em Ágar MRS-IM com maltose.

A Figura 9 mostra as contagens médias globais obtidas para *Lactobacillus acidophilus* nos oito tratamentos.

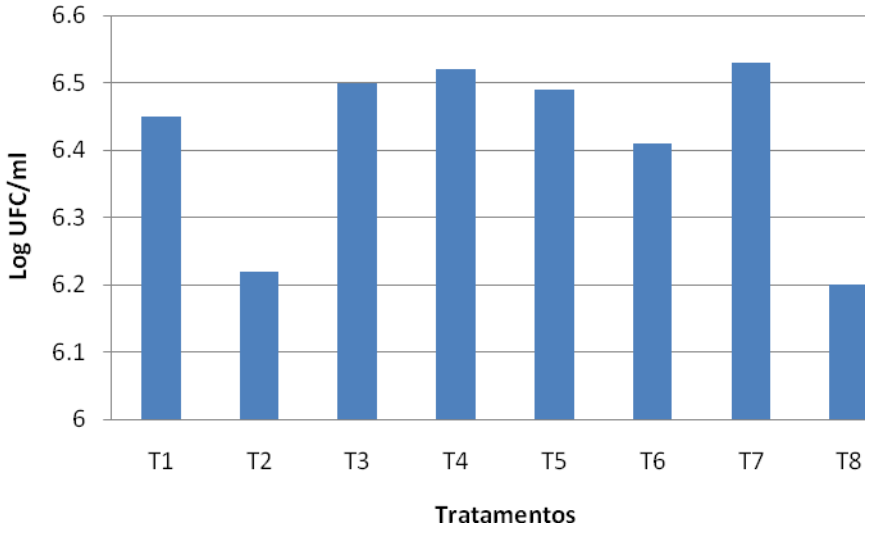

Figura 9: Contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos oito tipos de leites fermentados experimentais. Valores expressam a média dos resultados obtidos nos dias 1,10 e 21 após a fabricação.

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A.

A contagem média de *L. acidophilus* variou de $6{,}16 \times 10^6$ UFC/ml a $6{,}54 \times 10^6$ UFC/ml (6,16 a 6,56 Log UFC/mL) (Tabela 3). A Figura 9, juntamente com os resultados estatísticos obtidos (Tabela 3), permite observar uma maior contagem de *Lactobacillus acidophilus* nos tratamentos com maior porcentagem de sólidos totais, porém, não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0{,}05$) entre estes tratamentos. Deste modo, embora o maior teor de sólidos totais colabore na maior contagem destes microrganismos, o enriquecimento acima do obtido no tratamento 3 (T3), de 10%, ou o acréscimo de açúcar, parecem não influenciar neste quesito.

Segundo Tramer (1973), *Lactobacillus acidophilus* poderia substituir *Lactobacillus bulgaricus* na produção de iogurtes e leites fermentados. Porém, o *L. acidophilus* apresenta

baixo crescimento no leite, mesmo quando suplementado com nutrientes, dado este que poderia explicar o fenômeno ocorrido no presente experimento.

Menores contagens de *L. acidophilus* foram obtidas nos tratamentos T2 e T8. No caso do tratamento T8, esta menor contagem pode ser justificada pela maior acidez obtida neste caso, já que os valores médios de pH variaram de 4,5 a 4,1. Segundo Collins et al. (1980) o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* pode ser influenciado pelo aumento da acidez, principalmente pela produção de ácido láctico, acético e benzóico, durante o armazenamento. Tais mudanças podem também ser em decorrência da menor porcentagem de sólidos totais neste tratamento, assim como no tratamento T2. No caso dos tratamentos T2 e T8, possíveis falhas quanto à assepsia durante a produção e estocagem podem ter colaborado nas menores contagens de *L. acidophilus* observadas. De acordo com GOMES & MALCATA (1999), em função da baixa velocidade de multiplicação das culturas probióticas em relação às bactérias láticas tradicionais, controle da assepsia e adição de fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para se obter altas contagens iniciais de células probióticas viáveis, caso contrário, esta população ficaria muito abaixo daquela do fermento.

Em alimentos fermentados, as bactérias ácido-lácticas em culturas mistas podem ser injuriadas devido ao ácido láctico produzido pelas demais bactérias presentes, assim, como pela acidificação crescente do produto durante a estocagem (HUTKINS, NANNEN; 1993). Similarmente, o *L. acidophilus* pode ser inibido de acordo com a composição do meio e disponibilidade de nutrientes (COLLINS, ARAMAKI, 1980; GILLILAND; SPECK, 1977). Desta forma, tais dados encontrados na literatura podem justificar o dados obtidos neste experimento para *L. acidophilus*.

A Figura 10 apresenta uma típica placa de Petri contendo colônias de *Bifidobacterium animalis* obtidas nas amostras de leite fermentado.

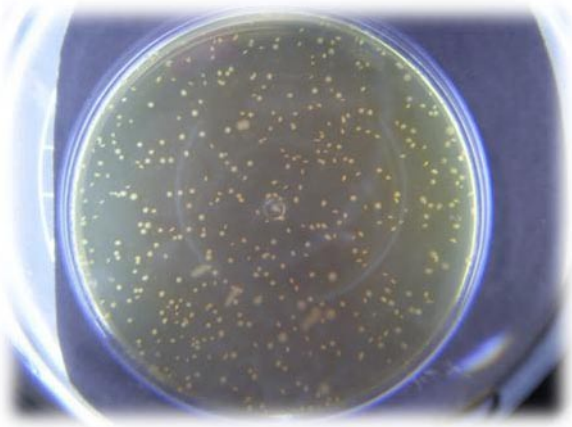

Figura 10: Colônias de *Bifidobacterium animalis* isoladas em Ágar MRS-IM adicionado de glicose e de soluções de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloreto de cisteína.

A contagem média de *B. animalis* nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação variaram de $6{,}04 \times 10^6$ UFC/ml a $6{,}57 \times 10^6$ UFC/ml (6,03 a 6,61 Log UFC/mL) (Tabela 3), sendo que a Figura 11 mostra as contagens médias globais de *Bifidobacterium animalis* nos oito tratamentos.

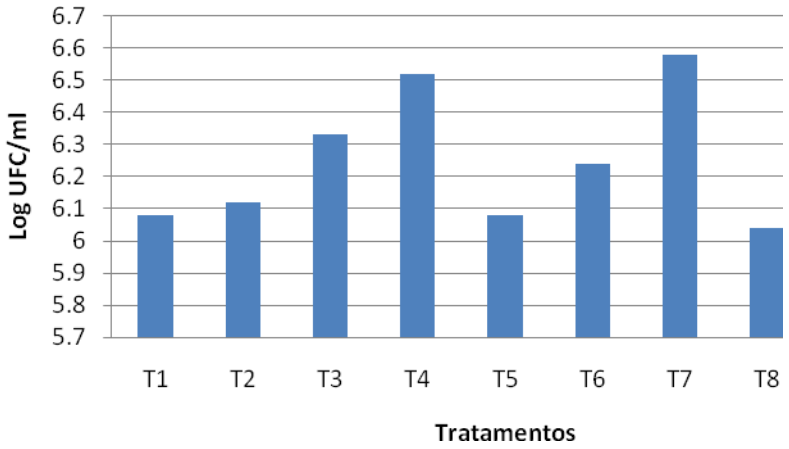

Figura 11: Contagem de *Bifidobacterium animalis* nos oito tipos de leites fermentados experimentais, Valores expressam a média dos resultados obtidos nos dias 1,10 e 21 após a fabricação.

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A.

Os dados observados na Figura 11, analisados juntamente com os resultados estatísticos (Tabela 3), permitem afirmar que houve um maior crescimento de *Bifidobacterium animalis* nos tratamentos com maior porcentagem de sólidos totais, sendo que a diferença destas contagens entre os tratamentos foi estatisticamente significativa ($P<0,05$). Estes resultados permitem afirmar que houve um maior desenvolvimento destes microrganismos em presença de maior porcentagem de sólidos totais, dados estes que vão de encontro com os encontrados na literatura (ZACHARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S.; 2004). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos com mesmo teor de sólidos totais (T1 e T8), cuja diferença foi a adição de açúcar no tratamento T8, mostrando que este componente não afeta na contagem final de *Bifidobacterium animalis*, nas condições do presente estudo.

Em geral, as bifidobactérias se desenvolvem melhor em meios sintéticos do que em leite. Contudo, estes meios se tornam caros para a multiplicação de bifidobactérias em grande escala, além de causarem sabores desagradáveis nos produtos finais. Assim, a melhora das condições de multiplicação de bifidobactérias em leite pode ser obtida, por exemplo, pela adição de fontes de nitrogênio ou substancias que abaixem o potencial redox, (ZACHARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S.; 2004).

Em trabalho realizado por Thamer & Penna (2005), analisou-se o efeito de teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. Dessa forma, os autores determinaram as populações de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*. As maiores populações de microrganismos probióticos foram observadas nas bebidas com baixa acidez e maior teor de sólidos totais, além de haver predominância de *Streptococcus thermophilus* sobre os demais microrganismos, o que também foi observado no

presente estudo. Corroborando este fato, Gardini et al (1999) demonstraram que a composição do produto em termos de conteúdo de sólidos total afeta a viabilidade de probióticos.

De acordo com Vinderola, Mochuitti e Reinheimer (2002), diversos tipos de interações foram detectados entre as bactérias ácido-lácticas, como estimulação, inibição e ausência de efeitos, sendo que, no geral, as bactérias probióticas foram as mais inibidas nesse estudo. A seleção da melhor combinação de estirpes deve ser uma medida adotada para aperfeiçoar o desempenho tecnológico e favorecer a sobrevivência bacteriana durante a estocagem refrigerada dos produtos lácteos.

Com base nestas considerações, Jaymanne e Adams (2006) dizem que *Bifidobacterium animalis* tem demonstrado habilidade para sobreviver em ambientes ácidos. Por serem mais resistentes, são preferencialmente utilizados comercialmente na produção de leites fermentados, o que está condizente com os resultados satisfatórios obtidos para *Bifidobacterium animalis* neste trabalho.

Levando-se em consideração os três microrganismos analisados, observou-se uma maior contagem de *S. thermophilus* sobre os microrganismos probióticos (*L. acidophilus e B. animalis*). O mesmo foi observado em trabalho realizado por Oliveira e Damin (2003), onde se estudou o efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. Neste estudo, o número médio de *S. thermophilu*s foi de $3,7x10^9$ UFC/ml e $6,2x10^9$ UFC/ml após 1 e 7 dias de armazenamento, respectivamente, predominando sobre o número de bactérias do iogurte e probióticas, cujas médias obtidas foram de $1,4x10^9$ para *L. acidophilus*, $6,5x10^7$ para *L. bulgaricus* e $1,8x10^9$ UFC/ml para *L. rhamnosus*. Os autores observaram que os leites contendo maiores teores de sólidos totais apresentaram maior acidez total, além de contagens de bactérias probióticas acima do reportado na literatura. De fato, segundo Dave & Shah (1998), para culturas mistas

de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, o primeiro predomina sob todas as condições de culturas usadas.

No que concerne aos efeitos benéficos dos probióticos sobre a saúde humana e sua importância terapêutica, sabe-se que há necessidade da ingestão de doses elevadas de probióticos, para que os mesmos sobrevivam à exclusão competitiva e cheguem viáveis ao sistema digestivo humano (OUWEHAND et al, 1999).

Gomes & Malcata (1999) enfatizaram que os fabricantes devem observar se os bio-produtos fermentados contêm número mínimo satisfatório de células ativas no momento do consumo de, pelo menos, 10^6 UFC/mL devido à dose mínima terapêutica diária ser de 10^8 – 10^9 células viáveis em 100g do bio-produto fermentado. Outros autores sugerem que para efeito terapêutico o produto deve conter quantidades acima de 10^5células/mL (SHAH et,al,, 1995). A legislação brasileira fixa o limite mínimo em 10^6 UFC/mL (MAPA, 2007). Desta forma, observando-se a contagem obtida de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis* para os oito tratamentos, é possível afirmar que os mesmos apresentam a contagem mínima recomendada na literatura e exigida pela legislação brasileira, mantendo-se estáveis nos oito tratamentos durante os 21 dias de armazenamento.

5.3 – Avaliação Sensorial

A análise sensorial realizada avaliou quatros parâmetros: aspecto, consistência, odor e sabor. Tais parâmetros foram analisados nos oito tratamentos no 1°, 10° e 21° dias após a fabricação, com 30 provadores não-treinados. Cada provador avaliou os quatro parâmetros citados acima em cada amostra, dando notas de acordo com uma escala de intensidade, cujas notas variavam de 1 (péssimo) a 9 (Excelente). Para cálculo da nota final, foram aplicados pesos diferentes para cada parâmetro, sendo as notas expressas em médias obtidas para cada tratamento, em cada dia de análise.

A Tabela 4 apresenta as médias das notas atribuídas pelos provadores aos leites fermentados nos dias 1, 10 e 21 após a fabricação.

Tabela 4: Notas médias e erro padrão referentes à análise sensorial obtidos para os oito tratamentos.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	EPM
Dia 01	$5,7^{Ab}$	$5,7^{Bb}$	$4,7^{Bb}$	$5,1^{Bb}$	$6,7^{Aa}$	$6,9^{Aa}$	$6,5^{Aa}$	$6,3^{Aa}$	0,10
Dia 10	$6,0^{Aab}$	$6,2^{Ab}$	$5,6^{Ab}$	$6,1^{Aab}$	$6,5^{Ab}$	$7,5^{Ab}$	$6,7^{Ab}$	$6,2^{Ab}$	0,11
Dia 21	$4,2^{Bcb}$	$5,8^{Bcb}$	$5,5^{Ab}$	$5,2^{Bb}$	$5,6^{Bb}$	$7,0^{Aa}$	$5,8^{Bb}$	$5,5^{Bb}$	0,12
EPM	0,19	0,14	0,16	0,18	0,18	0,14	0,17	0,17	

T1: leite fermentado desnatado (LFD); T2: LFD+5% leite em pó (LP); T3: LFD+10% LP; T4: LFD+15% LP; T5: LFD+5% LP+10% açúcar (A); T6: LFD+10% LP+10% A; T7: LFD+15% LP+10% A; T8: LFD+10% A; EPM: Erro padrão da média.

^{A,B} Médias na mesma coluna com a mesma letra maiúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

$^{a-c}$ Médias na mesma linha com a mesma letra minúscula não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Foram observadas diferenças estatisticamente significativa (P<0,05) entre os tratamentos e também entre os dias analisados, com uma tendência a diminuição das notas médias nos dias subseqüentes a fabricação, com exceção do tratamento 6 (T6), cujas notas médias não apresentaram mudança estatisticamente significativa entre si (P>0,05), mantendo-se constantes durante os três dias analisados.

Os dados obtidos permitem visualizar uma nítida preferência dos provadores pelas amostras dos tratamentos com adição de açúcar (T5 a T8), com diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (P<0,05). Esta tendência pode estar relacionada à preferência dos consumidores por iogurtes comerciais de composição próxima à dos tratamentos que apresentaram maior nota, principalmente dos tratamentos T6 (leite

desnatado+10% leite em pó+10% açúcar) e T7 (leite desnatado+15% leite em pó+10% açúcar). Entretanto, embora as maiores notas tenham sido obtidas para o tratamento 6 (T6), este valor não foi estatisticamente significativo para o dia 1 e 10 quando comparando com os outros tratamentos também contendo açúcar (T5, T7 e T8). Deste modo, estes tratamentos foram avaliados como “moderadamente bons”, enquanto os tratamentos sem adição de açúcar foram avaliados como “moderadamente ruim” ou “indiferente”.

No dia 21, observou-se melhor nota para o tratamento 6 (T6), com diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) quando comparando com os outros tratamentos. Assim, o tratamento 6 (T6) foi avaliado como “bom” neste dia de análise, enquanto os outros tratamentos mantiveram a avaliação de “indiferentes” ou “moderadamente ruim”.

Segundo Heller (2001) variadas espécies ou subespécies de bactérias ácido-lácticas podem conferir distintas características aos produtos alimentícios. Os compostos metabólicos finais de determinadas culturas, puras ou mistas, podem contribuir para a elaboração de produtos com características sensoriais indesejáveis.

Além disso, segundo Samona et al, (1996) as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácidos acético (SAMONA, MARAKIS, ROBINSON, 1996) e lático na proporção de 3:2, de modo que seu desenvolvimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma “a vinagre”, dificultando a aceitação do produto pelos consumidores, característica esta que pode influencia a aceitação do produto.

Já as menores notas obtidas nos dias subseqüentes a produção dos leites fermentados podem ter sido em decorrência da pós-acidificação, já que em alguns tratamentos, tais como T1 e T3, o pH variou entre 4,30 e 4,10, principalmente no dia 21 (Tabela 3). Muitos provadores relataram que algumas amostras, tais como as dos tratamentos 2 (T2) e 3 (T3), apresentavam sabor “forte”, ou mesmo sabor de “queijo”.

Segundo Kurmann (1997), o pH ideal para leites fermentados é próximo de 4,5, porquanto valores inferiores podem levar a rejeição por parte dos consumidores e favorecer a contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, causando dessoramento ou sinérese. No presente estudo, nenhum dos tratamentos apresentou sinérese, sendo que não houve diferença ($P>0,05$) nos valores de pH, cujos valores variaram no dia 21 após a fabricação de 4,10 (T8) a 4,49 (T7). Estes fatos indicam que o pH das amostras não influenciou as diferenças nas notas atribuídas pelos provadores aos leites fermentados experimentais.

Em síntese, o tratamento 6 foi o que obteve as melhores notas na avaliação sensorial, tendo maior aprovação dos provadores nos três dias de análise, porém com diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) apenas para o dia 21, mostrando assim ser este o tratamento mais adequado de acordo com os quesitos levados em conta pelos provadores.

6 - CONCLUSÕES:

Face aos resultados obtidos no presente estudo, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir que:

1) As variáveis físico-químicas dos leites fermentados experimentais mantiveram-se estáveis durante os 21 dias de estocagem, com exceção do pH, em decorrência da natural pós-acidificação destes produtos durante a vida-de-prateleira;

2) A contagem de *S. thermophilus* prevaleceu sobre a contagem dos microrganismos probióticos utilizados no estudo;

3) Foram obtidas maiores contagens de *L. acidophilus* e *B. animalis* nos tratamentos com maior porcentagem de sólidos totais (T4, T6 e T7), porém a adição de açúcar na porcentagem utilizada neste trabalho parece não influenciar nas contagens das bactérias ácido-lácticas.

4) As contagens para *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis*, permaneceram estáveis em todos os tratamentos durante os 21 dias de armazenamento, e estiveram de acordo com o mínimo estabelecido pela legislação brasileira.

5) As notas da avaliação sensorial dos leites fermentados experimentais diminuíram durante o armazenamento por 21 dias, com exceção dos tratamentos T3 e T6.

6) O tratamento T6, constituído de leite desnatado (0,2% gordura) + 10% de leite em pó + 10% de açúcar obteve maior média na avaliação sensorial, indicando ser esta formulação a melhor dentre as avaliadas para a produção de leite fermentado contendo as bactérias probióticas utilizadas no estudo.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, Legislação, Visalegis, **Resolução RDC n.2 de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substancias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional ou de saúde, Disponível em: <http://e-legis,anvisa,gov,br/leisref/public/showact,php?id=1567&word>, Acesso em: 21 de janeiro de 2008.

ALAIS, C.; Principe das techniques laitiéres, In: CHEFTEFJ,; CUE. J.L.; LORIENT, D.; ed. **Science du lait**, Paris, Édition SEPAIC, 1984, p.247-310.

ALM..L., The therapeutic effects of various cultures: an overview. In: ROBINSON, R.K.; The therapeutical properties of fermented milks, London. **Elsevier Applied Science**, p.45-64, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Official methods of analyses of AOAC International, 17 ed, Gaithersburg: AOAC, 1995.

AZEVEDO, S.; Iogurte light quer conquistar consumidor que não faz dieta, **Terra viva**. Disponível em: <http//www,terraviva,com,br/clique/iogurte,html>. Acesso em 15/07/2009.

BARRETO, G.P.M.; Quantificaçao de *Lactobacillus acidohpilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil; **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.119-126, 2003.

BÉAL, C.; CORRIEU, G.; Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398at the different steps of their production, **LWT – Food and Science Technology**, v. 27, p.86-92, 1994.

BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C.; Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroids* strains in milk, **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1520-1527, 1997.

BIAVATI, B.; VESCOSO, M.; TORRIANI, S.; BOTAZZI, V.; Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications, **Annals of Microbiology**, v.50, p.117-131, 2000.

BJORKSTEN, B.; SEPP, E.; JULGE, K.; VOOR, T.; MIKELSAAR, M.; Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.108, n.4; p.516-520, 2001.

BRANDÃO, S.C.C.; Tecnologia da produção industrial de leite, **Revista Leite e Derivados,** n.25, p.24-38, 1995.

CASALIS, J,; Facterus technologiques influençant La consistance, La texture, l'arome, et Le gout Du yaourt, **Industries Alimentaires et Agricoles**, v.92, n.11, p.1253-1262, 1975.

CHANDAN, C.R.; ed. Manufacturing yogurt and fermented milks, Oxford; **Balckwell Publishing**, 364p, 1992.

CHR HANSEN, Method for counting probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* in milk products made with nu-trish cultures, 4 p, 1999.

COLLET, L.S.F.C.; **A influência da adição de caseinato de sódio sobre o escoamento e posterior recuperação estrutural do iogurte batido**, São Paulo, 2005, 105p.; Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.

COLLINS, E.B.; HALL, J.B.; Growth of Bifidobacteria in milk and preparation of *B. infantis* for a dietary adjunct; **Journal of Dairy Science**, v.67, n.7, p.1376-1380, 1984.

COLLINS, E.B.; ARAMAKI, K.; Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*, **Journal of Dairy Science**, v.62, p.353, 1980.

D'AIMMO, M.R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B.; Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium spp* isolated from dairy and pharmaceutical products, **International Journal of Food Microbiology**, v,115, p,35-42, 2006.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P.; Viability of yoghurt and probiotic bactéria in yoghurts made from commercial starters cultures, **International Dairy Journal**, v.7, p.31-41, 1997.

DAVE, R,I,; SHAH, N,P, Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt, **Journal of Dairy Science**, v, 81, n,11, p, 2804-2816, 1998.

DAVIS, J.G.; Dietary or Health yogurt, **Dairy Industries**, v.35, p.827, 1970.

DELLAGLIO, F.; TORRANI, S.; VLAEMINCK, G.; Specific characteristics of microorganisms used for fermented Milks, **Bulletin of International Dairy Federation**, v.277, p.4-16, 1992.

DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIER, J.; Probiotics-compensation for lactase insufficiency, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2; p.421-429, 2001.

DONNET-HUGHES, A.; ROCHAT, F.; SERRANT, P.; AESCHLIRMANN, J.M.; SCHIFFRIN, J.E.; Modulation of nonspecific mechanisms of defense by acid lactic bacteria: effective dose, **Journal of Dairy Science**, v.82, p.863-869, 1999.

DONG, X.; CHENG, G.; JIAN, W.; Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers, **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.386-390, 2000.

DRIESSEN, F.M.; LOONES, A.; Developments in the fermentation process (liquid, stirred and set fermented milks) new technologies for fermented milks, **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.277, p.28-40, 1992.

DU PLESSIS, E.M.; DICKS, L.M.T.; VESCOSO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F.; *Lactobacillus* and related species: a review, **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.46, n.2, p.319-340, 1996.

[FAO] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live bacteria**, Córdoba, 2001, 34 p.

FERREIRA, C.L.L.F., Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos, In: PORTUGAL, J.A.B., CASTRO, M.C.D., SILVA, P.H.F., SAVINO, A.C., NEVES, B.S., ARCURI, E.F., **O Agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**, Juiz de Fora: EPAMIG - Centro Tecnológico - ILCT, p.183-203, 2001.

FOCHINO, R.; CAFARO, I..; OTTOGALLI, G.; Studio sulla vitalitá di batteri probiotici presenti in campioni di latti fermentati del commercio, **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.47, p.151-164, 1997.

FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, Y.; TEREDA, A.; MITSUOKA, T.; Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin, A production in healthy children, **International Journal of Food and Microbiology**, v.42, p.39-44, 1998.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; FITZGERALD, G.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; STANTON, C.; Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar, **Journal of Agric. Food. Chem.**, Washington, v.47, n.12, p.4907-4916, 1999.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E.; TORRIANI, S.; Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp, *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks, **International Dairy Journal**, v.9, p.125-134, 1999.

GAVINI, F.; POURCHER, A.M.; NEUT,C.; MONGET,D.; ROMOND,C.; OGER,C.; IZARD, D.; Pheonotypic differenciation of bifidobacteria of human and animal origin, **International Journal Systematic Bacteriology**, v.4, p.548-557, 1991.

GIBSON, G.R.; WNAG, X.; Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria , **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.175-188, 1990.

GILLILAND, S.E.; SPECK, L.M.; Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and foodborne pathogens in associative cultures, **Journal of Food Protection**, v.40, p.820, 1977.

GILLILAN, S.E.; STALEY, E.T.; BUSH, J.L.; Importance of bile tolerance of Lactobacillus acidophilus towards intestinal and foodborne pathogensin associative cultures, **Journal of Dairy Science**, v.67, p.3045, 1984.

GILLILAND, S. E.; Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria, **FEMS Microbiology Letters**, v.87, p.175-188, 1990.

GOLDIN, B.R.; Health benefits of probiotics, **British Journal of Nutrition**, v.80, p.S203-S207, 1998.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X., Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas, **Bol. Biotecnol. Al**., São Paulo, n.64, p.12-22, 1999.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R.; Gut flora in health and disease, **Lancet**, v.361, n. 9356, p.512-519, 2003.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; Viability and Diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks, **Food Research International**, v.37, p.839-850, 2004.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H.J.; Probiotics: a general review, In: WOOD, B.J.B.; ed. The lactic acid bacteria, London, New York: **Elsevier Applied Science**, 1992, p.151-170.

HELLER, K.J.; Probiotic bacteria in fermented foods; product characteristcsand starter organisms, **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.374S-379S, 2001.

HIGASHIO, K.; YOSHIOKA, Y.; KIKUCHI, T.; Isolation and identification of growth factors of *S. thermophilus* produced by *L. bulgaricus* , **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v.51, p.209-215, 1977.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J.; Overview of gut flora and probiotics, **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.

HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G.; Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk, **Journal of Dairy Science**, v.78, p.268-273, 1991.

HUIS IN'T VELD, J.H.J.; HAVENAAR, R.; Probiotics and animal health, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.51, n.4, p.562-567, 1991.

HUTKINS, R.W.; NANNEN, N.L.; pH homeostasis in lactic acid bacteria, **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2354-2365, 1993.

IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION STANDARD 117B:1997, **Enumeration of the characteristics of the microorganisms**, IDF/ISO Standard, 1997, 5p.

IDF INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, **Dairy Fed. Brussels**, n.306, p.23-33, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, 3a Ed. São Paulo, IAL, 1985, v.1.

ITSARANUWAT, P.; KHAWLA, S.; ROBINSON, R.K.; The potential therapeutic benefits consuming "health promoting" fermented dairy products; a brief update, **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.4, p.203-210, 2003.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S.; Bifidobacteria: research and development in Japan, **Food Technology**, v.47, n.6, p.126-134, 1993.

JAYMANNE, V.S.; ADAMS, M.R.; Determination of survival , identity and stress resistance of probiotic bacteria in bio-yogurts, **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.189-194,2006.

JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; BAIDOO, S.K.; Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987 by the *Lactobacillus* isolated from porcine intestine, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.5, p.619-624, 2000.

JUILIARDI, V.; SPINNLER, E.H.; DESMAUZEAUD, J.M.; BOQUIEN, Y.C.; Phenomenes de cooperation et d'inhibition entre lés bacteries lactiques utilices en industrie laitere, **Lait**, v.67, p.149-172, 1987.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S.; *L,acidophilus* and *Bifidobacterium spp*,, their therapeutical potentialand survival in yogurt, **Australian Journal of Dairy Thechnology**, v.52, p.28-35, 1997.

KHEADR, E.; DABOUR, N.; LAY, C.; LACROIX, C.; FLISS, I.; Antibiotic sucsceptibility profile of bacteria as affect by oxgall, acid and hydrogen peroxide stress, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.1, p.169-174, 2007.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G.; Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103-125, 1998.

KLAVER, F.A.M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A.H.; Growth and survival of bifidobacteria in milk, **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.47, p.151-164, 1993.

KOSAZA, M.; Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding , M.A.N. **Microbiology Aliments Nutrition**, v.4, p.121-135, 1986.

KURMANN, J.A.; RASIC, J.L.; Technology of fermented special products, **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.277, p.101-104, 1997.

LAYE, I.; KARLESKIND, D.; MORR, C.V.; Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yoghurt, **Journal of Food Science,** v.58, p.991-995,1993.

LERAYER, A.L.S.; MIGUEL, A.M.R.; GUEDES, A.L.A.; CARVALHO, A.F.; ed, Nova Legislação comentada de produtos lácteos, São Paulo: **Revista Indústria de Laticínios**, 2002, p.62-80.

LIN, S.Y.; AYRES, J.W.; WINKLER, W.J.; SANDINE, W.E.; *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results, **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2885-2899, 1989.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, C.B.; Yoghurt as probiotic carrier food, **International Dairy Journal**, v.11, n.1/2, p.1-17, 2001.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Instrução Normativa n.46 de 23 de Outubro de 2007, publicado no Diário Oficial da União, seção 1, p.5.

MARSHALL, V.M.; Gut derived-microrganisms for milk fermentations, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.51, p.548-553, 1991.

MARTIN, A.F.; **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácteas**, 2002, 50p, (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MATSUBARA, S.; Alimentos Funcionais: uma tendência que abre novas perspectivas aos laticíneos , **Industria de Laticíneos**, n.34, p.10-18, 2001.

MATTILA-SANDHOLM, A.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M.; Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora, **International DairyJournal**, v.11, n.1, p.1-17, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.;CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.;SAARELA, M.; Technological challenges or futureprobiotic foods, **International Dairy Journal**, v.12, n.2, p.173-182, 2002.

MATTO, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it, **International Dairy Journal**, v.16, p.1029-1037, 2006.

MEGHROUS, J.; EULOGE, P.; JUNELLES, A.M.; Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production, **Biotechnology Letters**, v,12, p,577-580, 1990.

MOREIRA, M.; ABRAHAM, A.; ANTONI, G.; Technological properties of milks fermented with thermofilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature, **Journal of Dairy Science**, v.83, p.395-400, 2000.

NAGAWA, M.; NAKABAYASHI, A.; FUJINO, S.; Preparation of the bifidus powder, **Journal of Dairy Science**, v.71, n.7, p.1777-1782, 1988.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A.; Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB), **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.1, p.13-126, 1999.

OBERMAN, H.; Fermented milks , In: WOOD, B.J.B.; ed. Microbiology of Fermented Foods, London, New York: **Elsevier Applied Science Publishers**, 1985, v.01, p.167-186.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G.; Effect of Milk suplementation and cultura composition on acidification textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria, **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.

OLIVEIRA, N.O.; DAMIN, M.R.; Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.; CORREIEU, G.; Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures, **Journal of Food Sciences**, v.67, n.6, p.2336-2341, 2002.

O'SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K.; Probiotic bacteria : myth or reality? **Trends in Food Science and Technology**, v.3, p.309-314, 1990.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, V.P.; SHORTT, C.; SALMINEN, S.; Probiotics: mechanisms and established effects, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.279-289, 2002.

OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S.; Health aspects of probiotics, **Drugs**, v.6, p.573-580, 2003.

PERDIGON, G.; Effect of LAB orally administered of yoghurt on the immune system**, LAB Ferments** v.57, p.77-84, 1989.

PIARDI, C.; HAUTEFORD, I.; FISCHETTI, V.A.; Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria, **Journal of Bacteriology**, v.179, p.3068-3072, 1997.

RAJAGOPAL, S.N.; SANDINE, E.W.; Associative growth and proteolysis of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in skim milk, **Journal of Dairy Science**, v.73, p.894-899, 1990.

RENZ, U.; PUHAN, Z.; Factors promoting bitternessin yoghurt, **Milchwissenschaft**, v.30, p.265, 1975.

ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y.; Manufacture of yogurt and other fermented milks, In: ROBINSON, R.K., ed. **Modern dairy technology**, 2nd ed, London, Chapman & Hall, p.1-47, 1993.

SAAD, S.M.I.; Probióticos e Prebióticos: o estado da arte, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.

SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J.; Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – uma revisão, **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.2, jul/dez 1997.

SACCARO, D.M.; **Efeito da associação de culturas iniciadoras probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008, 101p., (Mestrado em Tecnologia Bioruímica-Farmaceutica), Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K.; Probiotics: hoe should they be defined? **Trends Food Science Technology**, v.10, p.107-110, 1999.

SAMONA, A.; ROBINSON, R.K.; MARAKIS, S.; Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk, **Food Microbiology**, v.13, n.4, p. 275-280, 1996.

SANCHEZ, B.; REYEZ-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; The F1F0 – ATPase of *Bifidobacterium animalis* is involved in bile tolerance. **Environmental Technology**, v.8, n.10, p.1825-1933, 2006.

SANDERS, E.M.; HUIS IN'T VELD, J.; Bringing a probiotic-containing functional food to the market : microbiological, product, regulatory, and labeling issues, **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.76, p.293-315, 1999.

SANDERS, M.E.; Probiotics: considerations for human health, **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n. 3, p.91-98, 2003.

SAS Institute, **SAS User's Guide: Statistics**, SAS Institute Inc., Cary, NC., 2004.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M,L.; KYLE, W.S.A.; Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage, **International Dairy Journal**, v.5, n.5, p.515-521, 1995.

SHAH, N.P.; Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods, **J. Dairy Sci.**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

SHAH, N.P.; Functional foods from probiotics and prebiotics, **Food Technology**, v.55, n.11, p.46-53, 2001.

SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C.L.; Whey and whey utilization: possibilities for utilization in agriculture and foodstuffs production, 2 ed., **Gelsenkirchen-Buer Mann**, 379p., 1990.

SPREER, E,; MIXA, A,; **Milk and dairy product technology**, New York: Marcel Dekker, Food and Science Technology, v.84, 483p., 1988.

SPREER, E., **Lactologia industrial**, 2a Ed. Zaragoza, Acribia, 1991.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P.; **Probiotic and Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.491-496, 1998.

TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E., ROBINSON, R.K.; Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria, **Journal of Dairy Research**, v. 62, n.1, p.151-187, 1995.

TEIXEIRA, S.M.B.; **Elaboraçao de bebida láctea fermentada utilizando soro de ricota**, 2002, 63p., Dissertaçao (Magister Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B.; Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p.393-400, 2005.

TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C.; Probióticos, prebióticos e simbióticos, In: TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C.; **Os Probióticos e a saúde infantil**, São Paulo: Nestlé, 2000, 15p. (Temas de Pediatria da Nestlé, 3).

TRAMER, J.; Yoghurt cultures, **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.26, p.16,1973.

VEDAMUTHU, E.R.; Cultures for buttermilk, sour cream and yoghurt with special comments on acidophilus yoghurt, **Cultured Dairy Products Journal of the American Cultured DairyProducts Institute**, v.9, p.16, 1974.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A.; Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese, **Journal Dairy Science**, v.83, n.9, p. 1905-1911, 2000a.

VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, A.J.; Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage, **Food Research International**, v.33, n.2, p.97-102, 2000b.

VINDEROLA, C.G.; MOCCHUITTI, P.; REIHEIMER, A.J.; Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products, **Journal of Dairy Science**, v.85, p.721-729, 2002.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S.; Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus termophilus, Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus,* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.4, 2004.

YOLANDA, S.; Ecological and Functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains, **International Dairy Journal**, v.17, p.1284-1289, 2007.