UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Alimentos

**Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de
caseína e com proteína concentrada de soro na obtenção
de leites fermentados contendo probióticos**

Maria Regina Damin

Dissertação para obtenção do Grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005716

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

D159e Damin, Maria Regina
Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína e proteína concentrada de soro na obtenção de leites fermentados contendo probióticos / Maria Regina Damin. -- São Paulo, 2003.
116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Oliveira, Maricê Nogueira de

1. Tecnologia de alimentos 2. Iogurte 3.
Fermentação : Tecnologia de alimentos I. T. II.
Oliveira, Maricê Nogueira de, orientador.

664 CDD

MARIA REGINA DAMIN

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO LEITE COM HIDROLISADO DE
CASEÍNA E COM PROTEÍNA CONCENTRADA DE SORO NA OBTENÇÃO
DE LEITES FERMENTADOS CONTENDO PROBIÓTICOS

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Presidente e Orientador

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 24 de outubro de 2003.

Ao Rubinho, que me apoiou todo o tempo,
ao Leonardo e à Flora.

AGRADECIMENTOS

À Prof^{ra}. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira, pela orientação, apoio e colaboração durante a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa durante o decorrer do trabalho.

À Rhodia pelo fornecimento das culturas lácticas.

À Germinal pelo fornecimento da proteína concentrada de soro.

À bibliotecária Adriana, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

Aos professores do Curso de Mestrado, por seus ensinamentos.

Aos técnicos Nilton e Ivani, do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio prestado.

À Lígia Shimabokuro Okuda, estagiária de nutrição, pelo auxílio no laboratório durante os experimentos.

Aos colegas e amigos, pelo auxílio e apoio.

SUMÁRIO

	página
NOTAÇÃO E NOMENCLATURA	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xiii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Definição e características dos leites fermentados	5
3.2. Histórico	9
3.3. As bactérias láticas	10
3.3.1. Culturas láticas	11
3.3.2. Probióticos	14
3.3.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
3.3.2.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	16
3.3.2.3. Efeito terapêutico	17
3.3.2.4. Produtos probióticos	19
3.4. Principais etapas do processo de produção dos leites fermentados	22
3.4.1. Ajuste do teor de sólidos totais	22
3.4.2. Suplementação do leite	24
3.4.2.1. Soro de leite	24

3.4.2.2. Hidrolisado de caseína	28
3.4.3. Homogeneização	29
3.4.4. Tratamento térmico	30
3.4.5. Inoculação e fermentação	31
3.4.6. Resfriamento: parada de fermentação	32
3.5. Cinética de acidificação	33
3.6. Qualidade do iogurte	38
3.6.1. Valor nutricional	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1. Procedimento experimental	43
4.1.1. Obtenção do leite fermentado contendo probióticos	43
4.2. Delineamento experimental	48
4.3. Métodos	50
4.3.1. Determinação dos parâmetros cinéticos	50
4.3.2. Análises físico-químicas	51
4.3.3. Análises microbiológicas	52
4.3.4. Avaliação do perfil de textura	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1. Caracterização dos suplementos	54
5.2. Sólidos totais dos leites fermentados	54
5.3. Caracterização dos parâmetros cinéticos dos leites fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. bulgaricus</i> (STLB), <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. acidophilus</i> (STLA) e <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. rhmanosus</i> (STLR)	55

5.4. Caracterização dos parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. bulgaricus</i> (STLB), <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. acidophilus</i> (STLA) e <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. rhmanosus</i> (STLR)	62
5.5. Caracterização dos parâmetros microbiológicos dos leites fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. bulgaricus</i> (STLB), <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. acidophilus</i> (STLA) e <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. rhmanosus</i> (STLR)	69
5.6. Análise dos resultados e determinação de modelos preditivos para as variáveis dependentes	75
5.7. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. bulgaricus</i> (STLB)	79
5.8. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. acidophilus</i> (STLA)	87
5.9. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. rhmanosus</i> (STLR)	95
6. CONCLUSÕES	103
7. SUGESTÕES	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

ABT	Cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ssp. e <i>Streptococcus thermophilus</i>
ABY	Cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ssp., <i>Lb. bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>
CINAC	<i>Cinétique d'acidification</i>
D1	Um dia de armazenamento
D7	Sete dias de armazenamento
IDF	International Dairy Federation
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HC	Hidrolisado de caseína
HTST	<i>High temperature for short time</i>
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LB	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
PC	Proteína concentrada
PCS	Proteína concentrada de soro
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i>
t	tempo
t _{max}	Tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação
t _{pH 4,5}	Tempo para atingir pH 4,5 = tempo de fermentação

$t_{\text{pH}5,0}$	Tempo para atingir pH 5,0
TPA	<i>Instrumental texture profiles analysis</i>
V_{max}	Velocidade máxima de acidificação
UF	Ultrafiltração
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UHT	<i>Ultra high temperature</i>
upH/min	Unidades de pH por minuto
WP	<i>Whey powder</i>
WPC	<i>Whey powder concentrate</i>

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1: Esquema da curva de crescimento bacteriano	34
Figura 2: Representação esquemática do sistema CINAC	38
Figura 3: Curva característica de TPA para leite fermentado	40
Figura 4: Esquema do método de quadrado de Pearson usado para padronização de sólidos do leite	43
Figura 5: Fluxograma de obtenção de leites fermentados contendo probióticos	45
Figura 6: Sistema CINAC	46
Figura 7: Quebra do coágulo	46
Figura 8: Seladora usada no acondicionamento dos iogurtes	47
Figura 9: Texturômetro TA.XT2	47
Figura 10: Curvas de queda de pH e velocidade de acidificação de leite fermentado por co-cultura de <i>S. thermophilus</i> e <i>Lb. rhamnosus</i>	51
Figura 11: Gráfico de firmeza iogurtes firmes contendo probióticos	53
Figura 12: Superfície de resposta para $V_{\max}$ de leites fermentados por STL B a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	80
Figura 13: Linhas de contorno para $V_{\max}$ de leites fermentados por STL B a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	80

Figura 14:	Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	81
Figura 15:	Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	82
Figura 16:	Superfície de resposta para pH de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	83
Figura 17:	Linhas de contorno para pH de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	83
Figura 18:	Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	84
Figura 19:	Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	85
Figura 20:	Superfície de resposta para log do número de <i>Lb. bulgaricus</i> de leites fermentados por STLB a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C	86
Figura 21:	Linhas de contorno para log do número de <i>Lb. bulgaricus</i> de leites fermentados por STLB a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C	86
Figura 22:	Superfície de resposta para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	88
Figura 23:	Linhas de contorno para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	88
Figura 24:	Superfície de resposta para $t_{\text{pH}4,5}$ de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	89

Figura 25:	Linhas de contorno para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	90
Figura 26:	Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	91
Figura 27:	Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	91
Figura 28:	Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	92
Figura 29:	Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	93
Figura 30:	Superfície de resposta para log do número de <i>Lb. acidophilus</i> de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	94
Figura 31:	Linhas de contorno para log do número de <i>Lb. acidophilus</i> de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	94
Figura 32:	Superfície de resposta para V_{max} de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	95
Figura 33:	Linhas de contorno para V_{max} de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	96
Figura 34:	Superfície de resposta para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	97
Figura 35:	Linhas de contorno para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	97

Figura 36:	Superfície de resposta para pH de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	98
Figura 37:	Linhas de contorno para pH de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	99
Figura 38:	Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLR a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C	100
Figura 39:	Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLR a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C	100
Figura 40:	Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	101
Figura 41:	Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C	102

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1: Cepas comumente empregadas em produtos probióticos	15
Tabela 2: Efeitos clínicos de probióticos	18
Tabela 3: Principais frações protéicas da caseína e do soro de leite bovino	25
Tabela 4: Composição característica do leite e do iogurte	42
Tabela 5: Delineamento estatístico dos experimentos para otimização da suplementação do leite com hidrolisado de caseína e soro de leite	49
Tabela 6: Valores médios das análises de sólidos dos iogurtes obtidos segundo os ensaios	54
Tabela 7: Valores médios dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por <i>Lb. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLB)	59
Tabela 8: Valores médios dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por <i>Lb. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLA)	60
Tabela 9: Valores médios dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLR)	61
Tabela 10: Valores médios dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por <i>Lb. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	66

Tabela 11: Valores médios dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por <i>Lb. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	67
Tabela 12: Valores médios dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	68
Tabela 13: Contagem média de microorganismos viáveis em leites fermentados por <i>Lb. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	72
Tabela 14: Contagem média de microorganismos viáveis em leites fermentados por <i>Lb. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	73
Tabela 15: Contagem média de microorganismos viáveis em leites fermentados por <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	74
Tabela 16: Valores dos coeficientes dos polinômios, erro, coeficientes de determinação e falta de ajuste obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, firmeza e pH dos leites fermentados por <i>Lb. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	76

Tabela 17: Valores dos coeficientes dos polinômios, erro, coeficientes de determinação e falta de ajuste obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, firmeza e pH dos leites fermentados por <i>Lb. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	77
Tabela 18: Valores dos coeficientes dos polinômios, erro, coeficientes de determinação e falta de ajuste obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, firmeza e pH dos leites fermentados por <i>Lb. rhamnosus</i> + <i>S. thermophilus</i> (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C	78

RESUMO

Os produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e prioridade de pesquisa em diversos países. A presença de bactérias probióticas viáveis e em alto número no produto durante sua vida de prateleira é condição essencial para assegurar o efeito probiótico. As bactérias probióticas apresentam crescimento lento no leite. O uso de co-culturas e a suplementação do leite são técnicas para superar esta dificuldade. O presente trabalho teve como objetivo verificar as condições de crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus* em cultura mista com *Streptococcus thermophilus* em leite suplementado com hidrolisado de caseína e proteína concentrada de soro em diversas proporções (3,05 a 17,05g/L). Os parâmetros cinéticos velocidade de acidificação, tempo para atingir a velocidade máxima, tempo para atingir pH 5,0 e tempo para atingir pH 4,5 foram analisados, assim como as características físico-químicas dos leites fermentados e a viabilidade das bactérias probióticas. A metodologia de superfície de resposta foi empregada visando otimizar a suplementação. O desempenho dos probióticos foi comparado com o leite fermentado pelas bactérias normais do iogurte nas mesmas condições. Ambos suplementos afetaram a acidificação do leite, sendo possível reduzir o tempo de fermentação. Em todos os ensaios, o nível de probióticos obtido esteve acima de 10^6 UFC/mL, valor mínimo de microorganismos viáveis sugerido por diversos autores para obter o efeito benéfico. Foi possível identificar modelos matemáticos preditivos.

SUMMARY

Dairy products containing probiotics and/or symbiotics are leader in the functional foods market and, priority in research worldwide. The use of casein hydrolysate and co-cultures are useful to lower fermentation time, and, in addition, it enhances the probiotic stability. The aim of the work was to verify the growing conditions of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* in mixed cultures with *Streptococcus thermophilus* in milk supplemented with casein hydrolysate and whey protein with different amounts (3,05 to 17,05g/L). Response surface methodology was used to establish adequate relationship of casein hydrolysate and whey protein contents aiming their optimization. The performance of probiotic bacteria was compared with those of yogurt bacteria. The supplements influenced milk acidification. In all experiments, probiotic levels were higher than 10^6 cfu/mL, the minimal viable number suggested by many authors to have therapeutic benefits. Mathematical models were developed.

1. INTRODUÇÃO

A área de alimentos funcionais foi identificada como prioritária para pesquisa na Europa, com base no reconhecimento de que há um enorme potencial de melhora da saúde através dos alimentos. Além disso, a dieta é o foco principal das estratégias de saúde pública, visando a manutenção de um ótimo estado de saúde durante a vida, prevenindo precocemente doenças crônicas do trato gastrointestinal, doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose, além de promover um envelhecimento saudável. O desenvolvimento de produtos inovadores pela indústria de alimentos está sendo estimulado pela demanda crescente de alimentos “saudáveis” (Mattila-Sandholm & Saarela, 2000).

Alimentos funcionais são aqueles que, além da função normal de nutrir, exercem uma função específica na saúde do hospedeiro. Podem ser definidos como aqueles que detêm um atributo passível de ser declarado (Roberfroid, 2000).

Muitos produtos tradicionais da indústria de laticínios podem ser considerados alimentos com funcionalidade fisiológica. Produtos lácteos como o leite, os queijos, os iogurtes e outros são reconhecidos há muito tempo como excelentes fontes de vitaminas e minerais, incluindo riboflavina, fósforo e cálcio. Em vários países que praticam dietas típicas ocidentais os produtos lácteos são a principal fonte de cálcio, fornecendo 60-75% do total de cálcio ingerido. Produtos lácteos fermentados como o iogurte, o *kefir* e vários outros tipos de leite fermentado são foco de interesse para cientistas desde que Metchnikoff, em 1907, estudou a relação entre a longevidade dos caucasianos e o consumo de iogurte (Jelen & Lutz, 1998).

Dentro do mercado de alimentos funcionais os produtos lácteos probióticos ou simbióticos ocupam a liderança. Entre 1970 e 1980 houve um grande crescimento do mercado norte-americano de iogurtes. No final da década de 90 a Europa liderou o desenvolvimento de novos produtos probióticos. Estatísticas recentes da FAO indicam que a venda de produtos

probióticos na Alemanha em 1997 atingiu 5.927 toneladas, tendo sido de 1.925 toneladas no ano anterior. Este crescimento indica que os produtos lácteos devem continuar liderando este segmento de mercado (Jelen & Lutz, 1998).

A adição de probióticos cresceu nas duas últimas décadas graças aos benefícios à saúde, principalmente sua aplicação em iogurtes e leites fermentados. As bactérias mais utilizadas foram os lactobacilos, como o *Lactobacillus acidophilus*, e as bifidobactérias. O principal crescimento na indústria de alimentos funcionais é dos produtos contendo probióticos e prebióticos, os quais são responsáveis por aumentar a presença de microorganismos promotores da saúde no intestino. Há evidências científicas de que a manutenção de uma microbiota intestinal saudável fornece proteção contra problemas gastrintestinais como infecções, inflamações e até câncer. O uso de probióticos estimula o crescimento de determinados microorganismos em detrimento de bactérias potencialmente perigosas, estimulando o sistema imune (Jelen & Lutz, 1998; Mattila-Sandholm & Saarela, 2000).

Alimentos funcionais contendo probióticos oferecem uma nova direção para a pesquisa de tratamento ou prevenção de doenças, estratégias de nutrição para pessoas de grupos específicos (idosos, bebês, crianças), pacientes com problemas inflamatórios no intestino e alergias alimentares. Contudo a necessidade de desenvolvimento de tecnologia para o crescimento e manutenção de bactérias probióticas viáveis e em número capaz de proporcionar os benefícios ainda é um desafio (Roberfroid, 2000).

Pesquisa mundial da ACNielsen (empresa especializada em pesquisa de mercado) sobre a evolução de mercado no ano de 2001 classificou a categoria de iogurtes e bebidas lácteas (exceto leite) entre as cinco primeiras em evolução, com um índice de crescimento de 12%. A pesquisa analisou a evolução de 90 categorias de produtos alimentares, das quais somente nove mostraram crescimento acima de 10%. Segundo a pesquisa, a categoria está em expansão em 31 dos 37 países pesquisados. Segundo a

ABRINI (Associação Brasileira da Indústria de Iogurtes), o consumo de iogurtes *per capita* no Brasil é de 4,1 kg/habitante/ano, bem inferior aos 30 kg/hab/ano em países como a França e a Holanda. Ainda é inferior ao consumo de 6 kg/hab/ano na Argentina, mas deve atingir este valor rapidamente. O mercado brasileiro está em expansão e registrou um resultado superior a R\$ 1,2 bilhão em 2002. Esse faturamento refere-se a um volume de produção superior a 400 mil toneladas. Em 2001 foram vendidas 326 mil toneladas de iogurtes no país (Gurgel, 2003).

A grande competitividade do mercado leva as empresas a buscarem a diferenciação em produtos inovadores. O desenvolvimento de leites fermentados contendo probióticos é uma oportunidade ainda a ser explorada no país, seguindo a tendência mundial de produtos lácteos probióticos.

2. OBJETIVOS

A pesquisa visa a obtenção de leite fermentado contendo probióticos, buscando-se:

- ✓ Verificar as condições de fermentação de *Lb. rhamnosus* e *Lb. acidophilus* em co-cultura com *S. thermophilus* em leite suplementado com hidrolisado de caseína e com proteína concentrada de soro em diversas proporções, através da análise dos parâmetros cinéticos: velocidade de acidificação, tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação, tempo para atingir pH 5,0 e tempo para atingir pH 4,5;
- ✓ Verificar o efeito da suplementação do leite na textura dos leites fermentados e na viabilidade das bactérias probióticas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Definição e características dos leites fermentados

Leites fermentados são produtos preparados a partir do leite ou creme de leite pasteurizado, algumas vezes enriquecidos com leite em pó desnatado e aromatizantes, e acidificados por bactérias lácticas, resultando em consistência e textura típicas. Todos os leites acidificados têm uma característica comum, que é a presença de ácido láctico, formado pela fermentação da lactose através de várias combinações de bactérias termofílicas e mesofílicas, resultando na coagulação da proteína do leite (Spreer & Mixa, 1998).

A legislação tem uma classificação geral para leites fermentados. O tipo de microorganismo empregado, a temperatura de fermentação e os compostos resultantes desta fermentação diferenciam esses produtos. Dentro da categoria leite fermentado tem-se os seguintes produtos: iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, *kefir*, *kumys* e coalhada (Brasil, 2000). Segundo o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os Padrões de Identidade e Qualidade dos produtos os define e diferencia da seguinte forma:

- Definição 1: Entende-se por “leites fermentados” os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, sendo que estes fermentos lácticos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade.
- Definição 2: Entende-se por “iogurte” o produto incluído na definição anterior cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar,

outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

- Definição 3: Entende-se por “leite fermentado ou cultivado” o produto incluído na Definição 1 cuja fermentação se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Streptococcus salivarius* sbsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias acidoláticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

O leite fermentado produzido com a adição de outros microorganismos além de *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* não deve ser denominado iogurte.

Diferentes leites fermentados foram desenvolvidos em suas regiões de origem, de acordo com o clima, disponibilidade de leite (bovino, eqüino, ovino) e propriedades organolépticas apreciadas, com o objetivo de aumentar a estabilidade do leite para estocagem (Fox & McSweeney, 1998).

- ✓ *Kefir*. é um leite acidificado a partir do leite pasteurizado padronizado, no qual a fermentação é resultado da ação de bactérias e leveduras, resultando em ácido láctico, CO₂ e etanol. A temperatura de incubação é de 18-22°C, por 18-24 horas.
- ✓ Leite acidófilo: obtido pela ação de estirpes selecionadas de *Lb. acidophilus* sobre o leite padronizado esterilizado. A temperatura de incubação é de 37-40°C, por 18-20 horas. Devido ao seu sabor fortemente ácido, tem o consumo bastante limitado e quase sempre associado às características terapêuticas.
- ✓ Leite *sweet acidófilo*: é um produto que surgiu no mercado norte-americano na década de 70. É produzido com o leite contendo 2% de gordura adicionado de uma cultura congelada de *Lb. acidophilus*. A cultura é adicionada ao leite pasteurizado, resfriado em um tanque, seguindo-se agitação para a completa homogeneização do inóculo. O

leite é envasado e mantido a 5°C até o momento do consumo. O termo *sweet* refere-se à não fermentação do produto, que não apresenta sabor ácido.

- ✓ *Buttermilk* fermentado: até pouco tempo era o produto obtido com o leiteiro, líquido resultante da batida da manteiga. Hoje é comum a utilização do nome *buttermilk* para o produto feito a partir do leite parcialmente desnatado, inoculado com culturas lácticas produtoras de sabor, aroma e ácido, onde o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis/cremoris* está presente.
- ✓ *Kumys*: é o produto feito originalmente com leite de égua, envolvendo fermentação ácida e alcoólica. *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus* são os microorganismos determinados pela legislação para sua obtenção.
- ✓ Coalhada: é o produto cuja fermentação se realiza por cultivos individuais ou mistos de bactérias lácticas mesofílicas produtoras de ácido láctico.

Os leites fermentados deverão apresentar contagem mínima de microorganismos específicos de acordo com o tipo de produto durante seu período de validade (Brasil, 2000):

- ✓ Mínimo de 10^7 UFC de bactérias lácticas/g de produto para iogurte, leite acidófilo, *kefir* e *kumys*.
- ✓ Mínimo de 10^6 UFC de bactérias lácticas/g de produto para leite cultivado e coalhada.
- ✓ Mínimo de 10^4 UFC/g de leveduras específicas para *kefir* e *kumys*.

Entre os tipos de leites fermentados, o iogurte é o mais conhecido e difundido no mundo (Staff, 1998). *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* são microorganismos que estão adaptados para o crescimento em leite, que é por si só um bom meio, pois contém carboidratos (47g/L), gorduras (36 g/L), proteínas (33 g/L), minerais e vitaminas. Esses microorganismos tradicionais

possuem as enzimas e vias metabólicas para a degradação e utilização da lactose como fonte de energia. Também possuem as proteinases e peptidases que possibilitam a assimilação do nitrogênio para o crescimento celular. A forma como os microorganismos utilizam os nutrientes disponíveis no leite determina as características sensoriais do produto fermentado (Marshall & Tamime, 1997).

Os iogurtes devem apresentar os seguintes atributos importantes: o corpo deve ser viscoso, firme e coeso; a textura deve ser suave, livre de grumos e sem fissuras; deve ter nítido sabor ácido e o maior componente volátil deve ser o acetaldeído (O'Neil *et al.*, 1979).

Os tipos de iogurtes são classificados de acordo com seu estado físico na embalagem, com o teor de gordura e valor calórico contidos e, finalmente, se são adicionados ou não de frutas ou aromas. As características físicas são influenciadas pelo processo de fabricação e pela formulação. Segundo Spreer & Mixa (1998), as propriedades estruturais características definem os tipos de iogurte como:

- ✓ iogurte firme: aquele em que a fermentação ocorre no interior da embalagem;
- ✓ iogurte batido: aquele em que o gel é quebrado, resfriado e embalado após a coagulação, sendo que o produto solidifica-se novamente, ocorrendo um aumento da viscosidade após a embalagem;
- ✓ iogurte para beber: aquele em que o gel é quebrado como no produto batido, mas é homogeneizado e mantém a consistência líquida.

Atualmente o iogurte é encontrado na forma firme, cremosa e líquida. Pode ser integral, parcialmente desnatado, desnatado, *diet*, *light* e enriquecido. As empresas lançam iogurtes com ingredientes que prometem ao consumidor saúde, energia e até beleza. São produtos enriquecidos com bactérias probióticas, com vitaminas A e E (antioxidantes, que previnem o envelhecimento), com cálcio, com fibras, com aloe vera (também usado na

indústria de cosméticos), com ginseng (energético) e com guaraná (Gurgel, 2003). O iogurte foi utilizado como fonte de parâmetros para o presente trabalho.

3.2. Histórico

A produção de iogurte data de milhares de anos e possivelmente iniciou-se quando o ser humano domesticou vacas, ovelhas ou cabras. É seguro assumir, entretanto, que antes do século XIX os estágios envolvidos em sua produção começaram a ser entendidos. A continuidade e transmissão do processo por muitos anos pode ser atribuída à passagem da técnica de pais para filhos, pela simplicidade e pela produção em pequena escala. Nas últimas décadas o processo tornou-se mais racional, principalmente devido à descoberta ou melhora dos conhecimentos em microbiologia, enzimologia, física, engenharia, química e bioquímica. Assim, a tecnologia industrial empregada no processamento de iogurtes combina processos complexos de arte e tecnologia (Tamime & Robinson, 1999).

A história registra as propriedades benéficas do consumo de leites fermentados contendo microorganismos vivos há muitos séculos. Seu uso no tratamento de doenças é mencionado em escrituras bíblicas e os pais da ciência, como Hipócrates e outros, consideravam o leite fermentado não apenas um alimento, mas um medicamento também. Eles prescreviam leites fermentados para curar doenças do estômago e intestinos. No início do século XX o bacteriologista russo Elie Metchnikoff (Instituto Pasteur, França) foi o primeiro a explicar os efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes em leites fermentados. Ele atribuiu a boa saúde e a longevidade dos búlgaros ao consumo de grandes quantidades de leites fermentados. O princípio de sua teoria era que as bactérias lácticas substituem àquelas produtoras de toxinas normalmente presentes no intestino. Devido ao ácido láctico e aos outros compostos produzidos pelas bactérias lácticas, o crescimento e a toxicidade das anaeróbicas eram inibidos no intestino grosso. Em 1899 Tissier isolou bifidobactéria de fezes de bebês alimentados com leite humano e verificou que estas eram o componente predominante

da flora intestinal. Tissier recomendou que se administrasse bifidobactérias às crianças que sofriam de diarreia, acreditando que estas bactérias poderiam substituir as putrefativas responsáveis pelos problemas gástricos (Fuller, 1992; Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

Pesquisas feitas desde o período de Metchnikoff mostraram que *Lb. bulgaricus* não sobrevive e não coloniza o trato gastrintestinal. Entretanto, outras espécies de lactobacilos foram documentadas como tendo efeito benéfico através do crescimento e da ação no trato gastrintestinal. Esse grupo de bactérias e outras são denominados hoje de probióticas. As culturas mais freqüentemente mencionadas como probióticas para humanos incluem *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* e espécies de *Bifidobacterium* (Gilliland, 2001).

Segundo Holzapfel & Schillinger (2002), provavelmente o termo probiótico foi introduzido por Vergio em 1954, quando comparou, em seu manuscrito *Anti-und Probiotika*, o efeito de antibióticos e outras substâncias antimicrobianas sobre a população microbiana intestinal, com fatores (*probiotika*) favoráveis à microflora intestinal. Lilly & Stilwell, em 1965, se referiram à palavra probiótico como “microorganismos que promoviam o crescimento de outros microorganismos”. Atualmente há consenso de que a palavra “probiótico” se refere a “microorganismos viáveis que ajudam ou promovem um balanço benéfico da microbiota endógena do trato gastrintestinal” (Holzapfel *et al.*, 1998; Holzapfel *et al.*, 2001). Estes microorganismos podem não ser necessariamente habitantes constantes do trato gastrintestinal, mas devem ter um efeito benéfico sobre o estado geral e saúde do ser humano ou dos animais (Fuller, 1989; Salminen, *et al.* 1998).

3.3. As bactérias lácticas

As bactérias lácticas são os principais agentes envolvidos na produção de leites fermentados e produtos lácteos. Os microorganismos empregados em culturas lácticas pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Baseando-se em sua morfologia, são

classificadas como cocos e bacilos. De acordo com a temperatura ótima de crescimento são classificadas como mesofílicas, as que crescem mais rapidamente entre 20-30°C, e termofílicas, as que crescem entre 35-45°C. Durante o crescimento das bactérias em leite, o metabolismo inicial da lactose resulta na formação de glicose e galactose. A etapa seguinte do processo metabólico varia com as espécies e resulta em diferentes produtos finais. Assim, as bactérias lácticas são classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas. As primeiras produzem quase que exclusivamente ácido láctico. As heterofermentativas produzem ácido láctico e outros compostos, como CO₂ e etanol (Walstra *et al.*, 1999).

3.3.1. Culturas lácticas

Leites fermentados e queijos existem há pelo menos 10.000 anos, mas somente nos últimos 100 anos as bases científicas da microbiologia dessas fermentações vêm sendo elucidadas. As primeiras definições de bactérias lácticas como um grupo restringiram-se à capacidade que essas bactérias tinham de coagular ou fermentar o leite, provocando alterações benéficas e geralmente melhorando o sabor, aroma e textura. Esta fermentação acumula vitaminas e ácidos orgânicos que vão aumentar a vida-de-prateleira dos produtos. A lactose presente no leite é fermentada pelas bactérias lácticas e resulta principalmente em ácido láctico, favorecendo a redução do pH e, conseqüentemente, a precipitação das proteínas do leite, dando origem aos vários produtos fermentados (Ferreira, 2001).

✧ A função geral da cultura láctica deve ser produzir ácido láctico suficiente em um período de tempo tão curto quanto possível para fermentar o leite do pH 6,4-6,7 ao pH 3,8-4,2. Deve promover textura, viscosidade, odor e sabor característicos ao produto final. O tipo de cultura láctica para a produção de leites fermentados varia entre os diversos tipos de produto. O termo termofílico é empregado para as culturas lácticas com temperatura ótima de crescimento entre 35-45°C. As culturas com temperatura ótima de

crescimento entre 20-35°C, utilizadas para alguns leites fermentados e queijos, são descritas como mesofílicas (Staff, 1998).

Stanley (1998) atribuiu três funções principais às culturas lácticas: acidificação, textura e realce de sabor e de odor. A acidificação é resultante da conversão da lactose em ácido láctico. Ocorre a formação do gel e aromas característicos de cada produto. O pH baixo inibe o crescimento de microorganismos patogênicos e deterioradores. Este ácido láctico produzido é resultante do metabolismo da lactose para produção de energia (ATP).

As culturas são fornecidas nas formas líquidas, ultracongeladas ou desidratadas. A cultura líquida é fornecida em leite desnatado reconstituído esterilizado, podendo ser armazenada em temperatura inferior a 8°C por período de uma a duas semanas. A cultura ultracongelada (-30 a -40°C ou em nitrogênio líquido a -196°C) pode ser armazenada por 3-6 meses e as culturas desidratadas (vácuo, *spray*, liofilizada ou liofilizada concentrada) por mais de 6 meses (Staff, 1998).

A composição da cultura láctica pode ser de uma ou mais espécies de bactérias. É definida como cultura pura quando consiste de uma única cepa. A cultura múltipla contém uma mistura definida de culturas puras, que podem ser de diferentes tipos de bactérias ou diferentes cepas de um tipo. As culturas mistas são iniciadoras naturais e consistem de misturas indefinidas de diferentes cepas ou espécies (Walstra *et al.*, 1999).

Segundo Walstra *et al.* (1999), as bactérias lácticas produzem diferentes quantidades de ácido láctico durante a fermentação por 24 horas em temperatura ótima: aproximadamente 2,5% em leite para o *Lb. bulgaricus*, 1% para o *Lb. acidophilus* e 0,9% para o *S. thermophilus*.

Dentre os leites fermentados por bactérias lácticas termofílicas, o acetaldeído é o principal composto responsável pelo aroma e sabor, sendo considerado ótimo quando presente entre 20 e 40 ppm. Algumas bactérias reduzem o acetaldeído a etanol e outras não. As que acumulam acetaldeído

são *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *S. thermophilus* e *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus*. Outros compostos que estão presentes em baixas concentrações e favorecem o desenvolvimento do sabor característico são o ácido láctico e o diacetil (Stanley, 1998; Walstra *et al.*, 1999; Ferreira, 2003). A fermentação modifica a composição do iogurte: há diminuição da lactose, das proteínas e de algumas vitaminas. Ocorre o aumento do ácido láctico, da glicose, da galactose, dos peptídeos, da β -galactosidase e de outras enzimas, de algumas vitaminas e de ácido fólico (Buttriss, 1997).

A flora essencial para iogurte consiste de *Streptococcus thermophilus* e *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*, bactérias lácticas termofílicas com ponto ótimo de crescimento próximo a 42°C. São usadas na proporção de 1:1, 2:1 3:2 de *S. thermophilus* para *Lb. bulgaricus* (Spreer & Mixa, 1998). Essas bactérias crescem melhor em conjunto que separadamente, efeito denominado simbiose. No começo da fermentação *S. thermophilus* inicia o desenvolvimento de ácido láctico ao fermentar a lactose e cresce rapidamente até atingir pH 5,5. Ocorre o consumo do oxigênio dissolvido, a formação de ácido e substâncias aminadas que são originadas da proteína do soro e que estimulam o crescimento do *Lb. bulgaricus*. Quando o *Lb. bulgaricus* passa a crescer, baixa mais o pH e libera aminoácidos ao meio, o que estimula o crescimento do *S. thermophilus*. Com o passar do tempo, o ácido láctico acumulado baixa ainda mais o pH do meio e esse pH passa a inibir o *S. thermophilus*, enquanto o *Lb. bulgaricus* sobrepuja o *S. thermophilus* em número (Spreer & Mixa, 1998; Tamime & Robinson, 1999).

As bactérias lácticas precisam ser supridas de grande quantidade de nutrientes para seu crescimento. O substrato deve ter disponíveis substâncias como hidratos de carbono, aminoácidos, peptonas, lipídios, vitaminas e sais minerais (Tamime & Robinson, 1999; Ferreira, 2003).

Os leites fermentados devem apresentar um alto número de bactérias lácticas viáveis, e esta presença é essencial para qualquer produto com apelo terapêutico ou profilático.

3.3.2. Probióticos

Bactérias lácticas isoladas do intestino de seres humanos e de animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo conhecido por bactérias probióticas. Consumidas em elevado número têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada por dieta, tratamento com medicamentos e estresse (Ferreira, 2003).

As bactérias lácticas do iogurte *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* não são endógenas ao trato intestinal humano. Quando consumidas não resistem à acidez do meio intestinal e aos sais biliares e, portanto, apresentam baixa capacidade de sobrevivência. Entretanto, sua destruição deixa lactase, que auxilia na absorção da lactose. *Lb. acidophilus* e *Lb. casei* presentes na flora intestinal humana resistem à acidez e aos sais biliares. Sua sobrevivência no trato gastrointestinal é estimada como sendo 2-5%, atingindo concentrações de 10^6 a 10^8 UFC/mL no cólon (Richardson, 1996).

Microrganismos comumente usados como probióticos incluem *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (Goldin & Gorbach, 1984).

Alguns dos critérios usados na seleção de uma boa cepa de probiótico incluem os requisitos: ser de origem humana, ter habilidade de sobreviver ao trânsito pelo trato gastrointestinal, aderir à mucosa intestinal, produzir substâncias antimicrobianas contra os patógenos, equilibrar a microbiota intestinal, ter propriedades antigenotóxicas, possuir curto tempo de geração, apresentar boa estabilidade nos alimentos ou preparações em pó e não ser patogênico ao ser humano (Collins *et al.*, 1998; Goldin, 1998; Klaenhammer & Kullen, 1999; Mattila- Sandholm *et al.*, 1999).

A Tabela 1 apresenta um resumo das cepas mais empregadas em produtos probióticos.

Tabela 1: Cepas comumente empregadas em produtos probióticos

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp</i>	Outras
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Lb. plantarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lb. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i>
<i>Lb. fermentum</i>		<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>Lb. helveticus</i>		<i>Pediococcus acidilacti</i>
<i>Lb. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>

Fonte: adaptado de Collins *et al.*, 1998

Alguns microrganismos usados como probióticos são bem documentados com relação às suas propriedades benéficas. Espécies de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* ganharam popularidade na fabricação de produtos probióticos graças aos benefícios à saúde humana e ao seu *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Geralmente se aceita, com exceção de alguns estreptococos e enterococos, que as bactérias lácticas são raramente patogênicas ao ser humano e aos animais (Collins *et al.*, 1998).

Tradicionalmente as bactérias são classificadas por suas características fenotípicas, mas algumas bactérias do grupo de *Lactobacillus* não podem ser distintas por esses métodos. As modernas técnicas de análise genética são importantes na identificação para a seleção das cepas probióticas, que são empregadas por suas características fisiológicas e funcionais (Holzapfel *et al.*, 2001). Espécies classificadas como *Lb. acidophilus* foram avaliadas por testes genéticos que mostraram haver pelo menos seis diferentes espécies neste grupo, incluindo *Lb. crispatus*, *Lb.*

gallinarum, *Lb. gasseri*, *Lb. amylovorus* e *Lb. johnsonii* (Du Plessis *et al.*, 1996).

3.3.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lb. acidophilus (LA) é descrito como bacilo circular, Gram-positivo, não móvel, não esporulante, geralmente de 0,6-0,9 μm , ocorrendo só, em par ou formando pequenas cadeias. As colônias são geralmente brancas. O crescimento a 16°C é raro ou muito lento; em temperaturas superiores, o crescimento depende da cepa sendo que algumas crescem a 45°C e outras a 48°C (Du Plessis *et al.*, 1996).

Seu metabolismo energético é fermentativo. Fermenta hexoses exclusivamente pela via do lactato de Embden-Meyerhof-Parnas; pentoses e gluconato não são fermentados. Acetoína e diacetil são produzidos a partir de citrato e de piruvato. Na presença de lactato ou a pH inferior a 4,25 o piruvato não é imediatamente convertido a diacetil ou acetoína. Não fermenta rhamnose (Du Plessis *et al.*, 1996).

Lb. acidophilus apresenta necessidades nutricionais complexas para seu crescimento. Requer baixa tensão de oxigênio; carboidratos fermentáveis; proteínas e aminoácidos; vitaminas do complexo B, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina; minerais como magnésio, manganês e ferro; e ácidos graxos livres. A presença de aminoácidos do grupo tiol, presentes no soro de leite, peptona e tripsina estimulam seu crescimento (Gomes & Malcata, 1999).

3.3.2.2. *Lactobacillus rhamnosus*

O *Lb. rhamnosus* (LR) pertence ao grupo dos lactobacilos heterofermentativos facultativos. Fermentam as hexoses produzindo ácido láctico e fermentam outras pentoses após indução de uma fosfocetolase com produção de ácido láctico e acético. A frutose é sempre fermentada. Este grupo, formado por bactérias muito difundidas na natureza, compreende três complexos de espécies semelhantes por suas homologias

DNA-DNA e diversas espécies não apresentam nenhuma relação filogenética conhecida (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Béal *et al.*, 1994).

O primeiro complexo é formado pela espécie *Lb. plantarum* e espécies geneticamente próximas, como *Lb. pentosus*, *Lb. graminis*, *Lb. agilis* e outras. O segundo, designado como grupo casei, é formado por espécies heterogêneas, dentre as quais se inclui o *Lb. casei* subsp. *ramnosus*, que fermenta a ramnose.

Lb. rhamnosus ou GG usado como probiótico foi estudado em modelos experimentais em animais e humanos, em estudos clínicos em humanos, cultura de tecidos e *in vitro* (Allander *et al.*, 1999). É considerado como o mais estudado probiótico nos últimos 10 anos. GG foi isolado de cultura fecal humana em 1985. Usando-se métodos genéticos e eletroforese foi identificado taxonomicamente como *L. rhamnosus*. Entretanto, é um ramnosum atípico porque não fermenta lactose, maltose ou sacarose, fermentando muito lentamente só a ramnose (Goldin, 1998).

3.3.2.3. Efeito terapêutico

Os principais benefícios terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos por diversos autores, como Goldin & Gorbach (1984), Kailasapathy & Rybka (1997), Goldin, (1998), Holzapfel *et al.* (1998), Salminen *et al.* (1998), Mattila-Sandholm *et al.* (1999), e seus mecanismos de ação podem ser resumidos em:

- ✓ controle de infecções intestinais: através da produção de substâncias antimicrobianas ou inibidoras, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas; competição por sítios de adesão e por nutrientes; estímulo do sistema imune;
- ✓ redução da intolerância a lactose: através da produção de β -D-galactosidase pelas bactérias em leites fermentados; menor teor de lactose nos produtos fermentados;

- ✓ redução do nível de colesterol sérico (mecanismo de ação não bem definido e comprovado);
- ✓ atividade anticarcinogênica: inibição dos procarcinógenos; ativação do sistema imune; diminuição do pH intestinal que reduz a atividade dos microorganismos patogênicos;

A Tabela 2 apresenta um resumo de estudos clínicos realizados com probióticos e os efeitos observados.

Tabela 2: Efeitos clínicos de probióticos

Cepas probióticas	Efeitos clínicos
<i>Lb. GG</i> ATCC 53103	Aderência às células intestinais humanas, queda da atividade enzimática das fezes. Prevenção de diarreia associada a antibióticos, a rotavírus e aguda; melhora da resposta imune. (13 referências)
<i>Lb. johnsonii</i> LJ-1 (LA-1)	Prevenção da diarreia do viajante, modulação da flora intestinal, melhora da intolerância a lactose e da constipação, melhora do sistema imune, auxiliar no tratamento de <i>H. pylori</i> . (8 referências)
<i>Bifidobacterium lactis</i> (<i>bifidum</i>) Bb-12	Prevenção da diarreia do viajante, tratamento de diarreia viral incluso por rotavírus, modulação da flora intestinal, melhora da constipação, modulação do sistema imune. (8 referências)
<i>Lb. reuteri</i> ATCC 55730	Colonização do trato intestinal, diminuição da diarreia por rotavírus, tratamento de diarreia aguda. (3 referências)
<i>Lb. casei</i> Shirota	Modulação da flora intestinal, queda da atividade enzimática das fezes, efeito positivo em alguns tipos de câncer. (4 referências)
<i>Lb. plantarum</i> DSM 9843	Aderência ao epitélio intestinal, modulação da flora intestinal. (1 referência)
<i>Saccharomyces</i> <i>boulardii</i>	Prevenção de diarreia associada a antibióticos, tratamento de <i>Clostridium difficile colitis</i> . (2 referências)

Fonte: Adaptado de Mattila-Sandholm *et al.*, 1999

3.3.2.4. Produtos probióticos

Recentemente o mercado de iogurtes contendo probióticos apresentou grande crescimento. Esses iogurtes incluem cepas de *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium* (conhecidas como culturas AB ou ABY) em adição às culturas tradicionais de iogurte (Y) e são denominados bioiogurtes ou biogurtes. A presença dos microorganismos probióticos vivos aumenta o apelo mercadológico do iogurte como benéfico à saúde (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

Entre os produtos lácteos probióticos comercializados no Brasil encontram-se os leites fermentados: Leite Fermentado Yakult (Yakult), LC1 (Nestlé), Chamyto (Nestlé), Leite Fermentado Parmalat (Parmalat), Vigor Club (Vigor), entre outros (Oliveira *et al.*, 2002).

Para se produzir os efeitos benéficos desejados as bactérias probióticas devem estar presentes em alto número nos produtos. No entanto, este número ainda não está bem estabelecido. Alguns autores sugerem que para se obter o efeito benéfico o número de bactérias probióticas deve ser de 10^5 a 10^6 células viáveis por mL de produto (Dave & Shah, 1997b). Esse número pode variar de uma espécie para outra e mesmo entre cepas da mesma espécie. Outros autores estipulam um número acima de 10^7 e 10^8 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de produto como necessário (Rybka & Kailasapathy, 1995; Kailasapathy & Rybka, 1997). Esse valor é denominado de "mínimo terapêutico".

O consumo de 100 mL diários de produtos lácteos contendo 10^7 UFC/mL de bactérias probióticas é recomendável (Oliveira *et al.*, 2002).

Apesar da importância da identificação e viabilidade das bactérias em produtos probióticos, alguns produtos comerciais apresentam problemas quanto aos dois aspectos.

Schillinger (1999) isolou, identificou e avaliou a viabilidade dos lactobacilos presentes em iogurtes e leites fermentados contendo probióticos comercializados na Alemanha e países europeus. A pesquisa mostrou que muitas das cepas declaradas pelos fabricantes não correspondem à espécie presente no produto. Os estudos indicaram que nem todos os produtos disponíveis no mercado contêm as bactérias probióticas em alto número e que nem todos mostram boas características de sobrevivência dessas bactérias até o final do período recomendado para consumo. Isso reforça a necessidade de mais atenção a estudos para melhorar a viabilidade.

Reuter *et al.* (2002) estudam há 30 anos amostras comerciais de alimentos, produtos farmacêuticos e produtos para alimentação animal contendo probióticos, especialmente cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que são comparadas com cepas de coleção. Métodos de análise molecular são empregados para a confirmação final das cepas, quando os testes de taxonomia não as diferenciam.

O desempenho tecnológico das culturas é de fundamental importância na fabricação de produtos alimentícios. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais adequadas ao produto e serem viáveis durante o armazenamento (Oliveira *et al.*, 2002).

As bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido à falta de atividade proteolítica (Klaver *et al.*, 1993). Assim, requerem a adição de fatores de crescimento (Dave & Shah, 1997a; Dave & Shah, 1998a) e/ou aminoácidos livres para melhorar sua multiplicação (Shah & Lankaputhra, 1997; Naidu & Clemens, 2000; Oliveira *et al.*, 2002). O uso de hidrolisado de caseína é recomendado na produção de iogurtes com o objetivo de disponibilizar peptídeos e aumentar o teor de aminoácidos livres, que estimulam o crescimento de *S. thermophilus* (Tamime & Robinson, 1999).

Oliveira *et al.* (2001) e Sodini *et al.* (2002) estudaram a influência da suplementação do leite e a composição das culturas nas propriedades

cinéticas, na firmeza do leite fermentado e na viabilidade das bactérias. A adição de hidrolisado de caseína resultou em melhora na acidificação e propriedades de textura do leite fermentado contendo probióticos.

Dos fatores que afetam a viabilidade dos microorganismos em produtos lácteos fermentados pode-se citar a presença de *Lb. bulgaricus*, em razão do abaixamento do pH e da produção de peróxido de hidrogênio. O efeito antagônico do *Lb. bulgaricus* sobre *Bifidobacterium* aparentemente depende da cepa de *Lactobacillus*. Amostras de iogurtes probióticos onde sua população excedia 10^6 UFC/mL também continham alto número de *S. thermophilus* (Gilliland & Speck, 1977; Klaver *et al.*, 1993; Samona & Robinson, 1994; Rybka & Kailasapathy, 1995; Lankaputhra & Shah, 1996; Lankaputhra *et al.*, 1996; Rybka & Fleet, 1997; Shah & Lankaputhra, 1997; Shah, 2000; Vinderola *et al.*, 2000a, Vinderola *et al.*, 2000b).

Ainda assim, é prática comum adicionar bactérias do iogurte para melhorar o processo de fermentação para a fabricação de leites fermentados contendo probióticos (Dave & Shah, 1997b; Oliveira *et al.*, 2001). Entretanto, *Lb. bulgaricus* produz ácido láctico durante o armazenamento sob refrigeração. Este fenômeno, conhecido por pós-acidificação, afeta a viabilidade das bactérias probióticas. Para superar o problema da pós-acidificação, a tendência é a de usar culturas iniciadoras isentas de *Lb. bulgaricus* (Dave & Shah, 1997b).

O *S. thermophilus* é uma espécie quase obrigatória na composição de fermentos termofílicos. Tem a função bioajustadora em processos fermentativos na presença de bactérias probióticas, que têm crescimento lento em leite (Ferreira, 2003).

O sucesso do mercado de alimentos funcionais do ponto de vista da saúde do consumidor e da indústria de alimentos depende da validação científica dos apelos de funcionalidade dos produtos. O desafio, no caso dos probióticos, é o monitoramento efetivo da viabilidade dos

microorganismos para as funções probióticas através de toda a cadeia do alimento (Roberfroid, 2000).

Segundo Naidu & Clemens (2000) a lista de efeitos benéficos atribuídos ao uso de probióticos e de apelos à saúde está em expansão. A tendência do mercado global é baseada nas expectativas de efeito profilático e, em muitos casos, como alternativa a preparados farmacêuticos convencionais.

3.4. Principais etapas do processo de produção dos leites fermentados

O processo de produção de iogurte ou de leites fermentados pode ser resumido na seguinte seqüência de operações: padronização do teor de sólidos do leite; tratamento térmico do leite padronizado, resfriamento até a 40-45°C; inoculação com os microorganismos específicos na proporção de 1:1, preferencialmente; incubação a 40-45°C durante até 5 horas, que deve resultar em coágulo firme com o pH de 4,6 a 4,7 (Brandão, 1995; Tamime & Robinson, 1999). As etapas seguintes são o resfriamento, o manuseio e o envase. O leite é o ingrediente básico do preparo e sua composição pode ser modificada para atender aspectos econômicos, práticos e de aceitação do consumidor. O teor de sólidos tem efeito marcante na firmeza do iogurte.

3.4.1. Ajuste do teor de sólidos totais

A porcentagem de sólidos não gordurosos do leite para produção de iogurte é de grande importância, pois afeta algumas das características do produto, como a consistência. A relação entre o teor de sólidos do leite e a consistência do iogurte foi estudada por Tamime & Robinson (1999), que observaram melhora acentuada das características do iogurte quando o teor de sólidos do leite é aumentado de 12 para 20%. O teor de sólidos (incluindo sólidos gordurosos) do leite para a produção de iogurtes pode estar abaixo de 9%, em iogurtes de baixo teor de gordura, e em até 30%, em outros tipos de iogurte. Segundo Tamime & Robinson (1999), a maioria dos iogurtes

comerciais tem 14-15% de sólidos totais e o leite contendo 15-16% de sólidos totais resulta em menor sinérese e melhor firmeza.

A revisão de Rattray & Jelen (1996) sobre padronização do teor de proteína do leite e produtos lácteos enfatiza a interpretação do *International Dairy Federation* (IDF), na qual o termo padronização implica em pequenas mudanças do teor de proteínas, dentro do limite natural de variabilidade do leite. Nesta definição a adição ou remoção de constituintes naturais do leite não deve alterar a proporção de proteínas do soro e de caseína presentes naturalmente. A padronização oferece vantagens principalmente para o posterior processo de secagem, evitando variações do teor protéico no leite em pó. O termo ajuste é usado para indicar uma modificação mais drástica do teor de proteínas, alterando ou não a proporção de proteínas do soro em relação às proteínas da caseína. O ajuste é benéfico quando o objetivo é melhorar o valor nutricional do produto final.

O ajuste do teor de sólidos do iogurte pode ser feito por diferentes métodos. O processo tradicional usa a fervura do leite até redução do volume a 2/3 do volume inicial, mas resulta em mudanças físico-químicas. Atualmente três sistemas são utilizados para ajustar o teor de sólidos: adição de produtos em pó (leite desnatado, soro e suas proteínas concentradas, caseinatos); evaporação de água sob vácuo; e remoção da água pelo processo de filtração por membranas. A escolha do método depende do custo, disponibilidade e escala de produção (Spreer & Mixa, 1998; Tamime & Robinson, 2001).

A ultrafiltração (UF) é um processo físico-químico complexo, que em resumo envolve a pressurização do leite através de uma membrana porosa para compostos de pequeno peso molecular, de forma a reter a maior parte das proteínas e gorduras do leite. A UF oferece a possibilidade de ajustar os diferentes constituintes do leite e padronizar o teor de proteínas sem afetar negativamente suas características físico-químicas. O teor final de proteínas, de lactose e de minerais depende da extensão das condições de processamento empregado. UF pode ser aplicada para a padronização do

valor nutricional do leite a ser consumido na forma líquida ou para o usado no preparo de leite em pó, contornando a variação natural na composição do leite (Rosenberg, 1995; Rattray & Jelen, 1996).

O uso de UF para a padronização do teor de proteína e de sólidos do leite usado na produção de leites fermentados pode resultar em melhor controle de qualidade de atributos como consistência, pós-acidificação e sinérese. Mas as mudanças de composição resultantes da UF também podem influenciar a atividade das culturas lácticas. O processo afeta a concentração de lactose e de minerais do leite, além de substâncias que podem inibir a atividade dessas culturas (Rosenberg, 1995).

A adição de leite em pó integral ou desnatado é largamente usada pela indústria na concentração de 3-4%, mas pode oscilar entre 1 e 6%. Outros produtos lácteos com alto teor protéico também podem ser usados para a padronização do leite antes da fermentação do iogurte. Suas características funcionais melhoram a viscosidade, a textura e a consistência perceptíveis pelo consumidor, ao mesmo tempo que reduzem a sinérese (Tamime & Robinson, 1999).

3.4.2. Suplementação do leite

Nesta revisão procura-se enfatizar o emprego do soro de leite e do hidrolisado de caseína na suplementação do leite e seu efeito sobre as bactérias probióticas.

3.4.2.1. Soro de leite

O soro é obtido durante a produção de queijos, depois da separação da caseína e da gordura que ocorre com a coagulação do leite. Na produção de um quilo de queijo são gerados aproximadamente nove litros de soro. Sua composição varia com o tipo de queijo produzido ou o método empregado na coagulação da caseína. O soro ácido é obtido da coagulação da caseína pela adição de ácidos, enquanto o soro obtido por coagulação enzimática (pela renina) é o soro doce. O teor de proteínas do soro é de 0,8-

1,0%. O pH varia de 6,4 a 6,2 para o soro doce e de 5,0 a 4,6 para o soro ácido. A acidez expressa em ácido láctico varia de traços para o soro doce até acima de 0,8% para o soro ácido (Spreer & Mixa, 1998).

A Tabela 3 apresenta a composição média das frações protéicas do leite e do soro de leite.

Tabela 3: Principais frações protéicas da caseína e do soro de leite bovino

Fração	Conteúdo (g/L)	% (m/m) do total de proteínas do leite
Caseína total	26,0	80,0
α_s -caseína	13,0	39,0
β -caseína	9,3	28,4
κ -caseína	3,3	10,1
Proteína total do soro	6,0	19,3
β -lactoglobulina	3,2	10,0
α -lactoalbumina	1,2	3,1
Albumina sérica	0,3	1,2
Imunoglobulinas	0,7	2,0
Outras	0,8	2,4

Fonte: Jelen & Lutz, 1998

Aproximadamente 20% da proteína do leite consiste de proteínas do soro. Entre essas proteínas algumas são reconhecidas por apresentar propriedades funcionais, como a α -lactoalbumina. O soro contém também as imunoglobulinas lactoferrina e lactoperoxidase. O desenvolvimento comercial de proteínas concentradas de soro (PCS), isolados protéicos de soro e, mais recentemente, frações protéicas de soro propiciou o crescimento de sua aplicação tecnológica. Esses produtos têm funcionalidade tecnológica e nutricional comprovadas e são matérias de inúmeras pesquisas, como nas de prevenção de câncer e da cárie dentária. (Jelen & Lutz, 1998).

Segundo Spreer & Mixa (1998), o soro pode ser utilizado na forma não processada (alimentação animal e adição em bebidas), na produção de soro em pó ou concentrados em pó, na produção de ingredientes isolados ou mesmo fermentado.

O substrato para produtos de soro concentrado e em pó é o soro doce ou o ácido, ou uma mistura destes, conhecido como soro industrial. A qualidade deste material base tem influência no rendimento e qualidade dos produtos finais. O soro deve ser inicialmente clarificado e pasteurizado. As dificuldades para o processamento são o alto teor de água e a curta vida-de-prateleira do soro. Deve ser considerado como um produto com nutrientes de alto valor, cuja utilização tem importância econômica (Spreer & Mixa, 1998).

A produção de concentrados protéicos de soro envolve a ultrafiltração do soro para concentração das proteínas e a diafiltração para remoção da maior parte da lactose, de minerais e de outros componentes de baixo peso molecular. A seguir, o produto é novamente concentrado por evaporação antes da secagem por atomização, com o objetivo de reduzir o custo de remoção da água e melhorar as propriedades físicas do pó (de la Fuente *et al.*, 2002).

A concentração do soro por osmose reversa é uma alternativa atrativa do ponto de vista tecnológico e econômico. Após a concentração, o soro para consumo humano ou animal é desmineralizado por eletrodialise com o objetivo de melhorar seu valor nutricional. Uma alternativa é o processo de desmineralização parcial por nanofiltração. A etapa seguinte é a evaporação, seguida da secagem por atomização (van der Horst, 2001).

A aplicação de processos de membrana na indústria de laticínios obtém maior sucesso na produção de produtos concentrados de soro. A concentração por ultrafiltração é feita de forma a obter produtos com teor de sólidos de 35, 50, 60, 70, 80% ou mais. Esses concentrados protéicos podem substituir parte da base láctea de produtos como iogurtes,

sobremesas, produtos de confeitaria, sopas e molhos. Alguns concentrados são empregados na substituição de gorduras em queijos, empregados por suas propriedades gelificantes, emulsificantes ou estabilizantes (van der Horst, 2001).

Segundo de la Fuente *et al.* (2002), a diferença na funcionalidade tecnológica das proteínas concentradas de soro é provavelmente mais influenciada pela modificação nas proteínas e outros componentes, causada pelos processos que são usados na produção de queijos ou caseína, do que pelos processos de produção dos concentrados. Um grande número de produtos de soro é fabricado atualmente e esses produtos variam com respeito à concentração de proteínas, de minerais, de lipídios e de lactose.

Segundo Penna *et al.* (1997), o soro de leite em pó pode ser usado em substituição parcial ao leite em pó desnatado (até 3%) sem alterar as características sensoriais do iogurte. O enriquecimento do leite para iogurte com soro em pó pode proporcionar um aumento da viscosidade do produto (Jelen & Lutz, 1998; Tamime & Robinson, 1999).

O uso de soro em pó, de proteína concentrada de soro de leite (contendo de 35 a 80% de proteínas), de proteína isolada de soro de leite (contendo acima de 90% de proteínas), de frações ou de hidrolisado de proteína do soro, são métodos disponíveis para alterar o teor de proteínas do leite. Diferentes tipos de caseína em pó são produzidos a partir do leite em pó desnatado e suas aplicações em iogurtes têm influência positiva na qualidade do produto (Tamime & Robinson, 1999).

Os benefícios ao iogurte são: maior produção de acetaldeído, aumento da viscosidade e redução da sinérese, melhora das características sensoriais e melhora da capacidade tamponante com baixo pH (Tamime & Robinson, 1999). Esta forma de padronização do leite pode trazer benefícios também ao meio ambiente, quando se reduz o descarte do soro de leite liberado na produção de queijo. O soro descartado da produção de queijo é um resíduo com alta demanda biológica de oxigênio, causando impacto ambiental negativo (Rattray & Jelen, 1996).

Dave & Shah (1998a) obtiveram redução do tempo de fermentação para iogurte suplementado com proteína concentrada de soro contendo *Lb. acidophilus*.

Bhullar *et al.* (2002) estudaram o efeito do uso de soro em pó, da proteína de soro concentrada (PCS) e do leite desnatado em pó na textura e microestrutura do iogurte. Concluíram que PCS melhora a firmeza e viscosidade do iogurte, resulta em matriz com menor espaço intersticial e produto menos susceptível à sinérese.

3.4.2.2. Hidrolisado de caseína

As proteínas são importantes como fonte de nitrogênio e aminoácidos essenciais. Por diversas razões a hidrólise de proteínas pode ser benéfica, como, por exemplo, para reduzir fatores alergênicos, para atender a necessidades nutricionais específicas e para melhorar aspectos funcionais. A hidrólise resulta em grandes alterações das propriedades funcionais, como solubilidade, viscosidade, sabor e capacidade emulsificante e estabilizante. Essas características funcionais são importantes para o emprego de hidrolisados em produtos alimentícios. Outro importante parâmetro de qualidade para as proteínas hidrolisadas é seu sabor amargo, que se origina de certos componentes formados durante a proteólise (van de Ven *et al.*, 2002).

A hidrólise quebra as proteínas resultando em peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos. Esta degradação pode ser obtida pela ação de enzimas, de ácido ou de álcali. O processo de hidrólise ácida ou alcalina é de difícil controle e resulta em produtos com valor nutricional reduzido. A hidrólise enzimática se desenvolve em condições de temperatura e pH moderados (40-60°C e pH 6-8). A composição final de aminoácidos da proteína hidrolisada por enzimas é similar àquela inicial (Clemente, 2000).

A produção de proteínas hidrolisadas pela ação seqüencial de endopeptidases e exoproteases, em conjunto com o desenvolvimento de procedimentos pós-hidrólise, é considerado o caminho mais efetivo para a obtenção de proteínas hidrolisadas com características definidas. É um

processo aplicado comercialmente em larga escala, com custo moderado e alta qualidade de produtos finais (Clemente, 2000).

A proteína do leite é a mais importante fonte usada no desenvolvimento de hidrolisados com finalidade de atender a nutrição de pacientes com necessidades específicas (Clemente, 2000).

A caseína hidrolisada também é estudada como ingrediente de alimentos para a prevenção de hipertensão, uma alternativa a medicamentos (Jelen & Lutz, 1998).

Dave & Shah (1997a) estudaram a influência da adição de cisteína na viabilidade de bactérias probióticas. *Lb. acidophilus* teve sua viabilidade aumentada durante a produção e estocagem em iogurte enriquecido com cisteína na proporção de 250 mg/L.

Dave & Shah (1998a) obtiveram um menor tempo de fermentação em iogurte contendo probióticos suplementado com caseína ácida hidrolisada.

Oliveira *et al.* (2001) estudaram o efeito do hidrolisado de caseína na suplementação do leite fermentado por culturas probióticas, o que resultou em aumento da atividade acidificante.

Sodini *et al.* (2002) recomendam um estudo para otimização do nível de adição de hidrolisado de caseína adicionado à base láctea para a produção de leites fermentados.

3.4.3. Homogeneização

A homogeneização do leite e sólidos tem a finalidade de promover a dispersão homogênea da mistura base, aumentar a viscosidade e melhorar as qualidades organolépticas. É muito importante no iogurte feito com leite integral (Ferreira, 2001).

O processo quebra os glóbulos de gordura, uniformizando seu tamanho em 1µm. Essa redução de tamanho é essencial para prevenir a separação da gordura durante a produção de iogurte integral, por exemplo. A homogeneização também melhora a consistência do iogurte batido (Tamime *et al.*, 2001). Em geral a homogeneização é feita antes do tratamento térmico do leite.

3.4.4. Tratamento térmico

Segundo Tamime *et al.* (2001), o tratamento térmico é feito em trocador de calor e a temperatura deve atingir 90-95°C, com um tempo de residência de 2 a 5 minutos. Uma alternativa é aquecer o leite em bateladas até 85°C e manter esta temperatura por 30 minutos. Esta etapa resulta em um produto final com melhor textura, pois altera as propriedades físico-químicas da caseína e desnatura as proteínas do soro. As proteínas do soro são quebradas liberando produtos que estimulam o crescimento das culturas, eliminando o oxigênio dissolvido no leite, melhorando o crescimento das culturas microaerófilas e matando os microorganismos patogênicos que podem estar presentes no leite.

A aplicação de tratamento *ultra high temperature* (UHT) ao leite não traz os mesmos benefícios e propriedades físicas necessárias ao crescimento das bactérias lácticas (Tamime *et al.*, 2001).

O leite é geralmente suplementado com leite em pó desnatado para melhorar as características de firmeza, sendo que o gel formado com a acidificação é bastante estável quando mantido em repouso. O tratamento térmico do leite a 90°C por 10 minutos, por exemplo, ou a 120°C por 2 minutos, reduz a tendência à sinérese, como efeito da desnaturação das proteínas (Fox & McSweeney, 1998).

O leite para comercialização na forma de leite fluido refrigerado é pasteurizado. A pasteurização inativa quase todos os patógenos que possam estar presentes. O processo de pasteurização pode ser contínuo ou em bateladas, nos quais é aquecido e mantido na temperatura por um período de tempo. A pasteurização contínua é a mais utilizada. Envolve o aquecimento do leite até 71,7-78,1°C por pelo menos 15 segundos, seguido de resfriamento até 6°C. Este processo é conhecido pela sigla HTST (*high temperature for short time* ou alta temperatura e curto espaço de tempo). Acima de 65°C ocorre a desnaturação das proteínas do soro e a formação de complexos com a caseína (Muir & Tamime, 2001).

Em alguns países é permitida a adição de estabilizantes para atingir a consistência desejada do iogurte batido com frutas ou outros ingredientes. A incorporação desses estabilizantes é feita antes do tratamento térmico da base láctea, para obter hidratação completa dessas moléculas e se eliminar possíveis contaminantes presentes (Tamime *et al.*, 2001).

3.4.5. Inoculação e fermentação

Após o tratamento térmico, o leite para a produção de iogurte é resfriado até 42°C, para a inoculação das culturas de *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*. Para a produção de produtos contendo probióticos, por exemplo, *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp., estas são adicionados da mesma maneira que as culturas do iogurte (Tamime *et al.*, 2001).

Segundo Tamime *et al.* (2001), a forma mais usual de preparo do inóculo é através da dissolução das culturas liofilizadas ou congeladas em leite esterilizado. O inóculo pode ser adicionado a uma porção do leite, incubado até próximo da coagulação (até atingir pH em torno de 5,0), e essa massa pré-fermentada é adicionada à base láctea preparada (leite com teor de sólidos ajustado) a uma taxa de 1-2 mL/100mL. Outra possibilidade é a adição direta do inóculo à base láctea. A adição pode ser feita diretamente em tanques de fermentação ou por dosagem durante o bombeamento da base láctea aos tanques de fermentação. Esta última opção está se tornando popular por sua conveniência.

Para a produção de iogurte ou de leites fermentados contendo probióticos a temperatura ótima de incubação para o crescimento das culturas mistas é de 40 a 45°C. É desejável que a fermentação se complete em 4-5 horas (Tamime & Robinson, 1999).

A formação e estabilização do gel do iogurte é basicamente resultado da desestabilização da caseína. Envolve o desdobramento da cadeia protéica, que expõe os aminoácidos laterais e formam pontes hidrogeniônicas. Quando as cadeias protéicas se ligam por essas pontes,

ocorrem cavidades que absorvem água, provocando a estabilização do gel (Ferreira, 2001). O processamento anterior do leite, homogeneização e tratamento térmico, também tem forte influência nas condições do gel do iogurte.

A caseína sofre modificações de acordo com a variação de pH durante a fermentação: (a) pH 5,5-5,2: ocorre desintegrações parciais, formando espaços vazios entre as micelas; (b) pH 5,2-4,8: ocorre contração do agregado de caseína, formando partículas maiores que as micelas originais; (c) $\text{pH} \leq 4,5$: ocorre agregação das partículas de caseína, formando uma rede de proteínas que retém os constituintes do leite e a fase aquosa (Tamime & Robinson, 1999).

O processo de fermentação pode ser feito na embalagem, para o iogurte firme, e o controle do ponto final de fermentação previne acidificação excessiva e reduz a sinérese. O iogurte batido é fermentado em tanques e agitado suavemente quando o pH atinge 4,6. A adição de frutas, açúcar e aromas mascaram o excesso de acidez que pode ocorrer (Tamime *et al.*, 2001).

3.4.6. Resfriamento: parada da fermentação

A fermentação deve ser interrompida quando a acidez do leite chegar a 1,2-1,4 g de ácido láctico/100mL (pH em torno de 4,2-4,3). Quando o pH atinge o ponto isoelétrico a caseína do leite torna-se instável e coagula formando um gel firme. O soro é preso dentro da matriz formada e, em geral, quanto maior o teor de proteína na base de leite, mais estável é o gel resultante. A interrupção da fermentação é obtida pelo resfriamento do produto. O resfriamento tem as funções de reduzir a atividade metabólica da cultura, de controlar a acidez do produto e de prevenir a pós-acidificação. Para o iogurte firme o resfriamento pode ser feito pela circulação de ar frio entre as embalagens. O resfriamento em tanques é feito para o iogurte batido, através de circulação de água fria em tacho encamisado ou através de bombeamento e por um trocador de calor, mas este processo resulta em

perda de viscosidade do produto. A mistura de frutas e aromatizantes pode ser feita em tanque misturador, após a temperatura cair a 15-25°C. O produto é envasado e o resfriamento final é feito diretamente na embalagem (Tamime *et al.*, 2001).

3.5. Cinética de acidificação

O crescimento bacteriano por unidade de volume de uma cultura pode ser avaliado seja por medidas diretas do número, do volume ou da massa de células formadas em relação ao volume da cultura, seja por medidas indiretas da concentração dos constituintes do meio de cultura ou da atividade metabólica das células. Entre os métodos podem ser citados:

- ✓ Contagem ao microscópio;
- ✓ Contagem em meio nutritivo;
- ✓ Medida de densidade óptica (480 e 650 nm);
- ✓ Medida da atividade metabólica;
- ✓ Dosagem dos componentes do meio de cultura.

Segundo Walstra *et al.* (1999), as bactérias se multiplicam por divisão em uma progressão geométrica. O tempo de geração (tempo necessário para a divisão completa da célula = g) depende de fatores diversos. Em leite a espécie bacteriana e a temperatura têm importância especial. Se a cultura contém N_0 células por mL, após n divisões a contagem bacteriana é:

$$N = N_0 \times 2^n \quad \text{ou}$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2 = \log N_0 + 0,3 n$$

O tempo de geração determina a taxa de crescimento bacteriano e depende do número de divisões que ocorrem um determinado tempo:

$$g = t \log 2 / (\log N - \log N_0)$$

Conseqüentemente, a contagem N , depois de um período de tempo t em condições bem definidas, pode ser calculada se N_0 e g são conhecidos:

$$\log N = \log N_0 + 0,3 t / g$$

Essas equações se aplicam à fase de crescimento exponencial das bactérias, também denominada fase logarítmica (fase log). A figura a seguir ilustra as diferentes fases de crescimento bacteriano.

Figura 1: esquema da curva de crescimento bacteriano (adaptado de Ferreira, 2001)

A fase inicial não deve ser considerada uma fase de latência, porque a célula está se adaptando para utilizar o substrato em que irá crescer. A fase exponencial é a de maior produção de ácido (Ferreira, 2001).

O estudo da influência das condições de cultura sobre a cinética de crescimento e de acidificação, e sobre os rendimentos da produção (em biomassa ou em ácido láctico), permite a obtenção de informações sobre a fisiologia de cepas bacterianas utilizadas industrialmente. Dentre estas condições, a temperatura, o valor de pH e as concentrações em substrato e em produtos, são aquelas que agem mais sobre a fase de crescimento exponencial das bactérias lácticas (Béal *et al.*, 1994).

A qualidade da cultura lática é definida por um conceito de atividade biológica que inclui a viabilidade das bactérias, seu estágio fisiológico e sua habilidade de acidificar um determinado meio (Fonseca *et al.*, 2000). Sua sobrevivência normalmente é medida pela capacidade das células em formar colônias em um meio de cultura (Foschino *et al.*, 1996).

Entretanto, este método não fornece resultados seguros, pois a maioria das bactérias láticas forma cadeias de diferentes comprimentos que diferem durante o estágio de crescimento. A contagem de colônias pode ser muito menor que o número de células viáveis presentes, especialmente para algumas espécies de *Lactobacillus* e, principalmente, para *Lactococcus* e *Streptococcus* (Walstra *et al.*, 1999).

Segundo Walstra *et al.* (1999), a principal propriedade das bactérias láticas é a produção de ácido. A avaliação do crescimento dos microorganismos é feita pela determinação da quantidade de ácido produzido, mais tradicionalmente através da titulação expressa em porcentagem de ácido lático. O pH pode ser medido em linha, o que é uma vantagem considerável no monitoramento e no controle do processo de acidificação.

A relação entre pH, acidez titulável e contagem de microorganismos tem várias complicações, entre as quais o efeito tampão das proteínas. O metabolismo também não é proporcional ao crescimento em todas as fases do processo. Somente na fase de crescimento exponencial a taxa de produção de ácido é proporcional à massa de bactérias, em condições externas constantes. Quando o crescimento fica mais lento ou pára, especialmente devido ao acúmulo de ácido lático, o sistema enzimático das bactérias pode continuar convertendo lactose a ácido lático. O metabolismo das espécies de bactérias láticas também pode variar. Enquanto uma cepa pode produzir quatro moléculas de ácido lático a partir de uma molécula de lactose, outra produz somente duas (Walstra *et al.*, 1999).

Devido ao efeito tamponante das proteínas e outros componentes do leite, a adição de leite em pó aumenta a acidez total do iogurte (Tamime & Robinson, 1999). Souza (1991) afirmou que o teor de sólidos do leite exerce grande influência na acidez titulável e, por isso, o pH é o melhor critério para expressar a acidez do iogurte. De acordo com Béal *et al.* (1994), a atividade acidificante é o método mais apropriado para avaliar a atividade das culturas.

O sistema CINAC (Cinétique d'acidification, Corrieu *et al.*, 1988) permite a caracterização da atividade acidificante das bactérias lácticas medindo o tempo necessário para atingir a máxima taxa de acidificação em leite. Esse método automático de medida de pH em tempo real é mais significativo, fácil de obter e de interpretar que os métodos de medida de viabilidade (Spinnler & Corrieu, 1989).

O sistema CINAC é uma patente obtida por Spinnler & Corrieu (1989) e trata-se de um método automático para a quantificação da atividade de uma cultura com base em medidas de valores de pH. É um aparelho para determinação automática do valor de pH e aquisição de dados mediante computador. Um eletrodo é inserido em um frasco contendo a amostra em estudo, sob temperatura controlada, é conectado a um potenciômetro e a uma interface eletrônica que digitaliza os dados no tempo de execução do experimento. As principais etapas das análises dos dados são:

- ✓ Aquisição e filtragem dos dados e expressão dos mesmos como valores físicos;
- ✓ Cálculo das velocidades de acidificação;
- ✓ Armazenamento e apresentação dos resultados em gráficos representando as medidas dos valores de pH e velocidades de acidificação;
- ✓ Cálculo dos parâmetros característicos da cinética do processo.

A aquisição de dados usando microcomputador permite a realização de um grande número de determinações simultâneas. A interface eletrônica filtra os sinais de modo que uma medida seja efetuada a cada segundo e após 90 segundos a média das 90 medidas é armazenada.

A medida de pH durante o tempo de fermentação possibilita o cálculo da velocidade de acidificação (dpH/dt), expressa como miliunidades de pH por minuto ($10^{-3}upH/min$). O tempo em minutos para atingir a máxima velocidade de acidificação (t_{max}) é usado para caracterizar a atividade bacteriana. Quanto maior esse tempo, menor é a atividade bacteriana (Fonseca *et al*, 2000). A partir dos dados obtidos calcula-se:

- ✓ Velocidade máxima de acidificação (V_{max} (upH/min ou s));
- ✓ Tempo no qual atinge-se a velocidade máxima (t_{Vmax});
- ✓ pH no qual V_{max} é observada;
- ✓ Tempo durante o qual a velocidade observada é maior que $V_{max}/2$ ($t_{50\%}$);
- ✓ Faixa de pH durante a qual a velocidade observada é maior que $V_{max}/2$ ($t_{pH5,0}$);
- ✓ Tempo final de fermentação ($t_{pH4,5}$).

Figura 2: Representação esquemática do sistema CINAC (adaptado de Spinnler & Corrieu, 1989)

3.6. Qualidade do iogurte

Do ponto de vista da indústria, a qualidade do iogurte está relacionada com as características microbiológicas e físicas do produto, sendo a viscosidade ou consistência um dos atributos mais importantes (Tamime & Robinson, 1999).

Szczesniak (1966) enfatiza a importância da textura na aceitação de alimentos pelo consumidor, resultando em interesse no desenvolvimento de métodos de avaliação quantitativa de textura, e os princípios e problemas dos métodos instrumentais de avaliação. As propriedades de textura dos alimentos são resultado da estrutura física, da composição e de como este alimento é sentido na mastigação. O método de classificação das características de textura (Friedman *et al.*, 1963) pode ser aplicado à avaliação tanto sensorial como instrumental, e divide as características de textura em três grupos principais: mecânica, geométrica e aquelas

relacionadas ao teor de umidade e gordura do alimento, sendo as características mecânicas as mais estudadas.

Friedman *et al.* (1963) descreveram o uso do texturômetro para avaliação de medidas instrumentais e correlação com a avaliação sensorial em alimentos. Foram definidos parâmetros principais, dureza (firmeza), coesividade, viscosidade, elasticidade e adesividade; e secundários, fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade, que englobam a caracterização e classificação de textura dos alimentos. Os parâmetros propostos podem ser usados para a caracterização dos alimentos por métodos instrumentais e sensoriais (Friedman *et al.*, 1963; Szczesniak, 1963).

O estudo do perfil de textura (*Instrumental texture profiles analysis* - TPA) é um teste onde uma amostra sofre dupla compressão, imitando as condições de mastigação na boca e possibilitando o cálculo dos parâmetros descritos anteriormente (Ponz & Fiszman, 1996). Segundo Szczesniak (1998), esses resultados numéricos podem ser considerados fatos, enquanto os resultados sensoriais podem ser opiniões.

Os trabalhos publicados com relação a análises de textura em iogurtes e leites fermentados utilizam diferentes equipamentos e corpos de prova para medida de firmeza.

Freqüentemente a firmeza é estimada através da penetração de um corpo de prova de medida e peso conhecido no produto durante um intervalo de tempo determinado. A profundidade de penetração é a medida de firmeza (Walstra *et al.*, 1999).

Dave & Shah (1998a) e Shihata & Shah (2002), utilizaram um penetrômetro cônico para medir a profundidade de penetração em milímetros após cinco segundos de movimento.

Oliveira *et al.* (2001) utilizaram o texturômetro TA.XT2 e o teste de simples compressão, com cilindro de 2,5 cm de diâmetro, no qual o

parâmetro firmeza correspondente ao pico da curva de força por tempo foi caracterizado.

Dominguez-Soberanez *et al.* (2001) utilizaram o texturômetro TA.XT2, com cilindro de 2,5 cm de diâmetro, com dupla compressão. Extraíram seis parâmetros físicos dos ensaios e concluíram que são válidos para iogurte firme, mas que para iogurtes desnatados batidos somente a avaliação do parâmetro firmeza detecta diferenças entre amostras.

Wszolck *et al.* (2001) utilizaram dois texturômetros diferentes para análise de firmeza, de adesividade e de gomosidade de leites fermentados: Stevens LFRA Texture Analyser (C. Stevens & Sons Ltd., U.K.) e The Universal TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems Ltd., U.K.). O corpo de prova utilizado foi do tipo cônico e a distância de penetração de 15 mm, com velocidade de 0,5 mm/s.

Figura 3: Curva característica de TPA para leite fermentado (adaptado de Ponz & Fiszman, 1996)

A curva gerada pelo texturômetro é um gráfico de força x tempo. A curva fornece sete parâmetros, sendo dois calculados (Figura 3). Os seguintes parâmetros são os mais utilizados (Ponz & Fiszman, 1996):

- (a) firmeza: a máxima força durante o primeiro ciclo de compressão;
- (b) coesividade: A_2 / A_1 ;
- (c) adesividade: A_3 ;
- (d) gomosidade: coesividade x firmeza.

3.6.1. Valor nutricional

É consenso que a imagem de produto saudável iogurtes e leites fermentados em todo o mundo contribuiu muito para o crescimento do consumo nas últimas décadas. Entretanto, além das propriedades nutritivas tradicionais há um crescente suporte quanto às vantagens à saúde (Buttriss, 1997).

O desenvolvimento de uma enorme variedade de tipos e sabores vendidos como sobremesa ou lanche também ajudou a popularizar o produto (Buttriss, 1997; Jelen & Lutz, 1998; Miller *et al.*, 2000).

Leites fermentados e iogurtes são considerados produtos saudáveis, similares ao leite, fontes de proteínas de alta qualidade, cálcio, fósforo, magnésio, zinco e vitaminas. A ação proteolítica das culturas bacterianas resulta em maior teor de aminoácidos livres, embora a concentração de aminoácidos totais seja equivalente ao do leite (Buttriss, 1997).

A ação das culturas bacterianas começa pela lactose, que é fermentada a glicose e galactose, resultando em uma redução de 20 a 30% da lactose em relação ao leite. Mas não é só essa redução que melhora a tolerância em pessoas com problemas de digestão da lactose, pois a β -galactosidase produzida pelas bactérias lácticas permanece no produto. Mesmo iogurte e leites fermentados com teor de lactose equivalente ao leite natural resultam em menor intolerância (Buttriss, 1997).

A vitamina C é mais estável nas condições ácidas dos produtos fermentados. Ocorre redução do teor de vitamina B12, que é consumida por

algumas culturas. Por outro lado, diversas culturas sintetizam vitamina B e ácido fólico, aumentando o teor de vitaminas presentes no produto final (Buttriss, 1997).

Embora a concentração de minerais não seja alterada, ocorre um aumento de sua biodisponibilidade (Buttriss, 1997).

A Tabela 4 apresenta algumas características nutricionais do leite e do iogurte.

Tabela 4: Composição característica do leite e do iogurte

Componente	Unidade	Leite	Iogurte
		integral	(leite enriquecido com 3% leite pó desnatado)
Proteína	%	3,30	4,30
Cálcio	%	0,12	0,16
Fósforo	%	0,10	0,13
Riboflavina	mg%	0,17	0,21

Fonte: adaptado de Jelen & Lutz, 1998

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimento experimental

4.1.1. Obtenção do leite fermentado contendo probióticos

O processo de produção para obtenção dos leites fermentados está representado esquematicamente na Figura 5.

Matéria-prima

Para a preparação do leite fermentado utilizou-se leite integral homogeneizado e pasteurizado da marca Top (Paulista, Brasil), padronizado através da adição de leite em pó desnatado (Glória, Rio de Janeiro) em 15% de sólidos totais usando o método de quadrados de Pearson, Figura 4 (Tamime & Robinson, 1999).

Figura 4: Esquema do método de quadrado de Pearson usado para padronização de sólidos do leite

O leite padronizado foi suplementado com hidrolisado de caseína (HC) (Merck, Darmstad, Alemanha) e proteína concentrada de soro (PCS) (Germinal, Diadema, Brasil), segundo o esquema da Tabela 5, e misturado com auxílio de agitador magnético por 15min. A seguir, foi distribuído em frascos esterilizados de 250 mL, em câmara de fluxo laminar, e acondicionados em câmara fria a 4°C por 24 horas.

As seguintes culturas lácteas puras liofilizadas para inoculação direta foram utilizadas:

- ✓ ST (TA040), *Streptococcus thermophilus*, Rhodia, França;
- ✓ LA, (LAC 4), *Lactobacillus acidophilus*, Rhodia, França;
- ✓ LR (LBA), *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus*, Rhodia, França;
- ✓ LB (LB 340), *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, Rhodia, França.

Preparação do inóculo

Cada cultura láctea liofilizada foi diluída em 50mL de leite integral (Top Paulista) previamente autoclavado a 121°C por 10 minutos e resfriado a 42°C. A seguir, as suspensões foram agitadas manualmente por 30 segundos.

A contagem inicial dos inóculos para as culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhannosus* foi de $3,5 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL, $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, $6,0 \times 10^7$ UFC/mL, $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente.

A partir das suspensões, procedeu-se à inoculação do leite numa razão de 0,2% (vol/vol) de *Streptococcus thermophilus* e 0,2% (vol/vol) de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (STLB), de 0,2% (vol/vol) de *Streptococcus thermophilus* e 0,2% (vol/vol) de *Lactobacillus acidophilus* (STLA) e de 0,2% (vol/vol) de *Streptococcus thermophilus* e 0,2% (vol/vol) de *Lactobacillus rhannosus* (STLR).

Fermentação

Os frascos contendo o leite foram colocados em banho termostatizado até estabilização da temperatura a 42°C. A seguir, adicionaram-se os inóculos e procedeu-se à agitação manual por 20 segundos. Os frascos

foram acoplados ao sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França – Figura 6) e a cinética de acidificação foi seguida pelo Sistema CINAC até valor de pH de 4,5. A seguir, o coágulo foi quebrado por agitação manual com haste de aço inoxidável (Figura 7), através de movimentos ascendentes e descendentes durante um minuto, evitando a incorporação de ar. Os leites fermentados foram então acondicionados em potes plásticos de 50 mL. Os potes foram selados em seladora térmica Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) (Figura 8), resfriados em banho de gelo e estocados a 4°C.

Figura 5: Fluxograma de obtenção de leites fermentados contendo probióticos

Figura 6: Sistema CINAC

Figura 7: Quebra do coágulo

Figura 8: Seladora usada no acondicionado dos iogurtes

Figura 9: Texturômetro TA.XT2

4.2. Delineamento experimental

A fim de obter-se leite fermentado contendo probióticos e otimização da suplementação de leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro de leite (PCS), foram planejados 12 experimentos, em duplicata, segundo delineamento estatístico apresentado na Tabela 5. Os 12 ensaios experimentais foram realizados segundo um desenho composto central (DCC), incluindo oito pontos fatoriais e quatro pontos centrais (Box *et al.*; 1978; Box & Draper, 1987). Foram estudados os efeitos das variáveis independentes, concentração de hidrolisado de caseína (X_1) e concentração de proteína concentrada de soro de leite (X_2), sobre as variáveis dependentes, velocidade de acidificação (V_{max}), tempo no qual atinge-se a velocidade máxima (t_{max}), tempo para atingir o pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), tempo para atingir o valor de pH 4,5 ($t_{pH4,5}$), firmeza, pH, acidez e número de microorganismos viáveis (ST, LB, LA e LR).

O delineamento estatístico constituiu-se de variações das concentrações das variáveis ao redor de um ponto central cuja região a ser estudada foi estabelecida com base em trabalhos anteriores (Oliveira *et al.*, 2001). A fim de verificar-se o efeito da suplementação do leite, foi realizado um experimento controle utilizando-se leite sem suplementação (ensaio 0).

Os dados foram tratados por regressão múltipla para desenvolver um modelo matemático, empregando o programa Statistica Stasoft, versão 6.0, Tulsa, USA. A equação preditiva foi do tipo:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_1X_1^2 + b_2X_2^2 + \varepsilon$$

$\hat{Y}$: resposta preditiva

X_1, X_2 : variáveis independentes

$b_0, b_1, b_2, \dots$: coeficientes estimados pela técnica de mínimos quadrados

ε : erro experimental

Tabela 5: Delineamento estatístico dos experimentos para a suplementação do leite com hidrolisado de caseína e soro de leite

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis originais (g/L)		Total (g/L)
	X ₁	X ₂	HC	PCS	
0	-	-	0,00	0,00	0,00
1	-1,00	-1,00	5,00	5,00	10,00
2	-1,00	+1,00	5,00	15,00	20,00
3	1,00	-1,00	15,00	5,00	20,00
4	1,00	+1,00	15,00	15,00	30,00
5	0,00	0,00	10,00	10,00	20,00
6	0,00	0,00	10,00	10,00	20,00
7	0,00	0,00	10,00	10,00	20,00
8	+1,41	0,00	17,05	10,00	27,05
9	-1,41	0,00	3,05	10,00	13,05
10	0,00	+1,41	10,00	17,05	27,05
11	0,00	-1,41	10,00	3,05	13,05
12	0,00	0,00	10,00	10,00	20,00

HC : hidrolisado de caseína

PCS: proteína concentrada de soro

A passagem do nível da variável codificada para a original é dada pelas seguintes equações:

$$X_1 = \frac{\text{hidrolisado caseína} - 10}{5}$$

$$X_2 = \frac{\text{proteína concentrada de soro} - 10}{5}$$

A significância do modelo foi testada pela análise da variância (teste F), considerando-se um nível de significância de $P < 0,05$. A influência das variáveis foi visualizada pela apresentação tridimensional de superfície de

resposta e das linhas de isorresposta. A representação tridimensional de superfície de resposta e das linhas de isorresposta foi realizada pelo pacote estatístico Statistica Statsoft 6.0, Tulsa, USA.

4.3. Métodos

4.3.1. Determinação dos parâmetros cinéticos

A modelagem da atividade acidificante de misturas de culturas lácticas foi feita através do Sistema CINAC, isto é, mediante um método automático para a quantificação da atividade de uma cultura *starter* com base em medidas de valores de pH (Corrieu *et al.*, 1988; Spinnler & Corrieu, 1989).

A partir dos dados obtidos, calculou-se as velocidades de acidificação (dpH/dt), expressa como miliunidades de pH / min ($10^{-3}upH/min$). No final do período de incubação foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos:

- ✓ V_{max} : velocidade máxima de acidificação ($10^{-3}upH/min$);
- ✓ $t_{V_{max}}$: tempo no qual atinge-se a velocidade máxima (V_{max}) (h);
- ✓ $t_{pH5,0}$: tempo para atingir valor de pH 5,0 (h);
- ✓ $t_{pH4,5}$: tempo para atingir valor de pH 4,5 (h);

A Figura 10 apresenta uma curva de acidificação (pH x tempo) de onde são obtidos alguns dos parâmetros cinéticos calculados. O ponto mínimo da curva de velocidade de acidificação (dpH/dt x tempo) representa a máxima taxa de acidificação e corresponde a $t_{V_{max}}$, o tempo necessário para atingir essa taxa.

Figura 10: Curvas de queda de pH e velocidade de acidificação de leite fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* e *Lb. rhamnosus*

4.3.2. Análises físico-químicas

Sólidos Totais

O teor de sólidos totais dos iogurtes foi determinado gravimetricamente em estufa a vácuo, Marconi mod. MA 030/12 (Piracicaba, Brasil), pressão - 650 mm Hg, a 70°C até peso constante. Os resultados foram expressos em % de sólidos totais (Case *et al.*, 1992).

Valor de pH

A pós-acidificação foi determinada pela medida do valor de pH (pH) usando potenciômetro Quimis modelo Q-400M1 (São Paulo, Brasil).

Acidez em ácido láctico

Para determinação do teor de acidez expressa em ácido láctico percentual peso por volume, foi utilizado o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1976).

Determinação de proteínas

O teor de nitrogênio dos suplementos foi determinado pelo método de Micro-Kjeldhal (AOAC, 1980). A fórmula de cálculo do teor de proteína utilizada foi:

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{vol. Titulado} \times N \text{ HCl} \times \text{fator} \times 0,014 \times 100}{\text{peso da amostra}}$$

$$\% \text{ Proteína} = 6,38 \times \% \text{ Nitrogênio}$$

Os resultados foram expressos em % de proteína.

4.3.3. Análises microbiológicas

Amostras de iogurte (1mL) e do inóculo foram homogeneizadas com 9mL de água peptonada 0,1% p/v durante 2min em um agitador de tubos e, em seguida, foram feitas diluições consecutivas utilizando-se o mesmo diluente e inoculações em meios seletivos através de plaqueamento em profundidade. *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foram enumerados em MRS ágar (Merck, São Paulo) a valor de pH 5,4, após incubação anaeróbica a 37°C por 72h. *L. bulgaricus* foi enumerado em MRS ágar (Merck, São Paulo) a valor de pH 5,4, após incubação aeróbica a 37°C por 72h. *S. thermophilus* foi contado em M17 (Merck, São Paulo), após incubação aeróbica a 37°C durante 48h. As contagens das unidades formadoras de colônias foram realizadas em Contador de Colônias CP600 (Phoenix, São Paulo, Brasil).

4.3.4. Avaliação da firmeza

A análise da firmeza dos leites fermentados foi feita através de teste de dupla compressão, com probe cilíndrico acrílico de 2,5 cm de diâmetro (P/25P), em analisador de textura TA.XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) (Figura 9) controlado por microcomputador. A distância percorrida pelo cilindro na amostra foi de 10 mm numa velocidade de 10 mm/s. O atributo firmeza foi determinado segundo recomendações de Pons e Fiszman (1996), que corresponde à altura do primeiro pico da curva de dupla compressão (Figura 11).

Figura 11: Gráfico de textura de iogurtes firmes contendo probióticos

Todas as análises físico-químicas e microbiológicas foram feitas em duplicata, após 1 e 7 dias de armazenamento do produto a 4°C. As determinações de cinética foram feitas em duplicata durante a fermentação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos suplementos

Os teores determinados de proteína do hidrolisado de caseína e da proteína concentrada de soro médio (3 determinações) foi de 78,4% ($\pm 1,81$) e 32,2% ($\pm 1,90$), respectivamente.

5.2. Sólidos totais dos leites fermentados

A Tabela 6 mostra o teor de sólidos totais obtidos para os leites fermentados por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (STLB), *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus* (STLA), e *S. thermophilus* e *Lb. rhmanosus* (STLR), segundo o ensaio. Observa-se que houve uma variação de 15,9% a 19,4% no valor dos sólidos totais dos leites fermentados suplementados, enquanto o teor de sólidos médio do controle sem suplementação foi de 14,81% .

Tabela 6: Valores médios* das análises de sólidos dos leites fermentados obtidos segundo os ensaios

Ensaio	Sólidos totais (%)	
Controle	14,81	$\pm 0,18$
1	15,84	$\pm 0,19$
2	17,63	$\pm 0,38$
3	17,15	$\pm 0,25$
4	17,74	$\pm 0,46$
5	16,63	$\pm 0,31$
6	16,63	$\pm 0,28$
7	16,62	$\pm 0,21$
8	18,41	$\pm 0,30$
9	15,89	$\pm 0,22$
10	19,43	$\pm 0,22$
11	15,98	$\pm 0,13$
12	16,62	$\pm 0,10$

*média de 3 determinações

Segundo Tamime *et al.* (2001), 13 a 14% de sólidos totais são adequados para a produção da maioria dos leites fermentados, mas para alguns produtos pode-se usar 16 a 18% de sólidos.

5.3. Caracterização dos parâmetros cinéticos dos leites fermentados por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (STLB), *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus* (STLA), e *S. thermophilus* e *Lb. rhmanosus* (STLR)

Os resultados referentes ao efeito da suplementação do leite e da composição das culturas na cinética de acidificação estão resumidos nas Tabelas 7, 8 e 9.

Ao analisarmos os parâmetros cinéticos para os ensaios controle (sem suplementação) verificamos que o tempo para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), o tempo para atingir a velocidade máxima ($t_{v_{max}}$) e a velocidade máxima de acidificação (V_{max}) apresentaram valores muito próximos para as três co-culturas. O tempo de fermentação ($t_{pH4,5}$ = final da fermentação) para a co-cultura STLB (8,2h) foi menor que para a co-culturas probióticas STLA (10,1h) e STLR (10,4h).

Para os leites suplementados fermentados com STLB (Tabela 7) a velocidade máxima de acidificação (V_{max}) variou de 14,3 a $19,2 \times 10^{-3}$ upH/min, de acordo com a suplementação. O tempo para atingir a velocidade máxima ($t_{v_{max}}$) variou de 1,5 a 4,3 h. O tempo para atingir o pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) variou de 2,7 a 5,7 h e o tempo para atingir o pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) variou de 4,6 a 7,9 h.

O $t_{pH4,5}$ do controle para STLB foi de 8,1 horas, superior ao maior tempo obtido com a suplementação (7,9 h), indicando o efeito positivo da suplementação sobre o tempo de fermentação em todos os ensaios.

O controle apresentou a menor velocidade máxima de acidificação, $V_{max} = 11,4 \times 10^{-3}$ upH/min, mostrando influência positiva das concentrações de suplementos empregadas sobre a velocidade de acidificação por STLB.

Para os leites suplementados fermentados com STLA (Tabela 8) a taxa de acidificação (V_{max}) variou de 13,7 a $19,4 \times 10^{-3}$ upH/min, de acordo com a suplementação. O tempo para atingir a velocidade máxima ($t_{v_{max}}$) variou de 1,4 a 4,4 h. O $t_{pH5,0}$ variou de 2,5 a 5,6 h e o $t_{pH4,5}$ variou de 4,5 a 10,4 h.

O $t_{pH4,5}$ do controle para STLA foi de 10,1 horas, pouco inferior ao tempo máximo obtido com a suplementação (10,4 h), que corresponde à máxima concentração de hidrolisado de caseína ($X_1=1,41$ ou 17,05 g/L), indicando o efeito inibidor do HC nesta concentração.

O controle apresentou a menor velocidade máxima de acidificação, $V_{max}= 11,3 \times 10^{-3}$ upH/min, mostrando influência positiva das concentrações de suplementos empregadas sobre a velocidade de acidificação por STLA.

Para os leites suplementados fermentados com STLR (Tabela 9) a taxa de acidificação (V_{max}) variou de 13,7 a $19,0 \times 10^{-3}$ upH/min, de acordo com a suplementação. O tempo para atingir a velocidade máxima (t_{Vmax}) variou de 1,4 a 4,3 h. O $t_{pH5,0}$ variou de 2,5 a 5,7 h e o $t_{pH4,5}$ variou de 4,5 a 10,4 h.

O $t_{pH4,5}$ do controle para STLR foi de 10,4 horas, o mesmo tempo máximo obtido com suplementação, que corresponde à máxima concentração de hidrolisado de caseína ($X_1=1,41$ ou HC= 7,05 g/L).

O controle apresentou a menor velocidade máxima de acidificação, $V_{max}= 11,6 \times 10^{-3}$ upH/min, mostrando influência positiva das concentrações de suplementos empregadas sobre a velocidade de acidificação por STLR.

A variação do tempo para atingir o pH 4,5 foi a mesma para STLA e STLR, e superior ao valor encontrado para STLB.

O tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação (t_{Vmax}), obtido com a suplementação, foi maior quando se utilizou concentração máxima de hidrolisado de caseína ($X_1=1,41$ ou HC = 17,05 g/L) que para o controle com as três co-culturas.

Dave & Shah (1998a) concluíram que o tempo para atingir o pH 4,5 diminuiu em leite suplementado com hidrolisado de caseína, com proteína concentrada de soro e com triptona, mas aumentou consideravelmente

quando o leite foi suplementado com 250 e 500 mg de cisteína/L (de 11-12 h para 18-20 h).

Fonseca *et al.* (2000) estudaram a atividade acidificante de culturas láticas, usando o tempo para atingir $V_{\max}$ ($t_{V\max}$) como parâmetro. Comparando duas diferentes cepas de *S. thermophilus* (ST) e uma de *Lb. bulgaricus* (LB) verificaram que ST tem maior atividade acidificante que LB.

Oliveira & Damin (2002) estudaram o efeito do aumento do teor de sólidos (de 12,3 para 14,7%) nos parâmetros cinéticos de quatro diferentes leites fermentados por culturas mistas de *S. thermophilus* (ST), *Lb. bulgaricus* (LB), *Lb. acidophilus* (LA) e *L. rhamnosus* (LR). Observaram que na primeira fase da fermentação o tipo de leite (diferentes teores de sólidos) afeta $V_{\max}$ e $t_{V\max}$. O aumento do teor de sólidos aumenta a atividade acidificante para as três co-culturas.

Oliveira *et al.* (2001) observaram um efeito significativo da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, com proteínas do leite e com soro em pó, sobre a taxa de acidificação do leite fermentado por culturas puras (LA e LR) e mistas (STLA e STLR). A atividade acidificante aumentou significativamente para o leite suplementado com hidrolisado de caseína. As maiores taxas de acidificação ($V_{\max}$) foram obtidas em leites fermentados por STLR e STLA, $20,7$ e $20,3 \times 10^{-3}$ upH/min, respectivamente. A menor taxa de acidificação ($7,2 \times 10^{-3}$ upH/min) para as culturas mistas STLA e STLR foram encontradas quando o leite foi suplementado com soro de leite doce. A composição da cultura também teve efeito significativo sobre a acidificação.

Sodini *et al.* (2002) estudaram o efeito da suplementação do leite com dois tipos de proteínas concentradas de leite (PC1 e PC2), dois hidrolisados de caseína (HC1 e HC2) e com leite em pó desnatado, sobre a taxa de acidificação de leites fermentados por culturas puras e mistas de *S. thermophilus* (ST), *Lb. acidophilus* (LA), *Lb. rhamnosus* (LR) e *Lb. bulgaricus* (LB). Leite sem suplementação foi utilizado como controle. Os resultados

mostram que para a cultura pura LR cresceu lentamente (23,5 h em média), independente da suplementação do leite, e que a cultura pura de *S. thermophilus* apresentou o maior estímulo com a suplementação do leite. O leite suplementado com hidrolisado de caseína HC2 apresentou o menor tempo de fermentação para as culturas puras ST, LA e LB.

A cultura lática empregada teve grande influência na taxa de acidificação. As co-culturas STLA e STLR foram fortemente influenciadas pela suplementação do leite, sendo que o maior efeito foi obtido com o HC2. Enquanto que, com as co-culturas STLALB e STLRLB, o efeito da suplementação não foi tão importante (Sodini *et al.*, 2002).

Shihata & Shah (2002) adicionaram cepas proteolíticas de *Lb. bulgaricus* a iogurte com culturas probióticas comerciais contendo *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *S. thermophilus* (ABT). O tempo de fermentação com duas cepas diferentes, ABT1 e ABT2, foi de 10 h e 7min e de 6 h, respectivamente. A adição de *Lb. bulgaricus* (LB 2501) resultou nos menores tempos de fermentação, de 5 h e 33 min e 5 h e 8 min para ABT1e ABT2, respectivamente. A adição de *Lb. bulgaricus* proteolítico ajudou a reduzir o tempo de fermentação por liberar peptídeos e aminoácidos necessários às culturas menos proteolíticas. No estudo destes autores o tempo mínimo de fermentação é superior ao mínimo obtido no presente estudo.

Tabela 7: Valores médios* dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por *Lb. bulgaricus* + *S. thermophilus* (STLB)

Ensaio	X ₁	X ₂	t _{Vmax} (h)	V _{max} (10-3upH/min)	t _{pH 5,0} (h)	t _{pH 4,5} (h)
Controle	#	#	4	11,4	5,4	8,2
1	-1,00	-1,00	3,4	16,7	4,5	6,2
2	-1,00	1,00	3,4	17,2	4,5	6,4
3	1,00	-1,00	4,3	17,1	5,5	7,7
4	1,00	1,00	4,1	18,8	5,3	7,5
5	0,00	0,00	3,5	17,6	4,6	6,5
6	0,00	0,00	3,5	17,9	4,6	6,4
7	0,00	0,00	3,3	19,2	4,5	6,5
8	1,41	0,00	4,1	17,6	5,7	7,9
9	-1,41	0,00	2,7	14,3	3,6	5,5
10	0,00	1,41	1,5	17,2	2,8	5,0
11	0,00	-1,41	1,5	16,8	2,7	4,6
12	0,00	0,00	3,3	18,5	4,5	6,4

* média de duas determinações

Tabela 8: Valores médios* dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por *Lb. acidophilus* + *S. thermophilus* (STLA)

Ensaio	X ₁	X ₂	t _{vmax} (h)	V _{max} (10-3upH/min)	t _{pH 6,0} (h)	t _{pH 4,5} (h)
Controle	#	#	3,9	11,3	5,6	10,1
1	-1,00	-1,00	3,5	15,3	4,5	6,9
2	-1,00	1,00	3,4	17,1	4,6	6,9
3	1,00	-1,00	4,3	17,0	5,4	10,2
4	1,00	1,00	3,6	17,7	4,7	6,5
5	0,00	0,00	2,4	19,4	3,5	5,6
6	0,00	0,00	2,4	18,2	3,5	5,5
7	0,00	0,00	3,4	18,6	4,5	6,8
8	1,41	0,00	4,4	17,1	5,6	10,4
9	-1,41	0,00	2,3	13,7	3,5	5,6
10	0,00	1,41	1,4	17,3	2,8	4,9
11	0,00	-1,41	1,5	16,8	2,5	4,5
12	0,00	0,00	3,3	18,9	4,5	6,8

*média de duas determinações

Tabela 9: Valores médios* dos parâmetros cinéticos de leites fermentados por *Lb. rhamnosus* + *S. thermophilus* (STLR)

Ensaio	X1	X2	t _{vmax} (h)	V _{max} (10 ⁻³ upH/min)	t _{pH 5,0} (h)	t _{pH 4,5} (h)
Controle	#	#	4,0	11,6	5,6	10,4
1	-1,00	-1,00	3,4	16,9	4,6	6,8
2	-1,00	1,00	3,4	15,9	4,7	6,9
3	1,00	-1,00	4,1	16,5	5,5	10,1
4	1,00	1,00	2,3	17,8	3,5	6,0
5	0,00	0,00	3,4	17,3	4,6	6,5
6	0,00	0,00	3,5	16,8	4,6	6,7
7	0,00	0,00	3,3	19,0	4,6	7,7
8	1,41	0,00	4,3	17,2	5,7	10,4
9	-1,41	0,00	2,3	13,7	3,5	5,6
10	0,00	1,41	1,4	17,4	2,7	4,6
11	0,00	-1,41	1,4	17,9	2,5	4,5
12	0,00	0,00	3,3	19,0	4,6	7,5

*média de duas determinações

5.4. Caracterização dos parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (STLB), *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus* (STLA), e *S. thermophilus* e *Lb. rhmanosus* (STLR)

A qualidade e aceitação do iogurte ou leite fermentado está relacionada com aroma, sabor, consistência, sinérese e aparência.

Os resultados referentes ao efeito da suplementação do leite e da composição das culturas nos parâmetros físico-químicos após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C estão resumidos nas Tabelas 10, 11 e 12.

Para os leites suplementados fermentados com STLB (Tabela 10) a firmeza após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 28,45 a 46,45 gf e 29,60 a 47,05 gf, respectivamente. O pH após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 4,01 a 4,34 e de 3,67 a 4,24, respectivamente. A acidez após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 1,106 a 1,464 ácido láctico % e de 1,097 a 1,557 ácido láctico%, respectivamente.

Para os leites suplementados fermentados com STLA (Tabela 11) a firmeza após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 26,65 a 38,25 gf e de 27,90 a 42,40 gf, respectivamente. O pH após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 3,99 a 4,28 e de 3,53 a 4,23, respectivamente. A acidez após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 1,055 a 1,532 ácido láctico % e de 1,080 a 1,469 ácido láctico%, respectivamente.

Para os leites suplementados fermentados com STLR (Tabela 12) a firmeza após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 27,00 a 42,90 gf e de 26,85 a 43,25 gf, respectivamente. O pH após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 4,01 a 4,31 e de 3,57 a 4,32, respectivamente. A acidez após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 1,106 a 1,356 ácido láctico % e de 1,075 a 1,471 ácido láctico%, respectivamente.

O maior valor de firmeza geral após 1 dia (D1) foi encontrado em leite fermentado por STLB, 46,45 gf para o ensaio 3. O mesmo se repetiu para 7 dias (D7), com 47,05 gf. O menor valor de firmeza foi apresentado em leite fermentado por STLA, 26,65 gf para o ensaio 4.

O maior valor de firmeza encontrado em leites fermentados por STLB (46,45 gf) e STLR (42,90 gf) corresponde a acidificação mais lenta, maior $t_{V_{max}}$ e maior $t_{pH4,5}$. Em um estudo realizado por Beal *et al.* (1999) foi encontrado maior valor de viscosidade correlacionado a maior $t_{V_{max}}$, indicando que o tempo de fermentação afeta o desenvolvimento de textura.

Salji & Ismail (1983) estudaram a relação entre a acidez inicial do iogurte e as mudanças durante a estocagem a 4 e 7°C por três semanas. Concluíram que a maior queda de pH ocorre após 7 dias e que iogurte com maior pH inicial apresentou maior queda durante o período (4,59 a 4,15).

Penna *et al.* (1994) encontram pH de 3,80 a 4,16 em amostras comerciais de iogurte natural firme.

Moreira *et al.* (1999) analisaram quatro marcas diferentes de iogurte, com e sem adição de polpa de fruta, e encontraram valores de pH nas amostras entre 3,76 e 4,39.

Segundo Gardini *et al.* (1999), a queda de pH após a fermentação é influenciada pelo teor de sólidos totais, pelo teor de gordura e pelo tamanho do inóculo. O aumento do teor de sólidos induz a maior queda de pH durante a estocagem. Encontraram o valor de 13% de sólidos como ponto ótimo para minimizar a queda de pH.

Martin (2002) encontrou valores de pH entre 4,18 e 4,36, em amostras de iogurte natural integral armazenadas entre 3 e 5 °C, por 30 dias consecutivos.

Um estudo realizado por nossa equipe do Laboratório de Leite do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Faculdade de

Ciências Farmacêuticas da USP - avaliou a firmeza e pH de iogurtes comerciais, sendo três naturais e um adoçado. A firmeza foi analisada pelo texturômetro TAXT2 e variou de 31,9 a 78,9 gf, sendo que o valor máximo correspondeu ao iogurte adoçado, adicionado de goma. O pH das amostras variou de 4,10 a 3,37.

Dave & Shah (1998b) investigaram o efeito da adição de cisteína (em três concentrações), de soro de leite em pó (WP), de dois tipos de proteína concentrada de soro (WPC1 e WPC2), de hidrolisado ácido de caseína (ACH) e de triptona nas propriedades de textura do iogurte. O iogurte enriquecido com WPC1 foi significativamente mais firme que os demais, e o enriquecido com WP foi o menos firme. Houve aumento significativo da viscosidade durante a estocagem refrigerada por 30 dias. A maior concentração de cisteína resultou em uma rede de proteínas irregular que afetou a firmeza e viscosidade do iogurte. A medida de firmeza foi feita com penetrômetro cônico (Stanhope-Seta).

Domínguez-Soberanes *et al.* (2001) estudaram o efeito de culturas de *Lb. bulgaricus* produtora de exopolissacarídeos e não produtora, e do enriquecimento do leite com substrato protéico nas características de textura de iogurtes firme e batido, usando o texturômetro TA.XT2. Concluíram que a análise das características de textura pode ser utilizada para a avaliação do efeito de substratos em leites fermentados.

Oliveira *et al.* (2001) estudaram o efeito do enriquecimento do leite e da composição das culturas sobre a firmeza de leites fermentados após 1 e 7 dias de armazenamento a 4°C. Concluíram que a composição das culturas usadas não afeta significativamente a firmeza do produto, mas a suplementação do leite tem efeito significativo. A firmeza foi analisada pelo texturômetro TA.XT2, através de compressão simples e expressa pela força máxima de penetração. A firmeza das amostras no D1 variou de 12,1 a 20,5 gf; de 45,9 a 62,2 gf; e de 70,8 a 85,9 gf, segundo a suplementação do leite

com soro de leite em pó, com hidrolisado de caseína e com proteínas do leite, respectivamente.

Shihata & Shah (2002) mediram a firmeza de iogurte usando um penetrômetro cônico (Stanhope-Seta Ltd.), medindo a profundidade de penetração em milímetros, após 5 segundos de movimento. O iogurte firme foi produzido com culturas probióticas comerciais ABT (*Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*) e cepas de *Lb. bulgaricus* produtoras de exopolissacarídeos. A adição de LB aumentou significativamente ($p \leq 0,001$) a firmeza em relação ao produto só com cultura ABT.

O estudo realizado por Bhullar *et al.* (2002) avaliou o efeito da suplementação do leite com soro em pó (13,5% proteínas), leite desnatado em pó (35% proteínas) e proteína concentrada de soro (83% proteínas), nas características de textura e microestrutura do iogurte, comparado a um controle sem suplementação. O iogurte suplementado com a proteína concentrada de soro foi o mais firme e a análise de microestrutura mostrou a rede protéica mais densa e regular. Embora todos os suplementos apresentassem efeito significativo na firmeza, o soro de leite e leite desnatado em pó se mostraram equivalentes. A medida de firmeza foi feita com penetrômetro cônico (Stanhope-Seta).

Jaros *et al.* (2002) estudaram a influência do teor de sólidos de 10, 12 e 14% sobre as propriedades físicas do iogurte firme. Encontraram maior firmeza e menor sinérese para os produtos em função do aumento do teor de sólidos.

Tabela 10: Valores médios* dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por *Lb. bulgaricus* + *S. thermophilus* (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	pH - D1	pH - D7	Acidez D1 (% ac.lático)	Acidez D7 (% ac.lático)	Firmeza-D1 (gf)	Firmeza-D7 (gf)
1	-1,00	-1,00	4,11	3,69	1,124	1,097	37,70	45,50
2	-1,00	1,00	4,08	3,91	1,106	1,155	37,30	38,50
3	1,00	-1,00	4,07	3,80	1,249	1,321	46,45	47,05
4	1,00	1,00	4,05	3,90	1,464	1,325	33,15	43,25
5	0,00	0,00	4,34	4,24	1,352	1,357	28,45	34,60
6	0,00	0,00	4,33	4,16	1,342	1,352	29,90	35,40
7	0,00	0,00	4,25	4,18	1,254	1,309	31,30	29,60
8	1,41	0,00	4,05	3,83	1,272	1,557	42,95	42,55
9	-1,41	0,00	4,01	3,67	1,110	1,060	35,05	39,15
10	0,00	1,41	4,13	3,81	1,230	1,256	32,05	32,85
11	0,00	-1,41	4,07	3,73	1,190	1,200	33,05	35,15
12	0,00	0,00	4,21	4,16	1,279	1,304	31,10	31,45

*média de duas determinações

Tabela 11: Valores médios* dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por *Lb. acidophilus* + *S. thermophilus* (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	pH - D1	pH - D7	Acidez D1 (% ac.lático)	Acidez D7 (% ac.lático)	Firmeza-D1 (gf)	Firmeza-D7 (gf)
1	-1,00	-1,00	4,04	3,93	1,102	1,115	38,25	42,40
2	-1,00	1,00	4,12	3,96	1,115	1,155	34,95	33,85
3	1,00	-1,00	4,08	3,80	1,209	1,281	36,35	40,60
4	1,00	1,00	4,10	4,19	1,532	1,469	36,50	37,75
5	0,00	0,00	4,14	4,06	1,372	1,406	28,70	27,85
6	0,00	0,00	4,13	3,75	1,352	1,446	26,65	27,90
7	0,00	0,00	4,25	4,22	1,239	1,254	29,70	28,75
8	1,41	0,00	4,13	3,89	1,218	1,471	36,35	33,75
9	-1,41	0,00	3,99	3,53	1,055	1,080	35,80	37,20
10	0,00	1,41	4,10	3,80	1,220	1,261	32,85	32,75
11	0,00	-1,41	4,09	3,80	1,100	1,205	30,35	35,60
12	0,00	0,00	4,28	4,23	1,234	1,249	28,80	29,70

*média de duas determinações

Tabela 12: Valores médios* dos parâmetros físico-químicos de leites fermentados por *Lb. rhamnosus* + *S. thermophilus* (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	pH - D1	pH - D7	Acidez D1 (% ac.lático)	Acidez D7 (% ac.lático)	Firmeza-D1 (gf)	Firmeza-D7 (gf)
1	-1,00	-1,00	4,08	3,93	1,106	1,075	38,95	39,45
2	-1,00	1,00	4,12	3,96	1,137	1,142	39,65	33,95
3	1,00	-1,00	4,08	3,79	1,200	1,276	42,90	43,25
4	1,00	1,00	4,01	4,09	1,356	1,341	30,10	29,30
5	0,00	0,00	4,28	4,32	1,312	1,372	35,60	34,40
6	0,00	0,00	4,31	4,28	1,332	1,471	34,70	32,05
7	0,00	0,00	4,25	4,25	1,244	1,309	29,75	27,90
8	1,41	0,00	4,15	3,92	1,231	1,477	35,75	37,40
9	-1,41	0,00	4,02	3,57	1,120	1,105	34,55	38,80
10	0,00	1,41	4,05	3,74	1,220	1,251	29,95	32,05
11	0,00	-1,41	4,15	3,87	1,115	1,195	31,10	37,95
12	0,00	0,00	4,27	4,27	1,233	1,249	27,00	26,85

*média de duas determinações

5.5 Caracterização dos parâmetros microbiológicos dos leites fermentados por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (STLB), *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus* (STLA), e *S. thermophilus* e *Lb. rhamnosus* (STLR)

Os resultados referentes ao efeito da suplementação do leite e da composição das culturas nos parâmetros microbiológicos após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C estão resumidos nas Tabelas 13, 14 e 15.

Para os leites suplementados fermentados com STLB (Tabela 13) a contagem de *Lb. bulgaricus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 6,81 a 9,66 log UFC/mL e de 6,85 a 9,48 log UFC/mL, respectivamente. A contagem de *S. thermophilus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 8,21 a 9,71 log UFC/mL e de 9,13 a 10,41 log UFC/mL, respectivamente.

Para os leites suplementados fermentados com STLA (Tabela 14) a contagem de *Lb. acidophilus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 8,18 a 10,18 log UFC/mL e de 6,78 a 9,19 log UFC/mL, respectivamente. A contagem de *S. thermophilus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 9,24 a 9,83 log UFC/mL e de 9,19 a 9,74 log UFC/mL, respectivamente.

Para os leites suplementados fermentados com STLR (Tabela 15) a contagem de *Lb. rhamnosus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 8,07 a 9,43 log UFC/mL e de 7,28 a 9,29 log UFC/mL, respectivamente. A contagem de *S. thermophilus* após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) variou de 9,31 a 9,71 log UFC/mL e de 9,35 a 9,86 log UFC/mL, respectivamente.

O número de bactérias probióticas ficou acima do mínimo recomendado para a obtenção de efeito terapêutico (Rybka & Kailasapathy, 1995; Kailasapathy & Rybka, 1997; Dave & Shah, 1997b).

O número de *Lb. bulgaricus* e de *Lb. acidophilus* apresentou queda superior a um ciclo logarítmico após uma semana (D7) em dois ensaios

cada, enquanto *Lb. rhamnosus* não apresentou a mesma queda. Este resultado inicial está de acordo a maior estabilidade de *Lb. rhamnosus* em comparação a *Lb. acidophilus* em leites fermentados observada por Nighswonger *et al.* (1996), Oliveira *et al.* (2001) e Sodini *et al.* (2002).

A contagem de *S. thermophilus* em geral foi maior que a dos lactobacilos e se mantém constante após 7 dias (D7). Moreira *et al.* (1999), que examinaram iogurtes comerciais de quatro diferentes marcas, encontraram proporção de 1:2 de *Lb. bulgaricus* em relação a *S. thermophilus* em 80% das amostras.

Um estudo realizado pelo Laboratório de Leite do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP avaliou iogurtes comerciais em sua fase final de vida-de-prateleira, onde o número de *S. thermophilus* esteve acima de 8,59 log UFC/mL e *Lb. bulgaricus* variou de 4,3 a 5,67 log UFC/mL, abaixo do valor exigido pela legislação (Brasil, 2000).

Rybka & Fleet (1997) examinaram quinze iogurtes e leites fermentados de 16 fabricantes australianos. As populações viáveis de *Lb. bulgaricus* e *S. thermophilus* excederam 10^7 UFC/mL em 54% e 68% das amostras, respectivamente. Iogurtes naturais, iogurtes adicionados de frutas e iogurtes de baixo conteúdo de gordura de quatro marcas comerciais australianas fabricadas com *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium spp.*, foram estudados durante a vida-de-prateleira a 4 e a 10°C. Os autores concluíram que o produto mantém as bactérias viáveis até seis semanas de armazenamento a 4°C. A temperatura de 10°C teve pequena influência sobre as culturas. A presença de gordura não mostrou afetar a viabilidade.

Estudo de Dave & Shah (1997b) também mostra a influência das espécies e das cepas associadas sobre o aumento do número de bactérias probióticas durante a produção e sua viabilidade durante a vida-de-prateleira. *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* se multiplicaram

consideravelmente e *S. thermophilus* manteve a viabilidade, mas *Lb. bulgaricus* rapidamente apresentou perda. As bactérias probióticas tiveram a multiplicação e a viabilidade afetadas pelas culturas associadas. Na presença de *Lb. bulgaricus* o número de *Lb. acidophilus* decresceu rapidamente, provavelmente devido à produção de peróxido de hidrogênio por *Lb. bulgaricus*.

Em outro estudo, Dave & Shah (1997a) avaliaram o efeito da suplementação do leite com cisteína (0, 50, 250 e 500mg/L) na viabilidade das bactérias do iogurte e das probióticas *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium*. A concentração de 50 mg/L reduziu o tempo de fermentação e favoreceu o crescimento das bactérias do iogurte, mas acima deste valor inibiu o crescimento de *S. thermophilus*, aumentando o tempo de fermentação. A contagem de *Lb. acidophilus* foi maior durante a produção e estocagem do iogurte suplementado com 250 mg/L de cisteína.

Diferente do resultado obtido por Dave & Shah (1997b), Shihata & Shah (2002) concluíram que a viabilidade de bactérias probióticas de culturas comerciais compostas de *S. thermophilus*, *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium* (ABT) foi melhor quando fermentados em associação com cultura *starter* adicionada de *Lb. bulgaricus*.

Tabela 13: Contagem média* de microorganismos viáveis em leites fermentados por *Lb. bulgaricus* + *S. thermophilus* (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	LB - D1 (log UFC/mL)	LB - D7 (log UFC/mL)	ST - D1 (log UFC/mL)	ST - D7 (log UFC/mL)
1	-1,00	-1,00	7,86	8,15	8,21	9,67
2	-1,00	1,00	8,20	8,48	9,61	10,41
3	1,00	-1,00	9,66	8,51	9,61	9,61
4	1,00	1,00	8,32	8,65	9,42	9,69
5	0,00	0,00	8,60	7,38	9,71	9,13
6	0,00	0,00	8,60	7,38	9,71	9,13
7	0,00	0,00	7,08	7,02	9,56	9,27
8	1,41	0,00	8,69	8,66	9,36	9,62
9	-1,41	0,00	7,70	9,48	9,68	9,98
10	0,00	1,41	7,06	7,08	9,55	9,40
11	0,00	-1,41	7,11	6,85	9,49	9,34
12	0,00	0,00	6,81	6,90	9,55	9,36

*média de duas determinações

Tabela 14: Contagem média* de microorganismos viáveis em leites fermentados por *Lb. acidophilus* + *S. thermophilus* (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	LA - D1 (log UFC/mL)	LA - D7 (log UFC/mL)	ST - D1 (log UFC/mL)	ST - D7 (log UFC/mL)
1	-1,00	-1,00	9,24	9,02	9,59	9,56
2	-1,00	1,00	9,34	9,06	9,63	9,54
3	1,00	-1,00	8,18	7,86	9,60	9,37
4	1,00	1,00	8,65	8,62	9,39	9,46
5	0,00	0,00	9,48	9,19	9,41	9,42
6	0,00	0,00	9,78	8,90	9,83	9,20
7	0,00	0,00	8,95	8,81	9,24	9,19
8	1,41	0,00	8,48	6,78	9,71	9,74
9	-1,41	0,00	9,06	9,17	9,60	9,54
10	0,00	1,41	10,18	8,78	9,43	9,61
11	0,00	-1,41	9,22	9,08	9,48	9,48
12	0,00	0,00	9,02	9,08	9,36	9,41

*média de duas determinações

Tabela 15: Contagem média* de microorganismos viáveis em leites fermentados por *Lb. rhamnosus* + *S. thermophilus* (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C

Ensaio	X ₁	X ₂	LR - D1 (log UFC/mL)	LR - D7 (log UFC/mL)	ST - D1 (log UFC/mL)	ST - D7 (log UFC/mL)
1	-1,00	-1,00	9,39	8,77	9,59	9,62
2	-1,00	1,00	9,43	9,00	9,71	9,60
3	1,00	-1,00	8,09	7,28	9,44	9,68
4	1,00	1,00	8,70	8,31	9,67	9,47
5	0,00	0,00	9,08	9,24	9,31	9,53
6	0,00	0,00	9,08	9,24	9,31	9,53
7	0,00	0,00	9,20	9,04	9,39	9,35
8	1,41	0,00	8,07	8,41	9,45	9,86
9	-1,41	0,00	9,07	8,90	9,54	9,38
10	0,00	1,41	9,08	9,29	9,44	9,57
11	0,00	-1,41	9,36	8,84	9,70	9,74
12	0,00	0,00	9,16	8,93	9,39	9,32

*média de duas determinações

5.6. Análise dos resultados e determinação de modelos preditivos para as variáveis dependentes

Com os resultados dos experimentos realizados (Tabelas 7 a 15) foi possível obter modelos preditivos para diferentes variáveis dependentes utilizando-se o programa Statistica 6.0, Statsoft.

Os modelos preditivos com ajuste estatístico significativo obtidos para as variáveis dependentes foram utilizados para determinar o efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, através da construção de superfícies de resposta e linhas de contorno.

Os coeficientes dos polinômios e coeficientes de determinação obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, físico-químicos e microbiológicos dos leites fermentados após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C podem ser observados nas Tabelas 16, 17 e 18. Os demais modelos que não mostraram ajuste estatístico significativo ($p \geq 0,05$) não são apresentados.

Tabela 16: Valores dos coeficientes dos polinômios e coeficientes de determinação obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, físico-químicos e microbiológicos dos leites fermentados com *Lb. bulgaricus* + *S. thermophilus* (STLB) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C. Resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

	Modelo	b_0	b_1	b_{11}	b_2	b_{22}	b_{12}	R^2
$V_{\max}$	$\hat{Y}_1$	18,297*	0,834*	-0,933*	0,347	-0,405	0,300	0,732
Firmeza D1	$\hat{Y}_2$	30,179*	1,973*	5,152*	-1,895*	1,907*	-3,225*	0,858
pH D1	$\hat{Y}_3$	4,283*	-0,002	-0,124*	0,004	-0,088*	0,003	0,882
pH D7	$\hat{Y}_4$	4,185*	0,408	-0,202*	0,054*	-0,192	0,030	0,956
Acidez D1	$\hat{Y}_5$	1,307*	0,892*	-0,049	0,032	-0,040	0,058	0,843
Acidez D7	$\hat{Y}_6$	1,331*	0,137*	-0,022	0,018	-0,063*	-0,014	0,908
LB D7	$\hat{Y}_7$	7,169*	-0,079	1,062*	0,010	0,004	-0,048	0,894

* Coeficientes significativos ($p \leq 0,05$)

$b_0, b_1, b_2, \dots$: coeficientes estimados pela técnica de mínimos quadrados

Tabela 17: Valores dos coeficientes dos polinômios e coeficientes de determinação obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, físico-químicos e microbiológicos dos leites fermentados com *Lb. bulgaricus* + *S. thermophilus* (STLA) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C. Resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

	Modelo	b ₀	b ₁	b ₁₁	b ₂	b ₂₂	b ₁₂	R ²
V _{max}	Ŷ ₈	18,773*	0,889*	-1,555*	0,402	-0,725*	-0,275	0,904
t _{pH4,5}	Ŷ ₉	6,171*	1,212*	1,240*	-0,393	-0,420	-0,925	0,764
Firmeza D1	Ŷ ₁₀	28,455*	0,055	4,498*	0,046	2,247*	0,860	0,853
Acidez D1	Ŷ ₁₁	1,301*	0,095*	-0,060	0,063	-0,048	0,078	0,767
LA D1	Ŷ ₁₂	9,309*	-0,322	-0,376	0,241	0,101	0,093	0,717

* Coeficientes significativos ($p \leq 0,05$)

b₀, b₁, b₂, ...: coeficientes estimados pela técnica de mínimos quadrados

Tabela 18: Valores dos coeficientes dos polinômios e coeficientes de determinação obtidos por regressão múltipla dos parâmetros cinéticos, físico-químicos e microbiológicos dos leites fermentados com *Lb. rhamnosus* + *S. thermophilus* (STLR) após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C. Resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$)

	Modelo	b_0	b_1	b_{11}	b_2	b_{22}	b_{12}	R^2
$V_{\max}$	$\hat{Y}_{13}$	18,024*	0,807	-1,236	-0,124	-0,129	0,575	0,743
$t_{pH4,5}$	$\hat{Y}_{14}$	7,096*	1,149*	0,751	-0,484	-0,984	-1,050	0,775
pH D1	$\hat{Y}_{15}$	4,278*	0,009	-0,102*	-0,021	-0,094*	-0,028	0,880
Firmeza D1	$\hat{Y}_{16}$	30,300*	-0,354	3,898*	-3,481*	2,339	-2,113	0,812
Acidez D1	$\hat{Y}_{17}$	1,280*	0,059*	-0,045*	0,042*	-0,049*	0,031	0,852

* Coeficientes significativos ($p \leq 0,05$)

$b_0, b_1, b_2, \dots$: coeficientes estimados pela técnica de mínimos quadrados

5.7. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus* (STLB)

Após simplificar as equações da Tabela 16, foram obtidos os seguintes modelos ajustados e significativos estatisticamente ($p \leq 0,05$):

$V_{\max}$

Para resposta velocidade máxima de acidificação, $V_{\max}$, o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 71,10\%$.

$$\hat{Y}_1 = 18,297 + 0,834 X_1 - 0,933 X_1^2 + 0,347 X_2 - 0,404 X_2^2$$

$$(\pm 0,423) \quad (\pm 0,300) \quad (\pm 0,336) \quad (\pm 0,300) \quad (\pm 0,336) \quad (*)$$

(*) erro padrão dos coeficientes

O modelo ajustado apresentou dependência das duas variáveis independentes, mas não há interação significativa entre estas variáveis. O efeito do HC é maior que o efeito da PCS sobre a velocidade de acidificação. Nos gráficos de superfície de resposta pode-se observar que o valor máximo de $V_{\max}$ é obtido para HC entre 0,25 (11,25g/L) e 0,7 (13,5g/L) e PCS entre 0,1 (10,5g/L) e 0,8 (14g/L).

A superfície de resposta correspondente e linhas de contorno estão representadas nas figuras 12 e 13.

Figura 12: Superfície de resposta para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLB a 42°C

Figura 13: Linhas de contorno para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLB a 42°C

Firmeza

Para a resposta firmeza o modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 85,81\%$.

$$\hat{Y}_2 = 30,179 + 1,973X_1 + 5,151X_1^2 - 1,894X_2 + 1,907X_2^2 - 3,225X_1X_2$$

$(\pm 0,656) \quad (\pm 0,465) \quad (\pm 0,521) \quad (\pm 0,465) \quad (\pm 0,404) \quad (\pm 0,656)$

O modelo ajustado apresentou dependência de todas as variáveis. A firmeza dos leites fermentados é mínima (30 gf) para HC entre -0,2 (9g/L) e 0,2 (11g/L) e PCS entre 0,0 (10g/L) e 0,9 (14,5g/L). A maior firmeza (55 gf) foi obtida para HC acima de 1,0 (15g/L) e PCS abaixo de -0,5 (6,5g/L), independente da concentração de PCS. Essa alta firmeza coincide parcialmente com a tendência de queda de $V_{\max}$ apresentada nas figuras 12 e 13. Onde a velocidade máxima de acidificação decresce e a fermentação é mais lenta, resultando em maior firmeza.

A superfície de resposta e linhas de contorno estão representadas nas figuras 14 e 15.

Figura 14: Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLb a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 15: Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

pH D1

Para pH após 1 dia (D1) de armazenamento o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 88,22$.

$$\hat{Y}_3 = 4,282 - 0,002X_1 - 0,124X_1^2 + 0,004X_2 - 0,088X_2^2$$

$(\pm 0,024)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,019)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,019)$

O máximo valor de pH dos leites fermentados por STLB é obtido quando HC e PCS estão próximos ao ponto médio da concentração de ambos.

A superfície de resposta correspondente a pH D1 e as linhas de contorno estão representadas nas figura 16 e 17.

Figura 16: Superfície de resposta para pH de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 17: Linhas de contorno para pH de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

pH D7

Para a resposta pH após 7 dias (D7) de armazenamento o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 94,85\%$.

$$\hat{Y}_4 = 4,185 + 0,041X_1 - 0,202X_1^2 + 0,054X_2 - 0,192X_2^2$$

$(\pm 0,029)$ $(\pm 0,021)$ $(\pm 0,023)$ $(\pm 0,021)$ $(\pm 0,023)$

A curva apresenta a mesma dependência de fatores de pH D1.

Acidez

Para a resposta acidez após 1 dia (D1) de armazenamento o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 76,39\%$.

$$\hat{Y}_5 = 1,275 + 0,089X_1 - 0,041X_1^2 + 0,032X_2 + 0,058X_1X_2$$

$(\pm 0,019)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,019)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,024)$

A acidez aumenta com o aumento das concentrações de HC e PCS. Essa curva confirma que a acidez é influenciada pelo aumento da adição de sólidos de leite.

A superfície de resposta correspondente e as linhas de contorno estão representadas nas figuras 18 e 19.

Figura 18: Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLb a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Figura 19: Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLB a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Número de *Lb. bulgaricus* D7

Para a resposta número de *Lb. bulgaricus* (logUFC/mL) após 7 dias (D7) de armazenamento o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 88,33\%$.

$$\hat{Y}_7 = 7,1721 - 0,079X_1 + 1,062X_1^2$$

(±0,129) (±0,117) (±0,129)

O número de *Lb. bulgaricus* depende da concentração de HC. A concentração de PCS não influencia o número de *Lb. bulgaricus*. A concentração central de HC resultou em menor número de microorganismos.

A superfície de resposta correspondente ao número de *Lb. bulgaricus* e as linhas de contorno correspondentes estão representadas nas figuras 20 e 21.

Figura 20: Superfície de resposta para log do número de *Lb. bulgaricus* de leites fermentados por STLB a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C

Figura 21: Linhas de contorno para log do número de *Lb. bulgaricus* de leites fermentados por STLB a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C

5.8. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus* (STLA)

Após simplificar as equações da Tabela 17, foram obtidos os seguintes modelos ajustados e significativos estatisticamente ($p \leq 0,05$):

$V_{\max}$

Para a resposta velocidade máxima de acidificação, $V_{\max}$, o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 89,26\%$.

$$\hat{Y}_8 = 18,773 + 0,889X_1 - 1,555X_1^2 + 0,402X_2 - 0,725X_2^2$$

$$(\pm 0,321) \quad (\pm 0,228) \quad (\pm 0,255) \quad (\pm 0,2228) \quad (\pm 0,255) \quad (*)$$

(*) erro padrão dos coeficientes

O valor máximo de $V_{\max}$ é obtido para HC entre 0 e 0,6 aproximadamente (10 e 13 g/L) e PCS entre -0,4 e 0,4 (8 a 12g/L). A influência de HC é maior que PCS. Como observado em leite fermentado por STLB, aqui também se observa uma queda de $V_{\max}$ para HC próximo a 1,4 (17,05g/L), indicando um efeito negativo da maior concentração de HC sobre a velocidade de acidificação por cultura STLA.

Os leites fermentados por STLA obtidos por Oliveira *et al.* (2001) apresentaram $V_{\max} = 20,3 \times 10^{-3}$ upH/min, quando o leite foi suplementado com hidrolisado de caseína (20g/L).

A superfície de resposta correspondente e linhas de contorno estão representadas nas figuras 22 e 23.

Figura 22: Superfície de resposta para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLA a 42°C

Figura 23: Linhas de contorno para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLA a 42°C

$t_{pH4,5}$

Para a resposta tempo para atingir pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 76,41\%$.

$$\hat{Y}_9 = 6,171 + 1,212X_1 + 1,240X_1^2 - 0,393X_2 - 0,420X_2^2 - 0,925X_1X_2$$

$(\pm 0,611) \quad (\pm 0,433) \quad (\pm 0,485) \quad (\pm 0,433) \quad (\pm 0,485) \quad (\pm 0,611)$

O tempo para atingir o pH 4,5 aumenta para HC acima de 1,0 (15g/L). O aumento de HC para a concentração máxima tem efeito negativo sobre o tempo de fermentação, elevando este tempo, o que indica um possível efeito inibitório sobre o metabolismo das bactérias.

A superfície de resposta e as linhas de contorno correspondentes estão apresentadas nas figuras 24 e 25.

Figura 24: Superfície de resposta para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLA a 42°C

Figura 25: Linhas de contorno para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLA a 42°C

Firmeza D1

Para a resposta firmeza o modelo simplificado apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 83,59\%$.

$$\hat{Y}_{10} = 28,455 + 0,055X_1 + 4,498X_1^2 + 0,046X_2 + 2,247X_2^2$$

$(\pm 0,645) \quad (\pm 0,457) \quad (\pm 0,512) \quad (\pm 0,457) \quad (\pm 0,512)$

O modelo depende de HC e PCS. A firmeza é mínima para o ponto central das concentrações de HC e PCS. Porém, baixas concentrações ou aumento dos dois suplementos aumentam a firmeza. Como visto na figura 24, a concentração de HC acima de 1,0 (15g/L) tem efeito negativo acentuado sobre o tempo de fermentação, mas há aumento da firmeza. A fermentação mais lenta resulta em maior firmeza do leite fermentado para as concentrações estudadas de HC e PCS.

A superfície de resposta correspondente e linhas de contorno estão representadas nas figuras 26 e 27.

Figura 26: Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 27: Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Acidez D1

Para a resposta acidez após 1 dia (D1) de armazenamento o modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 76,74\%$.

$$\hat{Y}_{11} = 1,302 + 0,095 X_1 - 0,060 X_1^2 + 0,063 X_2 - 0,048 X_2^2 + 0,078 X_1 X_2$$

$(\pm 0,448) \quad (\pm 0,317) \quad (\pm 0,355) \quad (\pm 0,317) \quad (\pm 0,355) \quad (\pm 0,448)$

Analisando-se o modelo observa-se que há interação entre as variáveis independentes. O efeito conjunto da concentração de sólidos aumenta a acidez do leite fermentado.

A superfície de resposta correspondente e linhas de contorno estão representadas nas figuras 28 e 29.

Figura 28: Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 29: Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Número de *Lb. acidophilus*

Para a resposta número de *Lb. acidophilus* (log UFC/mL) após 1 dia (D1) de armazenamento o modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 71,69\%$.

$$\hat{Y}_{12} = 9,309 - 0,322 X_1 - 0,367 X_1^2 + 0,241 X_2 + 0,101 X_2^2 + 0,093 X_1 X_2$$

$(\pm 0,197)$ $(\pm 0,139)$ $(\pm 0,156)$ $(\pm 0,139)$ $(\pm 0,156)$ $(\pm 0,197)$

O modelo obtido mostra que o número de *Lb. acidophilus* é influenciado por HC e PCS, além de ocorrer interação entre essas variáveis. O número de *Lb. acidophilus* decresce com o aumento da concentração de HC acima de 0 (10g/L), quando a concentração de PCS é inferior a 1,0 (15g/l).

A superfície de resposta correspondente e linhas de contorno estão representadas nas figuras 30 e 31.

Figura 30: Superfície de resposta para número de *Lb. acidophilus* de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 31: Linhas de contorno para número de *Lb. acidophilus* de leites fermentados por STLA a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

5.9. Influência da suplementação do leite com hidrolisado de caseína (HC) e proteína concentrada de soro (PCS) para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. rhamnosus* (STLR)

Após simplificar as equações da Tabela 18, foram obtidos os seguintes modelos ajustados e significativos estatisticamente ($p \leq 0,05$):

$V_{\max}$

Para a resposta velocidade de acidificação, $V_{\max}$, o modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 74,25\%$.

$$\hat{Y}_{13} = 18,024 + 0,807X_1 - 1,236X_1^2 - 0,051X_2 - 0,129X_2^2 + 0,575X_1X_2$$

$$(\pm 0,486) \quad (\pm 0,344) \quad (\pm 0,385) \quad (\pm 0,344) \quad (\pm 0,385) \quad (\pm 0,485) \quad (*)$$

(*) erro padrão dos coeficientes

O modelo ajustado apresentou dependência das duas variáveis, ocorrendo interação entre essas variáveis, mas o efeito de HC é mais acentuado. O maior valor de $V_{\max}$ é obtido para HC acima entre 0,4 até 0,8 (12 até 14 g/L) e PCS entre 0,7 e 1,4 (13,5 e 17,0g/L) A superfície de resposta correspondente e as respectivas linhas de contorno estão apresentadas nas figuras 32 e 33.

Figura 32: Superfície de resposta para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLR a 42°C

Figura 33: Linhas de contorno para $V_{\max}$ de leites fermentados por STLR a 42°C

$t_{pH4,5}$

O modelo apresentou o falta de ajuste não significativa e $R^2 = 77,52\%$ para a resposta tempo para atingir pH 4,5 ($t_{pH4,5}$).

$$\hat{Y}_{14} = 7,096 + 1,149X_1 + 0,751X_1^2 - 0,484X_2 - 0,984X_2^2 - 1,050X_1X_2$$

$(\pm 0,590) \quad (\pm 0,418) \quad (\pm 0,469) \quad (\pm 0,418) \quad (\pm 0,469) \quad (\pm 0,591)$

O menor tempo para atingir o pH 4,5 é obtido para HC entre $-1,0$ e $0,0$ (5 e 10g/L) e PCS entre $0,1$ e $0,5$ (10,5 e 12,5g/L). O aumento da concentração de HC acima de $1,0$ (15g/L) e PCS abaixo de $0,7$ (13,5g/L) resulta em aumento do tempo de fermentação. O mesmo efeito foi observado para a cultura STLA, indicando um possível efeito inibitório sobre o metabolismo das bactérias.

A superfície de resposta e o gráfico de linhas de contorno correspondentes estão apresentadas nas figuras 34 e 35.

Figura 34: Superfície de resposta para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLR a 42°C , após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 35: linhas de contorno para $t_{pH4,5}$ de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

pH D1

Para a resposta pH após 1dia (D1) de armazenamento o modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 85,51\%$.

$$\hat{Y}_{15} = 4,278 + 0,009X_1 - 0,102X_1^2 - 0,021X_2 - 0,094X_2^2$$

$(\pm 0,013)$ $(\pm 0,009)$ $(\pm 0,010)$ $(\pm 0,009)$ $(\pm 0,010)$

O máximo valor de pH dos leites fermentados por STLB é obtido quando HC e CPS estão próximos ao ponto médio da concentração de ambos.

A superfície de resposta e as linhas de contorno correspondentes estão apresentadas nas figura 36 e 37.

Figura 36: Superfície de resposta para pH de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Figura 37: Linhas de contorno para pH de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C.

Firmeza D7

O modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 76,40\%$ para a resposta firmeza após 7 dias (D) de armazenamento.

$$\hat{Y}_{16} = 30,800 - 0,354 X_1 + 3,647 X_1^2 - 3,481 X_2 - 2,088 X_2^2$$

$(\pm 0,1,493)$ $(\pm 1,057)$ $(\pm 0,1,185)$ $(\pm 1,057)$ $(\pm 0,1,185)$

A firmeza mínima foi obtida para HC entre $-0,5$ e $0,5$ (7,5 e 12,5 g/L) e PCS entre 0 e 1,4 (10 e 17,05).

A superfície de resposta e as linhas de contorno correspondentes estão apresentadas nas figuras 38 e 39.

Figura 38: Superfície de resposta para firmeza de leites fermentados por STLR a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C

Figura 39: Linhas de contorno para firmeza de leites fermentados por STLR a 42°C, após 7 dias de armazenamento a 4°C

Acidez D1

O modelo apresentou falta de ajuste não significativa e $R^2 = 80,39\%$ para a resposta acidez, após 1 dia (D1) de armazenamento.

$$\hat{Y}_{17} = 1,280 + 0,589X_1 - 0,045X_1^2 + 0,042X_2 - 0,049X_2^2$$

$(\pm 0,024)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,019)$ $(\pm 0,017)$ $(\pm 0,019)$

A acidez aumenta com o aumento da concentração de sólidos adicionados na suplementação. A equação simplificada mostra maior efeito do HC e não apresenta efeito de interação entre os ingredientes.

A superfície de resposta e as linhas de contorno correspondentes estão apresentadas nas figuras 40 e 41.

Figura 40: Superfície de resposta para acidez de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

Figura 41: Linhas de contorno para acidez de leites fermentados por STLR a 42°C, após 1 dia de armazenamento a 4°C

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho permitiram concluir que:

- Os leites fermentados suplementados com hidrolisado de caseína e com proteína concentrada de soro mostraram firmeza (26,9 a 47,1gf), pH (3,53 a 4,34) e acidez (1,1 a 1,6%ác.lático) similares a iogurtes naturais comerciais.
- A suplementação do leite com hidrolisado de caseína e com proteína concentrada de soro afeta a acidificação do leite por *S. thermophilus* em co-cultura com *Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus* e *Lb. rhamnosus*.
- O tempo de fermentação em relação ao controle sem suplementação foi reduzido em até:
 - ✓ De 8,1 a 4,6 horas para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*;
 - ✓ De 10,1 a 4,5 horas para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus*;
 - ✓ De 10,4 a 4,5 horas para leite fermentado por *S. thermophilus* e *Lb. rhamnosus*.
- Em todos os ensaios o nível de probióticos esteve acima daquele recomendado pela literatura e os leites fermentados podem ser utilizados na formulação de bebidas lácteas probióticas.
- O presente trabalho pode ser utilizado para determinar concentrações otimizadas de hidrolisado de caseína e proteína concentrada de soro na obtenção de leites fermentados por *S. thermophilus* e *Lb. bulgaricus*, por *S. thermophilus* e *Lb. acidophilus*, e por *S. thermophilus* e *Lb. rhamnosus*, através da metodologia de superfície de resposta.

7. SUGESTÕES

- Otimizar a suplementação do leite com hidrolisado de caseína e proteína concentrada de soro com base nos resultados de $V_{\max}$ e $t_{\text{pH4,5}}$.
- Estudar a vida-de-prateleira de leite fermentado obtido no ponto ótimo até 35 dias, avaliando suas características físico-químicas e microbiológicas.
- Utilizar o leite fermentado obtido no ponto ótimo para a produção de bebidas lácteas probióticas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDOHOLM, T.; VON WRIGTH, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption, **Appl. Environ. Microbiol.**, Baltimore, v.65, p.351-354, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis**. 13.ed. Washington: AOAC, 1980. 858p.
- BÉAL, C.; DESCHAMPS, N.; JUILLARD, V.; ROISSART, H.; RICHARD, J.; SARAUX, B. Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. In: ROISSART, H., LUQUET, F.M. **Bactéries lactiques**. Loriga: Chemin de Saint Georges, 1994. v.1, p.367-401.
- BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.82, p.673-681, 1999.
- BHULLAR, Y.S.; UDDIN, M.A.; SHAH, N.P. Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. **Milchwissenschaft**, Muenchen, v.57, n.6, p.328-332, 2002.
- BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite Deriv.**, São Paulo, v.4, p.24-38, 1995.

- BRASIL. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. A Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal determina a entrada em vigor dos “padrões de identidade e qualidade de leites fermentados”. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.1, ano XLII, 2 jan. 2001. Seção I, p.19-22. [Republicado nesta data por ter saído com incorreção no original, DOU de 27/11/00. Seção I, p.9-12].
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**. New York: Wiley, 1978. 653p.
- BOX, G.E.P.; DRAPER, N.R. **Empirical model building and response surface**. New York: Wiley, 1987. 669p.
- BUTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **Int. J. Dairy Technol.**, Long Hanborough, v.50, n.1, p.21-28, 1997.
- CASE, R.A.; BRADLEY JR., R.L.; WILLIAMS, R.R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 18.ed. Washington, 1992. p.327-404.
- CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.11, p.254-262, 2000.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.8, p.487-490, 1998.
- CORRIEU, G.; SPINLER, H.E.; PICQUE, D.; JOMIER, Y. Procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en œuvre. Institut National de la Recherche Agronomique, FR 8814456, 1988.

- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.7, p.537-545, 1997a.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starters cultures. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.7, p.31-41, 1997b.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. **J Dairy Sci.**, Lancaster, v.81, p.2804-2816, 1998a.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.53, p.180-184, 1998b.
- DE LA FUENTE, M.A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Process-induced changes in whey proteins during manufacture of whey protein concentrates. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.12, p.361-369, 2002.
- DELLAGLIO, F.; ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSEN, D. Caractéristique générales des bactéries lactiques. *In*: Roissart, H.; Luquet, F.M. **Bactéries lactiques**. Lorica : Chemin de Saint Georges, v.1, 1994. p. 25-116.
- DOMÍNGUEZ-SOBERANES, J.; GARCÍA-GARIBAY, M.; CASAS-ALENCÁSTER, N.B.; MARTÍNEZ-PADILLA, L.P. Instrumental texture of set and stirred fermented milk. Effect of ropy strain of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and enriched substrate. **J. Texture Stud.**, Trumbull, v.32, p.205-217, 2001.
- DU PLESSIS, E.M.; DICKS, L.M.T.; VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; DELLAGLIO, F. *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review. **Ann. Microbiol. Enzimol.**, Milano, v.46, p.319-340, 1996.

- FERREIRA, C.L.L. **Produtos láteos fermentados**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. 2.ed. Viçosa: UFV, 2001. 112p.
- FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: UFV, 2003. p.7-33.
- FONSECA, F.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Method of quantifying the loss activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. **J. Dairy Res.**, London, v.67, p.83-90, 2000.
- FOSCHINO, R.; FIORI, E.; GALLI, A. Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. **J. Dairy Res.**, London, v.63, p.295-303, 1996.
- FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478p.
- FRIEDMAN, H.H.; WHITNEY, J.E.; SZCZESNIAK, A.S. The texturometer: a new instrument for objective texture measurements. **J. Food Sci.**, Chicago, v.28, p.390-396, 1963.
- FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R. **Probiotics**: the scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992. cap.1, p.1-8.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.
- GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.9, p.125-134, 1999.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.60, p.1395-1398, 1977.

- GILLILAND, S.E. Probiotics and prebiotics. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied dairy microbiology**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2001. cap.10, p.327-343.
- GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. **Brit. J. Nutr.**, Cambridge, v.80, suppl.2., S203-S207, 1998.
- GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.39, p.756-761, 1984.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* ssp and *Lactobacillus acidophillus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.10, p139-157, 1999.
- GURGEL, A. Mercado de iogurtes. **Ind. Laticínios**, São Paulo, n.44, p.18-28, 2003.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.41, p.85-101, 1998.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.73, p.365S-373S, 2001.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.109-116, 2002.
- JAROS, D.; ROHM, H.; HAQUE, A.; BONAPARTE, C.; KNEIFEL, W. Influence of the starter culture on the starter culture on the relationship between dry matter content and physical properties of set-style yogurt. **Milchwissenschaft**, Muenchen, v.57, n.6, p.325-328, 2002.

- JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products, In: MAZZA, G. **Functional foods biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic, 1998. cap.11, p.357-380.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yogurt. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.52, p.28-35, 1997.
- KLAVER, F.A.M.; KINGMAN, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Neth. Milk Dairy J.**, Meppel, v.47, p.151-164, 1993.
- KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.50, p.45-57, 1999.
- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Milchwissenschaft**, Muenchen, v.51, n.8, p.446-451, 1996.
- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. **Food Aust.**, Sydney, v.48, n.3, p.113-118, 1996.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748 *apud* HOLZAPFEL, W.H.; SCHLLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.109-116, 2002.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.11, p.1-17, 2001.
- MARSHALL, V.M.; TAMIME, Y.A. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. **Int. J. Dairy Technol.**, Long Hanborough, v.50, n.1, p.35-41, 1997.

- MARTIN, AF. **Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas**. Piracicaba, 2002. 50p. Dissertação de Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims: interactions and interference with gastrointestinal flora. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.9, p.25-35, 1999.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Probiotic functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. **Functional foods-concept to product**. Boca Raton: CRC, 2000. cap.12, p.287-312.
- MILLER, G.D.; JARVIS, J.K.; McBEAN, L.D. **Handbook of dairy foods and nutrition**. 2.ed. Boca Raton: CRC, 2000. 423p.
- MOREIRA, S.R.; SCHWAN, R.F.; CARVALHO, E.P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras – MG, **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.1, p.147-152, 1999.
- MUIR, D.D.; TAMIME, A.Y. Liquid milk. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A. **Mechanization and automation in dairy technology**. Reading: Sheffield Academic, 2001. cap.3, p.53-94.
- NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. cap.17, p.341-462.
- NIGHSWONGER, B.D.; BRASHEARS, M.M.; GILLILAND, S.E. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.79, p.212-219, 1996.
- NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 2.ed. São Paulo: IAL, 1976. 371p.

- O'NEIL, J.M.; KLEIN, D.H.; HARE, L.B. Consistency and compositional characteristics of commercial yogurts. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.62, n.6, p.1032-1036, 1979.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.11, n.11/12, p.935-942, 2001.
- OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, na firmeza e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre:SBCTA, 2002. CD-ROM
- PENNA, A.L.B.; BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da qualidade de iogurtes. **Leite Deriv.**, São Paulo, n.16, p.13-19, 1994.
- PENNA, A.L.B.; BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Optimization of yoghurt production using demineralized whey. **J. Food Sci.**, Chicago, v.62, p.846-850, 1997.
- PONS, N.; FISZMAN, S.M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. **J. Texture Stud.**, Trumbull, v.27, p.597-624, 1996.
- RATTRAY, W.; JELEN, P. Protein standardization of milk and dairy products. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.7, p.227-234, 1996.
- REUTER, G.; KLEIN, G.; GOLDBERG, M. Identification of probiotic cultures in food samples. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, p.117-124, 2002.

- RICHARDSON, D. Probiotics and product innovation. **Nutr. Food Sci.**, London, n.4, p.27-33, 1996.
- ROBERFROID, M.B. Defining functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. **Functional foods-concept to product**. Boca Raton: CRC, 2000. cap.1, p.9-27.
- ROSENBERG, M. Current and future applications for membrane processes in the dairy industry. **Trends Food Sci. Technol.**, Cambridge, v.61, p.12-19, 1995.
- RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Aust.**, Sydney, v.49, n.10, p.471-475, 1997.
- RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yogurts. **Aust. J. Dairy Technol.**, Melbourne, v.50, p.51-57, 1995.
- SALJI, J.P.; ISMAIL, A.A. Effect of initial acidity of plain yogurt on acidity changes during refrigerated storage. **J. Food Sci.**, Chicago, v.48, p.258-259, 1983.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.8, p.563-572, 1998.
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt culture on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **J. Soc. Dairy Technol.**, London, v.42, n.2, p.58-60, 1994.
- SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.47, p.79-87, 1999.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, p.894-907, 2000.

- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* in yogurt. **Int Dairy J.**, Oxford, v.7, p.349-356, 1997.
- SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **Int. Dairy J.**, Oxford, v.12, p.765-772, 2002
- SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M.N.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.85, p.2479-2488, 2002.
- SOUZA, G. Fatores de qualidade do iogurte. **Colet. Inst. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n.1, p.20-27, 1991.
- SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. **J. Dairy Res.**, London, v.56, p.755-764, 1989.
- SPREER, E.; MIXA, A. **Milk and dairy product technology**. New York: Marcel Dekker, 1998. 483p.
- STAFF, M.C. Cultured milk and fresh cheese. In: EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2.ed. London: Blackie Academic, 1998. cap.4, p.123-157.
- STANLEY, G. Microbiology of fermented milk products. In: EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2.ed. London: Blackie Academic, 1998. cap.2, p.50-80.
- SZCZESNIAK, A.S. Classification of textural characteristics. **J. Food Sci.**, Chicago, v.28, p.385-389, 1963.

- SZCZESNIAK, A.S. Texture measurements. **Food Technol.**, Chicago, p.1292-1298, oct., 1966.
- SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling: historical and scientific perspectives. **Food Technol.**, Chicago, v.52, n.8, p.54-57, 1998.
- TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt: science and technology**. 2.ed. Boca Raton: CRC, 1999. 368p.
- TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K.; LATRILLE, E. Yoghurt and other fermented milks. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A. **Mechanization and automation in dairy technology**. Reading: Sheffield Academic, 2001. cap.6, p.152-203.
- VAN DER HORST, H.C. Membrane processing. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A. **Mechanization and automation in dairy technology**. Reading: Sheffield Academic, 2001. cap.11, p.296-317.
- VAN DER VEN, C.; MURESAN, S.; GRUPPEN, H.; DE BONT, D.B.A.; MERCK, K.B.; VORAGEN, A.G.J. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.50, p.6943-6950, 2002.
- VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.33, p.97-102, 2000a.
- VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean fresco cheese. **J. Dairy Sci.**, Lancaster, v.83, p.1905-1911, 2000b.
- WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; BOEKEL, M.A.J.S. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**. New York: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WSZOLCK, M.; TAMIME, Y.A.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensm.-Wiss. -Technol.**, London, v.34, p.251-261, 2001.