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

Avaliação do efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*

Maria Regina Damin

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2008

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013688

Ficha Catalográfica

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

Damin, Maria Regina
D159a Avaliação do efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* / Maria Regina Damin. -- São Paulo, 2008.
128p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador: Oliveira, Maricê Nogueira de

1. Alimentos: Processamento: Tecnologia 2. Iogurte 3. Alimentos funcionais : Ciência dos alimentos I. T. II. Oliveira, Maricê Nogueira, orientador.

664 CDD

Maria Regina Damin

Avaliação do efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira
orientador/presidente

1º. Ana Lucia Barreto Penna

2º. Walkiria Hanada Viotto

3º. Carmen Cecilia Tadini

4º. Inar Alves de Castro

São Paulo, 04 de setembro de 2008.

Ao meu marido, Rubens,
aos meus filhos, Leonardo e Flora
e à minha mãe,
por seu amor. Por me apoiarem
no caminho que escolhi e
valorizarem quem eu sou.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. 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 Danisco pelo fornecimento das culturas lácticas.

À ISP do Brasil pelo fornecimento da proteína concentrada de soro.

À bibliotecária Leila Bonadio, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas.

Aos professores do Curso de Doutorado, por seus ensinamentos.

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

À Eimy Minowa, pelo auxílio durante os experimentos.

Ao Alexandre Mariani, pelo auxílio durante as análises

Aos colegas e amigos, pelo auxílio e apoio.

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

AB	Cultura de <i>L. acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium</i> spp
ABC	Cultura de <i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp. e <i>L. casei</i>
ABT	Cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ssp. e <i>Streptococcus thermophilus</i>
BL	<i>Bifidobacterium lactis</i>
°C	Graus Celsius
CINAC	Cinétique d'acidification
CONT	Bioiogurte controle não suplementado
d1, d7, d14, 21, d28	dias de armazenamento
EPS	exopolissacarídeos
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization</i>
IDF	International Dairy Federation
ILSI	International Life Sciences Institute
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
HC	Hidrolisado de caseína
HPH	High Pressure Homogenisation
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LAB	lactic acid bacteria
LAOT	Bioiogurte suplementado no ponto ótimo definido pela MRS
LB	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
LPD	Leite em pó desnatado
LR	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta

PCS	Proteína concentrada de soro
ST	<i>Streptococcus thermophilus</i>
t	tempo
$t_{v_{\max}}$	Tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação
$t_{pH4,5}$	Tempo para atingir pH 4,5 = tempo de fermentação
$t_{pH5,0}$	Tempo para atingir pH 5,0
TPA	Texture profile analysis
$V_{\max}$	Velocidade máxima de acidificação
ufc/mL	Unidades formadoras de colônias por mililitro
UHT	Ultra high temperature
upH/min	Unidades de pH por minuto
$V_{\max}$	Velocidade máxima de acidificação
τ	Tensão de cisalhamento
γ	Deformação
$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento
λ	tempo característico do material

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1: Efeito do crescimento associativo de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> durante o processo de fermentação do leite	8
Figura 2: Representação esquemática das micelas de caseína	10
Figura 3: Representação esquemática do sistema CINAC	22
Figura 4: Representação das forças envolvidas no fluxo laminar entre superfícies paralelas de área A: a placa superior move-se a uma velocidade v ; h é a distância entre as placas; o comprimento das setas é proporcional à velocidade local. A aplicação de tensão de cisalhamento ($\tau = F/A$) resulta em gradiente de velocidade entre as camadas do fluido, que é a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma} = dv/dh$)	34
Figura 5: Diagramas de curvas de fluxo (a), viscosidade (b) e fluxo com e sem tensão limite (c), para os diferentes tipos de fluido: 1. newtoniano; 2. pseudoplástico; 3. dilatante; 4. pseudoplástico sem limite de escoamento; 5. pseudoplástico com limite de escoamento	34
Figura 6: Curvas de nível e superfície de resposta para um modelo quadrático preditivo para todas as possíveis misturas dos componentes X_1 , X_2 e X_3 em um experimento de mistura, obtidas utilizando o programa Statistica	40
Figura 7: Diagrama de blocos da obtenção de bioiogurtes	46
Figura 8: Delineamento experimental tipo <i>centróide simplex</i> usado no estudo do efeito simultâneo da suplementação com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado em bioiogurte. X_1 : hidrolisado de caseína (HC); X_2 : proteína concentrada de soro (PCS); X_3 : leite em pó desnatado (LPD)	49
Figura 9: Sistema Cinac: banho termostatizado contendo os frascos com a mistura da base láctea. Os eletrodos são conectados à interface com o computador	51
Figura 10: Quebra do coágulo (a) e seladora (b) usada para selagem das tampas dos potes plásticos	51

Figura 11:	Exemplo de curvas de diminuição de pH e velocidade de acidificação (dpH/dt) de leite fermentado por co-cultura de <i>S. thermophilus</i> com <i>L. bulgaricus</i> , com <i>L. acidophilus</i> , e com <i>B. lactis</i>	53
Figura 12:	Detalhe do <i>probe</i> e da embalagem do bioiogurte imediatamente antes da realização do ensaio e curva típica obtida em teste TPA, usando analisador de textura TA-XT2, no qual a firmeza corresponde à altura do primeiro pico	55
Figura 13:	Exemplo de curva obtida em ensaio de determinação de limite de escoamento do bioiogurte, em reômetro MCR 300	56
Figura 14:	Exemplo de curvas obtidas para dois produtos diferentes em ensaios de varredura de amplitude do bioiogurte, em reômetro MCR 300	56
Figura 15:	Exemplo de curva obtida em ensaio de recuperação estrutural do bioiogurte, em reômetro MCR 300	57
Figura 16:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para t_{Vmax} , para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	76
Figura 17:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH5,0}$, para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	76
Figura 18:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $pHd1$, para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	77
Figura 19:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	77
Figura 20:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH5,0}$, para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	80

Figura 21:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH4,5}$ para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	80
Figura 22:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	81
Figura 23:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para t_{Vmax} para bioiogurte fermentado por STBL, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	84
Figura 24:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para BL (contagem de <i>B. lactis</i> viáveis em d1) para bioiogurte fermentado por STLB, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	84
Figura 25:	Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a firmeza, para bioiogurte fermentado por STBL, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	85
Figura 26:	Diagramas para valores preditivos, desejabilidade das variáveis otimizadas e desejabilidade global através da otimização de Derringer-Suich para as variáveis resposta $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$ de bioiogurte fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> , onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente	91
Figura 27:	Curvas de queda de pH para as culturas puras de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> em leite controle (▪ ST-LO, ▪ ST-CO) e leite suplementado no ponto ótimo (▪ LA-LO, ▪ LA-CO)	95
Figura 28:	Curvas de velocidade de acidificação (dpH/dt versus tempo) para as culturas puras de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> em leite controle (▪ ST-LO, ▪ ST-CO) e leite suplementado no ponto ótimo (▪ LA-LO, ▪ LA-CO)	95

Figura 29:	Valores médios (n=4) de tempos para se atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e do controle (CONT) fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	97
Figura 30:	Valores médios (n=4) de velocidades máximas de acidificação (V_{max}) e de tempos para se atingir velocidades máximas de acidificação (t_{Vmax}) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e do controle (CONT) fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	97
Figura 31:	Contagens de <i>L. acidophilus</i> obtidas para leite suplementado no ponto ótimo (LAOT) e para o controle (CONT), armazenados a 4–6°C, para leite fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	99
Figura 32:	Valores médios (n=3) de pH, obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	102
Figura 33:	Valores médios (n=5) de firmeza, obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	103
Figura 34:	Valores médios (n=4) de tensão limite (<i>Yield stress</i>) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	106
Figura 35:	Valores médios (n=2) de módulo de armazenamento (G') obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4-6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	107
Figura 36:	Valores médios (n=2) de módulo de perda (G'') obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4-6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	107

Figura 37:	Valores médios (n=2) de percentual de recuperação obtidos dos ensaios de tixotropia para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> . Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)	109
Figura 38:	Imagem obtida através de microscopia eletrônica de varredura de bioiogurte controle (CONT) fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	111
Figura 39:	Imagem binária obtida através do programa <i>Image Pro Plus</i> , da micrografia de bioiogurte controle (CONT) fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	111
Figura 40:	Imagem obtida através de microscopia eletrônica de varredura de bioiogurte fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> , suplementado no ponto ótimo (LAOT)	112
Figura 41:	Imagem binária obtida através do programa <i>Image Pro Plus</i> , da micrografia de bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	112
Figura 42:	Distribuição do diâmetro médio de poros, obtida para as micrografias das amostras de bioiogurte controle (CONT) e bioiogurte fermentado suplementado no ponto ótimo (LAOT), usando o programa <i>Image Pro Plus</i>	113

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1: Exemplos dos principais microorganismos considerados probióticos	11
Tabela 2: Composição da formulação básica dos bioiogurtes	47
Tabela 3: Delineamento experimental tipo <i>centróide simplex</i> para otimização da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado para a produção de bioiogurtes	48
Tabela 4: Valores médios* $\pm$ DP da composição de proteína e sólidos totais das misturas correspondentes aos ensaios 1 a 7 do delineamento experimental e controle	60
Tabela 5: Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por <i>S. thermophilus</i> em co-cultura com <i>L. bulgaricus</i> (STLB), de acordo com o delineamento experimental e controle	63
Tabela 6: Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por <i>S. thermophilus</i> em co-cultura com <i>L. acidophilus</i> (STLA), de acordo com o delineamento experimental e controle	64
Tabela 7: Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por <i>S. thermophilus</i> em co-cultura com <i>B. lactis</i> (STBL), de acordo com o delineamento experimental e controle	65
Tabela 8: Valores médios* $\pm$ DP de respostas para pH e firmeza de bioiogurtes fermentados por <i>S. thermophilus</i> em co-cultura com <i>L. bulgaricus</i> (STLB), <i>L. acidophilus</i> (STLA) e <i>B. lactis</i> (STBL) após 24h (d1) de armazenamento a 4°C, de acordo com o delineamento experimental e controle	69
Tabela 9: Populações de microrganismos expressa em média* $\pm$ DP, obtidas no inóculo imediatamente após a inoculação e na base láctea a ser fermentada (tempo zero), a 42°C	71
Tabela 10: Valores médios* $\pm$ DP de respostas para contagens de microrganismos viáveis em bioiogurtes fermentados por <i>S. thermophilus</i> em co-cultura com <i>L. bulgaricus</i> (STLB), <i>L. acidophilus</i> (STLA) e <i>B. lactis</i> (STBL), de acordo com o delineamento experimental e controle, armazenados por 24 h (d1) a 4°C	72

Tabela 11:	Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, no tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação (t_{Vmax}), no tempo para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), no pHd1 e na diferença de tempo entre pH 5,0 e 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), em bioiogurte fermentado pela co-cultura <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> (STLB)	75
Tabela 12:	Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, nos tempos para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) e na diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), em bioiogurte fermentado pela co-cultura <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> (STLA)	79
Tabela 13:	Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, no tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação (t_{Vmax}), na contagem de <i>B. lactis</i> e na firmeza, em bioiogurte fermentado pela co-cultura <i>S. thermophilus</i> e <i>B. lactis</i> (STBL)	83
Tabela 14:	Resultados de análise de variância (ANOVA) bifatorial para V_{max} , t_{Vmax} , $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$, contagem de ST, pH e firmeza em função do suplemento e da cultura utilizada	87
Tabela 15:	Teste de contrastes pareada Tukey HDS para V_{max} , t_{Vmax} , $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$, contagem de ST, pH e firmeza em função do suplemento utilizado	88
Tabela 16:	Valores atribuídos aos parâmetros $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$ para o procedimento de otimização através da função de desejabilidade, usando o <i>software</i> Statistica 6.0 (Statsoft), para a co-cultura STLA	90
Tabela 17:	Composição de ingredientes nas misturas usadas para os ensaios de validação dos modelos para a co-cultura STLA, valores observados, valores estimados, significância da probabilidade e erro percentual relativo entre observado e estimado, para as respostas $t_{pH4,5}$ e $t_{pH5,0}$	92
Tabela 18:	Tempos médios* para se atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) para as culturas puras e co-cultura de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> , no leite controle e no leite suplementado no ponto ótimo	96

SUMÁRIO

página

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS	3
2.1.1 Produtos lácteos funcionais	3
2.2. IOGURTE E LEITES FERMENTADOS	5
2.2.1. Definição e legislação	5
2.2.2. Bactérias lácticas	6
2.2.3. Proteínas do leite e formação do gel	9
2.2.4. Bactérias probióticas	10
2.2.5. Efeitos benéficos dos probióticos	14
2.2.6. Desafios tecnológicos	16
2.2.7. Cinética de acidificação	19
2.3. PROCESSAMENTO DE IOGURTE E LEITES FERMENTADOS	24
2.3.1. Homogeneização do leite	25
2.3.2. Tratamento térmico do leite	25
2.3.3. Composição da base láctea	26

2.4. INDICADORES DE QUALIDADE	30
2.4.1. Atributos físicos: textura e microestrutura	30
2.4.1.1. Textura	30
2.4.1.2. Microestrutura	36
2.4.2. Microbiologia	37
2.5. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E OTIMIZAÇÃO	39
3. OBJETIVOS	45
3.1. Objetivos específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	46
4.1.2. Obtenção do leite fermentado contendo probióticos	46
4.1.3. Ingredientes, preparo da mistura e delineamento experimental	47
4.1.4. Bioiogurte otimizado	49
4.1.5. Culturas lácticas	50
4.1.6. Preparo do inóculo	50
4.1.7. Fermentação	50
4.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	52
4.3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	53
4.3.1. Sólidos totais	53
4.3.2. Valor de pH	53
4.3.3. Proteínas	54
4.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	54
4.5. DETERMINAÇÃO DA FIRMEZA	55
4.6. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA	56
4.7. DETERMINAÇÃO DE MICROESTRUTURA	57
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. Determinações das concentrações de proteína e sólidos totais das misturas	60
5.2. Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado em bioiogurtes fermentados por co-culturas de <i>S. thermophilus</i> com <i>L. bulgaricus</i> , com <i>L. acidophilus</i> e com <i>B. lactis</i>	62
5.2.1. Parâmetros cinéticos	62
5.2.2. Parâmetros físico-químicos	67
5.2.3. Populações de microorganismos	71
5.3. Estimativa dos modelos polinomiais preditivos	74
5.3.1. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STLB	75
5.3.2. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STLA	79
5.3.3. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STBL	83
5.4. Análise comparativa do efeito da suplementação e da cultura nos parâmetros de cinética de acidificação, na contagem de <i>S. thermophilus</i> e nos parâmetros físico-químicos	86
5.5. Otimização da suplementação do leite através da MSR	89
5.5.1. Ensaios de validação do modelo	92
5.6. Cinética de acidificação do leite controle e do suplementado no ponto ótimo para leite fermentado por <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> em culturas puras e em co-cultura	93
5.7. Estudo de estabilidade ao armazenamento do bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo, fermentados por co-cultura de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i>	98
5.7.1. Contagens de microorganismos	98
5.7.2. pH e pós-acidificação	101
5.7.3. Firmeza	102
5.7.4. Determinações reológicas	104
5.7.5. Estudo exploratório por microscopia eletrônica de varredura	109

6. CONCLUSÕES	114
7. SUGESTÕES	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117

RESUMO

As bactérias probióticas crescem lentamente em leite e a suplementação é um dos fatores que melhoram seu crescimento na produção de iogurtes funcionais ou bioiogurtes, além da aplicação em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito simultâneo da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-culturas com *Streptococcus thermophilus*. A metodologia de superfície de resposta com delineamento de mistura foi empregada e diferentes composições de misturas de suplementação otimizadas foram obtidas para as diferentes co-culturas. Foi possível avaliar o efeito da suplementação simultânea do enriquecimento do leite com os três ingredientes estudados, identificar interação ocorrida entre os ingredientes e obter composições de mistura otimizadas. A co-cultura *S. thermophilus* e *L. acidophilus* obteve bons modelos preditivos e falta de ajuste não significativo para os parâmetros cinéticos tempo para se atingir pH 5,0 e 4,5 ($t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$). Ensaio de validação do modelo confirmaram a qualidade do ajuste. A otimização resultou composição de mistura da suplementação do leite com 50% de hidrolisado de caseína, 0% de proteína concentrada de soro e 50% de leite em pó, atende em 95% os critérios de desejabilidade. Os perfis de acidificação de culturas puras e co-culturas de *Streptococcus thermophilus* com *Lactobacillus acidophilus* em leite controle e leite suplementado no ponto ótimo foram estudados, assim como o comportamento dos bioiogurtes, usando-se a co-cultura, durante estudo de estabilidade ao armazenamento. Os parâmetros avaliados foram perda de viabilidade das bactérias, pós-acidificação e propriedades de textura. A microestrutura dos bioiogurtes obtidos com leite controle e suplementado no ponto ótimo foi analisada. Em todos os ensaios os bioiogurtes obtidos puderam ser considerados probióticos, pois as populações foram superiores ao mínimo recomendado para promoção de efeitos benéficos à saúde. O bioiogurte suplementado no ponto ótimo resultou em tempo de fermentação 32% menor em relação ao controle fermentado pela co-cultura de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. A contagem de *S. thermophilus* permaneceu estável e de *L. acidophilus* decresceu durante o período de estudo de estabilidade ao armazenamento, embora as populações tenham sido superiores ao recomendado

para promoção de efeitos benéficos à saúde aos 28 dias de armazenamento. A firmeza, a tensão limite τ_0 , os módulos de armazenamento G' e de perda G'' do leite otimizado foram superiores ao leite controle, enquanto a porcentagem de recuperação estrutural apresentou comportamento oposto. A análise das micrografias do leite ótimo e do controle mostrou maior percentual de poros de menor diâmetro para o primeiro, indicando uma estrutura mais densa.

SUMMARY

The probiotic bacteria develop slowly in milk and for probiotic yogurt production milk supplementation improves bacteria growth. Beyond that, use of probiotic in combination with *Streptococcus thermophilus* is common and recommendable. The aim of this research was to evaluate the simultaneous effect of milk supplementation with casein hydrolysate, whey protein concentrate and skim milk powder in the production of bioyogurt. Milk was fermented by *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in co-cultures with *Streptococcus thermophilus*. The Response Surface Methodology for mixture model was applied and compositions of optimized mixtures for supplementation had been obtained. It was possible to evaluate the effect of the simultaneous supplementation, identify interaction between the ingredients and get optimized compositions of mixture. Mathematical models with lack of fit not significant were obtained and validation experiments confirmed the quality of the adjustment. For co-culture *S. thermophilus* and *L. acidophilus* the models were obtained for kinetic parameters time to reach pH 5,0 and 4,5 ($t_{pH5,0}$ and $t_{pH4,5}$). The optimization resulted in mixture composition with 50% of casein hydrolysate of casein, 0% of whey protein concentrate and 50% of skim milk powder, with fit the desirability in 95%. The acidifying profiles of pure cultures and co-culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* in milk prepared with the optimum ingredients amounts calculated by RSM and control milk were studied. Stability and bacterial viability during 28 days of cold storage for bioyogurts produced with optimum and control milk had been studied, using co-culture of *S. thermophilus* and *L. acidophilus*. The loss of viability of bacteria, post-acidification and texture properties were examined. The microstructure of the two bioyogurts has been analyzed. All produced bioyogurts could have been considered probiotics, as the populations were higher than the minimum recommended one for promotion of beneficial effect to the health. Bioyogurt from milk supplemented at optimum region resulted in 32% of reduction on time necessary to reach pH 4.5, in comparison with that produced from control milk. The *S. thermophilus* counting remained stable, while *L. acidophilus* counts decreased, even so the populations were superior to 1 billion at 28 days of storage. The firmness, yield stress τ_0 , elastic G' and viscous G'' modulus of optimum milk were superior to control milk during the study, while the structural recovery presented

opposite behavior. The analysis of the micrographs of optimum milk and the control showed greater number of pores with small diameter for the former, indicating a denser structure.

1. INTRODUÇÃO

O potencial de vantagens nutricionais oferecidas pelo consumo de alimentos funcionais consiste em efeito preventivo de proteção à saúde, buscando evitar algumas doenças. Hoje se vive mais e melhor devido aos avanços da ciência e do grau de instrução cada vez maior das pessoas sobre as questões da saúde. Os consumidores modernos estão mais interessados em sua saúde e esperam que os alimentos que consomem auxiliem no objetivo de ter uma vida saudável.

Hoje, também, é bem conhecida a importância do equilíbrio da microbiota intestinal no estado de saúde geral das pessoas e esta é uma chave para o desenvolvimento de novos produtos lácteos probióticos, prebióticos e simbióticos. Esses produtos são estimados como responsáveis por 65% do volume de alimentos funcionais comercializados em todo o mundo e acredita-se que esse mercado chegue a US\$ 250 bilhões em 2010, números que indicam que os produtos lácteos funcionais possuem excelente aceitação pelos consumidores. São preferidos como opção para o consumo de probióticos, uma vez que a presença de microrganismos vivos em produtos fermentados é bem aceita.

Dentre os lácteos, os bioiogurtes e leites fermentados são as melhores opções do ponto de vista tecnológico para carrear os probióticos, possuem grande valor nutritivo e são reconhecidos como produtos saudáveis. O consumo desses produtos na forma de bebidas também cresce mais que na forma de produto cremoso para consumir com colher. Iogurtes de baixo teor de gordura ganharam popularidade nos últimos anos devido ao aumento de casos de obesidade nas populações e à conseqüente demanda crescente por produtos de baixa caloria.

Cabe ressaltar que estudos recentes favorecem o conhecimento dos mecanismos pelos quais ocorrem os efeitos benéficos, mas há necessidade de estudos clínicos bem planejados (tipo duplo-cego com placebo) e controlados para comprovação de determinados efeitos na população. Novos métodos de seleção e caracterização de estirpes probióticas recentemente desenvolvidos contribuem para o desenvolvimento desse mercado. As estirpes devem ser selecionadas por sua capacidade de sobreviver ao estresse da passagem pelo trato digestivo, retraindo sua funcionalidade no organismo do hospedeiro. Estudos sobre doses efetivas para a

obtenção de efeitos benéficos específicos das estirpes selecionadas estão entre os desafios para os pesquisadores.

Antes de chegarem ao consumidor, os produtos probióticos devem passar pelo desenvolvimento de processos tecnológicos de produção industrial que favoreçam o crescimento e a manutenção da viabilidade em alto número até o momento do consumo. As bactérias probióticas crescem muito lentamente em leite e estudos mostram que os produtos comerciais nem sempre atendem aos requisitos de número de bactérias viáveis definidos para alcançar os efeitos desejados. O enriquecimento do leite é uma opção para melhorar o crescimento dos probióticos durante a fermentação ou favorecer a manutenção de sua viabilidade no produto. Dentre as alternativas, o fornecimento de proteínas, peptídeos e aminoácidos é a melhor opção para suplementação do leite, embora os estudos publicados não sejam conclusivos quanto à concentração ideal a ser empregada.

Assim, é importante estudar a suplementação do leite visando reduzir o tempo de fermentação de bactérias probióticas e formas de fornecer características organolépticas adequadas ao produto final. Pesquisas empregando mais de um ingrediente simultaneamente permitem otimizar as quantidades individuais de cada um e, quando se aplicam ferramentas estatísticas apropriadas, tornam possível otimizar estas quantidades.

Com a maior expectativa de vida, são grandes os desafios socioeconômicos, com altos custos de programas de saúde e o aumento de enfermidades relacionadas ao consumo de gorduras, como a obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes. Assim, o mercado de alimentos com baixo teor de calorias vem ganhando popularidade e o consumo de iogurtes de baixo teor ou sem gorduras cresce.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Um possível resumo das tendências de desenvolvimento de produtos observadas na indústria de alimentos desde a década de 1970 consistiria em: (i) 1970: produtos para controle do peso; (ii) 1980: vitaminas e complementos minerais; (iii) 1990: produtos *diet* e *light*; (iv) 2000: nutracêuticos e funcionais.

O consumo de alimentos funcionais, que oferecem benefícios à saúde, além do conceito de fornecimento dos nutrientes tradicionais, está se tornando comum. Um alimento pode ser considerado funcional se demonstra satisfatoriamente afetar de modo benéfico uma ou mais funções no organismo, além do efeito nutricional adequado, de forma a afetar positivamente o estado de saúde e/ou reduzir o risco de doenças (SAXELIN; KORPELA; MÄYRÄ-MÄKINEN, 2003; STANTON *et al.*, 2005). Exemplos de alimentos funcionais que conferem efeitos benéficos sobre o sistema gastrointestinal incluem os probióticos, prebióticos e simbióticos. Os probióticos são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos ao hospedeiro (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization*, 2002). Prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam benéficamente o consumidor, por estimular o crescimento ou a atividade de número limitado de bactérias no cólon, melhorando a saúde do hospedeiro. O termo simbiótico é usado quando se refere a um produto que usa probiótico e prebiótico em combinação (ROBERFROID, 1998).

Evidências demonstram que o balanço da microbiota intestinal é necessário à manutenção da saúde e prevenção de doenças (SALMINEN; BOULEY; BOUTRON RUULT, 1998; OUWEHAND *et al.*, 1999).

2.1.1. Produtos lácteos funcionais

Os principais produtos lácteos funcionais são aqueles contendo os probióticos. Dentre estes tem-se:

- (i) leites fermentados com apresentações na forma cremosa, para comer com colher;

- (ii) leites fermentados para beber;
- (iii) leite não-fermentado adicionado de probiótico ou prebiótico;
- (iv) sorvete e sobremesas congeladas;
- (v) queijos;
- (vi) cremes ou margarinas vegetais;
- (vii) produtos desidratados para uso em fórmulas infantis (TAMIME *et al.*, 2005).

Há algum tempo a indústria de alimentos mostra forte tendência na produção de iogurtes e leites fermentados funcionais. Segundo Agrawal (2005), 65% do mercado mundial de alimentos funcionais correspondem a probióticos. De acordo com Playne, Bennett e Smithers (2003), em 2003 o mercado global de produtos lácteos funcionais era estimado em mais de US\$ 5 bilhões, com tendência de crescimento rápido. Em trabalho de Stanton *et al.* (2005), o mercado global de alimentos funcionais (lácteos e outros) indicava participação de mais de US\$ 50 bilhões, sendo que os principais produtos consumidos na Europa, Japão e Austrália eram probióticos, prebióticos e simbióticos.

Os produtos lácteos funcionais possuem excelente aceitação pelos consumidores e grande valor nutritivo, são vistos como produtos saudáveis, e, principalmente, são considerados uma opção preferencial para o consumo de probióticos, uma vez que a presença de microrganismos vivos em produtos fermentados é bem aceita pelo consumidor (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2000; LOURENS-HATTING; VILJEON, 2001; TAMIME *et al.* 2005).

2.2. LEITES FERMENTADOS

A diferença entre leite fermentado e iogurte está nos microrganismos empregados: um iogurte é fermentado apenas por *duas culturas específicas*, enquanto que com a adição de uma bactéria probiótica para a fermentação o produto é chamado de leite fermentado ou de bioiogurte. O termo leite fermentado, usado na legislação e literatura, se refere a um produto similar ao iogurte em suas características de sabor, de textura e de aspecto, mas também é usado para um leite fermentado apresentado na forma totalmente líquida. Portanto, no presente trabalho, o termo bioiogurte foi usado para identificar os leites fermentados probióticos.

Acompanhando a demanda por produtos alimentícios de baixa caloria o mercado dos iogurtes e leites fermentados com baixo teor ou sem gordura tem apresentado crescimento. Este mercado caracteriza-se pelos alimentos *low carb* (baixo teor de carboidratos), *low fat* ou *fat free* (baixo teor ou sem gordura). Nesse sentido, a produção de iogurtes com baixo teor ou sem gorduras vem ganhando popularidade e aumentando a demanda de consumidores preocupados com a saúde, o que exige cuidadosos estudos das propriedades de textura (HAQUE; JI, 2003).

2.2.1. Definição e legislação

A produção de iogurte se dá pela fermentação do leite por *Streptococcus ssp. thermophilus* e *Lactobacillus delbruekii ssp. bulgaricus*, exclusivamente, 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 *L. bulgaricus* (SPREER; MIXA, 1998). Os leites fermentados probióticos podem ser produzidos usando-se *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, em conjunto com outros lactobacilos, ou apenas *S. thermophilus*, em associação com os lactobacilos probióticos, ou bifidobactérias.

O iogurte ou bioiogurte pode ser classificado de acordo com:

- (i) o teor de gordura: integral ou desnatado, e
- (ii) a estrutura do gel: firme, batido ou líquido (para beber).

2.2.2. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (LAB – *lactic acid bacteria*) são os principais agentes envolvidos na produção de leites fermentados. Os microrganismos empregados em culturas lácticas pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, que são classificadas como cocos e bacilos, de acordo com sua morfologia. Segundo a temperatura ótima de crescimento, são agrupadas 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 homo ou hetero fermentativas. As primeiras produzem quase que exclusivamente ácido láctico. As heterofermentativas produzem ácido láctico e outros compostos, como CO₂ e etanol (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As primeiras definições de bactérias lácticas, como grupo, restringiram-se à capacidade que essas bactérias tinham de coagular ou fermentar o leite, provocando alterações benéficas e geralmente melhorando o sabor, o aroma e a textura. Esta fermentação acumula vitaminas e ácidos orgânicos que aumentam 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).

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

As culturas são ministradas nas formas líquidas, ultracongeladas ou desidratadas. As culturas líquidas são fornecidas em leite desnatado reconstituído esterilizado, podendo ser armazenadas em temperatura inferior a 8°C por período de uma a duas semanas. As culturas ultracongeladas (-30 a -40°C ou em nitrogênio

líquido a -196°C) podem ser armazenadas por 3-6 meses e as culturas desidratadas (vácuo, *spray*, liofilizada ou liofilizada concentrada) podem ser armazenadas por mais de seis 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; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), 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 *L. bulgaricus*, 1% para o *L. acidophilus* e 0,9% para o *S. thermophilus*.

Dentre os leites fermentados por bactérias lácticas termofílicas, o acetaldeído é o principal composto responsável por 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 *L. bulgaricus*. Outros compostos que estão presentes em baixas concentrações e favorecem o desenvolvimento do sabor característico são o ácido láctico e o diacetil (ROBINSON; TAMIME; WSZOLEK, 2002; FERREIRA, 2003; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

As bactérias lácticas (LAB) 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 não contêm compostos nitrogenados imediatamente disponíveis (peptídeos de baixo peso molecular e aminoácidos) em quantidade suficiente para suportar o crescimento dessas bactérias. Um pré-requisito para o crescimento em leite é a presença nas bactérias de um sistema de enzimas proteolíticas (proteases e peptidases) associadas às membranas celulares, além das mesmas enzimas endoplasmáticas. O sistema enzimático consecutivo hidrolisa as proteínas até resultar em aminoácidos assimiláveis no citoplasma. A presença desse sistema nas LAB, seu crescimento e a

produção de ácidos são significativamente correlacionados. É recomendado o uso de culturas mistas contendo cepas proteolíticas e não proteolíticas na produção de iogurtes e leites fermentados (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Algumas bactérias podem se desenvolver independentemente, mas crescem melhor em conjunto, sendo denominado crescimento protocooperativo. O estímulo mútuo que ocorre entre *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* é um bom exemplo. O lactobacilo é proteolítico e favorece o crescimento dos estreptococos através da formação de peptídeos e aminoácidos, que produziriam ácidos mais lentamente em cultura pura. O estreptococo produz ácido fórmico a partir do ácido pirúvico em condições anaeróbicas, além de produzir dióxido de carbono, que favorecem o crescimento de lactobacilos (Figura 1). O estímulo mútuo durante o crescimento desses dois microorganismos resulta na produção de ácido láctico mais rapidamente que no crescimento individual. Efeito contrário ocorre com o desenvolvimento da acidez, que inibe o crescimento dos estreptococos em certo nível de pH. No iogurte, o *L. bulgaricus* sobrepuja o *S. thermophilus* em número, pois os lactobacilos continuam a crescer (SPREER; MIXA, 1998; TAMIME; ROBINSON, 1999; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Figura 1. Efeito do crescimento associativo de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o processo de fermentação do leite (adaptado de WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006)

2.2.3. Proteínas do leite e formação do gel

O leite de vaca contém 3,5% de proteína, que podem ser divididas em dois grupos: (a) caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β e κ -caseína), fosfoproteínas, que constituem ~ 80% da proteína total; (b) proteínas do soro (β -lactoglobulina e α -lactoalbumina – representam 16% e 4% do total de proteínas, respectivamente) (FOX; McSWEENEY, 1998). As proteínas são moléculas estruturalmente ordenadas e qualquer alteração nessa conformação leva à desnaturação. O tratamento térmico ao qual o leite é submetido é um dos fatores que levam à desnaturação das proteínas, que sofrem modificação da conformação globular, resultando no desenrolamento da cadeia peptídica, se tornando mais reativas. O aquecimento causa a desnaturação das proteínas do soro, especialmente β -lactoglobulina, e sua interação com as micelas de κ -caseína (LUCEY; SINGH, 1998; FOX, 2001).

No leite normal, 95% da caseína não estão presentes em solução, mas em agregados aproximadamente redondos que tendem a se associar, chamados micelas, com diâmetros variando de 80 a 300 nm. O coração das micelas contém partes aproximadamente iguais de α e β -caseínas, enquanto a camada externa possui partes iguais de α e κ -caseínas, sendo que as últimas se ligam por pontes S-S, existindo uma camada hidrofílica com carga negativa. Os modelos propostos (Figura 2) incluem submicelas com um coração hidrofóbico que é coberto por uma camada hidrofílica (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006; SINGH; BENNETT, 2002).

As micelas consistem de 94% de proteína; os 6% restantes consistem de pequenos íons, principalmente cálcio, fosfato, magnésio e citrato. Essas partículas são conhecidas como fosfato de cálcio coloidal e estabilizam a estrutura das micelas, suprimindo a repulsão eletrostática entre elas. A formação e a estabilização do gel do iogurte são basicamente resultados da desestabilização da caseína, causada pela queda de pH com a produção de ácido láctico pelas bactérias durante a fermentação. Esse processo envolve o desdobramento da cadeia protéica, que expõe os aminoácidos laterais. Assim, formam-se as pontes hidrogeniônicas, além da rede de proteínas (composta por micelas de caseína). Na ligação das cadeias protéicas, formando essas pontes, ocorrem cavidades nas quais o soro fica preso, provocando a estabilização do gel (SINGH; BENNETT, 2002).

As micelas recobertas pelas proteínas do soro (caseína com proteínas desnaturadas do soro após o tratamento térmico) sofrem agregação com a queda do pH ao ponto isoelétrico das proteínas durante a fermentação (~4,7). Ligações do hidrogênio dão forma a essa matriz da proteína (FERREIRA, 2001; SINGH; BENNETT, 2002). O tratamento térmico aplicado ao leite para produção do iogurte reduz a tendência à sinérese. Na acidificação do leite até pH 4,6 a 20°C, aproximadamente 80% da proteína é precipitada. O processamento anterior do leite, homogeneização e tratamento térmico também têm forte influência nas condições do gel do iogurte. A produção do ácido láctico pelas bactérias lácticas resulta nesta queda de pH e na coagulação da caseína, formando o gel.

Um dos atributos mais importantes para a qualidade do iogurte é a textura, que é afetada principalmente pelo tratamento térmico da base do leite, pela cultura de *starter* e pela quebra do coágulo após a fermentação na produção do iogurte batido (LUCEY *et al.*, 1998; TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001; SODINI *et al.*, 2004; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Figura 2. Representação esquemática das micelas de caseína

2.2.4. Bactérias probióticas

Os principais microrganismos usados correntemente como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias Gram-positivas (HOLZAPFEL *et al.*, 1998). Outros microrganismos dos gêneros *Escherichia*,

Enterococcus e *Saccharomyces* também se encontram em produtos probióticos de mercado. Evidências indicam que os efeitos dos probióticos são específicos para as cepas testadas, portanto, efeitos benéficos atribuídos a uma cepa não podem ser assumidos como efeitos de outras, mesmo que pertençam à mesma espécie (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Alguns exemplos dos microrganismos mais usados como probióticos estão destacados na Tabela 1.

Os critérios gerais listados para a seleção dos microrganismos para uso como probióticos em humanos são:

- (i) origem humana,
- (ii) biossegurança,
- (iii) resistência ao suco gástrico,
- (iv) resistência à bile (HOLZAPFEL *et al.*, 1998).

Tabela 1. Exemplos dos principais microrganismos considerados probióticos

<i>Lactobacillus</i> ssp.	<i>Bifidobacterium</i> ssp.	Outros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Escherichia coli</i> Nisslc
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> ^a
<i>L. delbrueckii</i> sbsp. <i>bulgaricus</i> ^a	<i>B. longum</i>	<i>Enterococcus faecium</i> ^b
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. adolescentis</i>	
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

^a Ainda não é consenso o efeito probiótico

^b A segurança ainda é preocupação, em função de patogenicidade potencial e de resistência à vancomicina

Adaptado de Salminen *et al.* (2004) e Tamime *et al.* (2005)

Na publicação *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*, da FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization*), de 2006, sobre as propriedades funcionais dos probióticos, estão descritos o papel destas bactérias nas funções imunológicas, digestivas e respiratórias.

Os probióticos podem ter efeito significativo no alívio de sintomas de doenças infecciosas em crianças e outros grupos de alto risco. Para uso em alimentos, os probióticos não devem apenas sobreviver à passagem pelo trato digestivo, mas também ter a capacidade de se proliferar no intestino, ou ser consumido em um veículo no alimento que permita a sobrevivência durante essa passagem. Para atingirem os sítios intestinais específicos, as bactérias probióticas deverão possuir uma ou mais das seguintes características: resistência à lisozima e às condições de processamento e concentração adequada do microrganismo probiótico no produto no momento do consumo (FERREIRA, 2003).

Estudos *in vitro* apropriados devem estabelecer os benefícios à saúde potenciais do probióticos antes de se empreender experimentações *in vivo*. Os testes, tais como a tolerância aos ácidos e à bile, produção de antimicrobianos e aderência às células intestinais humanas devem ser executados dependendo do benefício de saúde proposto (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998).

Embora as bactérias do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não sejam parte do grupo de bactérias endógenas ao trato digestivo e não sejam capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo, hoje são aceitas como probióticas por sua capacidade de melhorar a tolerância à lactose, em decorrência da alta atividade de lactase (GUARNER *et al.*, 2005). Em estudos comparativos do iogurte contendo bactérias viáveis e o produto pasteurizado (bactérias destruídas pelo calor), todos mostraram melhor digestão da lactose quando ocorreu o consumo do produto com bactérias viáveis, além de redução de sintomas gastrintestinais.

A legislação brasileira para alimentos funcionais ainda é incipiente. As bactérias aprovadas para uso em produtos probióticos são (BRASIL, 2007):

- (i) *L. acidophilus*
- (ii) *L. casei* Shirota
- (iii) *L. casei* variedade *ramnosus*

- (iv) *L. casei* variedade *defensis*
- (v) *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*
- (vi) *L. paracasei*
- (vii) *Lactococcus. lactis*
- (viii) *B. animallis*
- (ix) *B. bifidum*
- (x) *B. lactis*
- (xi) *B. longum*
- (xii) *Enterococcus faecium*
- (xiii) *S. salivarius* ssp *thermophilus*

No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimentos com “Alegações de Propriedade Funcional e ou de Saúde” devem ter registro prévio à comercialização, conforme anexo II da Resolução RDC nº 278/2005, atualizado em agosto de 2007. A alegação permitida é: “O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. Ainda segundo esta Resolução, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 ufc na porção diária. A legislação ainda permite valor abaixo deste, desde que o fabricante comprove a eficácia do microrganismo no produto e na concentração inferior. Deve ser apresentado laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade. A quantidade do probiótico em unidades formadoras de colônias, contida na porção diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. A apresentação nas formas de cápsulas, tabletes ou comprimidos não será considerada alimento, uma vez que estes produtos são registrados como medicamentos.

O *B. animallis* é permitido na legislação brasileira, tem alegação aceita como “auxiliar o funcionamento do intestino” e recomendação de que “seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e a hábitos de vida saudáveis”.

Segundo Tamime *et al.* (2005), mais de cem leites fermentados probióticos podem ser encontrados no mercado mundial. Para ter efeito benéfico é essencial que os produtos vendidos com apelo à saúde atendam ao requisito de ter a concentração mínima de 10^6 unidades formadoras de colônias (ufc) por mL ou g de

produto até o final da vida-de-prateleira (TAMIME *et al.*, 2005). Alguns autores recomendam o consumo diário de 10^6 a 10^9 ufc como dose mínima efetiva, mas esse valor não é consenso e nem validado por estudos científicos, assim como não há consenso sobre a forma de se avaliar o efeito (recuperação nas fezes) (GARDINER *et al.*, 2002). Considerando-se a contagem mínima de bactérias probióticas de 10^6 ufc/mL de produto, no momento do consumo, e o consumo mínimo de 100mL de alimento probiótico por dia, atinge-se a quantidade mínima viável de ingestão.

Os produtos comerciais encontrados no mercado brasileiro nem sempre atendem às determinações da legislação, tanto em relação ao número mínimo de microrganismos viáveis, quanto em relação à correta identificação da cultura presente no produto (BOTELHO, 2005). Diversos trabalhos mostram ocorrência similar em produtos comerciais (SHAH, 2000; GUEIMONDE *et al.*, 2004).

2.2.5. Efeitos benéficos dos probióticos

A definição de produtos probióticos, como alimentos que contenham microrganismos vivos que influenciam benéficamente a saúde do hospedeiro, requer que a segurança e a eficácia dos probióticos sejam cientificamente comprovadas para cada cepa e produto. A demonstração de benefícios inclui pesquisas sobre mecanismos de ação e estudos clínicos em humanos. Os alimentos são funcionais depois de demonstrados os efeitos benéficos em uma ou mais funções do corpo além daqueles decorrentes de nutrição, nas condições de consumo normal, de forma a ser relevante em melhorar o estado de saúde e de bem-estar e/ou reduzir o risco de doenças. Essas premissas são usadas como base para as publicações do grupo de especialistas do *International Dairy Federation (IDF Expert Group)* (SALMINEN *et al.*, 2004).

As bactérias do trato gastrointestinal têm profunda influência em nosso bem-estar. A ecologia microbiana intestinal é composta por mais de 400 espécies e mais de 100 trilhões de microrganismos saprófitos e patogênicos, que normalmente vivem em equilíbrio. Esse equilíbrio pode ser alterado em função de dieta, tratamento com antibióticos, tratamento quimioterápico e situações de estresse, provocando problemas intestinais. Nas diferentes regiões do trato intestinal encontram-se grupos específicos, como bactérias bífidas (predomínio no cólon) e

lactobacilos (predomínio no intestino delgado), modulando o microambiente. Os microrganismos probióticos são usados com a função de restaurar a microbiota saudável perdida por alguma das razões citadas (FERREIRA, 2003).

Os *Lactobacillus* ssp. têm a capacidade de estabilizar a região do intestino delgado, que tem o equilíbrio alterado por secreções luminiais e pela introdução de bactérias exógenas. A região do intestino grosso é mais estável, mas é facilmente afetada pela presença de antibióticos. A ingestão de prebióticos tem a capacidade de balancear esta região ao favorecer o crescimento das bactérias bífidas de maneira seletiva (FERREIRA, 2003).

Os principais mecanismos de ação dos probióticos propostos no controle de patógenos intestinais incluem:

- (i) produção de substâncias antimicrobianas;
- (ii) exclusão competitiva por ligações;
- (iii) competição por nutrientes;
- (iv) modulação do sistema imune.

Alguns efeitos podem ser considerados cientificamente comprovados, de acordo com os critérios para comprovação do ILSI (*International Life Sciences Institute*), segundo Salminen *et al.* (2004):

- (i) intolerância à lactose: o mecanismo de ação inclui a redução da concentração da lactose presente no leite fermentado, pelo uso de bactérias com alta atividade de enzima lactase; aumento da chegada de lactase ao intestino, presente no leite fermentado ou na bactéria que chega viva a este sítio. A enzima β -galactosidase, detectada no duodeno e íleo depois do consumo de probióticos viáveis, é o principal fator que melhora a digestibilidade por hidrolisar a lactose;
- (ii) diarreia associada ao rotavírus: o *Lactobacillus* GG reduziu sua duração em crianças, com respostas no aumento de anticorpos e no aumento no número de células secretoras de imunoglobulinas;
- (iii) diarreia associada ao uso de antibióticos: o *Lactobacillus* GG foi considerado eficiente na redução do risco desta diarreia em crianças e adultos, sendo administrado na forma de cultura liofilizada ou pelo

consumo de leite fermentado. Em estudos com *Bifidobacterium lactis* e com *L. acidophilus* La5 estes também foram considerados eficazes.

É importante ressaltar que os efeitos são dependentes das estirpes empregadas, pois os estudos científicos observaram diferenças entre diferentes estirpes.

Há necessidade de mais estudos para conclusão de alguns efeitos benéficos parcialmente definidos, embora possam ser considerados razoavelmente bem estabelecidos e bem documentados clinicamente. Estes estudos propostos são: prevenção de doenças atópicas (eczema atópico, asma, alergias respiratórias); redução do risco de câncer de bexiga e intestino; alívio dos sintomas do intestino irritável e doença de *Crohn*; redução do risco de diarreia associada ao *Clostridium difficile*; controle do colesterol; redução do risco de doenças respiratórias em bebês e crianças; e redução do risco de cárie dental (SALMINEN *et al.*, 2004).

Estudos clínicos bem planejados (do tipo duplo-cego com placebo) e documentados são necessários para comprovação científica de diversos efeitos benéficos. É importante identificar qual é o grupo alvo do produto para o desenvolvimento de produtos probióticos.

2.2.6. Desafios tecnológicos

Os alimentos probióticos devem ser fabricados de acordo com as tecnologias empregadas para a produção dos produtos convencionais, mantendo ao máximo o sabor e a textura característicos. Os estágios de produção de leites fermentados probióticos também devem procurar se aproximar do processo de fabricação do iogurte (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001).

Entretanto, a produção de leites fermentados probióticos exige uma série de cuidados. Entre as dificuldades podem ser citadas: baixo ritmo de crescimento em leite não-suplementado; condições de produção (temperaturas tradicionais) não são ótimas para o crescimento dos probióticos; falta de desenvolvimento das propriedades organolépticas tradicionais durante a incubação; metabólitos dos microrganismos probióticos que podem ser indesejáveis e causar sabor estranho (produção de ácido acético por bífidas); difícil manutenção da viabilidade em

populações elevadas (GOMES; MALCATA, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ØSTLIE; HELLAND; NARVHUS, 2003).

Outros fatores no leite fermentado podem afetar a viabilidade dos probióticos, incluindo níveis do pH e de acidez, presença de outros microrganismos e de oxigênio (SHAH *et al.*, 1995; KAILASAPATHY; RIBKA; FLEET, 1997; SHAH, 2000). Os microrganismos probióticos têm freqüentemente demonstrado baixa viabilidade em preparações comerciais, que pode ser afetada pelos fatores citados, mas devem permanecer viáveis até o fim da vida útil do produto (LOURENS-HATTING; VILJEON, 2001; TAMIME *et al.*, 2005; DONKOR *et al.*, 2007).

O uso de culturas do iogurte em co-cultura com as probióticas tem a finalidade de superar os problemas de sabor, textura e aroma e de diminuir o tempo de fermentação do leite até pH 4,5-4,6. Essas culturas são denominadas bioajustadoras. Na produção de leites fermentados as bactérias probióticas podem ser adicionadas por diferentes processos:

- (i) como uma cultura *starter*, na qual se espera que o microrganismo probiótico cresça nas condições utilizadas no processo, resultando em longos tempos de incubação;
- (ii) junto com a cultura *starter*, mas como as condições podem não ser ótimas para o probiótico, usualmente não há crescimento durante a fermentação, mas o produto será um carreador;
- (iii) no final da fermentação e na forma concentrada, nos quais se espera que o produto seja carreador;
- (iv) o probiótico pode crescer nas condições ótimas, enquanto as culturas tradicionais do iogurte crescem separadamente em suas condições.

Vale lembrar que, em qualquer forma de aplicação, o objetivo é atingir e manter populações acima de 10^6 ufc/mL (FERREIRA, 2003; TAMIME *et al.*, 2005).

O *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são altamente proteolíticos quando comparados às bactérias probióticas *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. Assim, as bactérias probióticas crescem lentamente em leite e requerem suprimento extra de peptídeos e aminoácidos para ótimo crescimento (KLAVER; KINGMAN; WEERKAMP, 1993; SHIHATA; SHAH, 2002). As bactérias do iogurte liberam altas

concentrações de aminoácidos e demonstram grande atividade de aminopeptidase, quando comparadas às bactérias probióticas.

A adição de estirpes proteolíticas de *L. bulgaricus* a iogurte com culturas probióticas comerciais, contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *S. thermophilus* (ABT), reduziu o tempo de fermentação por liberar peptídeos e aminoácidos necessários às culturas menos proteolíticas. Foi observada melhora na viabilidade das culturas probióticas com a adição de LB (SHIHATA; SHAH, 2002), embora o uso de LB seja responsabilizado pela perda de viabilidade de probióticos em outros estudos (GILLILAND; SPECK, 1977; DAVE; SHAH, 1997b; VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000).

O uso de culturas do iogurte associadas aos probióticos melhora as condições de fermentação. *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* podem ser incorporados ao leite fermentado pelas bactérias do iogurte (TAMIME *et al.*, 2005).

A adição de hidrolisado de proteína de soro e de culturas do iogurte favoreceu o crescimento de *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* em leite desnatado (McCOMAS; GILLILAND, 2003). Entretanto, a população de bactérias probióticas foi similar ou inferior à do leite controle sem suplementação após 28 dias de armazenamento refrigerado.

Algumas culturas probióticas podem exigir períodos superiores a 24 horas para que o leite chegue ao pH final de 4,5, quando são os únicos microrganismos utilizados. O leite fermentado Yakult¹ usa uma cultura probiótica pura, o *L. casei* Shirota, e seu tempo de incubação pode ser de mais que cinco dias (TAMIME *et al.*, 2005).

Os leites fermentados probióticos podem ser classificados segundo as culturas empregadas:

- (i) culturas AB: contendo apenas *L. acidophilus* ou *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp;
- (ii) culturas ABC: *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. e *L. casei*;
- (iii) culturas ABT: *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. e *S. thermophilus*.

Entretanto, o tempo de fermentação pode ser excessivamente longo, propiciando perda da qualidade sensorial, mesmo com algumas culturas ABT. O

emprego de *S. thermophilus* é mais usual na produção de leites fermentados probióticos (TAMIME *et al.*, 2005). Alguns autores recomendam a produção de leites fermentados probióticos sem a adição *L. bulgaricus*, pois este produz pós-acidificação acentuada, durante o armazenamento refrigerado, e peróxido de oxigênio, resultando em queda de viabilidade dos probióticos, mas essa produção depende da cepa de *L. bulgaricus* empregada (DAVE; SHAH, 1997b; VINDEROLA; MOCCHIUTTI; REINHEIMER, 2002). Por outro lado, as culturas *starter* favorecem o crescimento e a sobrevivência dos probióticos pela produção de substratos promotores de crescimento – peptídeos – ou pela redução da concentração de oxigênio dissolvido no leite (DAVE; SHAH, 1997a, 1997b; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; VINDEROLA; MOCCHIUTTI; REINHEIMER, 2002).

2.2.7. 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:

- (i) contagem ao microscópio;
- (ii) contagem em meio nutritivo;
- (iii) medida de densidade óptica (480 e 650 nm);
- (iv) medida da atividade metabólica;
- (v) dosagem dos componentes do meio de cultura.

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), as bactérias se multiplicam por divisão em uma progressão geométrica. O tempo de geração (tempo necessário para a divisão completa da célula) depende de diversos fatores. Em leite, a espécie bacteriana e a temperatura têm importância especial. A fase inicial de crescimento dos microrganismos 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 estirpes 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; CORRIEU, 1994).

A qualidade da cultura láctica 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; BÉAL; CORRIEU, 2000). Sua sobrevivência normalmente é medida pela capacidade das células em formar colônias em um meio de cultura (FOSCHINO; FIORI; GALLI, 1996).

Entretanto, este método não fornece resultados seguros, pois a maioria das bactérias lácticas forma cadeias de distintos 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; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), a principal propriedade das bactérias lácticas é a produção de ácido. A avaliação do crescimento dos microrganismos é feita pela determinação da quantidade de ácido produzido, mais tradicionalmente através da titulação expressa em porcentagem de ácido láctico. O pH pode ser medido em linha na produção, o que é uma vantagem considerável no monitoramento e no controle do processo de acidificação (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001).

A relação entre pH, acidez titulável e contagem de microrganismos tem várias complicações, dentre 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 láctico, o sistema enzimático das bactérias pode continuar convertendo lactose a

ácido láctico. O metabolismo das espécies de bactérias lácticas também pode variar. Enquanto uma cepa pode produzir quatro moléculas de ácido láctico a partir de uma molécula de lactose, outra produz somente duas (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Devido ao efeito tamponante das proteínas e de 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 e Corrieu (1994), a atividade acidificante é o método mais apropriado para avaliar a atividade das culturas.

O sistema CINAC (*Cinétique d'acidification*) permite a caracterização da atividade acidificante das bactérias lácticas medindo o tempo necessário para se atingir a máxima taxa de acidificação em leite. Esse método automático de medida de pH em tempo real é mais significativo, fácil de se obter e de se interpretar que os métodos de medida de viabilidade (SPINNLER; CORRIEU, 1989). É uma patente obtida em 1989 por Spinnler e Corrieu e trata-se de um método para a quantificação da atividade de uma cultura com base em medidas de valores de pH. Um eletrodo conectado a um potenciômetro e a uma interface eletrônica, que digitaliza os dados no tempo de execução do experimento, é inserido em um frasco contendo a amostra em estudo, sob temperatura controlada (Figura 3). As principais etapas das análises dos dados são:

- (i) aquisição e filtragem dos dados e expressão dos mesmos como valores físicos;
- (ii) cálculo das velocidades de acidificação;
- (iii) armazenamento e apresentação dos resultados em gráficos representando as medidas dos valores de pH e velocidades de acidificação;
- (iv) cálculo dos parâmetros característicos da cinética do processo.

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

Figura 3. Representação esquemática do sistema CINAC (adaptado de Spinnler e Corrieu, 1989)

A medida do valor 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 ($t_{V_{\max}}$) é usado para caracterizar a atividade bacteriana. Quanto maior esse tempo, menor é a atividade bacteriana (FONSECA; BÉAL; CORRIEU, 2000). A partir dos dados obtidos, entre outros parâmetros cinéticos de acidificação, pode-se calcular:

- (i) velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$ (10^{-3}upH/min);
- (ii) tempo no qual atinge-se a velocidade máxima ($t_{V_{\max}}$);
- (iii) valor de pH no qual $V_{\max}$ é atingida;
- (iv) tempo durante o qual a velocidade observada é maior que $V_{\max}/2$ ($t_{50\%}$);
- (v) faixa de pH durante a qual a velocidade observada é maior que $V_{\max}/2$ ($t_{pH5,0}$);
- (vi) tempo final de fermentação ($t_{pH4,5}$).

Spinnler e Corrieu (1989) usaram $t_{V_{\max}}$ para avaliar diferentes cepas de ST e LB e para comparar o desempenho das culturas puras ou em co-cultura. Afirmaram

que o tempo para se atingir a velocidade máxima de acidificação é um bom parâmetro para se avaliar a atividade das culturas.

Fonseca, Béal e Corrieu (2000) estudaram a atividade acidificante de culturas de ST e LB usando $t_{v_{max}}$ como parâmetro, mostrando que ST tem maior atividade acidificante que LB.

O tempo para se atingir pH 5,5 ($t_{pH5,5}$) foi usado para caracterizar a atividade acidificante e a tolerância ao congelamento de *L. paracasei* BFE 5264 em função do tratamento de homogeneização a alta pressão e de suplementação da suspensão com leite desnatado e com gordura do leite (WANG; CORRIEU; BÉAL, 2005). Quanto maior o $t_{pH5,5}$, maior a fase de latência e, conseqüentemente, menor a atividade acidificante.

2.3. PROCESSAMENTO DE IOGURTE E LEITES FERMENTADOS

O processo de produção de iogurte e leites fermentados pode variar um pouco, mas sempre inclui as etapas de homogeneização, tratamento térmico do leite ou base láctea e de fermentação láctica. A etapa de fermentação é responsável pelo desenvolvimento de características intrínsecas dos produtos: a gelificação do leite através da desestabilização das proteínas. A qualidade do iogurte depende das propriedades do leite utilizado na sua produção, sendo que os principais defeitos que ocorrem são sinérese e textura irregular. Segundo Lucey e Singh (1998), Tamime e Robinson (1999), Lucey (2001), Oliveira *et al.* (2001) e Sodini *et al.* (2004), a sinérese e a textura irregular dependem de vários fatores, mas os principais são:

- (i) o processo de homogeneização,
- (ii) o tratamento térmico,
- (iii) a composição da base láctea e
- (iv) a composição da cultura empregada.

Fortificação e tratamento térmico do leite são os parâmetros mais importantes que afetam propriedades da textura de iogurte e leites fermentados, justificando serem foco principal desta revisão.

No processo de obtenção de iogurte batido (ou cremoso) a quebra final do coágulo é realizada após o resfriamento até 15°C. Essa quebra do coágulo reduz parcialmente o problema da sinérese, que pode ocorrer durante a fermentação, pois o soro liberado é novamente incorporado. No Brasil, assim como em alguns países, é permitida a adição de estabilizantes para se atingir a consistência desejada do iogurte batido com frutas ou outros ingredientes, fato que reduz o problema da sinérese. A incorporação desses estabilizantes é feita antes do tratamento térmico da base láctea, para se obter hidratação completa dessas moléculas e se eliminar possíveis contaminantes presentes (TAMIME *et al.*, 2001).

2.3.1. Homogeneização do leite

A homogeneização melhora a consistência, o corpo e a estabilidade do iogurte. Reduz o tamanho dos glóbulos de gordura e aumenta a viscosidade, especialmente em iogurte integrais. Durante a homogeneização, a caseína e as proteínas do soro são absorvidas na interface do glóbulo de gordura, aumentando o número de componentes da estrutura formadora do gel (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). A homogeneização também auxilia na mistura de estabilizantes e outros ingredientes.

O leite para a produção de iogurte é normalmente homogeneizado a 10 a 20 MPa, em temperaturas em torno de 55 a 65°C, antes do tratamento térmico (LUCEY; SINGH, 1998). Mais recentemente o tratamento de homogeneização por alta pressão (acima de 400 MPa) (*High Pressure Homogenisation* – HPH) tem sido opção ao tratamento convencional de homogeneização, descrito como responsável por maior interação caseína-caseína ou caseína-gordura e resulta em matriz de caseína mais compacta, com efeitos de redução do tamanho dos glóbulos de gordura e melhora da estabilidade do produto final, inativação de microrganismos e redução do tempo de gelificação (TAMIME; ROBINSON, 1999).

2.3.2. Tratamento térmico do leite

O tratamento térmico do leite afeta a textura, a microestrutura e as propriedades reológicas do iogurte (LUCEY *et al.*, 1998; TAMIME; ROBINSON, 1999; LUCEY, 2004). As propriedades reológicas e a microestrutura do leite acidificado não tratado termicamente ou do leite que passou por um tratamento severo, apropriado para a produção de iogurte, são muito diferentes (LUCEY *et al.*, 1998).

Segundo Tamime, Robinson e Latrille (2001), o tratamento térmico é feito em trocador de calor, devendo a temperatura atingir de 90 a 95°C, com tempo de residência de 2 a 10 minutos. Uma alternativa é aquecer o leite em bateladas até 85°C e manter esta temperatura por até 30 minutos. Esta etapa resulta em 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 eliminando os microrganismos patogênicos que podem estar presentes no leite. 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).

Dannenbergh e Kessler (1988) e Augustin, Cheng e Clarke (1999) encontraram relação linear entre desnaturação das proteínas do soro e capacidade de retenção de água em iogurte. Análise da microestrutura sugeriu que a estrutura do iogurte tratado termicamente imobilizou maior volume da fase líquida (LUCEY *et al.*, 1998).

O tratamento térmico e de alta pressão hidrostática resultou em aumento no módulo do armazenamento (G'), no limite de escoamento e na viscosidade do iogurte (LUCEY *et al.*, 1997; HARTE; CLARK; BARBOSA-CÁNOVAS, 2007). O iogurte exibe comportamento não-newtoniano, como queda de viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, viscoelasticidade e dependência de tempo (BENEZECH; MAINGONNAT, 1994; STEFFE, 1996; LUCEY *et al.*, 1997; SODINI *et al.*, 2004).

2.3.3. Composição da base láctea

Tradicionalmente, o índice de sólidos do leite para a produção do iogurte é elevado em relação ao teor do leite puro. As melhores opções para atingir os índices desejados de proteína e de sólidos são:

- (i) adição de ingredientes em pó (leite desnatado; concentrados, isolados ou hidrolisados de proteína do leite ou do soro; caseinatos);
- (ii) evaporação da água do leite sob o vácuo ou
- (iii) remoção da água pelo processo de filtração por membrana (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001).

Diversos autores relatam o uso dos ingredientes lácteos em pó para a produção de iogurtes e leites fermentados (LUCEY; MUNRO; SINGH, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001; REMEUF *et al.* 2003; SODINI; MONTELLA; TONG, 2005; PATOCKA *et al.*, 2006).

O aumento do teor de sólidos do iogurte induz a maior queda de pH durante a estocagem, segundo Gardini *et al.* (1999). Essa queda de pH após a fermentação sofre influência do teor de sólidos totais, do teor de gordura e do tamanho do inóculo. Estes autores encontraram o valor de 13% de sólidos como ponto ótimo para minimizar a queda de pH.

A fortificação para o teor de proteína de 5% melhora as propriedades reológicas do iogurte (FOX, 2001; TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001). Estudar separadamente os efeitos do teor de proteína ou de sólidos totais é difícil, porque as duas variáveis não são modificadas independentemente na composição da formulação. Além disso, a proporção relativa entre proteínas do soro e da caseína é alterada com o uso de concentrados de proteínas de soro ou de leite, de caseinatos ou de leite desnatado. Apesar da dificuldade em separar os efeitos que podem ser atribuídos a cada fator, aumentar os sólidos totais melhora a textura do iogurte, segundo avaliações sensoriais ou instrumentais, mesmo para teor de sólidos provenientes de açúcares ou agentes texturizantes. Os níveis de sólidos na composição do iogurte foram estudados por Tamime e Robinson (1999), resultando em melhor consistência com o aumento de sólidos de 12 a 20g/100g, embora o efeito principal tenha sido observado para o acréscimo de 12 para 14g/100g; os níveis acima de 16g/100g resultaram em mudança pouco pronunciada.

De acordo com Prentice (1992), o aumento na proteína é o principal fator de influência na textura e o enriquecimento do leite com leite em pó resulta no desenvolvimento de redes e agregados de micelas de caseína.

Proteínas são importantes fontes de nitrogênio e de aminoácidos essenciais, do ponto de vista nutricional. Para algumas aplicações pode ser benéfico hidrolisar as proteínas para, por exemplo, reduzir efeito alergênico, disponibilizar peptídeos com objetivos nutricionais específicos e melhorar suas propriedades funcionais. A hidrólise pode ser enzimática ou ácida (FOX, 2001).

Dave e Shah (1998a) observaram o efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, com proteína concentrada de soro e com triptona na redução do tempo para se atingir o pH 4,5. Quando o leite foi suplementado com até 250mg/L de cisteína houve redução no tempo, mas houve aumento no tempo quando foram empregadas concentrações entre 250 e 500mg/L.

O uso de hidrolisado de caseína é recomendado na produção de iogurtes com o objetivo de disponibilizar peptídeos e de aumentar o teor de aminoácidos livres, que estimulam o crescimento de *S. thermophilus* (DAVE; SHAH, 1997a, 1998a; TAMIME; ROBINSON, 1999).

Zizu e Shah (2003) estudaram a influência de pH, da temperatura e da suplementação com proteína concentrada de soro na produção de exopolissacarídeos (EPS) por *S. thermophilus*, os quais têm efeito na textura dos iogurtes. A adição de proteína concentrada de soro resultou em aumento na produção de EPS, assim como a co-cultura de ST produtor e não-produtor também aumentou a produção em relação à cultura produtora sozinha. A temperatura ótima para a produção de EPS foi de 37 °C.

Oliveira *et al.* (2001), Sodini *et al.* (2002) e Damin (2003) observaram redução do tempo de fermentação, maior atividade microbiana, aumento da firmeza e na viabilidade das bactérias em leite fermentado contendo probióticos. Outro enfoque para melhorar o crescimento e a atividade de acidificação dos organismos probióticos no leite é adicionar a energia prontamente disponível como, por exemplo, glucose (OLIVEIRA; DAMIN, 2002), fatores do crescimento (hidrolisados de proteínas do leite ou extrato de levedura), antioxidantes, minerais e vitaminas apropriados (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; DAVE; SHAH, 1998a; GOMES; MALCATA, 1999; NAIDU; CLEMENS, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2001; REMEUF *et al.*, 2003; SODINI; MONTELLA; TONG, 2005).

A adição de hidrolisado de proteína de soro (obtida pela hidrólise enzimática da proteína concentrada de soro) também foi responsável pelo aumento do crescimento de *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* em leite desnatado (McCOMAS; GILLILAND, 2003). A adição de três tipos de hidrolisados de caseína e três diferentes tipos de hidrolisados de proteína de soro em leites fermentados probióticos foi estudada por Lucas *et al.* (2004), em concentrações de 0,25 a 4 g/L. Houve estímulo na acidificação e redução do tempo de fermentação.

Oliveira *et al.* (2001) observaram efeito significativo da suplementação do leite com 20 g/L de hidrolisado de caseína, proteínas do leite e soro doce 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 e o tempo de fermentação foi reduzido em até 55%. A composição da cultura também teve efeito significativo sobre a acidificação.

Sodini *et al.* (2002) observaram que a cultura pura de *S. thermophilus* apresentou o maior estímulo, *L. acidophilus* apresentou estímulo, mas baixa estabilidade, e *L. rhamnosus* cresceu sempre lentamente com a suplementação do leite por duas proteínas concentradas de leite e dois hidrolisados de caseína. O leite foi padronizado em 13% de sólidos e cada ingrediente compôs 53 g/kg. O uso de hidrolisado de caseína resultou em maior contagem de bactérias probióticas. Um dos hidrolisados foi responsável pela maior redução do tempo de fermentação. Entretanto, os autores enfatizaram a necessidade de otimização dessa concentração para melhorar textura e *flavor*.

Finalmente, o tipo e as concentrações de proteínas empregadas influenciam significativamente as características de textura e reologia do produto final (PUVANENTHIRAN; WILLIAMS; AUGUSTIN, 2002; SODINI *et al.*, 2004; PENNA; CONVERTI; OLIVEIRA, 2006).

Embora o número de trabalhos relacionados à suplementação do leite para a produção de iogurte e leites fermentados (ou bioiogurtes) seja grande, não são conclusivos quanto ao nível ideal de suplementação pelos diversos ingredientes estudados.

2.4. INDICADORES DE QUALIDADE

Como discutido no item 2.3., do ponto de vista da indústria, a qualidade do iogurte está relacionada principalmente com as características microbiológicas e físicas do produto, sendo a consistência um dos atributos mais importantes (TAMIME; ROBINSON, 1999).

2.4.1. Atributos físicos: textura e microestrutura

2.4.1.1. Textura

A textura é analisada como atributo de qualidade, indicador de frescor e excelência do processo de produção, contribuindo para o prazer no consumo dos alimentos. É uma manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e de superfície dos alimentos, detectada pela visão, audição, toque e componente sinestésico. Os instrumentos de medição de textura podem detectar e quantificar somente alguns parâmetros físicos, que podem ser interpretados em termos de percepção sensorial (SZCZESNIAK, 1963). A importância da textura na aceitação de alimentos pelo consumidor resulta em grande interesse no desenvolvimento de métodos de avaliação quantitativa de textura e dos princípios e problemas dos métodos instrumentais de avaliação.

Segundo a *International Standard Organization* (apud SODINI *et al.*, 2004), textura engloba todos os atributos reológicos e estruturais perceptíveis por meios mecânicos, tácteis e, quando apropriado, por receptores visuais e auditivos.

Neste sentido, os atributos desejáveis no iogurte são (PENNA; BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1994; TAMIME; ROBINSON, 1999):

- (i) corpo firme e uniforme, sem rachaduras, de modo que possa ser consumido com colher;
- (ii) textura viscosa, lisa e uniforme, sem apresentar sinérese;
- (iii) sabor ácido e suave característico e

- (iv) para o iogurte batido: produto consistente e homogêneo, que não escorra facilmente e cuja estrutura possa suportar pedaços de frutas em suspensão.

Um método de classificação das características de textura (FRIEDMAN; WHITNEY; SZCZESNIAK, 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.

O TA-XT2 *Texture Analyser* (Stable Micro Systems) é um equipamento usado para avaliação da textura ou viscosidade, através da análise de perfil de textura (*texture profile analysis* - TPA) ou *back extrusion*. O modo TPA simula a mastigação e deglutição de um alimento através de ensaio de dupla compressão, fornecendo parâmetros de firmeza (ou dureza), coesividade, elasticidade e adesividade; além de fraturabilidade, mastigabilidade e gomosidade. No modo *back extrusion* um corpo cilíndrico pressiona o alimento acondicionado em um copo cilíndrico de forma que o material flua através do espaço anular entre o copo e o cilindro, fornecendo o ponto de quebra da estrutura, a firmeza, a consistência e a viscosidade (ANGIOLONI; COLLAR, 2008).

A força necessária para comprimir o alimento na mastigação (entre a língua e o palato para alimentos semi-sólidos) corresponde à firmeza, determinada por testes de compressão (SZCZESNIAK, 1998). Trabalhos publicados com relação a análises de textura em iogurtes e leites fermentados utilizam diferentes equipamentos, como penetrômetros e texturômetros, com diferentes corpos de prova (cilíndricos ou cônicos) para medida de firmeza (DAVE; SHAH, 1998a; DOMINGUEZ-SOBERANEZ *et al.*, 2001; WSZOLCK *et al.*, 2001; SHIHATA; SHAH, 2002).

O uso do texturômetro TA.XT2 equipado com cilindro de 2,5cm de diâmetro mostrou-se como um método adequado para a avaliação do efeito de cultura 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 (DOMÍNGUEZ-SOBERANES *et al.* (2001). O efeito do enriquecimento do leite com ingredientes protéicos sobre a firmeza de leites fermentados foi estudado por

Oliveira *et al.* (2001), através de teste de compressão simples com o TA.XT2, comparando a firmeza expressa pela força máxima de penetração.

Estudos de Dave e Shah (1998b) e de Shihata e Shah (2002) determinaram a firmeza de iogurte através da profundidade de penetração em mm de um corpo cônico de peso controlado, após cinco segundos de movimento. Menor firmeza resultou em maior profundidade de penetração e vice-versa. No segundo estudo, iogurte firme foi produzido com culturas probióticas comerciais ABT (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *S. thermophilus*) e cepas de *L. bulgaricus* produtoras de exopolissacarídeos, sendo que a adição de LB aumentou significativamente a firmeza em relação ao produto só com cultura ABT.

Os analisadores de textura Stevens LFRA *Texture Analyser* (C. Stevens & Sons Ltd., Inglaterra) e The Universal TA.XT2 *Texture Analyser* (Stable Micro Systems Ltd., Inglaterra) foram usados por Wszolck *et al.* (2001) empregando corpo de prova cônico e distância de penetração de 15 mm, para análise de firmeza, gomosidade e adesividade de leites fermentados.

A reologia é o estudo da deformação e do fluxo da matéria (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993). O comportamento reológico é de grande importância na indústria de alimentos como uma ferramenta para a caracterização física de materiais antes de processá-los (controle de qualidade de matéria-prima) e do produto durante o processamento (comportamento em bombeamento, por exemplo), além de ser uma medida da qualidade do produto final (HOLDSWORTH, 1971; RAO, 1977; ROSENTHAL, 1999; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005). O desempenho de acidificação das bactérias probióticas afeta a textura dos leites fermentados e sua caracterização reológica auxilia no controle de diferentes estágios do processo de industrialização.

Quanto a suas características, os materiais podem ser sólidos, líquidos ou gases, enquanto as deformações podem ser de sólidos elásticos (deformação elástica) ou fluidos ideais (deformação irreversível – líquidos ou gases – flui). Os alimentos possuem estrutura complexa e variada, o que não permite uma classificação tão clara como sólidos ou líquidos. Na maioria dos casos, estes consistem de uma mistura de componentes sólidos e fluidos, apresentando comportamentos intermediários entre sólidos elásticos e líquidos ideais, chamado

comportamento viscoelástico. Todo material pode ser considerado viscoelástico, dependendo do tempo de observação avaliado (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1999; STEFFE, 1996). As propriedades reológicas são determinadas através dessas medidas de força e de deformação em função do tempo.

Em relação ao fluxo e ao tempo, considera-se que tudo pode fluir, dependendo do tempo de observação. O número de Deborah ($De = \lambda / t$, onde λ : tempo característico do material; t : o tempo de observação) é um valor que define o comportamento de um fluido – semelhante a um sólido quando o número é muito alto – semelhante a um líquido quando o valor é muito baixo (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993).

O comportamento de fluxo de um líquido ideal foi expresso primeiramente por Newton, em equação na qual a medida da viscosidade é a razão da tensão de cisalhamento pela taxa de cisalhamento, assumindo proporcionalidade direta. Essa definição é restritiva, visto que a faixa de tensão na qual os materiais apresentam comportamento linear é restrita, o que torna o estudo de comportamento não linear fundamental para a reologia (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993).

Os conceitos básicos de tensão de cisalhamento (força/área) e de deformação (deformação por comprimento) são as chaves para as avaliações reológicas. A tensão é sempre uma medida de força por unidade de área de superfície e é expressa em Pascal (Pa). A direção da força em relação à área superficial impactada determina o tipo de tensão. A tensão normal ocorre quando a força é perpendicular à superfície e pode ser encontrada durante tensão ou compressão. Tensão de cisalhamento (τ) ocorre quando a força age paralelamente à superfície. Por outro lado, a deformação (γ) representa quantidade adimensional da deformação relativa do material. A direção da tensão aplicada em relação à superfície do material determinará o tipo de deformação (TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

A Figura 4 ilustra caso mais simples de fluxo laminar entre duas superfícies paralelas e detalhe do deslocamento das camadas do fluido.

Figura 4. Representação das forças envolvidas no fluxo laminar entre superfícies paralelas de área A: a placa superior move-se a uma velocidade v ; h é a distância entre as placas; o comprimento das setas é proporcional à velocidade local. A aplicação de tensão de cisalhamento ($\tau = F/A$) resulta em gradiente de velocidade entre as camadas do fluido, que é a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma} = dv/dh$)

O iogurte é formado por um gel fraco de caseína e exibe uma variedade de comportamentos característicos de fluidos não-newtonianos, no qual a viscosidade é afetada por mudanças na taxa de cisalhamento, exibe tensão limite de escoamento, viscoelasticidade e dependência temporal (BENEZECH; MAINGONNAT, 1994; LUCEY *et al.*, 1997; LUCEY; SINGH, 1998; SODINI *et al.*, 2004). Sua caracterização reológica foi obtida através do estudo de suas propriedades elásticas e viscosas. Os comportamentos de líquidos newtonianos e não-newtonianos estão representados graficamente na Figura 5 (STEFFE, 1996; BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993).

Figura 5. Diagramas de curvas de fluxo (a), viscosidade (b) e fluxo com e sem tensão limite (c), para os diferentes tipos de fluido: 1. newtoniano; 2. pseudoplástico; 3. dilatante; 4. pseudoplástico sem limite de escoamento; 5. pseudoplástico com limite de escoamento

O limite de escoamento é definido como tensão mínima requerida para iniciar o fluxo. Este parâmetro pode ser usado para caracterizar a firmeza do iogurte, sendo que diversos métodos foram sugeridos para medir esta propriedade, dentre eles: (i) extrapolação na curva de fluxo para a taxa de cisalhamento igual a zero, para o modo rampa de taxa controlada; (ii) máximo da curva de tensão de cisalhamento *versus* tempo, usando teste de deformação controlada; (iii) interseção das tangentes na mudança de declive na curva log da deformação *versus* log da tensão de cisalhamento, para teste de rampa de controle de tensão (STEFFE, 1996). Trabalhos sobre medida de limite de escoamento de iogurtes relatam o uso dos diversos métodos (HARTE *et al.*, 2002; ROHM; SCHMID, 1993; HARTE; CLARK; BARBOSA-CÁNOVAS, 2007).

Testes rotacionais (destrutivos) fornecem informações sobre a resistência do gel durante o consumo, o processamento e o envase, monitorando a dependência da taxa de cisalhamento em função da tensão aplicada, ou vice-versa. Através de testes rotacionais pode ser obtida a curva de fluxo. Quando iogurtes batidos foram submetidos a testes rotacionais, as propriedades de tensão limite não foram perdidas, embora não exibissem o mesmo valor de amostras de iogurtes firmes originais (LUCEY; SINGH, 1998).

Através de testes oscilatórios (não destrutivos) é possível calcular os módulos de armazenamento e de perda, que descrevem as propriedades elásticas e viscosas do gel, respectivamente (LUCEY; SINGH, 1998). Nestes testes são aplicadas perturbações mecânicas de frequência ou de amplitude.

A viscosidade diminui com o tempo de cisalhamento nos fluidos não-newtonianos, como resultado da quebra da estrutura. A regeneração gradual da estrutura quando a tensão é removida é chamada tixotropia. O comportamento tixotrópico é obtido depois de um determinado período de observação em descanso, que se segue a cisalhamento. Uma recuperação de 100% indica que a estrutura original se reorganiza totalmente (BARNES; HUTTON; WALTERS, 1993).

2.4.1.2. Microestrutura

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000x) e resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem caráter virtual, pois o que é visualizado no monitor do aparelho é a transcodificação da energia emitida pelos elétrons, ao contrário da radiação de luz a qual se está habitualmente acostumado. As amostras devem ser desidratadas e fixadas para a observação neste tipo de microscopia. Alguns autores usam solução de glutaraldeído e posterior lavagem com série de soluções de acetona em graduações cada vez mais concentradas, até lavagem final com acetona anidra. Após segue-se uma desidratação com CO₂, as amostras secas são fixadas com resina epóxi em cilindros metálicos e, então, quebradas com espátula, de forma a exibir sua microestrutura. É feito o recobrimento final com liga de ouro-platina antes da observação em microscópio.

Outros trabalhos relatam o congelamento das amostras pelo contato direto com nitrogênio líquido, seguido de quebra e desidratação a vácuo. Essas amostras podem ser observadas em temperatura de -190°C no microscópio eletrônico de varredura (BHULLAR; UDIN; SHAH, 2002).

A microscopia eletrônica possibilita observação direta da microestrutura do gel. A análise das imagens geradas permite a avaliação da homogeneidade da rede de proteína resultante do efeito do tratamento térmico da base láctea (LUCEY *et al.*, 1998), da adição de diferentes estabilizantes (TAMIME; ROBINSON, 1999), do tratamento por alta pressão hidrostática (HARTE *et al.*, 2002), da adição de cultura probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), da suplementação do leite (REMEUF *et al.*, 2003) ou do emprego de culturas produtoras de exopolissacarídeos (FOLKENBERG; DEJMEK; SKRIVER, 2005). Em análise de *labneh* a microscopia eletrônica de varredura mostrou que os produtos com maior teor de proteínas tinham estrutura mais compacta e poros menores que suas contrapartidas de índice de proteínas mais baixo (OZER *et al.*, 1999).

O iogurte é um gel que aparece como uma rede tridimensional de cadeias e agregados de micelas de caseína, com espaços preenchidos por soro, contendo lactobacilos e estreptococos. O trabalho de Kalab e Harwalker (1974) ilustrou a relação entre microestrutura e propriedades mecânicas, com o estudo da força

necessária para penetração (firmeza) em géis produzidos com várias concentrações de sólidos (40 a 60%) e suas respectivas micrografias. Ocorreu aumento não-linear da firmeza com aumento da concentração. As micrografias mostraram a formação de uma rede de caseína, que resultou em maior resistência à penetração do corpo de prova.

Uma análise da influência do tratamento térmico na estrutura de iogurte batidos através de análise de microscopia foi descrita por Skriver, Hansen e Qvist (1997). As imagens tridimensionais obtidas na microscopia foram analisadas através de *software* para análise de imagens. Foi feita uma segmentação baseada na discriminação do brilho, na qual um nível de ponto inicial foi estabelecido para cada imagem, estas foram transformadas em um plano e passadas para branco e preto, formando imagens binárias. As imagens em branco e preto foram analisadas através da separação dos agregados de caseína e espaços entre eles, sendo analisados os tamanhos e as quantidades dos agregados (SKRIVER; HANSEN; QVIST, 1997).

2.4.2. Viabilidade das bactérias lácticas

Historicamente, as bactérias lácticas são incorporadas aos alimentos com o objetivo de reduzir perdas por deterioração e prolongar a vida-de-prateleira. Com as pesquisas sobre os efeitos benéficos à saúde expandiu-se grandemente o interesse comercial sobre essas bactérias (McCARTNEY, 2005).

Além de suas propriedades desejadas para a saúde, o desenvolvimento de produtos funcionais contendo probióticos requer o atendimento das exigências de sobrevivência e estabilidade durante o armazenamento do produto. Como já mencionado no item 2.2.4., enquanto alguns pesquisadores sugerem a concentração de 10^6 ufc/mL (KURMAN; RASIC, 1991) para se atingir os efeitos terapêuticos, outros sugerem de 10^7 a 10^8 ufc/mL (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; LOURENS-HATTINGH; VILJEON, 2001). Os principais fatores apontados como responsáveis pela perda de viabilidade dos probióticos são o valor de pH do meio e o acúmulo de ácidos orgânicos resultantes da fermentação (SHAH, 2000).

A correta identificação das espécies é de fundamental importância, assim como a declaração no rótulo do produto de quais as espécies realmente presentes. As estirpes podem ser identificadas usando-se métodos de biologia molecular

(GUEIMONDE; SALMINEN, 2006). Os modernos métodos de identificação se baseiam menos na capacidade de fermentação de determinados carboidratos e mais nas características genotípicas e fenotípicas, baseadas em análise molecular.

A quantificação por métodos de plaqueamento em meios seletivos é largamente aplicada. Diferentes meios, chamados meios seletivos, e diferentes condições de incubação (temperatura, tempo, atmosfera) promovem a melhora do crescimento do grupo de interesse. Entretanto, há poucos meios realmente seletivos disponíveis (McCARTNEY, 2005). É importante lembrar que o crescimento em meio seletivo presume qual é a bactéria, mas necessita de caracterização posterior.

O uso de anaerobiose é essencial para o crescimento de bifidobactérias; assim, quando se enumera lactobacilos em mistura com as bífidas, as primeiras são freqüentemente incubadas em aerobiose para inibir o crescimento das últimas. O tempo de incubação também é importante na diferenciação, já que algumas crescem mais rapidamente que outras. É recomendável checar o crescimento nas placas por alguns dias consecutivos, assegurando que as colônias pequenas não sejam perdidas na contagem (McCARTNEY, 2005).

2.5. METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA E OTIMIZAÇÃO

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) é uma técnica estatística largamente empregada em pesquisa química, nas áreas de ciência de alimentos, de nutrição e de desenvolvimento de produtos. Como resultado do emprego da técnica se obtém modelos matemáticos para as variáveis dependentes estudadas. Desses modelos são gerados diagramas de imagem tridimensional de superfícies de resposta na região investigada, descrevendo as variáveis, suas interações e o efeito combinado sobre as respostas. Em muitos casos modelos de primeira ou de segunda ordem são adequados para as funções resposta. É bastante comum a aproximação dos parâmetros em modelos de segunda ordem, que são flexíveis e resolvem bem os problemas reais (CORNELL, 1981; BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

A MSR se inicia com a modelagem, que normalmente é feita ajustando-se modelos simples (em geral, lineares ou quadráticos) às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O passo seguinte é a busca pela região na qual a resposta varia de forma mais pronunciada, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

A aplicação da MSR é bastante focada na otimização de parâmetros de processos industriais e de nutrientes em formulações de alimentos. As principais vantagens da técnica podem ser resumidas em:

- (i) capacidade de explorar todas as combinações possíveis entre as variáveis selecionadas com um número mínimo de experimentos,
- (ii) possibilidade de ajustar um modelo polinomial preditivo para as respostas e
- (iii) oportunidade de otimizar uma resposta comum que satisfaça simultaneamente os diversos modelos (CASTRO *et al.*, 2006).

A Metodologia de Superfície de Resposta para Mistura é um modelo de experimento na qual as propriedades são determinadas pelas proporções dos ingredientes e não por valores absolutos (CORNELL, 1981; BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001). A soma dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%. Para uma mistura qualquer de q componentes pode-se escrever:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1$$

Equação 1

Em que x_i representa a proporção do i -ésimo componente. Esta equação retira um grau de liberdade das proporções, assim, para especificar a composição da mistura, basta fixar as proporções de $q-1$ componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%.

Para misturas de três componentes independentes o espaço experimental limita-se aos pontos pertencentes a um triângulo, que representa todas as possíveis misturas dos componentes. Para a mistura de três componentes deve-se obedecer à restrição $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, que define um triângulo equilátero. A Figura 6 representa um exemplo de diagramas obtidos para um experimento de mistura de três componentes, com suas curvas de nível e superfície de resposta que representam todas as composições possíveis da mistura ternária (área interior do triângulo), misturas binárias (lados do triângulo) e componentes puros (vértices do triângulo). A superfície desenhada acima do triângulo equivale às respostas para uma dada propriedade avaliada.

Figura 6. Curvas de nível e superfície de resposta para um modelo quadrático preditivo para todas as possíveis misturas dos componentes X_1 , X_2 e X_3 em um experimento de mistura, obtidas utilizando o programa Statistica

O modelo linear é o mais simples e é dado pela equação estimativa da resposta de interesse ($\hat{y}$):

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3$$

Equação 2

com a restrição: $x_1 + x_2 + x_3 = 1$.

Substituindo o termo b_0 por $b_0(x_1 + x_2 + x_3)$ e agrupando os termos em x_i , obtém-se:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3, \text{ sendo } b_i^* = b_0 + b_i, \text{ para } i = 1, 2 \text{ e } 3.$$

Equação 3

Em casos nos quais o modelo linear não satisfaz, deve-se partir para o modelo quadrático, cuja expressão geral será dada por:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

Equação 4

Substituindo as relações $1 \times b_0 = (x_1 + x_2 + x_3) \times b_0$ e $b_{11}x_1^2 = b_{11}x_1(1 - x_1 - x_2)$, além de expressões análogas para $b_{22}x_2^2$ e $b_{33}x_3^2$, e agrupando os termos, tem-se:

$$\hat{y} = b_1^*x_1 + b_2^*x_2 + b_3^*x_3 + b_{12}^*x_1x_2 + b_{13}^*x_1x_3 + b_{23}^*x_2x_3$$

Equação 5

Em que $b_i^* = b_0 + b_i + b_{ii}$ e $b_{ij}^* = b_{ij} - b_{ii} - b_{jj}$, com $i \neq j$

Assim, a Equação 4 se reduz de dez para seis coeficientes, nos quais os termos da equação descrevem as interações entre dois componentes e conseguem reproduzir satisfatoriamente os valores das respostas nos vértices e nas arestas do triângulo de concentrações, que representam os componentes puros e suas misturas binárias, respectivamente. Para determinar seus valores precisa-se de um planejamento experimental contendo pelo menos seis ensaios distintos. Um planejamento experimental de misturas muito empregado é chamado de *planejamento simplex em rede*.

Pode ocorrer que efeitos não aditivos envolvendo a presença simultânea dos três componentes sejam importantes para descrever a resposta de determinadas misturas ternárias (os pontos no interior do triângulo). Nesse caso, o modelo quadrático se mostrará insuficiente e será necessário acrescentar-lhes termos cúbicos.

O modelo cúbico completo exige no mínimo 10 ensaios diferentes para determinar os valores dos 10 componentes do modelo. Para muitas situações práticas isso é um exagero e basta introduzir um termo cúbico para que o modelo passe a descrever satisfatoriamente toda a região experimental. O modelo cúbico especial (após as substituições, como efetuadas nos modelos anteriores) possui apenas um termo a mais que o quadrático, portanto, só precisa de um ensaio adicional:

$$\hat{y} = b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 x_2 + b_{13} \cdot x_1 x_3 + b_{23} \cdot x_2 x_3 + b_{123} \cdot x_1 x_2 x_3$$

Equação 6

O planejamento experimental normalmente empregado para determinar valores dos coeficientes do modelo cúbico especial é o chamado *centróide simplex*, obtido pelo acréscimo de um ponto central ao *simplex em rede*, correspondente à mistura ternária em partes iguais (1/3, 1/3, 1/3).

Os modelos passam por uma avaliação da significância estatística, através da análise de variância. Uma maneira de testar a qualidade dos modelos é determinar novas respostas para misturas não usadas na modelagem e comparar os resultados obtidos com os valores previstos por cada modelo. Outro modo de testar é realizar uma análise de variância incluindo falta de ajuste, quando se tem um número maior de ensaios do que parâmetros para todos os modelos (CORNELL, 1981; BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2001).

Um problema no desenvolvimento de produtos é encontrar uma determinada concentração de ingredientes ou a contribuição das variáveis que resulte no produto mais desejável quanto às suas características, ou respostas para as variáveis dependentes, chamada de otimização. O procedimento usado para resolver o problema geralmente envolve duas etapas:

- (i) determinação das respostas preditivas para as variáveis dependentes, ajustando as respostas observadas através de uma equação baseada nos níveis das variáveis independentes e
- (ii) determinação dos níveis de um número de variáveis que simultaneamente produza a mais desejável resposta preditiva na equação do modelo $\hat{Y}$.

Uma opção de metodologia para otimização foi proposta por Derringer e Suich (1980). Esta se baseia em encontrar a região ótima em função dos modelos preditivos obtidos e dos limites desejáveis das variáveis em estudo. O programa *Statistica* (*StatSoft*) utiliza a função de desejabilidade (*desirability*) para a alcance da região ótima .

Através dessa metodologia identifica-se qual a proporção ideal entre os componentes da mistura que resultará no melhor desempenho do experimento. Cada resposta obtida a partir do modelo ajustado e validado é transformada em uma função normalizada. O valor de desejabilidade varia de 0 (mínimo) a 1 (máximo). Modelos preditivos ajustados (da mesma ordem) podem ser empregados para a otimização conjunta de 2 ou mais respostas. Os resultados obtidos no universo de testes devem ser considerados pelo pesquisador como mais ou menos desejáveis, classificando-os entre 0 e 1. Todas as funções individuais são combinadas em uma única função global de desejabilidade (D) pelo aplicativo. A otimização multirresposta se reduz à maximização do valor de D. A desejabilidade será expressa em porcentagem obtida pela metodologia para atingir os parâmetros especificados como objetivo na classificação de 0 a 1.

Através da Metodologia de Superfície de Resposta identifica-se qual a proporção ideal entre os componentes da mistura que resultará no melhor desempenho do experimento.

Uma maneira segura de testar a qualidade dos modelos resultantes é determinar novas respostas para misturas que não foram usadas na modelagem e comparar os resultados observados com os previstos nos modelos (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A Metodologia de Superfície de Resposta tem sido usada com sucesso como ferramenta em pesquisas envolvendo bactérias lácticas, probióticas e outros

microrganismos. Dentre estas pesquisas podem-se citar trabalhos de otimização da composição meios de cultura (LEE; CHEN, 1997), modelagem do processo de acidificação e das propriedades reológicas de iogurte (KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003), otimização da remoção de colesterol por probióticos (LIONG; SHAH, 2005), desenvolvimento de produtos simbióticos (CARDARELLI, 2006).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-culturas com *Streptococcus thermophilus*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito e a interação dos ingredientes na produção dos bioiogurtes usando a Metodologia de Superfície de Resposta para Mistura.
- ✓ Otimizar a mistura de suplementação, buscando reduzir o tempo de fermentação para co-culturas.
- ✓ Avaliar o perfil de acidificação das culturas puras e co-cultura em leite controle e leite suplementado.
- ✓ Avaliar o comportamento do bioiogurte fermentado que apresentar o melhor resultado de redução de tempo de fermentação em função da suplementação, quanto às seguintes características: (i) perda de viabilidade durante armazenamento refrigerado; (ii) pós-acidificação; (iii) propriedades de textura; (iv) microestrutura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1.2. Obtenção do bioiogurte contendo probióticos

O processo de produção para obtenção dos bioiogurtes está representado esquematicamente na Figura 7.

Figura 7. Diagrama de blocos da obtenção de bioiogurtes

4.1.3. Ingredientes, preparo da mistura e delineamento experimental

Para a preparação do bioiogurte utilizou-se, como principal componente, leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) diluído em água destilada. Para a obtenção das misturas utilizaram-se os ingredientes selecionados: hidrolisado de caseína (HC) (Merck, Darmstad, Alemanha), proteína concentrada de soro (PCS) (ISP do Brasil, Cabreúva, Brasil) e leite em pó desnatado (LPD) (Molico, Nestlé, Brasil). O hidrolisado de caseína e a proteína concentrada de soro são ingredientes com teor de proteína semelhantes, de aproximadamente 80g/100g (78,4 e 81,2g/100g, respectivamente). O leite em pó desnatado tem apenas 35g de proteína /100g, mas é um ingrediente largamente empregado para padronização do teor de sólidos na produção de iogurte, assim procurou-se verificar o efeito de concentrações adicionais acima da concentração usada na amostra controle. A Tabela 2 mostra a composição empregada no preparo dos bioiogurtes.

Tabela 2: Composição da formulação básica dos bioiogurtes

Ingrediente	%
Leite em pó desnatado	11,8
Água destilada	87,0
Mistura (X_1 , X_2 , X_3)	1,2

X_1 : hidrolisado de caseína (HC); X_2 : concentrado protéico de soro (CPS); X_3 : leite em pó desnatado (LPD)

A combinação de ingredientes definida para a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) para misturas, de acordo com o delineamento de mistura para três componentes, determinou as concentrações dos componentes em cada ensaio (Tabela 3). Um ensaio controle com 12% de leite em pó desnatado diluído em água destilada foi feito para comparação com os leites suplementados. Esse leite controle foi tratado termicamente como os demais ensaios e fermentado pelas três combinações de co-culturas.

O delineamento experimental foi escolhido com o objetivo de manter uma composição pouco variável quanto ao teor de sólidos e de proteínas, que são dois fatores com grande influência nas propriedades finais do iogurte, produto modelo buscado na produção dos bioiogurtes. Os fatores testados são o hidrolisado de caseína (HC), a proteína concentrada de soro (PCS) e o leite em pó desnatado (LPD). O delineamento experimental utilizou a MSR para misturas simples com um ponto central (*centróide simplex*) e três fatores, apresentado na Tabela 3 e Figura 8. Foram realizadas 3 repetições para a mistura tripla.

Tabela 3. Delineamento experimental tipo *centróide simplex* para otimização da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado para a produção de bioiogurtes

Ensaio	Variáveis codificadas*			Variáveis originais (g/100g)		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	1	0	0	1,2	0,0	0,0
2	0	1	0	0,0	1,2	0,0
3	0	0	1	0,0	0,0	1,2
4	½	½	0	0,6	0,6	0,0
5	½	0	½	0,6	0,0	0,6
6	0	½	½	0,0	0,6	0,6
7	⅓	⅓	⅓	0,4	0,4	0,4

X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: concentrado protéico de soro (CPS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

Os valores originais dos componentes (X₁, X₂, X₃) equivalem à proporção dos ingredientes na mistura da base láctea sem tratamento térmico utilizada para a produção dos bioiogurtes. Os ensaios foram aleatorizados e a análise estatística da

Metodologia de Superfície de Resposta para Mistura foi aplicada usando o *software* Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

Os componentes secos foram misturados, diluídos em água destilada, misturados com auxílio de agitador magnético por 15 minutos e submetido a tratamento térmico em banho de água em ebulição até a mistura atingir 90°C com 5 minutos de retenção. Após o tratamento térmico, a mistura foi resfriada em banho de gelo até 15°C, distribuída em frascos de 250mL previamente esterilizados, usando câmara de fluxo laminar, e acondicionados a 4°C por 24 horas (Figura 5).

Figura 8. Delineamento experimental tipo *centróide simplex* usado no estudo do efeito simultâneo da suplementação com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado em bioiogurte. X_1 : hidrolisado de caseína (HC); X_2 : proteína concentrada de soro (PCS); X_3 : leite em pó desnatado (LPD)

4.1.4. Bioiogurte otimizado

Depois de encontrada a combinação de concentração de ingredientes pela metodologia de otimização através da função de desejabilidade, usando o *software* Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, Estados Unidos), foi produzido um bioiogurte suplementado no ponto ótimo para estudo de estabilidade ao armazenamento, juntamente com amostra controle não suplementada.

4.1.5. Culturas lácticas

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

- ST (TA040), *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, Danisco, França;
- LA, (LAC 4), *Lactobacillus acidophilus*, Danisco, França;
- LB (LB 340), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, Danisco, França;
- BL (BL04) *Bifidobacterium lactis*, Danisco, França.

4.1.6. Preparo do inóculo

Cada cultura lática liofilizada foi diluída separadamente em 50mL de leite desnatado reconstituído (10% m/m) (Molico, Nestlé, Brasil) previamente autoclavado a 121°C por 10 minutos e resfriado a 42°C. A seguir, as suspensões foram agitadas manualmente por 30 segundos e deixadas em repouso por 40 minutos antes da inoculação do leite. Essas suspensões de culturas puras são os inóculos.

A partir das suspensões, procedeu-se à inoculação dos leites, de forma a combinar *S. thermophilus* (ST) com as demais culturas puras para obtenção das co-culturas: *L. bulgaricus* (STLB), *L. acidophilus* (STLA) e de *B. lactis* (STBL). Foi usado 1mL de inóculo de ST junto com 1mL de cada uma das suspensões de LB, LA e BL em 250mL de leite (0,4% v/v) suplementado segundo a composição dos Ensaio 1 a 7). Após a adição dos inóculos, procedeu-se à agitação dos frascos por 1 minuto e foram retiradas alíquotas de 1mL para contagem das populações iniciais no tempo zero.

4.1.7. Fermentação

Os frascos contendo o leite foram colocados em banho termostaticado até estabilização da temperatura a 42°C. A seguir, adicionaram-se os inóculos, os frascos foram agitados manualmente por 40 segundos e alíquotas de 1mL foram retiradas para a contagem do número inicial de bactérias do leite a ser fermentado.

Os frascos foram acoplados ao sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França – Figura 9) e a cinética de acidificação foi obtida à medida que o Sistema CINAC registrou continuamente os valores de pH (em intervalos de 2 minutos) até o pH final desejado (pH 4,5) para cálculos posteriores. A seguir, o coágulo foi quebrado por agitação manual (a 42°C) com haste de aço inoxidável, através de movimentos

ascendentes e descendentes durante um minuto, evitando a incorporação de ar (Figura 10a). Os leites fermentados foram então acondicionados em potes plásticos de 50mL. Os potes foram selados em seladora térmica Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) (Figura 10b), resfriados em banho de gelo e estocados a 4 °C.

Figura 9. Sistema Cinac: banho termostatzado contendo os frascos com a mistura da base láctea. Os eletrodos são conectados à interface com o computador

Figura 10. Quebra do coágulo (a) e seladora (b) usada para selagem das tampas dos potes plásticos

4.2. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

A medida da atividade acidificante das misturas de culturas lácticas foi obtida através do Sistema CINAC, um método automático para a quantificação da atividade de uma cultura *starter* com base em medidas de valores de pH (SPINNLER; CORRIEU, 1989).

A partir dos valores de pH registrados foram traçadas curvas em função do tempo. As derivadas destas curvas forneceram as velocidades de acidificação, expressas em miliunidades de pH/min (10^{-3} upH/min). No final do período de incubação foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos:

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

A Figura 11 apresenta exemplos de curvas de acidificação (pH x tempo) das quais 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.

Estudo do tempo para se atingir a velocidade máxima de acidificação – $t_{V_{\max}}$ – e tempo para se atingir pH 5,0 – $t_{pH5,0}$ – são utilizados como medida da atividade acidificante das culturas lácticas (SPINLER E CORRIEU, 1989; BÉAL; CORRIEU, 1994; BEAL *et al.*, 1999; FONSECA; BÉAL; CORRIEU, 2000).

As determinações de parâmetros cinéticos foram feitas em duplicata.

Figura 11. Exemplo de curvas de diminuição de pH e velocidade de acidificação (dpH/dt) de leites fermentados por co-cultura de *S. thermophilus* com *L. bulgaricus*, com *L. acidophilus* e com *B. lactis*

4.3. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

4.3.1. Sólidos totais

O teor de sólidos totais dos leites suplementados foi determinado gravimetricamente em estufa a vácuo, Marconi mod. MA 030/12 (Piracicaba, Brasil), pressão -650 mmHg, a 70°C, até peso constante. Os resultados foram expressos em percentual de sólidos totais (CASE; BRADLEY; WILLIAMS, 1992).

4.3.2. Valor de pH

A pós-acidificação foi determinada pela medida do valor de pH (pH) usando potenciômetro Quimis modelo Q-400M1 (São Paulo, Brasil), após 1 dia de armazenamento do produto a 4°C, para as amostras obtidas nos ensaios 1 a 7 do delineamento experimental (Tabela 3) e controle.

Amostras do bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo foram analisadas em duplicata em após 1 (d1), 7 (d7), 14 (d14), 21 (d21) e 28 (d28) dias de armazenamento dos produtos a 4°C.

4.3.3. Proteínas

As determinações de proteínas foram realizadas usando-se o método descrito em Brasil (2003). O teor de nitrogênio dos suplementos foi determinado pelo método de Micro-Kjeldhal (AOAC, 1980). A proteína bruta foi calculada em função do nitrogênio total. O resultado é expresso multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total por 6,38, que é o fator específico de conversão da relação nitrogênio/proteína para leite.

As análises físico-químicas foram feitas em triplicata, após 24h de armazenamento do produto a 4°C.

4.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Amostras de bioiogurte (1mL) , dos leites suplementados inoculados 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, de acordo com métodos descritos pelas normas do *International Dairy Federation* (IDF, 1997, 2003). *L. acidophilus* foi enumerado em MRS ágar (Merck, São Paulo, Brasil) com pH 5,4, após incubação anaeróbica a 37°C por 72h. *L. bulgaricus* foi enumerado em MRS ágar (Merck, São Paulo, Brasil) com pH 5,4, após incubação aeróbica a 37°C por 48h. *B. lactis* foi enumerado em MRS ágar (Merck, São Paulo, Brasil) com pH 6,2, após incubação anaeróbica por 72h. *S. thermophilus* foi enumerado em M17 (Merck, São Paulo, Brasil), 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). As análises microbiológicas foram feitas em duplicata, após 1 dia de armazenamento do produto a 4°C, para as amostras obtidas nos ensaios 1 a 7 do delineamento experimental (Tabela 3) e controle.

Amostras do bioiogurte controle e suplementado no ponto foram analisadas em duplicata após a fermentação após 1 (d1), 7 (d7), 14 (d14), 21 (d21) e 28 (d28) dias de armazenamento dos produtos a 4°C.

4.5. DETERMINAÇÃO DA FIRMEZA

A análise de firmeza dos bioiogurtes foi feita no produto acondicionado em pote plástico de 5,5cm de diâmetro, após 24h de armazenamento a 4–6°C, através de teste de dupla compressão (TPA), em analisador de textura TA-XT2 (*Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra*), equipado com *probe* modelo cilindro acrílico com 25 mm de diâmetro, com carga de 5kg. A distância percorrida pelo cilindro na amostra foi de 10mm (25% da profundidade), na velocidade de pré-teste de 5mm/s, e de 10mm/s após a penetração (Oliveira *et al.*, 2001). O atributo firmeza em N foi determinado segundo recomendações de Pons e Fiszman (1996) e correspondeu à altura do pico da curva de compressão (Figura12).

Figura 12. Detalhe do *probe* e da embalagem do bioiogurte imediatamente antes da realização do ensaio e curva típica obtida em teste TPA, usando analisador de textura TA-XT2, no qual a firmeza corresponde à altura do primeiro pico

As análises de firmeza foram feitas em triplicata, com duas repetições por ensaio, usando novas amostras, para as amostras obtidas nos ensaios 1 a 7 do delineamento experimental (Tabela 3) e controle.

Amostras do bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo foram analisadas em triplicata (com duas repetições por ensaio) após a fermentação (d1) e semanalmente no produto sob armazenamento a 4°C até o final do estudo de estabilidade ao armazenamento, determinada pela contagem de *L. acidophilus* viáveis.

4.6. CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

A caracterização reológica foi realizada nas amostras obtidas na fase de avaliação de estabilidade ao armazenamento dos ensaios com bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo para a co-cultura STLA. Esses parâmetros foram determinados por teste rotacional e oscilatório, a 10°C, em reômetro MCR 300 (*Physica, Stuttgart, Alemanha*), com geometria de placas paralelas (50mm diâmetro e 1,0mm *gap*), conectado com computador, para aquisição de dados, usando controlador de temperatura *Peltier*.

Testes para avaliação de limite de escoamento (*yield stress* – τ_0) foram conduzidos através de rampa de tensão de cisalhamento ($\tau = 1$ a 100Pa) e medida

da deformação (γ) resultante. No limite de escoamento, a inclinação da curva muda de forma acentuada indicando o início do escoamento.

Figura 13. Exemplo de curva obtida em ensaio de determinação de limite de escoamento do bioogurte, em reômetro MCR 300

Testes de varredura de amplitude foram realizados a fim de se estabelecer o módulo de armazenamento G' , o módulo de perda G'' . A percentagem de deformação variou entre 0,01 e 50%, a frequência constante de 1Hz. A região limite de viscoelasticidade linear (LVE) foi determinada para o valor de deformação no qual a queda de G' foi de 5% (LUCEY, 1998).

Figura 14. Exemplo de curvas obtidas para dois produtos diferentes em ensaios de varredura de amplitude do bioogurte, em reômetro MCR 300

A recuperação estrutural foi estudada por ensaio em três passos: (i) estado similar ao repouso (amplitude 0,5% e frequência 1Hz, 10s – faixa de viscoelasticidade linear); (ii) alta taxa de cisalhamento, quando ocorre a

decomposição estrutural (taxa de cisalhamento de 801/s, 10s); (iii) estado similar ao repouso para recuperação estrutural (amplitude 0,5% e frequência 1Hz, 1.000s).

Os parâmetros reológicos avaliados foram: tensão limite de escoamento, módulo de armazenamento (G'), módulo de perda (G''), região de viscoelasticidade linear (LVE) e porcentagem de recuperação estrutural.

Figura 15. Exemplo de curva obtida em ensaio de recuperação estrutural do bioiogurte, em reômetro MCR 300

Os testes reológicos foram feitos um dia após a fermentação (d1) e semanalmente no produto sob armazenamento a 4°C até o final do estudo de estabilidade ao armazenamento, determinada pela contagem de *L. acidophilus* viáveis, considerando o final do estudo a última época onde a contagem de LA foi superior a 10^6 ufc/mL. Os testes foram realizados em duplicata para os ensaios de varredura e recuperação estrutural, e em quadruplicata, para os ensaios de limite de escoamento.

As amostras resfriadas foram depositadas cuidadosamente na placa do reômetro, usando uma colher de medida.

As análises foram conduzidas no laboratório GRESO – Grupo de Reologia em Sistemas Organizados, do Instituto de Química da USP, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Regina Alcântara.

4.7. DETERMINAÇÃO DE MICROESTRUTURA

As análises de microestrutura foram realizadas em amostras de bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo, fermentados pela co-cultura STLA. Após 24h do armazenamento a 4 °C as amostras foram liofilizadas em liofilizador Edwards L4KR modelo 118 (BOC Edwards, São Paulo, Brasil). O preparo das amostras depois de liofilizadas incluiu: i) fixação em fita metálica adesiva dupla face, fixada sobre discos metálicos do microscópio (*stubs*) e ii) metalização, quando foram cobertas por fina camada de ouro (Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Física da USP) em metalizador Edwards S150 (Edwards High Vacuum, Manor Royal, Crawley, Inglaterra).

A análise de microscopia foi realizada em conjunto com o Laboratório de Microscopia da Central Analítica do Instituto de Química da USP, usando-se um microscópio eletrônico de emissão de campo de catodo frio (*Field Emission Electron Microscope* - JEOL JSM-7401-F, JEOL Ltd, Tóquio, Japão), operando-se na tensão de 1,0 a 10 quilovolts. As imagens foram registradas sob ampliações de 5.000x a 10.000x e aproximadamente seis campos foram observados. As imagens obtidas foram analisadas usando-se o programa Image Pro Plus, v.4.5.1 (Media Cybernetics, Bethesda, Estados Unidos). Através deste programa as imagens tridimensionais obtidas na microscopia foram transformadas em um plano e passadas para branco e preto, quando foi possível separar os agregados de caseína e espaços entre eles e analisar os tamanhos de um ou outro, que correspondem às regiões nas quais o soro foi retido na rede de proteína (SKRIVER; HANSEN; QVIST, 1997). Foram analisados os tamanhos e as quantidades dos poros.

4.8. ANÁLISE ESTÁTICA

Os resultados experimentais obtidos para as variáveis dependentes cinética de acidificação (V_{max} , t_{Vmax} , $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$ e $t_{pH4,5}-t_{pH5,0}$), pH, firmeza e contagem de bactérias viáveis, para os sete ensaios, foram inicialmente submetidos a teste de normalidade e homogeneidade das variâncias (Levene), seguido de análise de variância (ANOVA). Respostas que apresentaram variância significativa e

homogênea foram ajustadas a modelos polinomiais, para obtenção dos coeficientes de regressão, e tratadas estatisticamente na modelagem das variáveis resposta.

Através de análise de variância (ANOVA) da regressão e do coeficiente de determinação (R^2), a qualidade do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi verificada ($p < 0,05$). As repetições forneceram graus de liberdade para a obtenção do erro puro e análise de falta de ajuste. Os resultados foram apresentados graficamente na forma de diagramas triangulares.

A otimização seguiu a metodologia proposta por Derringer e Suich (1980), que busca encontrar a região ótima em função dos modelos preditivos obtidos e dos limites desejáveis das variáveis em estudo, resultando na função de desejabilidade (*desirability*).

O teste qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparação dos valores estimados e observados obtidos em três ensaios em pontos aleatórios dentro da área experimental definida, para testar a qualidade do ajuste dos modelos (BARROS NETO, SCARMINIO e BRUNS, 2001).

Análise (ANOVA) bifatorial foi realizada para avaliar o efeito da cultura e do suplemento empregado.

O efeito dos ingredientes como componente único, mistura binária e ternária foi analisado por análise de variância (ANOVA) e teste de contrastes (Tukey HDS – $p < 0,05$).

Análise de variância (ANOVA) bifatorial e posterior teste de contrastes (Tukey HDS – $p < 0,05$) foram empregados para detectar diferenças significativas entre médias comparando os períodos de armazenamento (d1 a d28) e o bioiogurte (contorle e ótimo), para os parâmetros físico-químicos, de textura e viabilidade das culturas.

Todos os cálculos e gráficos foram obtidos com o auxílio do *software* Statistica 6.0 (Statisoft, Tulsa, Estados Unidos).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinações das concentrações de proteína e sólidos totais das misturas

A Tabela 4 apresenta a composição média de proteína e sólidos totais de cada mistura obtida, de acordo com as composições definidas pelo delineamento experimental (Tabela 3).

Tabela 4. Valores médios* $\pm$ DP da composição de proteína e sólidos totais das misturas correspondentes aos ensaios 1 a 7 do delineamento experimental e controle

Número do Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura	Proteína (g/100g)	Sólidos totais (g/100g)
1	(1, 0, 0)	5,50 $\pm$ 0,10 ^{bc}	14,52 $\pm$ 0,17 ^a
2	(0, 1, 0)	5,08 $\pm$ 0,09 ^{ab}	14,11 $\pm$ 0,47 ^a
3	(0, 0, 1)	5,16 $\pm$ 0,20 ^{ab}	14,54 $\pm$ 1,02 ^a
4	(1/2, 1/2, 0)	5,08 $\pm$ 0,03 ^{ab}	13,63 $\pm$ 0,30 ^a
5	(1/2, 0, 1/2)	4,87 $\pm$ 0,13 ^a	14,26 $\pm$ 0,34 ^a
6	(0, 1/2, 1/2)	5,32 $\pm$ 0,06 ^{abc}	14,00 $\pm$ 0,45 ^a
7	(1/3, 1/3, 1/3)	5,64 $\pm$ 0,34 ^c	13,90 $\pm$ 0,22 ^a
Controle	-	4,42 $\pm$ 0,13	12,60 $\pm$ 0,54

^{a, b}: Valores na mesma coluna com letras diferentes diferem significativamente ($p \leq 0,05$) para os Ensaios 1 a 7;

*média de três determinações;

X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: proteína concentrada de soro (PCS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

As análises de teor de proteínas e sólidos totais foram realizadas nos leites suplementados após tratamento térmico e resfriamento. Os valores obtidos correspondem aos valores reais utilizados na fermentação, lembrando-se que o leite pode ter perdido umidade por evaporação durante o tratamento térmico. O

tratamento térmico descontínuo permite a evaporação de pequena parcela de água, mas buscou-se padronizar esse procedimento de forma a reduzir essa perda.

Considerando-se os resultados de análise de proteína dos leites suplementados pode-se observar que o teor variou de 4,87 a 5,64g/100g, ocorrendo variação significativa entre as misturas. A variação do teor de proteína é esperada, desde que os ingredientes que compõem a mistura tenham diferentes teores de proteína: $X_1 = \text{HC: } 77,77 \pm 1,81\text{g/100g}$; $X_2 = \text{PCS: } 77,22 \pm 10,97\text{g/100g}$; $X_3 = \text{LPD: } 33,37 \pm 0,73\text{g/100g}$. O teor de proteínas das misturas está próximo de 5g/100g, valor recomendado para a produção de iogurte (FOX, 2001; TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001). O leite controle tem teor de proteína de 4,42 g/100g.

A análise de correlação (resultados não apresentados) entre o teor de proteína das misturas e as variáveis respostas obtidas para os parâmetros cinéticos, físico-químicos ou contagens de microrganismos viáveis não se mostrou significativa.

O teor de sólidos totais do leite controle foi de 12,60 g/100g, enquanto o das misturas variou de 13,90 a 14,5 g/100g. A diferença entre as amostras não foi significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Esses valores estão de acordo com o recomendado pela literatura para a produção de iogurte. Segundo Tamime, Robinson e Latrille (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%.

5.2. Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado em bioiogurtes fermentados por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. bulgaricus*, com *L. acidophilus* e com *B. lactis*

Os resultados desta pesquisa são apresentados de acordo com os ensaios de números 1 a 7 do delineamento experimental (Tabela 3) de mistura *centróide simplex* realizado juntamente com os resultados do leite controle. Os fatores testados são o hidrolisado de caseína (HC), a proteína concentrada de soro (PCS) e o leite em pó desnatado (LPD), que correspondem às variáveis independentes X_1 , X_2 e X_3 , respectivamente.

5.2.1. Parâmetros cinéticos

Os resultados referentes aos efeitos da suplementação do leite e da composição da cultura nos parâmetros cinéticos dos bioiogurtes fermentados por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. bulgaricus* (STLB), com *L. acidophilus* (STLA) e com *B. lactis* (STBL) estão resumidos nas Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente.

A análise inicial dos parâmetros cinéticos mostra que os ensaios que apresentam as maiores velocidades máximas de acidificação (V_{max}) não correspondem ao de menor tempo para se atingir a velocidade máxima ($t_{V_{max}}$), ou ao de menor tempo para se atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), nem o menor tempo de fermentação ($t_{pH4,5}$). Entretanto, comparando o tempo para se atingir a V_{max} ($t_{V_{max}}$) com $t_{pH4,5}$, vê-se que os menores tempos dos dois parâmetros correspondem ao mesmo número de ensaio, indicando a condição de maior atividade das culturas nesses números de ensaios: 4, 5 e 7, para as co-culturas STLB, STLA e STBL, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7). A diferença de tempo entre atingir o pH 5,0 e o pH 4,5 ($t_{pH4,5} - t_{pH5,0}$) foi analisada entre os parâmetros cinéticos, pois variou com as diferentes composições.

Tabela 5. Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus* (STLB), de acordo com o delineamento experimental e controle

Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura (X ₁ , X ₂ , X ₃)	V _{max} ¹ (10 ⁻³ upH/min)	t _{Vmax} ¹ (h)	t _{pH5,0} ¹ (h)	t _{pH4,5} ² (h)	t _{pH4,5} - t _{pH5,0} ¹ (h)
1	(1, 0, 0)	16,90 $\pm$ 0,42	2,98 $\pm$ 0,03	4,40 $\pm$ 0,02	5,20 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,02
2	(0, 1, 0)	22,25 $\pm$ 1,15	2,94 $\pm$ 0,03	3,34 $\pm$ 0,02	5,03 $\pm$ 0,00	1,69 $\pm$ 0,01
3	(0, 0, 1)	20,80 $\pm$ 0,60	2,95 $\pm$ 0,05	3,45 $\pm$ 0,05	5,22 $\pm$ 0,02	1,76 $\pm$ 0,04
4	(1/2, 1/2, 0)	18,10 $\pm$ 0,10	2,62 $\pm$ 0,07	3,37 $\pm$ 0,04	4,90 $\pm$ 0,02	1,53 $\pm$ 0,03
5	(1/2, 0, 1/2)	18,00 $\pm$ 0,40	2,62 $\pm$ 0,02	3,39 $\pm$ 0,02	5,15 $\pm$ 0,01	1,77 $\pm$ 0,01
6	(0, 1/2, 1/2)	19,85 $\pm$ 1,30	2,72 $\pm$ 0,15	3,50 $\pm$ 0,03	5,20 $\pm$ 0,02	1,70 $\pm$ 0,02
7	(1/3, 1/3, 1/3)	17,80 $\pm$ 0,50	2,62 $\pm$ 0,10	3,39 $\pm$ 0,02	5,15 $\pm$ 0,05	1,86 $\pm$ 0,04
Controle	-	22,10 $\pm$ 0,60	3,10 $\pm$ 0,28	3,70 $\pm$ 0,05	5,50 $\pm$ 0,02	1,80 $\pm$ 0,03

V_{max}: velocidade máxima de acidificação; t_{Vmax}: tempo para atingir a V_{max}; t_{pH5,0}: tempo para atingir pH 5,0; t_{pH4,5}: tempo para atingir pH 4,5; t_{pH4,5} - t_{pH5,0}: diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5; X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: proteína concentrada de soro (PCS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

*média de duas determinações

¹ Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) não significativo, $p < 0,05$.

² Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) significativo, $p < 0,05$.

Tabela 6. Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. acidophilus* (STLA), de acordo com o delineamento experimental e controle

Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura (X ₁ , X ₂ , X ₃)	V _{max} ¹ (10 ⁻³ upH/min)	t _{Vmax} ² (h)	t _{pH5,0} ¹ (h)	t _{pH4,5} ¹ (h)	t _{pH4,5} - t _{pH5,0} ¹ (h)
1	(1, 0, 0)	17,85 $\pm$ 0,18	3,04 $\pm$ 0,05	5,17 $\pm$ 0,00	6,92 $\pm$ 0,04	1,73 $\pm$ 0,02
2	(0, 1, 0)	20,60 $\pm$ 0,10	3,00 $\pm$ 0,01	3,72 $\pm$ 0,01	6,69 $\pm$ 0,02	2,97 $\pm$ 0,01
3	(0, 0, 1)	19,75 $\pm$ 0,05	3,12 $\pm$ 0,02	4,17 $\pm$ 0,03	8,70 $\pm$ 0,00	4,53 $\pm$ 0,01
4	(1/2, 1/2, 0)	17,95 $\pm$ 0,85	2,72 $\pm$ 0,08	3,55 $\pm$ 0,02	6,95 $\pm$ 0,20	3,40 $\pm$ 0,10
5	(1/2, 0, 1/2)	17,70 $\pm$ 0,35	2,42 $\pm$ 0,02	3,53 $\pm$ 0,00	6,27 $\pm$ 0,30	2,74 $\pm$ 0,10
6	(0, 1/2, 1/2)	20,45 $\pm$ 0,70	2,85 $\pm$ 0,25	4,02 $\pm$ 0,08	8,22 $\pm$ 0,40	4,20 $\pm$ 0,24
7	(1/3, 1/3, 1/3)	17,00 $\pm$ 0,60	2,88 $\pm$ 0,03	3,50 $\pm$ 0,02	6,52 $\pm$ 0,14	3,51 $\pm$ 0,08
Controle	-	19,20 $\pm$ 0,20	3,20 $\pm$ 0,02	4,30 $\pm$ 0,05	8,40 $\pm$ 0,05	4,10 $\pm$ 0,05

V_{max}: velocidade máxima de acidificação; t_{Vmax}: tempo para atingir a V_{max}; t_{pH5,0}: tempo para atingir pH 5,0; t_{pH4,5}: tempo para atingir pH 4,5; t_{pH4,5} - t_{pH5,0}: diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5; X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: proteína concentrada de soro (PCS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

*média de duas determinações

¹ Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) não significativo, $p < 0,05$.

² Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) significativo, $p < 0,05$.

Tabela 7. Valores médios* $\pm$ DP de respostas para os parâmetros cinéticos de bioiogurtes fermentados por *S. thermophilus* em co-cultura com *B. lactis* (STBL), de acordo com o delineamento experimental e controle

Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura (X_1, X_2, X_3)	$V_{\max}^2$ (10^{-3} upH/min)	$t_{V_{\max}}^1$ (h)	$t_{pH5,0}^2$ (h)	$t_{pH4,5}^1$ (h)	$t_{pH4,5} - t_{pH5,0}^1$ (h)
1	(1, 0, 0)	17,80 $\pm$ 0,28	2,67 $\pm$ 0,05	4,94 $\pm$ 0,10	6,77 $\pm$ 0,24	1,73 $\pm$ 0,15
2	(0, 1, 0)	23,55 $\pm$ 0,75	2,78 $\pm$ 0,05	3,57 $\pm$ 0,01	7,04 $\pm$ 0,26	3,47 $\pm$ 0,15
3	(0, 0, 1)	21,85 $\pm$ 0,15	2,85 $\pm$ 0,05	3,95 $\pm$ 0,02	8,48 $\pm$ 0,35	4,53 $\pm$ 0,20
4	($1/2, 1/2, 0$)	17,00 $\pm$ 0,90	2,52 $\pm$ 0,08	3,62 $\pm$ 0,02	7,45 $\pm$ 0,05	3,83 $\pm$ 0,03
5	($1/2, 0, 1/2$)	19,10 $\pm$ 0,20	2,49 $\pm$ 0,02	3,47 $\pm$ 0,04	6,40 $\pm$ 0,13	2,94 $\pm$ 0,7
6	(0, $1/2, 1/2$)	20,50 $\pm$ 1,40	2,77 $\pm$ 0,25	4,05 $\pm$ 0,05	8,93 $\pm$ 0,10	4,88 $\pm$ 0,06
7	($1/3, 1/3, 1/3$)	17,70 $\pm$ 0,05	2,40 $\pm$ 0,07	3,40 $\pm$ 0,03	6,20 $\pm$ 0,40	3,43 $\pm$ 0,22
Controle	-	20,00 $\pm$ 0,60	3,30 $\pm$ 0,03	4,20 $\pm$ 0,05	8,00 $\pm$ 0,32	3,80 $\pm$ 0,18

$V_{\max}$: velocidade máxima de acidificação; $t_{V_{\max}}$: tempo para atingir a $V_{\max}$; $t_{pH5,0}$: tempo para atingir pH 5,0; $t_{pH4,5}$: tempo para atingir pH 4,5; $t_{pH4,5} - t_{pH5,0}$: diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5; X_1 : hidrolisado de caseína (HC); X_2 : proteína concentrada de soro (PCS); X_3 : leite em pó desnatado (LPD)

*média de duas determinações

¹ Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) não significativo, $p < 0,05$.

² Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) significativo, $p < 0,05$.

O objetivo da suplementação do leite é melhorar a atividade acidificante das culturas probióticas, reduzindo o tempo de fermentação dos leites. Assim, para efeito de comparação, é interessante que os parâmetros de tempos para atingir $V_{\max}$, pH 5,0 e 4,5 indiquem a mesma tendência. Por outro lado, o objetivo do delineamento é analisar os resultados pela Metodologia de Superfície de Resposta para mistura e, assim, avaliar o efeito simultâneo dos diferentes ingredientes sobre a ação das bactérias no bioiogurte.

O número do ensaio que corresponde ao menor tempo de fermentação ($t_{\text{pH}4,5}$) variou entre as co-culturas, indicando que a influência dos níveis de suplementação de cada ingrediente variou de uma co-cultura para outra. A co-cultura do iogurte (STLB) sofreu menor influência da suplementação do leite, apresentando menor variação de $t_{\text{pH}4,5}$ entre o maior e o menor tempo de fermentação (0,32h). As co-culturas STLA e STBL apresentam maior variação entre o menor e o maior tempo: 2,43h e 2,73h, respectivamente (Tabelas 5, 6 e 7). Com as diferentes suplementações houve reduções de 25,5%, 34,8% e 34,91% no tempo para atingir o pH 5,0 ($t_{\text{pH}5,0}$), enquanto no tempo para atingir pH 4,5 ($t_{\text{pH}4,5}$) as reduções foram de 10,1%, 30,7% e 34,3%, para as culturas STLB, STLA e STBL, respectivamente (considerados os ensaios individuais e não as médias). A redução percentual observada no parâmetro tempo para se atingir pH 5,0 indica que há efeito da suplementação sobre a fase de adaptação das culturas.

Nos bioiogurtes controle observou-se maior tempo para se atingir a velocidade máxima de acidificação ($t_{V_{\max}}$) que os tempos observados nos bioiogurtes suplementados, para as três co-culturas (Tabelas 5, 6 e 7).

O tempo para se atingir pH 5,0 ($t_{\text{pH}5,0}$) do Ensaio 1 é maior que o $t_{\text{pH}5,0}$ do leite controle para as três co-culturas, indicando efeito negativo correspondente à esta composição única de HC para esta resposta, que equivale a fase de adaptação, neste vértice do triângulo (1, 0, 0). O efeito não se repete na resposta de tempo para se atingir pH 4,5, indicando que a fase inicial da fermentação é afetada de forma diferente pelas concentrações dos ingredientes da mistura (Tabelas 5, 6 e 7). O maior $t_{\text{pH}4,5}$ foi de 8,70 h para STLA (Ensaio 3), que corresponde à mistura de maior concentração de LPD, enquanto STBL apresentou o maior $t_{\text{pH}4,5}$ no Ensaio 6, que corresponde à mistura binária com 50% PCS e 50% LPD.

Esses resultados estão de acordo com trabalhos de Dave e Shah (1998a), Oliveira *et al.* (2001, 2002), Sodini *et al.* (2002), Damin (2003) e Lucas *et al.* (2004), nos quais as culturas probióticas mostraram maior sensibilidade e atividade segundo a suplementação do leite com proteínas concentradas de leite ou soro, caseínas hidrolisadas ou triptona, reduzindo tempos de fermentação e melhorando a atividade acidificante. Efeito inibidor ou estimulante na acidificação para os mesmos suplementos, variando com as concentrações estudadas, foi relatado por Dave e Shah (1997a, 1998a). Segundo os autores, o crescimento de ST foi afetado adversamente com concentrações acima de 50 mg/L da cisteína, ocorrendo danos às células em concentrações de 500 mg/L. Damin (2003) observou que a atividade acidificante foi negativamente influenciada pela adição de hidrolisado de caseína em concentrações próximas a 15 g/L.

Comparando a diferença de tempo entre o pH 5,0 e o pH 4,5 nos Ensaio de 1 a 7, observa-se que a faixa de variação para STL (0,77 a 1,86) é a menor, aumentando para STLA (1,73 a 4,53) e depois para STBL (1,73 a 4,88), indicando as influências relativas da suplementação na atividade das culturas (Tabelas 5, 6 e 7).

Vale lembrar que os trabalhos citados acima concluíram que os ingredientes contendo proteínas, peptídeos ou aminoácidos têm efeito sobre a atividade das culturas probióticas e que estes estudos não são conclusivos quanto à concentração ótima a ser empregada.

5.2.2. Parâmetros físico-químicos

A Tabela 8 apresenta os parâmetros físico-químicos (valor de pH e firmeza) dos bioiogurtes fermentados por co-culturas de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* com *S. thermophilus* após 24h (d1) de armazenamento dos produtos a 4°C.

Os bioiogurtes fermentados mostraram diminuição do pH entre o final da fermentação (pH de parada 4,5) e após 24h armazenado a 4°C, efeito conhecido como pós-acidificação. A queda foi de 0,20 a 0,35upH para o bioiogurte fermentado pela co-cultura STL, de 0,12 a 0,28upH para STLA e 0,08 a 0,20upH para STBL. A pós-acidificação ocorreu para todos os ensaios, sendo mais pronunciada com a co-

cultura STLB, resultado que está de acordo com o relatado na literatura e observado por outros autores (TAMIME; ROBINSON, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2002). A queda de pH mais acentuada foi observada no bioiogurte controle fermentado por STLB e a menos acentuada no fermentado por STBL, similar ao observado nos bioiogurtes suplementados.

A firmeza dos bioiogurtes variou de 0,299 a 0,649 N com a co-cultura STLB, de 0,279 a 0,729 N com STLA e de 0,265 a 0,817 N com STBL. Um estudo com iogurtes comerciais naturais e adoçados, de marcas tradicionais no mercado paulista, avaliou a firmeza e o pH dos produtos próximos ao final da vida-de-prateleira. A firmeza foi analisada pelo texturômetro TAXT2 e variou de 0,313 a 0,774 N, sendo que o valor máximo correspondeu ao iogurte adoçado, adicionado de goma. O pH dessas amostras variou de 4,10 a 3,37 (DAMIN *et al.*, 2006a).

A faixa de variação de firmeza encontrada nos iogurtes comerciais é ampla e os valores dos ensaios 1 a 7 do presente trabalho são condizentes com esses resultados.

A firmeza dos bioiogurtes controle foi de 0,407, 0,475 e 0,412 N quando fermentados por STLB, STLA e STBL, respectivamente. Esses valores são maiores que os mínimos encontrados nos bioiogurtes suplementados, mas inferiores aos valores máximos destes.

O maior tempo de fermentação resultou em leites fermentados probióticos significativamente mais firmes (DAMIN, 2003). Neste estudo o efeito da suplementação no tempo de fermentação e, conseqüentemente, na firmeza variou de acordo com a concentração de hidrolisado de caseína e de proteína concentrada de soro empregados; a firmeza foi influenciada pela co-cultura empregada, variando de 0,263 a 0,462 N.

Tabela 8. Valores médios* $\pm$ DP de respostas para pH e firmeza de bioiogurtes fermentados por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus* (STLB), *L. acidophilus* (STLA) e *B. lactis* (STBL) após 24h (d1) de armazenamento a 4 °C, de acordo com o delineamento experimental e controle

Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura (X ₁ , X ₂ , X ₃)	STLB			STLA			STBL		
		pH ¹ (upH)	Firmeza ¹ (N)	pH ¹ (upH)	pH ¹ (upH)	Firmeza ¹ (N)	pH ¹ (upH)	pH ¹ (upH)	Firmeza ¹ (N)	Firmeza ¹ (N)
1	(1, 0, 0)	4,27 $\pm$ 0,02	0,299 $\pm$ 0,045	4,38 $\pm$ 0,01	4,38 $\pm$ 0,01	0,279 $\pm$ 0,011	4,42 $\pm$ 0,01	4,42 $\pm$ 0,01	0,265 $\pm$ 0,001	
2	(0, 1, 0)	4,22 $\pm$ 0,00	0,649 $\pm$ 0,015	4,35 $\pm$ 0,03	4,35 $\pm$ 0,03	0,729 $\pm$ 0,041	4,32 $\pm$ 0,09	4,32 $\pm$ 0,09	0,817 $\pm$ 0,003	
3	(0, 0, 1)	4,15 $\pm$ 0,04	0,507 $\pm$ 0,028	4,22 $\pm$ 0,00	4,22 $\pm$ 0,00	0,553 $\pm$ 0,016	4,30 $\pm$ 0,01	4,30 $\pm$ 0,01	0,554 $\pm$ 0,016	
4	(1/2, 1/2, 0)	4,30 $\pm$ 0,00	0,535 $\pm$ 0,009	4,33 $\pm$ 0,01	4,33 $\pm$ 0,01	0,523 $\pm$ 0,010	4,32 $\pm$ 0,00	4,32 $\pm$ 0,00	0,473 $\pm$ 0,012	
5	(1/2, 0, 1/2)	4,30 $\pm$ 0,02	0,463 $\pm$ 0,011	4,37 $\pm$ 0,01	4,37 $\pm$ 0,01	0,445 $\pm$ 0,040	4,32 $\pm$ 0,05	4,32 $\pm$ 0,05	0,445 $\pm$ 0,007	
6	(0, 1/2, 1/2)	4,25 $\pm$ 0,01	0,622 $\pm$ 0,010	4,28 $\pm$ 0,01	4,28 $\pm$ 0,01	0,700 $\pm$ 0,023	4,31 $\pm$ 0,02	4,31 $\pm$ 0,02	0,631 $\pm$ 0,017	
7	(1/3, 1/3, 1/3)	4,20 $\pm$ 0,01	0,517 $\pm$ 0,09	4,33 $\pm$ 0,01	4,33 $\pm$ 0,01	0,544 $\pm$ 0,001	4,35 $\pm$ 0,02	4,35 $\pm$ 0,02	0,532 $\pm$ 0,002	
Controle	-	4,26 $\pm$ 0,01	0,407 $\pm$ 0,08	4,38 $\pm$ 0,01	4,38 $\pm$ 0,01	0,475 $\pm$ 0,020	4,47 $\pm$ 0,01	4,47 $\pm$ 0,01	0,412 $\pm$ 0,020	

X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: proteína concentrada de soro (PCS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

*média de 4 determinações

¹ Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) não significativo, $p < 0,05$.

O efeito do enriquecimento do leite (com soro em pó, caseína hidrolisada e proteínas do leite) e da composição das culturas probióticas sobre a firmeza de leites fermentados foi estudado por Oliveira *et al.* (2001). A firmeza analisada pelo texturômetro TA-XT2, através de compressão simples, variou de 0,119 a 0,201 N; de 0,450 a 0,610 N; e de 0,695 a 0,843 N, segundo a suplementação do leite com soro de leite em pó, hidrolisado de caseína e proteínas do leite, respectivamente.

Dave e Shah (1998b) também estudaram o efeito da suplementação do leite sobre as características de textura de iogurte, verificando que a adição de 2% de proteína concentrada de soro resultou no produto mais firme (significativo $p < 0,001$). Amostras suplementadas com hidrolisado de caseína, triptona ou cisteína foram similares e menos firmes, enquanto a amostra suplementada com soro em pó foi significativamente a menos firme dentre todas.

O tempo de fermentação foi reduzido enquanto a firmeza aumentou quando *L. bulgaricus* foi adicionado para a produção de iogurte com culturas probióticas comerciais ABT (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*) em estudo realizado por Shihata e Shah (2002).

Bhullar, Uddin e Shah (2002) avaliaram 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, equivalente ao resultado da presente pesquisa.

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.

Zizu e Shah (2003) estudaram a influência do pH, da temperatura e da suplementação com proteína concentrada de soro na produção de exopolissacarídeos (EPS) por *S. thermophilus*. A adição de proteína concentrada de soro foi responsável em aumentar a produção de EPS, assim como a co-cultura de ST produtor e não-produtor também aumentou a produção em relação à cultura produtora sozinha. O estímulo na produção de EPS pela PCS pode ser a explicação

para a maior firmeza encontrada nas amostras de ingrediente único PCS (Ensaio 2 para as três co-culturas).

5.2.3. Populações de microrganismos

As populações de ST, LB, LA e BL obtidas no inóculo e na base láctea logo depois de inoculada estão na Tabela 9. Embora fosse interessante manter os inóculos com contagens iguais, a cultura de LB não atingiu os mesmos valores das demais, mesmo sendo usada em quantidades bem superiores. Como está na Tabela 9, a contagem inicial na base láctea inoculada com LB ficou abaixo dos demais. O efeito da diluição do inóculo ao ser adicionado (0,4%) à mistura para fermentação resulta em diminuição aproximada de 2 ciclos log, para LB, LA e BL, e de 2,5 ciclos log para ST.

Na Tabela 10 estão as contagens de bactérias no bioiogurte fermentado. Esses valores foram obtidos do bioiogurte depois de armazenado a 4°C por um período de 24 horas (d1), mas puderam ser considerados como valores de final da fermentação, uma vez que a variação entre o final da fermentação e d1 não foi significativa.

Tabela 9. Populações de microrganismos expressa em média* $\pm$ DP, obtidas no inóculo imediatamente após a inoculação e na base láctea a ser fermentada (tempo zero), a 42°C

	Inóculo log ufc/mL	t = 0 h log ufc/mL
<i>S. thermophilus</i>	8,78 $\pm$ 0,13	6,32 $\pm$ 0,11
<i>L. bulgaricus</i>	7,75 $\pm$ 0,12	5,70 $\pm$ 0,51
<i>L. acidophilus</i>	8,65 $\pm$ 0,22	6,45 $\pm$ 0,04
<i>B. lactis</i>	8,66 $\pm$ 0,27	6,44 $\pm$ 0,31

* n=6

Tabela 10. Valores médios* $\pm$ DP de respostas para contagens de microrganismos viáveis em bioiogurtes fermentados por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus* (STLB), *L. acidophilus* (STLA) e *B. lactis* (STBL), de acordo com o delineamento experimental e controle, armazenados por 24 h (d1) a 4°C

Ensaio	Proporção de ingredientes na mistura (X ₁ , X ₂ , X ₃)	STLB			STLA			STBL		
		ST ¹ (log ufc/mL)	LB ² (log ufc/mL)	ST ¹ (log ufc/mL)	ST ¹ (log ufc/mL)	LA ¹ (log ufc/mL)	ST ¹ (log ufc/mL)	ST ¹ (log ufc/mL)	BL ¹ (log ufc/mL)	STBL
1	(1, 0, 0)	9,39 $\pm$ 0,01	8,28 $\pm$ 0,03	9,29 $\pm$ 0,02	8,08 $\pm$ 0,10	9,37 $\pm$ 0,01	7,53 $\pm$ 0,01			
2	(0, 1, 0)	9,34 $\pm$ 0,03	8,82 $\pm$ 0,05	9,32 $\pm$ 0,01	7,75 $\pm$ 0,00	9,34 $\pm$ 0,01	8,50 $\pm$ 0,01			
3	(0, 0, 1)	9,29 $\pm$ 0,01	8,44 $\pm$ 0,10	9,37 $\pm$ 0,02	8,00 $\pm$ 0,12	9,27 $\pm$ 0,01	8,51 $\pm$ 0,01			
4	(1/2, 1/2, 0)	9,32 $\pm$ 0,02	8,26 $\pm$ 0,02	9,50 $\pm$ 0,01	7,82 $\pm$ 0,01	9,49 $\pm$ 0,01	9,27 $\pm$ 0,01			
5	(1/2, 0, 1/2)	9,39 $\pm$ 0,02	8,41 $\pm$ 0,02	9,28 $\pm$ 0,01	7,79 $\pm$ 0,02	9,37 $\pm$ 0,02	9,29 $\pm$ 0,02			
6	(0, 1/2, 1/2)	9,24 $\pm$ 0,02	8,35 $\pm$ 0,04	9,42 $\pm$ 0,01	7,89 $\pm$ 0,01	10,20 $\pm$ 0,05	9,08 $\pm$ 0,01			
7	(1/3, 1/3, 1/3)	9,31 $\pm$ 0,01	8,40 $\pm$ 0,03	9,35 $\pm$ 0,01	7,92 $\pm$ 0,01	9,43 $\pm$ 0,01	9,27 $\pm$ 0,01			
Controle	-	9,33 $\pm$ 0,02	8,20 $\pm$ 0,11	9,11 $\pm$ 0,01	8,08 $\pm$ 0,10	9,28 $\pm$ 0,02	8,98 $\pm$ 0,01			

X₁: hidrolisado de caseína (HC); X₂: proteína concentrada de soro (PCS); X₃: leite em pó desnatado (LPD)

*média de 4 determinações

¹ Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) não significativo, $p < 0,05$.

² Análise de variância significativa, $p < 0,05$. Teste de homogeneidade de variância (Levene) significativo, $p < 0,05$.

Comparando os valores da base láctea no tempo zero (Tabela 9) e aqueles do final da fermentação (Tabela 10), constata-se que houve crescimento durante o processo, para todas as culturas e todos os ensaios, com aumento médio das contagens de 2,67, 1,44 e 2,34 ciclos log para as bactérias LB, LA e BL, respectivamente. *S. thermophilus* cresceu de 6,32 para 9,27 a 9,44 log ufc, considerando as 3 co-culturas, o que resulta em aumento médio de 3,02 ciclos log durante as fermentações.

S. thermophilus apresentou crescimento mais acentuado, o que está de acordo com o encontrado na literatura e foi observado por diversos autores em iogurtes comerciais, além de manter maior população durante a vida-de-prateleira (MOREIRA *et al.*, 1999; TAMIME; ROBINSON, 1999; VINDEROLA; MOCCHIUTTI; REINHEIMER, 2002; DAMIN *et al.*, 2006b). Iogurtes comerciais apresentaram proporção de 1:2 de *L. bulgaricus* em relação a *S. thermophilus* na maioria das amostras.

As contagens médias de LB ao final da fermentação (d1) estão acima das contagens obtidas para LA, indicando que o crescimento do LB é mais acentuado, independente da composição de mistura estudada. As contagens de BL em média estão acima dos valores encontrados para LB e LA, mas abaixo de ST.

Em estudo de McComas e Gilliland (2003), o crescimento de bactérias probióticas em leite desnatado, *L. acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium*, foi melhorado significativamente (até 1,8 ciclos log) com a suplementação do leite por proteína hidrolisada de soro, enquanto LB e ST não foram afetados. As bactérias do iogurte acrescentadas aos probióticos favoreceram o crescimento das últimas, quando houve suplementação com o hidrolisado. Neste estudo, o tempo de fermentação foi fixado em 16 horas para todos os ensaios e o pH final variou com as culturas. Essa diferença entre controle de tempo ou de pH final pode explicar a diferença de influência sobre as culturas do iogurte.

As populações de probióticos encontradas nos bioiogurtes controle estão próximas dos valores observados nos suplementados. Os bioiogurtes suplementados e controle atendem ao requisito de concentração mínima de bactérias viáveis exigido pela legislação.

5.3. Estimativa dos modelos polinomiais preditivos

Os resultados experimentais dos sete ensaios, obtidos das determinações de parâmetros de cinética de acidificação ($V_{\max}$, $t_{V_{\max}}$, $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$ e $t_{pH4,5}-t_{pH5,0}$), físico-químicos (pH e firmeza) e microbiológicos (contagens de LB, LA, BL e ST), apresentaram variância significativa ($p < 0,05$). O teste de Levene de homogeneidade de variância apresentou resultado significativo ($p < 0,05$) para alguns parâmetros (co-cultura STLB nos parâmetros $t_{pH4,5}$ e contagem da população de LB; para a co-cultura STLA em $t_{V_{\max}}$; para a co-cultura STBL nos parâmetros $V_{\max}$ e $t_{pH5,0}$) que não foram empregados na modelagem.

Inicialmente, ajustaram-se aos resultados os modelos lineares. Quando os modelos polinomiais lineares apresentaram baixo coeficiente de determinação e falta de ajuste significativo ($p < 0,05$) buscou-se, então, ajustar modelos mais complexos, como as regressões quadráticas ou cúbicas. Os modelos estimados exibidos a seguir apresentaram falta de ajuste não significativa e coeficientes de determinação acima de 0,65 ($R^2 \geq 0,65$, $p < 0,05$). Os demais não são apresentados.

Foram usados os valores individuais dos resultados experimentais, com repetições para a mistura tripla. Os coeficientes dos termos quadráticos não significativos não foram apresentados nos modelos polinomiais preditivos ajustados.

Vale lembrar que os diagramas triangulares obtidos para um experimento de mistura de três componentes representam todas as composições possíveis da mistura ternária (área interior do triângulo), misturas binárias (lados do triângulo) e componentes puros (vértices do triângulo). Esses diagramas triangulares e as curvas de nível para os modelos estimados apresentados a seguir são úteis para mostrar todas as combinações possíveis de ingredientes dentro da faixa experimental testada e a resposta obtida, assim como as interações que podem ocorrer entre os componentes.

5.3.1. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STLB

A Tabela 11 apresenta as equações dos modelos preditivos ajustados para os parâmetros t_{Vmax} , $t_{pH5,0}$, $pHd1$, $t_{pH5-4,5}$ e diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$) para os bioiogurtes fermentados pela co-cultura STLB, seus coeficientes de determinação (R^2) e nível de significância (p).

Tabela 11: Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, no tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação (t_{Vmax}), no tempo para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), no pHd1 e na diferença de tempo entre pH 5,0 e 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), em bioiogurte fermentado pela co-cultura *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (STLB)

Resposta	Equação	R^2	p (modelo)	p (falta de ajuste)
$\hat{Y}_{t_{Vmax}} =$	$+3,00x_1+2,95x_2+2,97x_3-1,67x_1x_2-1,70x_1x_3-1,21x_2x_3$ ($\pm 0,11$) ($\pm 0,11$) ($\pm 0,11$) ($\pm 0,50$) ($\pm 0,50$) ($\pm 0,50$)	0,797	0,0041	0,2160
$\hat{Y}_{t_{pH5,0}} =$	$+4,40x_1+3,34x_2+3,45x_3-2,06x_1x_2-2,21x_1x_3+0,36x_2x_3$ ($\pm 0,03$) ($\pm 0,03$) ($\pm 0,03$) ($\pm 0,13$) ($\pm 0,13$) ($\pm 0,13$)	0,994	0,0000	0,4337
$\hat{Y}_{pHd1} =$	$+4,27x_1+4,22x_2+4,15x_3+0,31x_1x_2+0,45x_1x_3+0,35x_2x_3$ ($\pm 0,02$) ($\pm 0,02$) ($\pm 0,02$) ($\pm 0,10$) ($\pm 0,10$) ($\pm 0,10$)	0,859	0,0006	0,1621
$\hat{Y}_{t_{H4,5-5,0}} =$	$+0,72x_1+1,69x_2+1,76x_3+1,50x_1x_2+2,28x_1x_3$ ($\pm 0,01$) ($\pm 0,01$) ($\pm 0,01$) ($\pm 0,10$) ($\pm 0,34$)	0,920	0,0003	0,1751

R^2 = coeficiente de determinação. Todas as respostas foram significativas através do teste F em nível de 5% ($p < 0,05$)

Os modelos preditivos explicam 79,7%, 99,4%, 85,9% e 92,0% da variação dos resultados para as respostas t_{Vmax} , $t_{pH5,0}$, $pHd1$ e $t_{pH4,5-5,0}$, respectivamente. As Figuras 16, 17, 18 e 19 apresentam as curvas de nível correspondentes a estes modelos. Os coeficientes dos termos quadráticos significativos apresentados indicam que essas interações entre os ingredientes são significativas (Tabela 11).

Figura 16: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para t_{vmax} , para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 17: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH5,0}$, para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 18: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para pHd1, para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 19: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Os seguintes efeitos relativos aos bioiogurtes fermentados por STLB podem ser observados:

(i) aumento de $t_{v_{max}}$ próximo aos três vértices do triângulo, indicando aumento no tempo para atingir a velocidade máxima para as concentrações máximas de cada ingrediente. A depressão no centro indica a queda em $t_{v_{max}}$ para a mistura ternária (Figura 16);

(ii) a influência do ingrediente HC é a mais acentuada no $t_{pH5,0}$, com uma depressão na parte central relativa a esse lado do triângulo, indicando diminuição no tempo para atingir o pH 5,0 e aumento acentuado nesse tempo quando se aproxima do vértice HC (Figura 17);

(iii) queda do valor de pH em d1, com depressão mais acentuada no vértice LPD, que significa maior pós-acidificação nesta região e menor pós-acidificação na região central do diagrama (Figura 18) e

(iv) quando aumenta a concentração de HC no lado da mistura binária HC-LPD diminui a diferença entre o tempo para atingir pH 5,0 e 4,5, enquanto ocorre aumento acentuado, formando um platô de longo tempo entre os dois valores de pH, próximo do vértice LPD (Figura 19).

Muitos trabalhos avaliaram o efeito da suplementação do leite na textura de iogurtes (DAVE; SHAH, 1998b; BUHLAR; UDIN; SHAH, 2002; SODINI; MONTELLA; TONG, 2005) e na viabilidade de ST e LB (DAVE; SHAH, 1998a; McCOMAS; GILLILAND, 2003), mas há poucos estudos sobre a influência desses suplementos na cinética de acidificação ou no tempo de fermentação quando não há adição de probióticos. Os resultados desta pesquisa mostram que a co-cultura STLB obtém benefícios com a suplementação.

5.3.2. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STLA

Na Tabela 12 observa-se as equações dos modelos preditivos ajustados para os parâmetros $t_{5,0}$, $t_{pH4,5}$ e diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$) para os bioiogurtes fermentados pela co-cultura STLA, seus coeficientes de determinação (R^2) e nível de significância (p).

Tabela 12: Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, nos tempos para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$), pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) e na diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), em bioiogurte fermentado pela co-cultura *S. thermophilus* e *L. acidophilus* (STLA)

Resposta	Equação	R^2	p (modelo)	p (falta de ajuste)
$\hat{Y}_{tpH5,0}$	$= +5,17x_1 + 3,72x_2 + 4,17x_3 - 3,56x_1x_2 - 4,54x_1x_3$ ($\pm 0,05$) ($\pm 0,05$) ($\pm 0,05$) ($\pm 0,20$) ($\pm 0,20$)	0,993	0,0000	0,9404
$\hat{Y}_{tpH4,5}$	$= +6,97x_1 + 6,73x_2 + 8,75x_3 - 7,10x_1x_3$ ($\pm 0,30$) ($\pm 0,30$) ($\pm 0,30$) ($\pm 1,33$)	0,849	0,0008	0,3760
$\hat{Y}_{tpH4,5-5,0}$	$= +1,71x_1 + 2,98x_2 + 4,45x_3 + 4,14x_1x_2 - 1,63x_1x_3 + 1,68x_2x_3$ ($\pm 0,19$) ($\pm 0,13$) ($\pm 0,13$) ($\pm 0,63$) ($\pm 0,634$) ($\pm 0,59$)	0,961	0,0002	0,7110

R^2 = coeficiente de determinação. Todas as respostas foram significativas através do teste F em nível de 5% ($p < 0,05$)

Os modelos preditivos explicam 99,3%, 84,9% e 96,1% da variação dos resultados para as respostas $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$ e diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), respectivamente. As curvas de nível correspondentes a estes modelos estão apresentadas nas Figuras 20, 21 e 22. Os coeficientes dos termos quadráticos significativos apresentados indicam que essas interações entre os ingredientes são significativas (Tabela 12).

Figura 20: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH5,0}$, para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 21: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para $t_{pH4,5}$ para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 22: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a diferença de tempo entre pH 5,0 e pH 4,5 ($t_{H4,5-5,0}$), para bioiogurte fermentado por STLA, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Os principais efeitos relativos aos bioiogurtes fermentados por STLA observados são:

(i) a influência do ingrediente HC é a mais acentuada para a resposta no $t_{pH5,0}$, com uma depressão na parte central relativa a esse lado do triângulo e aumento acentuado nesse tempo quando se aproxima do vértice HC (Figura 20);

(ii) o menor valor de $t_{pH4,5}$ quando a composição da mistura tem HC entre 0,5 e 0,75, no lado do triângulo correspondente à mistura binária LPD e HC, mas há aumento expressivo de $t_{pH4,5}$ próximo ao vértice HC (Figura 21). O HC favorece a atividade acidificante, mas, ao caminhar para a adição do ingrediente puro, ocorre inibição, aumentando o $t_{pH4,5}$ e

(iii) a redução acentuada da diferença de tempo de pH 5,0 a 4,5 próximo ao vértice HC e o aumento acentuado próximo ao vértice LPD (Figura 22).

O tempo para se atingir pH 5,0 é utilizado como medida da atividade acidificante das culturas lácticas (BÉAL; CORRIEU, 1994; BEAL *et al.*, 1999; FONSECA; BÉAL; CORRIEU, 2000), sendo o tempo para se atingir pH 4,5 fator importante a ser observado na produção industrial de leite fermentado, pois a

atividade acidificante das culturas deve ser compatível com o requerimento de tempo de fermentação. A concentração máxima de LPD é o ponto no qual foi encontrado o maior tempo de fermentação para a co-cultura STLA, indicando que esse ingrediente puro inibe a atividade das culturas na concentração máxima empregada no experimento.

O efeito negativo de leite em pó desnatado nos parâmetros cinéticos foi relatado por Kristo, Biliaderis e Tzanetakis (2003), que observaram queda na velocidade de acidificação com o aumento na concentração de LPD até 14,7%.

Diversos trabalhos mostram efeito semelhante de redução de tempos de fermentação, de maior crescimento e de melhora de textura em leites fermentados por *L. acidophilus*, quando há suplementação com hidrolisado de caseína ou de soro (OLIVEIRA *et al.*, 2001; SODINI *et al.*, 2002; DAMIN, 2003; LUCAS *et al.*, 2004), mas esses trabalhos não determinaram qual é a concentração ideal de suplementação, objetivo deste estudo. Esta pesquisa mostrou que a redução do tempo de fermentação para STLA obtida se aproxima dos valores encontrados para STLB.

5.3.3. Modelos polinomiais preditivos ajustados para STBL

As equações dos modelos preditivos ajustados para os parâmetros $t_{V_{\max}}$, $t_{pH5,0}$ e $pHd1$, para os bioiogurtes fermentados pela co-cultura STBL, seus coeficientes de determinação (R^2) e nível de significância (p) podem ser vistos na Tabela 13.

Tabela 13: Modelos polinomiais ajustados aos dados experimentais e respectivos erros-padrão dos coeficientes, para os efeitos de suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, no tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação ($t_{V_{\max}}$), na contagem de *B. lactis* e na firmeza, em bioiogurte fermentado pela co-cultura *S. thermophilus* e *B. lactis* (STBL)

Resposta	Equação	R^2	p (modelo)	p (falta de ajuste)
$\hat{Y}_{t_{V_{\max}}} =$	$+2,68x_1+2,79x_2+2,86x_3-0,96x_1x_2-1,22x_1x_3$ ($\pm 0,09$) ($\pm 0,09$) ($\pm 0,09$) ($\pm 0,41$) ($\pm 0,41$)	0,671	0,0207	0,5598
$\hat{Y}_{BL} =$	$+7,44x_1+8,41x_2+8,42x_3+6,91x_1x_2+6,97x_1x_3+4,19x_2x_3$ ($\pm 0,29$) ($\pm 0,29$) ($\pm 0,29$) ($\pm 1,27$) ($\pm 1,27$) ($\pm 1,27$)	0,887	0,0002	0,7903
$\hat{Y}_{firmeza} =$	$+0,27x_1+0,82,13x_2+0,55x_3-0,25x_1x_2+0,17x_1x_3-0,19x_2x_3$ ($\pm 0,01$) ($\pm 0,01$) ($\pm 0,01$) ($\pm 0,04$) ($\pm 0,04$) ($\pm 0,04$)	0,995	0,0000	0,2728

R^2 = coeficiente de determinação. Todas as respostas foram significativas através do teste F em nível de 5% ($p < 0,05$)

Os modelos preditivos explicam 67,1%, 88,7% e 99,5% da variação dos resultados para as respostas $t_{V_{\max}}$, contagem de BL e firmeza, respectivamente. As Figuras 23, 24 e 25 apresentam as curvas de nível correspondentes a estes modelos. Os coeficientes dos termos quadráticos significativos apresentados indicam que essas interações entre os ingredientes são significativas (Tabela 13).

Figura 23: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para t_{vmax} para bioiogurte fermentado por STBL, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 24: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para BL (contagem de *B. lactis* viáveis em d1) para bioiogurte fermentado por STLb, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Figura 25: Curvas de nível obtidas pelo modelo polinomial ajustado para a firmeza, para bioiogurte fermentado por STBL, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

Os efeitos relativos aos bioiogurtes fermentados por STBL observados são os seguintes:

- (i) t_{vmax} aumenta próximo ao lado PCS-LPD do triângulo e diminui próximo ao lado HC-LPD. Um platô próximo ao lado LPD-HC indica a região de menor t_{vmax} (Figura 23), equivalente à maior atividade das bactérias;
- (ii) a contagem da população de *B. lactis* é máxima no centro do triângulo e cai próximo aos vértices, sendo a queda mais acentuada no vértice HC (Figura 24) e
- (iii) o ponto máximo de firmeza está no vértice PCS, enquanto o valor mínimo de firmeza está no vértice HC (Figura 25).

5.4. Análise comparativa do efeito da suplementação e da cultura nos parâmetros de cinética de acidificação, na contagem de *S. thermophilus* e nos parâmetros físico-químicos

O delineamento de mistura forneceu modelos preditivos que possibilitaram a otimização da suplementação do leite, mas os modelos obtidos foram para diferentes variáveis respostas nas diferentes co-culturas. Desta forma, optou-se pela realização de mais uma análise de variância (ANOVA) bifatorial para avaliar o efeito da cultura e do suplemento (Tabela 14). Foi possível verificar-se que o efeito dos suplementos é significativo em 5% para todos os parâmetros estudados e a cultura (co-cultura) empregada só não tem efeito significativo na velocidade máxima de acidificação.

O efeito dos ingredientes como componente único, mistura binária e ternária analisada por análise de variância (ANOVA) e teste de contrastes (Tukey HDS – $p < 0,05$), apresentados na Tabela 15 mostram que a suplementação com HC como ingrediente único resulta diferença significativa: em $V_{\max}$ (diminui), $t_{pH5,0}$ (aumenta) e firmeza (reduz). A suplementação com PCS como ingrediente único tem efeito significativo na maior firmeza, enquanto a suplementação com LPD como ingrediente único resulta em maior $t_{pH4,5}$ e maior pós-acidificação.

Quando as misturas são binárias, a participação do HC reduz o $t_{pH5,0}$ e o $t_{pH4,5}$ significativamente. A mistura PCS-LPD que tem maior tempo de fermentação também corresponde à maior firmeza entre as misturas binárias, além de satisfazer a maior contagem de *S. thermophilus*, que é a cultura produtora de exopolissacarídeos.

A mistura ternária resulta em valores próximos dos menores $t_{V_{\max}}$, $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$, mas apresenta a menor contagem de *S. thermophilus*, embora em populações dentro do número esperado e necessário.

Tabela 14. Resultados de análise de variância (ANOVA) bifatorial para $V_{\max}$, $t_{V\max}$, $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$, contagem de ST, pH e firmeza em função do suplemento e da cultura utilizada

	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrados médios	F	p
$V_{\max}$	Suplemento	142,900	6	23,820	13,62*	0,0000*
	Cultura	5,700	2	2,850	1,63	0,2089
	Resíduo	68,220	39	1,750		
$t_{V\max}$	Suplemento	1,649	6	0,275	9,44*	0,0000*
	Cultura	0,277	2	0,139	4,76*	0,0141*
	Resíduo	1,136	39	0,029		
$t_{pH5,0}$	Suplemento	9,911	6	1,652	97,53*	0,0000*
	Cultura	1,314	2	0,657	38,78*	0,0000*
	Resíduo	0,661	39	0,017		
$t_{pH4,5}$	Suplemento	15,619	6	2,603	9,19*	0,0000*
	Cultura	45,433	2	22,716	80,22*	0,0000*
	Resíduo	11,044	39	0,283		
ST	Suplemento	0,936	6	0,156	6,30*	0,0001*
	Cultura	0,267	2	0,133	5,40*	0,0084*
	Resíduo	0,960	39	0,025		
pH	Suplemento	0,152	6	0,025	11,90*	0,0000*
	Cultura	0,061	2	0,030	14,40*	0,0000*
	Resíduo	0,083	39	0,002		
Firmeza	Suplemento	0,766	6	0,128	127,83*	0,0000*
	Cultura	0,004	2	0,002	1,94	0,1568*
	Resíduo	0,039	39	0,001		

* Significativo ($p < 0,05$)

Tabela 15. Teste de contrastes Tukey HDS para $V_{\max}$, $t_{V\max}$, $t_{pH5,0}$, $t_{pH4,5}$, contagem de ST, pH e firmeza em função do suplemento utilizado

Suplemento	$V_{\max}$ (10^{-3} upH/min)	$t_{V\max}$ (h)	$t_{pH5,0}$ (h)	$t_{pH4,5}$ (h)	ST (log ufc/mL)	pH (upH)	Firmeza (N)
HC	17,52 ^a	2,90 ^{bc}	4,84 ^c	6,30 ^a	9,35 ^{abc}	4,35 ^{bc}	0,281 ^a
PCS	22,13 ^c	2,91 ^{bc}	3,54 ^a	6,25 ^a	9,33 ^{ab}	4,29 ^{ab}	0,740 ^e
LPD	20,80 ^c	2,97 ^c	3,86 ^b	7,47 ^b	9,31 ^{ab}	4,22 ^a	0,538 ^c
HC-PCS	17,68 ^a	2,62 ^{ab}	3,51 ^a	6,43 ^a	9,44 ^{bc}	4,32 ^b	0,510 ^c
HC-LPD	18,27 ^{ab}	2,51 ^a	3,46 ^a	5,94 ^a	9,35 ^{abc}	4,33 ^b	0,451 ^b
PCS-LPD	20,27 ^{bc}	2,78 ^{abc}	3,85 ^b	7,45 ^b	9,62 ^c	4,28 ^{ab}	0,651 ^d
HC-PCS-LPD	17,47 ^a	2,51 ^a	3,38 ^a	6,08 ^a	9,16 ^a	4,40 ^c	0,514 ^c

^{a,b} Letras iguais na mesma coluna indicam médias estatisticamente iguais ($p < 0,05$)

5.5. Otimização da suplementação do leite através da MSR

A metodologia de otimização proposta por Derringer-Suich (1980) foi usada para os resultados dos modelos preditivos ajustados para os bioiogurtes fermentados pelas co-culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, *S. thermophilus* e *B. lactis*.

A otimização para a co-cultura STL_B, através dos modelos quadráticos para as respostas t_{vmax} , $t_{pH5,0}$ e pH_{d1}, resultou em desejabilidade global de 85%, sendo que a composição da mistura otimizada é de 33% de HC, 25% de PCS e 42% de LPD; ou seja, o ponto de composição (0,33, 0,25, 0,42) da mistura.

A otimização para a co-cultura ST_BL, através dos modelos quadráticos de t_{vmax} , contagem de BL e firmeza, também foi testada, mas resultou em desejabilidade global de 69%, sendo que a composição da mistura otimizada é de 25% de HC, 50% de PCS e 25% de LPD; ou seja, o ponto de composição (0,25, 0,5, 0,25) da mistura. Como se observou nos modelos polinomiais e nas respectivas curvas de nível, o componente PCS tem o maior coeficiente na equação do modelo preditivo de firmeza, sendo o maior valor de firmeza encontrado no vértice PCS (Tabela 14 e Figura 25).

A co-cultura que obteve bons modelos preditivos e falta de ajuste não significativo para os parâmetros cinéticos tempo para se atingir pH 5,0 e 4,5 ($t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$) foi *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. As bactérias probióticas apresentam baixo ritmo de crescimento em leite, resultando em alto tempo de fermentação, que é um dos desafios a serem vencidos na produção de leites fermentados por probióticos (GOMES; MALCATA, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2001; ØSTLIE; HELLAND; NARVHUS, 2003; TAMIME *et al.*, 2005). Um dos objetivos estabelecidos para o presente trabalho foi reduzir o tempo de fermentação do leite com as culturas probióticas; assim, os resultados obtidos com a análise de regressão para os parâmetros cinéticos do leite fermentado por ST_LA foram utilizados na metodologia de otimização e são apresentados de forma mais completa que para STL_B e ST_BL.

Os menores tempos para se atingir os pH 5,0 e 4,5 foram definidos pelo critério da metodologia, como desejabilidade 1, enquanto os maiores tempos foram definidos como desejabilidade 0 (Tabela 16).

Tabela 16. Valores atribuídos aos parâmetros $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$ para o procedimento de otimização através da função de desejabilidade, usando o *software* Statistica 6.0 (Statsoft), para a co-cultura STLA

	Desejabilidade e valor atribuído					
	Alta	Valor atribuído	Média	Valor atribuído	Baixa	Valor atribuído
$t_{pH5,0}$	3,37	1	4,27	0,5	5,17	0
$t_{pH4,5}$	6,03	1	7,365	0,5	8,7	0

Os modelos quadráticos foram então adotados para a otimização. O resultado final desta otimização sugere a composição de mistura da suplementação do leite com 50% de hidrolisado de caseína, 0% de proteína concentrada de soro e 50% de leite em pó, ou seja, o ponto de composição (0,5, 0, 0,5) da mistura, que atende aos critérios de desejabilidade. A desejabilidade global foi estimada em 95%, isto é, a composição resultante atende em 95% aos parâmetros especificados no procedimento de otimização matemática.

A Figura 26 apresenta o comportamento das variáveis resposta em função das concentrações e a faixa contendo os resultados otimizados está representada em azul. A linha pontilhada vertical vermelha corresponde às proporções de cada variável na mistura otimizada obtida. Observa-se que a faixa de variação da resposta $t_{pH5,0}$ é menor que aquela correspondente ao $t_{pH4,5}$, pois o modelo ajustado para a primeira resposta representa 99,3% da variação dos resultados, enquanto o modelo da segunda representa 84,9%. O diagrama resultante representa a desejabilidade global obtida de 95%.

Cabe ressaltar que em diversos trabalhos o leite foi enriquecido com um único ingrediente por vez, sendo as influências de uma única ou mais concentrações de cada ingrediente avaliadas separadamente (DAVE; SHAH, 1998a; OLIVEIRA *et al.* 2001; SODINI *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2004). No presente trabalho de pesquisa foi possível avaliar o efeito da suplementação simultânea do enriquecimento do leite com os três ingredientes estudados, identificar interação ocorrida entre os ingredientes e obter composições de mistura otimizadas.

Figura 26: Diagramas para valores preditivos, desejabilidade das variáveis otimizadas e desejabilidade global através da otimização de Derringer-Suich para as variáveis resposta $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$ de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, onde HC (X_1), PCS (X_2) e LPD (X_3) são os fatores hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado, respectivamente

5.5.1. Ensaios de validação do modelo

Os modelos preditivos obtidos para a co-cultura *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, que atingiram maior desejabilidade global, foram empregados para os ensaios confirmativos e validação.

Para validação dos modelos obtidos foram realizados três ensaios em pontos aleatórios dentro da área experimental definida, como recomendado por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2001). Os resultados obtidos nestes ensaios foram comparados usando-se o teste qui-quadrado (χ^2) (Tabela 17). O teste mostrou que os desvios não são significativos e confirmou que os modelos apresentaram bons ajustes.

Tabela 17. Composição de ingredientes nas misturas usadas para os ensaios de validação dos modelos para a co-cultura STLA, valores observados, valores estimados, significância da probabilidade e erro percentual relativo entre observado e estimado, para as respostas $t_{pH4,5}$ e $t_{pH5,0}$

Resposta	Ensaios confirmativos	Observado	Estimado	p	Erro (%)
$t_{pH4,5}$	(4/6, 1/6, 1/6)	6,83	6,44	0,95732	6,1
	(1/10, 1/10, 8/10)	8,20	7,89		3,9
	(1/6, 4/6, 1/6)	7,60	7,00		8,6
$t_{pH5,0}$	(4/6, 1/6, 1/6)	3,88	3,55	0,97337	9,3
	(1/10, 1/10, 8/10)	4,10	3,86		6,2
	(1/6, 4/6, 1/6)	4,05	3,87		4,7

5.6. Cinética de acidificação do leite controle e do suplementado no ponto ótimo para leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* em culturas puras e em co-cultura

A composição da mistura definida como ótima pelo método de otimização de Derringer-Suich foi usada na produção de leite fermentado pelas culturas puras ST e LA (LO: ST-LO e LA-LO) em comparação com leite controle sem suplementação (ST-CO e LA-CO).

Também foi produzido bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) por co-cultura STLA para a análise da cinética de acidificação e estudo de estabilidade ao armazenamento, em estudo comparativo com bioiogurte controle (CONT), sem suplementação.

O leite suplementado ótimo resultou em proteína de $5,01 \pm 0,01$ g/100g e sólidos totais de $14,10 \pm 0,01$ g/100g.

As curvas de fermentação (Figura 25) e de velocidade de acidificação (dpH/dt *versus* tempo) (Figura 26) das culturas puras mostram grande influência da suplementação do leite nos parâmetros velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$), tempo para atingir $V_{\max}$ ($t_{V_{\max}}$), tempo para atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) para as culturas ST e LA. A diferença entre os leites é notadamente maior para o LA.

Para a fermentação por cultura pura ST no leite controle e no leite ótimo, o $t_{pH5,0}$ foi 5,3 e 4,3 h e o $t_{pH4,5}$ foi de 12,5 e 7,1 h, respectivamente (Figura 25). A $V_{\max}$ no leite controle e no leite ótimo foi de 16,8 e $19,0 \cdot 10^{-3}$ upH/min, enquanto o $t_{V_{\max}}$ foi de 3,4 e 3,2 h, respectivamente (Figura 26).

Quando os leites controle e ótimo foram fermentados por cultura pura LA, foram encontrados valores de $t_{pH5,0}$ de 15,8 e 11,4 h, e de $t_{pH4,5}$ de 22,1 e 16,7 h (Figura 27), de $V_{\max}$ de 2,8 e $4,8 \cdot 10^{-3}$ upH/min, e de $t_{V_{\max}}$ de 11,9 e 8,0 h (Figura 28), respectivamente.

Poucos pesquisadores estudaram o perfil de acidificação ou os parâmetros cinéticos de leites fermentados por culturas puras, embora publicações sobre o crescimento das bactérias em meios de cultura enriquecidos com hidrolisados, peptona, aminoácidos, vitaminas, sais e açúcares sejam encontradas (DAVE; SHAH, 1998a; VINDEROLA *et al.*, 2002).

Em estudo de Spinnler e Corrieu (1989) $t_{V_{max}}$ foi usado para avaliar o desempenho das culturas puras ou da co-cultura para diferentes cepas de ST e LB. Em média, o $t_{V_{max}}$ para ST foi de 5 h (300 min) e de 3,6 h para LB (216 min).

Oliveira *et al.* (2001) relataram efeito de aumento de V_{max} , redução de $t_{V_{max}}$ e de $t_{pH4,5}$ em função da adição de hidrolisado de caseína na fermentação do leite com cultura pura de *L. acidophilus*. O efeito daquele ingrediente foi o maior quando comparado com o do soro de leite em pó e de proteínas de leite (mistura de caseína e proteína concentrada de soro). O menor $t_{pH4,5}$ para LA foi de 8,1 h, quando enriquecido com HC, enquanto o maior foi de 13,8 h com uso de soro de leite em pó.

Em trabalho de Sodini *et al.* (2002), o tempo para se atingir pH 5,0 foi estudado para culturas puras de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* (LR) em leite suplementado com leite em pó desnatado, proteínas concentradas de leite e hidrolisado de caseína. A cultura pura de ST apresentou o maior estímulo; LA apresentou estímulo, mas baixa estabilidade; LR cresceu sempre lentamente. O $t_{pH5,0}$ para ST foi dividido por três na maior redução, enquanto para LA foi dividido por dois.

No presente trabalho observou-se que a cultura ST é a principal responsável pela textura/consistência final dos leites fermentados. O leite fermentado apenas por ST apresentou consistência semelhante àquele fermentado pela co-cultura, enquanto o fermentado apenas por LA apresentou-se com pequenos grumos esbranquiçados misturados a uma fase mais líquida, o que impossibilitou que fossem obtidas medidas físicas de textura dessas amostras usando o TA-X2.

Quando analisados os tempos médios para se atingir pH 5,0 e 4,5 da fermentação por co-culturas STLA, estes apresentaram variação significativa entre o leite controle e o suplementado, com maior variação observada no $t_{pH4,5}$ das amostras. O $t_{pH5,0}$ foi de 3,5 h ($\pm 0,1$) e 4,2 h ($\pm 0,1$) e o $t_{pH4,5}$ foi de 6,1 h ($\pm 0,4$) e 8,9 h ($\pm 0,3$), para LAOT e CONT, respectivamente (Figura 29). A diferença no $t_{pH4,5}$ representou 31% de redução de tempo do controle para o suplementado, resultante da melhora da atividade acidificante obtida com a suplementação.

Quando analisados os parâmetros de acidificação das co-culturas em bioiogurte controle ou suplementado no ponto ótimo, observa-se redução nos

tempos para se atingir a velocidade máxima de acidificação e nos tempos para se atingir o pH 5,0 e o pH 4,5. A média da velocidade máxima de acidificação do bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) foi de $19,5 \cdot 10^{-3}$ upH/min, significativamente maior que a do controle (CONT), que foi de $16,9 \cdot 10^{-3}$ upH/min. O tempo médio para se atingir $V_{\max}$ foi menor para o LAOT (3,2h) do que para o CONT (3,5h) (Figura 30).

Figura 27. Curvas de queda de pH para as culturas puras de *S. thermophilus* e *L. acidophilus* em leite controle (● ST-LO, ■ ST-CO) e leite suplementado no ponto ótimo (▲ LA-LO, ■ LA-CO)

Figura 28: Curvas de velocidade de acidificação (dpH/dt versus tempo) para as culturas puras de *S. thermophilus* e *L. acidophilus* em leite controle (● ST-LO, ■ ST-CO) e leite suplementado no ponto ótimo (▲ LA-LO, ■ LA-CO)

O crescimento protocooperativo das culturas lácticas é bem descrito na literatura (SPREER; MIXA, 1998; TAMIME; ROBINSON, 1999; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Spinnler e Corrieu (1989) obtiveram $t_{V_{max}}$ para culturas puras de ST de 5 horas (300 min) e para LB de 3,6 horas (216 min), enquanto para a co-cultura STLB $t_{V_{max}}$ foi de 2,8 h (168 min).

Os resultados cinéticos desta pesquisa estão de acordo com os obtidos em trabalhos como os de Dave e Shah (1998a), Oliveira *et al.* (2001) e Sodini *et al.* (2002), que também mostraram o estímulo na atividade acidificante/redução no tempo de fermentação quando o leite é suplementado com diferentes tipos de proteínas concentradas ou hidrolisadas, com ênfase no efeito do hidrolisado de caseína.

Lucas *et al.* (2004) estudaram a suplementação de leite fermentado por três hidrolisados de caseína e três hidrolisados de proteína de soro em concentrações variando de 0,25 a 4 g/L. Concluíram que a adição de hidrolisados favorece o crescimento de ST, reduzindo o tempo de fermentação e o crescimento das bactérias probióticas, com o aumento da concentração dos hidrolisados. Essa redução de crescimento foi associada ao menor tempo de fermentação.

A Tabela 18 apresenta um resumo dos resultados da fermentação com culturas puras ou co-culturas de ST e LA. Observou-se estímulo à atividade acidificante (conseqüente redução dos tempos) quando os microrganismos cresceram juntos, tanto no leite controle, quanto no ótimo.

Tabela 18. Tempos médios* para se atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) para as culturas puras e co-cultura de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, no leite controle e no leite suplementado no ponto ótimo

Cultura	$t_{pH5,0}$ (h)		$t_{pH4,5}$ (h)	
	Leite controle	Leite ótimo	Leite controle	Leite ótimo
ST	5,3	4,3	12,5	7,1
LA	15,8	11,4	22,1	16,7
STLA	4,2	3,5	8,9	6,1

* n=2

ST: *S. thermophilus*; LA: *L. acidophilus*; STLA: *S. thermophilus* com *L. acidophilus*

Figura 29: Valores médios ($n=4$) de tempos para se atingir pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e pH 4,5 ($t_{pH4,5}$) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e do controle (CONT) fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

Figura 30: Valores médios ($n=4$) de velocidades máximas de acidificação (V_{max}) e de tempos para se atingir velocidades máximas de acidificação (t_{Vmax}) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e do controle (CONT) fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

5.7. Estudo de estabilidade ao armazenamento do bioiogurte controle e suplementado no ponto ótimo, fermentados por co-cultura de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

A co-cultura com *L. acidophilus* foi escolhida para o estudo de estabilidade ao armazenamento por ser a que apresenta maior perda de viabilidade durante o armazenamento, relatada por diversos autores (NIGHSWONGER; BRASHEARS; GILLILAND, 1996; DAVE; SHAH, 1998a; OLIVEIRA *et al*, 2001; DAMIN *et al.*, 2006b), e por apresentar efeito positivo sobre a viabilidade quando cresce em leite suplementado com hidrolisados (LUCAS *et al.*, 2004), além de ser o resultado com maior valor de desejabilidade obtido pela MSR.

5.7.1. Contagens de microrganismos

As respectivas contagens das populações de ST e LA foram de 6,3 e 6,4 log ufc/mL, imediatamente após a inoculação. O ST apresentou crescimento de 3 ciclos log durante a fermentação, para os dois leites, com a contagem em d1 de 9,3 log ufc/mL para o leite controle e o leite ótimo. Durante o período de armazenamento a contagem se ST permaneceu estável durante os 28 dias de armazenamento, sendo 9,2 log ufc/mL e 9,1log ufc/mL, no bioiogurte controle e no ótimo, respectivamente, aos 28 dias de armazenamento.

As respectivas contagens de LA em d1 foram de 8,1 e 8,3 log ufc/mL, para os leites controle e ótimo, representando crescimentos de 1,8 ciclos log para o leite controle e 1,9 ciclos log para o leite ótimo. O crescimento de 3 ciclos log observado para ST foi superior a estes, ainda assim, LA cresceu bem no leite ótimo, independente do menor tempo para se atingir pH 4,5 neste leite.

A população de LA no bioiogurte controle decresceu apenas 0,3 ciclos log durante o período e armazenamento de 28 dias, enquanto no ótimo diminuiu 1,3 ciclos log. As contagens de LA em d28 foram de 7,9 e 6,9 log ufc/mL para bioiogurte controle e ótimo, respectivamente. Embora com valor menor no bioiogurte ótimo, a contagem permaneceu acima de 10^6 ufc/mL aos 28 dias, o que permitiria ao produto exercer efeitos benéficos à saúde (Figura 31).

Figura 31: Contagens de *L. acidophilus* obtidas para leite suplementado no ponto ótimo (LAOT) e para o controle (CONT), armazenados a 4–6°C, para leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p < 0,05$)

Em outro estudo foi demonstrado o efeito positivo de adição de 50 a 250 mg/L de cisteína ao leite a ser fermentado por *L. acidophilus*, melhorando o crescimento deste (DAVE; SHAH, 1997a). Esse resultado difere do obtido por Lucas *et al.* (2004), no qual a redução do tempo de fermentação obtida com o enriquecimento do leite com hidrolisados de caseína e de proteína de soro resultou em menor crescimento do LA.

Rybka e Fleet (1997) examinaram quinze iogurtes e leites fermentados de 16 fabricantes australianos. As populações viáveis de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* excederam 10^7 UFC/mL. *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. foram estudados durante estudo de vida-de-prateleira a 4 e a 10°C. As bactérias permaneceram viáveis até seis semanas.

A associação com a cultura iniciadora sobre o aumento do número de bactérias probióticas foi estudada por Dave e Shah (1997b) durante a produção e a estabilidade ao armazenamento. As bactérias probióticas tiveram a multiplicação e a viabilidade afetadas pelas culturas associadas. Na presença de *L. bulgaricus*, a

contagem de *L. acidophilus* decresceu rapidamente, provavelmente devido à produção de peróxido de hidrogênio por *L. bulgaricus*.

Dave e Shah (1997a) também estudaram a viabilidade das bactérias do iogurte e probióticas em leites suplementados com cisteína, por 35 dias de estocagem. A viabilidade de LA aumentou com adição de 250 mg/L de cisteína, quando em co-cultura com as bactérias do iogurte.

Estudo de McComas e Gilliland (2003) mostrou melhora significativa no crescimento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com a suplementação do leite por proteína hidrolisada de soro, enquanto ST não foi afetado. Entretanto, após 28 dias de armazenamento, a contagem de probióticos do leite suplementado era igual ou inferior à contagem do controle não suplementado (MCCOMMAS; GILLILAND, 2003).

Ravula e Shah (1998) testaram o efeito da adição de hidrolisado de caseína no crescimento de *L. acidophilus* e bifidobactéria, na produção de sobremesa láctea fermentada congelada. Observaram efeito significativo na sobrevivência de ambos no período de 12 semanas, além da população de bifidobactéria ter sido mais alta no final da fermentação.

Sodini *et al.* (2002) observaram que o enriquecimento do leite com hidrolisados de caseína resultou em aumento na população de bactérias probióticas, mas a concentração de LA decresceu significativamente durante as cinco semanas do estudo, entre 2 e 4,5 ciclos log, influenciada pela base láctea e pela cultura iniciadora associada. A cultura mista de LA e ST manteve maior viabilidade que quando associada a culturas ST-LB. Shihata e Shah (2002), entretanto, concluíram que a viabilidade de bactérias probióticas de culturas comerciais compostas de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* (ABT) foi melhor quando fermentadas em associação com cultura *starter* adicionada de *L. bulgaricus*.

Muitos fatores afetam a viabilidade das bactérias probióticas, como pós-acidificação e oxigênio dissolvido. Talwalkar *et al.* (2004) mostraram que culturas probióticas de *L. acidophilus* e *B. lactis* sobreviveram por 42 dias em leites fermentados, quando armazenados em embalagens de material barreira a gases, ou embalagens barreira com agente seqüestrante de O₂.

Lucas *et al.* (2004) observaram melhora na viabilidade de *L. acidophilus* durante armazenamento quando o leite foi suplementado com hidrolisados de caseína e de proteína de soro. Outro fator relatado como estimulante da viabilidade dos probióticos e das bactérias do iogurte foi a presença de inulina (DONKOR *et al.*, 2007), em estudo de viabilidade em 28 dias.

5.7.2. pH e pós-acidificação

O pH variou de 4,34 a 4,14 para o bioiogurte ótimo e de 4,43 a 4,20 para o controle, com redução de 0,20 upH para as duas amostras durante o período de armazenamento. O pH de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* suplementado no ponto ótimo caiu mais rapidamente até d14 e depois se manteve estável, enquanto o pH do controle caiu mais lentamente durante o estudo de estabilidade ao armazenamento (Figura 32). A pós-acidificação em d1 foi mais acentuada no bioiogurte ótimo, visto que o pH final de fermentação foi 4,50 para as duas amostras, mas o valor de d1 diferiu significativamente. A suplementação provavelmente resultou em maior atividade das culturas. A pós-acidificação é evidenciada pela queda de pH durante armazenamento refrigerado e pode ser explicada pela atividade metabólica dessas bactérias, que persiste a baixas temperaturas.

A pós-acidificação e o nível de acidez são os principais fatores que afetam a viabilidade das bactérias probióticas. Dave e Shah (1997a) também observaram queda mais acentuada de pH durante a estocagem quando o leite foi suplementado com cisteína. Quando as células das bactérias do iogurte sofreram processo de ruptura para liberação da β -galactosidase antes da fermentação, os probióticos *L. acidophilus* e *B. longum* apresentaram maior crescimento (2 ciclos log) e maior viabilidade durante a estocagem por 6 semanas (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997).

Figura 32: Valores médios ($n=3$) de pH, obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6 °C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)

Segundo Tamime e Robinson (1999), o pH afeta a força de agregação no gel de caseína. Afonso e Maia (1999) relataram que a queda de pH induz a mudanças iônicas na rede protéica, originando quebra nas interações. Embora tenha ocorrido degradação da estrutura no referido estudo, a consistência do iogurte aumentou com o tempo.

A queda de pH mais acentuada no leite ótimo que no controle está de acordo com o obtido em leite fermentado probiótico suplementado com cisteína, hidrolisado de caseína, proteína de soro concentrada e triptona, que foi mais que o dobro da queda de pH em leite controle não suplementado durante 35 dias de estocagem (DAVE; SHAH, 1998a).

Lucas *et al.* (2004) também observaram pós-acidificação mais acentuada em leites suplementados, que foi resultante do efeito estimulante no metabolismo das bactérias pelo maior teor de nitrogênio.

5.7.3. Firmeza

A firmeza variou de 0,386 a 0,495N, para o bioiogurte ótimo, e de 0,285 a 0,360N, para o controle, durante o período de armazenamento. Os valores de

firmeza de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* suplementado no ponto ótimo foram significativamente superiores aos do controle, durante o estudo de estabilidade ao armazenamento. A firmeza do bioiogurte ótimo aumentou entre d1 e d21 (máximo 0,531N) e diminuiu em d28; para o controle a firmeza cresceu entre d1 e d28 (Figura 33).

Figura 33: Valores médios (n=5) de firmeza, obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6 °C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p < 0,05$)

A firmeza de iogurte de leite de ovelha produzido com culturas probióticas de bifidobactéria, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* decresceu de d1 para d7 e aumentou de d7 para d14, enquanto com as bactérias do iogurte observou-se aumento de d1 a d7 e queda entre d7 e d14 (BONCZAR; WSZOLEK; SIUTA, 2002).

Estudo de Rawson e Marshall (1997) sobre o efeito de culturas de ST e LB, produtoras ou não-produtoras de exopolissacarídeos (EPS), sobre a firmeza, a adesividade e a elasticidade dos iogurtes concluiu que a firmeza é influenciada principalmente pela matriz de proteína e não tanto pela secreção de EPS pelas culturas.

Em estudos anteriores observou-se que a firmeza aumentou entre d1 e d7 para as culturas do iogurte e probióticas contendo co-cultura de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* e com *L. rhamnosus* (DAMIN, 2003). Em estudo de estabilidade ao armazenamento de iogurte (STLB) e leites fermentados probióticos (STLA e STBL) encontrou-se correlação positiva e significativa entre maior firmeza e maior tempo de fermentação (DAMIN *et al.*, 2008).

Efeito de aumento de granulidade foi observado por Sodini *et al.* (2002) e Lucey e Singh (1998), relacionado com tempos mais longos de fermentação, provavelmente devido ao fenômeno de coagulação em duas etapas, no qual a agregação teve início em pH 5,3 e continuou em pH 4,6 (correspondentes ao ponto isoelétrico das proteínas do soro e da caseína, respectivamente). Em intervalo de fermentação muito longo o tempo gasto entre esses dois valores de pH propiciou quebra de ligações e aumento de granulidade do gel.

Resultados similares de aumento da firmeza, durante armazenamento por uma semana de leites fermentados probióticos, foram observados por Oliveira *et al.* (2001), atribuídos ao fortalecimento da estrutura do gel. A maioria dos autores relata o aumento de firmeza durante a primeira semana de armazenamento, com variações entre aumento ou queda no período subsequente.

5.7.4. Determinações reológicas

A tensão limite variou de 20,0 a 28,9Pa, para o bioiogurte ótimo, e de 14,6 a 23,4Pa, para o controle, durante o período de armazenamento. Os valores de tensão limite de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* suplementado no ponto ótimo foram significativamente superiores aos do bioiogurte controle durante o estudo de estabilidade ao armazenamento. As tensões limite do bioiogurte ótimo e do controle mostraram aumento entre d1 a d28 (Figura 34). O aumento da tensão limite indica que com o passar do tempo aumenta a tensão de cisalhamento necessária para produzir deformação nas amostras com o passar do tempo, para o período estudado.

O tipo de proteína empregada na fortificação do leite afetou a tensão limite e a viscosidade complexa em estudo de fortificação. Os maiores valores foram encontrados em leites fortificados com leite em pó desnatado e três concentrados

protéicos de soro, enquanto outros dois concentrados resultaram nos menores valores (SODINI; MONTELLA; TONG, 2005).

A tensão limite de iogurtes produzidos a partir de leites tratados por processo de alta pressão hidrostática foi de 13,7 a 49,3Pa, enquanto a tensão limite do tratado a 85 °C por 30min foi de 63,5Pa. O controle não recebeu tratamento térmico ou por alta pressão, apresentando tensão limite de 12,2Pa (HARTE *et al.*, 2002). Os autores usaram ensaios de rampa de tensão *versus* deformação para a determinação. Os valores de tensão limite para o bioiogurte controle obtidos no presente trabalho estão acima destes valores encontrados para leite não tratado e do mínimo do leite tratado por alta pressão, enquanto o bioiogurte ótimo tem valores intermediários aos ensaios de alta pressão.

A tensão limite para determinação de firmeza inicial em iogurte foi usada por Harte, Clark e Barbosa-Cánovas (2007). O objetivo foi obter um método substituto à análise sensorial e provadores treinados, facilitando a análise de dados e reduzindo a variância causada pelos panelistas. A tensão limite mostrou correlação significativa com a firmeza inicial de iogurtes comerciais e produzidos em laboratório, percebida por provadores treinados. Enquanto a análise sensorial detectava diferenças de 2,35 cm em uma escala de 13,0cm, a medida de tensão limite detectava diferenças equivalentes a 0,3cm na mesma escala.

O módulo de armazenamento (G') predominou sobre o módulo de perda (G'') durante todo o período estudado. Valor de G' maior que G'' indicou que o produto tem características predominantemente elásticas. Os valores de módulo de armazenamento de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* suplementado no ponto ótimo foram significativamente superiores aos do controle durante o estudo de estabilidade ao armazenamento. O G' variou de 2,7 a $3,6 \cdot 10^2$ Pa, para o bioiogurte ótimo, e de 1,6 a $2,3 \cdot 10^2$ Pa, para o controle, de d1 a d28. O G' do bioiogurte ótimo mostrou aumento mais acentuado de d7 para d14, permanecendo estável entre d14 e d21 e crescendo em d28, enquanto para o bioiogurte controle G' aumentou durante todo o período (Figura 35).

O limite de viscoelasticidade linear (LVE) das amostras ficou entre 1,5 e 2,0% durante todo o período, com exceção de bioiogurte controle em d28, que aumentou para 6,4%.

Os valores de módulo de perda (G'') de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* suplementado no ponto ótimo foram significativamente superiores aos do controle durante o estudo de estabilidade ao armazenamento. O G'' variou de 6,8 a $8,5 \cdot 10^1$ Pa, para o bioiogurte ótimo, e de 4,0 a $5,5 \cdot 10^1$ Pa, para o controle, de d1 a d28. O G'' do bioiogurte ótimo mostrou aumento mais acentuado de d7 para d14, permanecendo estável entre d14 e d21 e crescendo em d28, enquanto para o controle G'' mostrou maior aumento entre d1 e d7 (Figura 36).

Serra *et al.* (2008) observaram aumento de G' durante a estocagem de iogurte, fato que foi atribuído a fusão parcial das micelas de caseína e rearranjos inter-partículas, que podem ter resultado em mais ligações. Segundo os autores, essas reações resultaram da contínua queda de pH observada.

Figura 34: Valores médios ($n=4$) de tensão limite (*Yield stress*) obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)

Figura 35: Valores médios ($n=2$) de módulo de armazenamento (G') obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)

Figura 36: Valores médios ($n=2$) de módulo de perda (G'') obtidos para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)

Resultados opostos foram observados por Afonso e Maia (1999), no qual a ocorrência de pós-acidificação e proteólise com longo tempo de estocagem foi relacionada com a queda de G' . Os autores concluíram que a influência do tempo de estocagem é mais significativa sobre iogurte batido do que no iogurte firme, caso no qual se forma uma estrutura protéica fraca. Com o tempo de estocagem essa estrutura é severamente degradada, como efeito da pós-acidificação e proteólise, causando queda dos módulos de perda e de armazenamento. As curvas de fluxo mostraram características tixotrópicas no iogurte firme.

Lucey *et al.* (1997) notaram aumento em G' quando a temperatura de aquecimento do leite foi de 80 para 85 °C, mas esta influência é dependente do tipo de fortificação do leite.

O percentual de recuperação variou de 33,2 a 30,3%, para o bioiogurte ótimo, e de 54,6 a 55,5%, para o controle. Os valores de percentual de recuperação de bioiogurte controle fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* foram significativamente superiores aos do suplementado no ponto ótimo durante o estudo de estabilidade ao armazenamento. O percentual de recuperação do bioiogurte ótimo mostrou queda em d14 a d21, com pequeno aumento em d28, enquanto o controle apresentou queda em d21 e aumento em d28 (Figura 37).

As amostras de bioiogurte ótimo que têm maior teor de proteínas formam uma estrutura mais densa que, depois de quebradas, tem menor recuperação que o controle.

Oliveira *et al.* (2002) relataram redução da tixotropia de bebida láctea probiótica durante armazenamento de 28 dias. O resultado foi atribuído a aumento da força das ligações que eleva a firmeza do gel, mas resulta em menor recuperação da estrutura com o tempo.

Figura 37: Valores médios ($n=2$) de percentual de recuperação obtidos dos ensaios de tixotropia para bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) e controle (CONT), armazenados a 4–6°C, fermentados por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*. Médias com letras diferentes são diferentes significativamente ($p<0,05$)

5.7.5. Estudo exploratório por microscopia eletrônica de varredura

Amostras do bioiogurte fermentado por STLA com leite suplementado no ponto ótimo e controle foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura para estudo da microestrutura. O exame das imagens mostrou estruturas densas, com agregados irregulares, com as bactérias interligadas a essas estruturas e com poros de diferentes tamanhos (Figuras 38 e 40). As imagens, ampliadas 5.000x e 10.000x, foram analisadas em relação à quantidade e ao tamanho de poros para se verificar se havia diferença entre elas. Usando o programa *Image Pro-Plus* foi possível analisar o diâmetro e a quantidade de poros, observados nas imagens binárias geradas à partir das micrografias, fixando-se uma faixa de diâmetro (Figuras 39 e 41). Depois de testes que não determinaram a faixa de diâmetro, foi escolhida a faixa de 0 a 10µm para as análises.

A contagem nas micrografias do leite ótimo apresentou maior quantidade de poros com diâmetro menor que 1µm, para as imagens de 5.000 e 10.000x. Em bioiogurte ótimo, 54% e 67,2% dos poros estavam abaixo de 1µm, enquanto para o

bioiogurte controle, 38,5% e 58,7% estavam nessa faixa, para aumentos de 5.000 e 10.000x, respectivamente (Figura 42).

O teor de proteína mais alto da amostra ótima mostrou maior número de poros, de menor diâmetro, o que representa uma matriz mais densa, enquanto a micrografia do bioiogurte controle apresentou maior percentual de orifícios de maior diâmetro. A presença de *S. thermophilus* ligados à matriz protéica foi observada nos bioiogurtes controle e ótimo, mas não foi possível identificar *L. acidophilus* nessas imagens.

Bhullar, Uddin e Shah (2002) estudaram o efeito da suplementação do leite com proteína concentrada de soro, soro em pó e leite desnatado sobre a textura e a microestrutura do iogurte. Poros foram observados facilmente nas amostras com soro em pó e leite em pó desnatado, mas não eram visíveis quando foi adicionada a proteína concentrada de soro. Os autores consideraram que, devido ao tratamento térmico, houve formação de complexos das proteínas do soro com a caseína, resultando em rede protéica mais densa.

Um iogurte com matriz mais densa deve sofrer menor sinérese, segundo resultado observado por Trachoo e Mistry (1998). Os autores observaram uma matriz mais aberta em iogurte desnatado, em relação aquele com baixo teor de gordura enriquecido com *buttermilk* ultrafiltrado (BUF) em pó, efeito atribuído ao maior teor de proteínas presente no produto enriquecido com BUF, que também resultou em textura mais firme. Poros menores e estrutura mais compacta foram encontrados em *labneh* com maior teor de proteínas, quando comparado ao produto de menor teor em um estudo conduzido por Ozer *et al.* (1999). Nesses trabalhos não são citados métodos ou programa de análise das micrografias.

Figura 38: Imagem obtida através de microscopia eletrônica de varredura de bioiogurte controle (CONT) fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

Figura 39: Imagem binária obtida através do programa *Image Pro Plus*, da micrografia de bioiogurte controle (CONT) fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

Figura 40: Imagem obtida através de microscopia eletrônica de varredura de bioiogurte fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, suplementado no ponto ótimo (LAOT)

Figura 41: Imagem binária obtida através do programa *Image Pro Plus*, da micrografia de bioiogurte suplementado no ponto ótimo (LAOT) fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus*

Figura 42. Distribuição do diâmetro médio de poros, obtida para as micrografias das amostras de bioiogurte controle (CONT) e bioiogurte fermentado suplementado no ponto ótimo (LAOT), usando o programa *Image Pro Plus*

6. CONCLUSÕES

As bactérias probióticas e do iogurte cresceram durante a fermentação, com aumento médio das contagens de 2,67, 1,44 e 2,34 ciclos log para *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, respectivamente. *Streptococcus thermophilus* aumentou 3,02 ciclos log. Em todos os ensaios os bioiogurtes obtidos puderam ser considerados probióticos, pois as populações foram superiores ao recomendado para promoção de efeitos benéficos à saúde.

A atividade acidificante das culturas foi melhorada com a suplementação e houve redução no tempo de fermentação, sendo que a co-cultura *S. thermophilus* – *L. bulgaricus* mostrou a menor queda (0,32h), seguida de *S. thermophilus* – *L. acidophilus* (2,43h) e *S. thermophilus* – *B. lactis* (2,34h). A composição da mistura correspondente ao menor tempo de fermentação variou com as culturas, indicando que a concentração dos ingredientes empregados tem efeito diferente entre elas.

O hidrolisado de caseína tem maior influência nos tempos de fermentação, enquanto a proteína concentrada de soro tem maior influência na firmeza. Este ingrediente mostrou efeito indesejável na atividade acidificante e na firmeza quando presente na concentração máxima empregada. As interações entre os ingredientes foram significativas.

A Metodologia de Superfície de Resposta com delineamento de mistura permitiu o estabelecimento de composições otimizadas de misturas de hidrolisado de caseína, de proteína concentrada de soro e de leite em pó desnatado, para suplementação do leite na produção de bioiogurtes.

A otimização para a co-cultura *S. thermophilus* – *L. bulgaricus*, através dos modelos quadráticos para as respostas t_{vmax} , $t_{pH5,0}$ e $pHd1$, resultou em desejabilidade global de 85%, sendo que a composição da mistura otimizada é de 33% de hidrolisado de caseína, 25% de proteína concentrada de soro e 42% de leite em pó desnatado. A otimização para a co-cultura *S. thermophilus* – *B. lactis*, através dos modelos quadráticos de t_{vmax} , contagem de *B. lactis* e firmeza, resultou em desejabilidade global de 69%, sendo que a composição da mistura otimizada é de 25% de hidrolisado de caseína, 50% de proteína concentrada de soro e 25% de leite em pó desnatado. A otimização para a co-cultura *S. thermophilus* – *L. acidophilus*,

através dos modelos quadráticos para as respostas tempo para se atingir pH 5,0 e 4,5 ($t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$), resultou em desejabilidade global de 95%, sendo que a composição de mistura otimizada é de 50% de hidrolisado de caseína, 0% de proteína concentrada de soro e 50% de leite em pó desnatado. A otimização para *S. thermophilus* – *L. acidophilus* incluiu a resposta tempo para se atingir o pH 4,5 e resultou no maior valor de desejabilidade. Assim, a cultura *S. thermophilus* – *L. acidophilus* foi utilizada em estudo de estabilidade ao armazenamento do bioiogurte.

A fermentação do leite otimizado e do controle evidenciou a influência significativa da suplementação do leite na atividade acidificante de culturas puras *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, além da co-cultura *S. thermophilus* – *L. acidophilus*. Reduziu-se em relação ao controle aproximadamente 43%, 24% e 32% no tempo para se atingir o pH 4,5, para *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* – *L. acidophilus*, respectivamente.

Estudo de estabilidade ao armazenamento do bioiogurte durante 28 dias mostrou que:

- ✓ *S. thermophilus* se manteve estável;
- ✓ *L. acidophilus* apresentou maior queda no número de bactérias viáveis em leite otimizado do que em leite controle, provavelmente devido à maior atividade;
- ✓ a pós-acidificação em leite controle foi menor que em leite otimizado, fator que também indica maior atividade;
- ✓ a firmeza, a tensão limite, os módulos de perda e de armazenamento do leite otimizado foram superiores ao leite controle durante o estudo, enquanto a porcentagem de recuperação estrutural apresentou comportamento oposto;
- ✓ a análise de micrografias do leite ótimo e do controle mostrou maior percentual de poros de menor diâmetro para o primeiro.

7. SUGESTÕES

A baixa viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* é um fator que requer estudos, desde que um período de validade de 28 dias para um bioiogurte possa ser considerado insuficiente para a indústria. Logo, estudo de viabilidade em embalagem livre de oxigênio, microencapsulação das culturas probióticas, a adição de outros fatores de crescimento e a fermentação em co-cultura com bifidobactérias podem ser sugestões para a continuidade das pesquisas.

Um estudo focando as características sensoriais dos bioiogurtes a partir do leite suplementado também se faz necessário, visto que os peptídeos e aminoácidos presentes no hidrolisado podem alterar o sabor final do produto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, I.M.; MAIA, J.M. Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. *Journal of Food Engineering*, v.42, p.183-190, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em agosto/2007. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia/lista_alega.htm. Acesso em: 26 out. 2007.

AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, v.19, n.3, p.227-246, 2005.

ANGIOLONI, A., COLLAR, C. Small and large deformation viscoelastic behaviour of selected fibre blends with gelling properties. *Food Hydrocolloids*, in press: doi:10.1016/j.foodhyd.2008.04.005, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. *Official methods of analysis*. 13.ed. Washington: AOAC, 1980. 858p.

AUGUSTIN, M.A.; CHENG, L.J.; CLARKE, P.T. Effects of preheat treatment of milk powder on the properties of reconstituted set skim yogurts. *International Dairy Journal*, v.9, p.415-416, 1999.

BARNES, H.A.; HUTTON, J.F.; WALTERS, K. *An introduction to rheology*. Amsterdam: Elsevier, 1993. 199p.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Campinas: UNICAMP, 2001. 401p.

BÉAL, C.; CORRIEU, G. Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398 at the different steps of their production. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.27, n.1, p.86-92. 1994.

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. *Journal of Dairy Science*, v.82, p.673-681, 1999.

BENEZECH, T.; MAINGONNAT, J.F. Characterization of the rheological properties of yoghurt: a review. *Journal of Food Engineering*, v.21, p.447-472, 1994.

BHULLAR, Y.S.; UDDIN, M.A.; SHAH, N.P. Effects of ingredients supplementation on textural characteristics and microstructure of yoghurt. *Milchwissenschaft*, v.57, p.328-332, 2002.

BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro*. Campinas. 2005. 203p. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

BONCZAR, G.; WSZOLEK, M.; SIUTA, A. The effects of certain factors on the properties of yoghurt made from ewe's milk. *Food Chemistry*, v.79, p.85-91, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de Consulta à Legislação. *Instrução Normativa SDA n.22, de 14 de abril de 2003*. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>. Acesso em: 11 de outubro de 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de Consulta à Legislação. *Instrução Normativa n.46, de 23 de outubro de 2007*. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e qualidade de leites fermentados publicado no Diário Oficial da União de 24/10/2007, Seção 1, p.5. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164>. Acesso em: 26 out. 2007.

CARDARELLI, H.R. *Desenvolvimento de queijo petit-suisse simbiótico*. São Paulo, 2006. 133p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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*. 16.ed. Washington, 1992. p.327-404.

CASTRO, I.A.; ROGERO, M.M.; JUNQUEIRA, R.M.; CARRAPEIRO, M.M. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, v.41, suppl.1, p.59-67, 2006.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, v.8, p.487-490, 1998.

CORNELL, J.A. *Experiments with mixtures: designs, models and the analysis of mixture data*. New York: Wiley, 1981. 305p. (Wiley series in probability and mathematical statistics).

DAMIN, M.R. *Efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína e com proteína concentrada de soro na obtenção de leites fermentados probióticos*. São Paulo, 2003. 116p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DAMIN, M.R.; EMILIO, K.E.; MINOWA, E.; OLIVEIRA, M.N. Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final da vida-de-prateleira. *Leite & Derivados*, ano.15, n.94, p.20-30, 2006a.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCANTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Chemical and viability changes during fermentation and cold storage of fermented milk manufactured using yogurt and probiotic bacteria. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY “FOOD IS LIFE”, 13, Nantes, 2006. *Proceedings*. Ontario: International Union of Food Science & Technology, 2006b. p.1309-1319.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCANTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies*, v.39, p.40-55, 2008.

DANNENBERG, F.; KESSLER, H.G. Effect of denaturation of β -lactoglobulin on texture properties of set-style nonfat yoghurt. 2. Firmness and flow properties. *Milchwissenschaft*, v.43, p.700-730, 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. *International Dairy Journal*, 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. *International Dairy Journal*, v.7, p.31-41, 1997b.

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

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.53, p.180-184, 1998b.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, v.12, n.4, p.214-219, 1980.

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. *Journal of Texture Studies*, v.32, p.205-217, 2001.

DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, v.17, p.657-665, 2007.

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.

FOLKENBERG, D.M.; DEJMEK, P.; SKRIVER, A. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and stirred yoghurts produced with different starter cultures. *Journal of Texture Studies*, v.36, p.174-189, 2005.

FONSECA, F.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Method of quantifying the loss activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, v.67, p.83-90, 2000.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Rome: FAO/WHO, 2002. 11p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: FAO/WHO, 2006. 53p. (FAO Food and nutrition paper, 85) [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food, including powder milk with live lactic acid bacteria: Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001; Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food].

FOSCHINO, R.; FIORI, E.; GALLI, A. Survival and residual activity of *Lactobacillus acidophilus* frozen cultures under different conditions. *Journal of Dairy Research*, v.63, p.295-303, 1996.

FOX, P.F. Milk proteins as food ingredients. *International Journal of Dairy Technology*, v.54, p.41-55, 2001.

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. *Journal of Food Science*, v.28, p.390-396, 1963.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; KELLY, P.M.; STANTON, C. Microbiology of therapeutic milks. In: ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology handbook*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. cap.9, p.431-478.

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. *International Dairy Journal*, v.9, p.125-134, 1999.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. *Journal of Dairy Science*, v.60, p.1395-1398, 1977.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, v.10, p139-157, 1999.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, v.93, p.783-786, 2005.

GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; REYES-GAVILÁN, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. *Food Research International*, v.37, p.839, 2004.

GUEIMONDE, M.; SALMINEN, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, v.38, suppl.2, p.S242-S247, 2006.

HAQUE, Z.U.; JI, T. Cheddar whey processing and source: II effect on non-fat ice cream and yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v.38, p.463-473, 2003.

HARTE, E.; AMONTE, M.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Yield stress and microstructure of set yogurt made from high hydrostatic pressure-treated full fat milk. *Journal of Food Science*, v.67, p.2245-2250, 2002.

HARTE, F.; CLARK, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Yield stress for initial firmness determination on yogurt. *Journal of Food Engineering*, v.80, p.990-995, 2007.

HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid products. *Journal of Texture Studies*, v.2, p.393-418, 1971.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v.41, 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. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.365S-373S, 2001.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Dairy Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria (LAB) – Standard of Identity, Standard No. 149A, 1997.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yoghurt /Enumeration of Characteristic Microorganisms – Colony Count Technique at 37 °C, Standard No. 117, 2003.

JAROS, D.; ROHM, H.; HAQUE, A.; BONAPARTE, C.; KNEIFEL, W. Influence of the starter culture on the relationship between dry matter content and physical properties of set-style yogurt. *Milchwissenschaft*, v.57, n.6, p.325-328, 2002.

KALAB, M.; HARWALKER, V.R. Milk gel structure. II Relation between firmness and ultrastructure of heat-induced skim milk gel containing 40-60% total solids. *Journal of Dairy Research*, v.41, p.131-135, 1974.

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

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

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. *Food Chemistry*, v.83, p.437-446, 2003.

KURMANN, J.A.; RASIC, J.L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON, R.K. *Therapeutic properties of fermented milks*. London: Elsevier Applied Food Sciences, 1991. cap.6, p.117-158.

LEE, S.L.; CHEN, W.C. Optimization of medium composition for the production of glucosyltransferase by *Aspergillus niger* with response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v.21, p.436-440, 1997.

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Optimization of cholesterol removal by probiotics in the presence of prebiotics by using response surface method. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.1745-1753, 2005.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJEON, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, v.11, p.1-17, 2001.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, v.14, p.47-53, 2004.

LUCEY, J.A.; TEO, C.T.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Rheological properties at small (dynamic) and large (yield) deformations of acid casein gels made from heated milk. *Journal of Dairy Research*, v.64, p.591-600, 1997.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, v.30, p.529-542, 1998.

LUCEY, J.A.; TEO, C.T.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Microstructure, permeability, and appearance of acid gels made from heated skim milk. *Food Hydrocolloids*, v.12, p.159-165, 1998.

LUCEY, J.A.; MUNRO, P.A.; SINGH, H. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. *International Dairy Journal*, v.9, n.3/6, p.275-279, 1999.

LUCEY, J.A. The relationship between rheological parameters and whey separation in milk gels. *Food Hydrocolloids*, v.15, p.603-608, 2001.

LUCEY, J.A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, p.77-84, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Probiotic functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIAMS, C.M. *Functional foods-concept to product*. Boca Raton: CRC Press, 2000. cap.12, p.287-312.

McCARTNEY, A.L. Enumeration and identification of mixed probiotic and lactic acid bacteria starter cultures. In: TAMIME, A.Y. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell, 2005. cap.5, p.99-119.

McCOMAS Jr., K.A.; GILLILAND, S.E. Growth of probiotic and traditional yogurt cultures in milk supplemented with whey protein hydrolysate. *Journal of Food Science*, v.68, n.6, p.2090-2095, 2003.

MOREIRA, S.R.; SCHWAN, R.F.; CARVALHO, E.P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras – MG, Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.19, n.1, p.147-152, 1999.

NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton: CRC Press, 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. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.212-219, 1996.

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. *International Dairy Journal*, v.11, p.935-942, 2001.

OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *Journal of Food Science*, v.67, p.2336-2341, 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. 1 CD-ROM.

ØSTLIE, H.; HELLAND, M.H.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, v.87, p.17-27, 2003.

OUWEHAND, A.; KIRJAVAINEN, C.; PIRKKA, V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, v.9, p.43–52, 1999.

OZER B.H.; STENNING, R.A.; GRANDISON, A.S.; ROBINSON, R.K. Rheology and microstructure of labneh (Concentrated yogurt). *Journal of Dairy Science*, v.82, p.682-689, 1999.

PATOCKA, G.; CERVENKOVA, R.; NARINE, S.; JELEN, P. Rheological behaviour of dairy products affected by soluble whey protein isolate. *International Dairy Journal*, v.16, p.399-405, 2006.

PENNA, A.L.B.; BARUFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da qualidade de iogurtes. *Leite & Derivados*, v.3, n.16, p.13-19, 1994.

PENNA, A.L.B.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. N. Simultaneous effects of total solids content, milk base, heat treatment temperature and sample temperature on the rheological properties of plain stirred yogurt. *Food Technology and Biotechnology*, v.44, p.515–518, 2006.

PLAYNE, M.J.; BENNETT, L.E.; SMITHERS, G.W. Functional dairy foods and ingredients. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.58, p.242-262, 2003.

PONS, N.; FISZMAN, S.M. Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, v.27, p.597-624, 1996.

PRENTICE, J.H. *Dairy rheology: a concise guide*. New York: VHC Publishers, 1992. 165p.

PUVANENTHIRAN, A.; WILLIAMS, R.P.W.; AUGUSTIN, M.A. Structure and visco-elastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. *International Dairy Journal*, v.12, p.383-391, 2002.

RAO, M.A. Rheology of liquid foods. *Journal of Texture Studies*, v.8, p.135-168, 1977.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Effect of acid casein hydrolysate and cysteine on the viability of yogurt and probiotic bacteria in fermented frozen dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.53, p.175-179, 1998.

RAWSON, H.; MARSHALL, V.M.; Effect of 'ropy' strains of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v.32, p.213-220, 1997.

REMEUF, F.; MOHAMMED, S.; SODINI, I.; TISSIER, J.P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. *International Dairy Journal*, v.13, p.773-782, 2003.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British Journal of Nutrition*, v.80, n.4, suppl., p.S197-S202, 1998.

ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.Y.; WSZOLEK, M. Microbiology of fermented milks. In: ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology handbook*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. cap.8, p.367-430.

ROHM, H.; SCHMID, W. Influence of dry matter fortification on flow properties of yogurt. 1. Evaluation of flow curves. *Milchwissenschaft*, v.48, p.556-559, 1993.

ROSENTHAL, A.J. *Food texture: measurement and perception*. Gaithersburg: Aspen, 1999. 311p.

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. *Food Australia*, v.49, p.471-475, 1997.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON RUAULT, M.C. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, v.80, suppl.1, p.S147-171, 1998.

SALMINEN, S.; GORBACH, S.; LEE, Y.; BENNO, Y. Human studies on probiotics: what is scientifically proven today? In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 2004. cap.18, p.515-530.

SAXELIN, M.; KORPELA, R.; MÄYRÄ-MÄKINEN, A. Introduction: classifying functional dairy products. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M., eds. *Functional dairy products*. Boca Raton: CRC Press; Cambridge: Woodhead, 2003. cap.1, p.1-16. (Woodhead Publishing in food science and technology).

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yogurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. *Food Hydrocolloids*, in press, doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.11.015, 2008.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.894-907, 2000.

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

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. *International Dairy Journal*, v.7, p.349-356, 1997.

SHIHATA, A.; SHAH, N.P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal*, v.12, p.765-772, 2002.

SINGH, H.; BENNETT, R.J. Milk and milk processing. In: ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology handbook*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 2002. cap.1, p.1-38.

SKRIVER, A.; HANSEN, M.B.; QVIST, K.B. Image analysis applied to electron micrographs of stirred yogurt. *Journal of Dairy Research*, v.64, p.135-143, 1997.

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. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.2479-2488, 2002.

SODINI, I., REMEUF, F., HADDAD, S.; CORRIEU, G. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.44, p.113-137, 2004.

SODINI, I.; MONTELLA, J.; TONG, P.S. Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.85, p.853-859, 2005.

SOUZA, G. Fatores de qualidade do iogurte. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v.21, n.1, p.20-27, 1991.

SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research*, 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, New York: 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.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SIDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, v16, p.198-203, 2005.

STEFFE, J.F. Rheological methods in food process engineering. 2.ed. East LLansing: Freeman Press, 1996. 418p.

SZCZESNIAK, A.S. Classification of textural characteristics. *Journal of Food Science*, v.28, p.385-389, 1963.

SZCZESNIAK, A.S. Sensory texture profiling: historical and scientific perspectives. *Food Technology*, v.52, n.8, p.54-57, 1998.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, v.67, p.147-156, 2005.

TALWALKAR, A.; MILLER, C.W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in

yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, v.39, p.605-611, 2004.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. *Yoghurt: science and technology*. 2.ed. Boca Raton: CRC; Cambridge: Woodhead, 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. (Sheffield food technology).

TAMIME, A.Y.; SAARELA, A.; KORSLUND-SØNDERGAARD, A.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In: TAMIME, A.Y. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell, 2005. cap.3, p.39-72.

TRACHOO, N.; MISTRY, V.V. Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in manufacture of nonfat and low fat yogurts. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.3163-3171, 1998.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.12, p.579-589, 2002.

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

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. *Dairy science and technology*. Boca Raton: CRC, 2006. 782p.

WANG, Y.; CORRIEU, G.; BÉAL, C. Fermentation pH and temperature influence the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* DR758. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.21-29, 2005.

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. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.34, p.251-261, 2001.

ZISU, B.; SHAH, N.P.; Effects of pH, temperature, supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* 1275. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.3405-3415, 2003.