1. INTRODUÇÃO

De acordo com a nova legislação brasileira de produtos lácteos, entende-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação lática mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade. Esta mesma legislação define iogurte como o produto cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacilus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que podem ser acompanhados, de forma complementar, por outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2000).

Entre as bactérias láticas que podem ser usadas no preparo de iogurtes e leites fermentados encontram-se as probióticas. Estas são definidas como microrganismos viáveis que afetam beneficamente a saúde do hospedeiro por promoverem balanço da microbiota intestinal, sendo *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* as espécies mais utilizadas como probióticos (FAO/WHO, 2002). As pesquisas com probióticos estão atualmente voltadas na direção do melhoramento das funções fisiológicas definidas pelo impacto nutricional dos alimentos, incluindo o potencial de reduzir os riscos de doenças (ISOLAURI, 2002).

Para assegurar os benefícios à saúde do consumidor, as culturas devem permanecer viáveis durante todo o armazenamento do produto (KURMANN; RASIC, 1991; KAILASAPATHY; RYBKA, 1995; DAVE; SHAH, 1997b; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001; OLIVEIRA *et al.,* 2002; TAMIME *et al.,* 2005; DONKOR *et al.,* 2006).

Iogurte probiótico é um leite fermentado, com as qualidades cientificamente comprovadas do iogurte associadas a outros efeitos benéficos para a saúde (ROLFE, 2000; LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001; CHAGAROVSKII; ZHOLKEVSKAYA, 2003; FABIAN; ELMADHA, 2006; DONKOR *et al.,* 2006; SARKAR, 2008; FABIAN *et al.,* 2008; APONTE *et al.,* 2008; FUKUDA *et al.,* 2008; SANDERS, 2008; BAJAJ *et al.,* 2008; UYENO; SEKIGUCHI; KAMAGATA, 2008; ZUCCOTTI *et al.,* 2008; HUSSAIN; ATTIQ-

UR-RAHMAN; ATKINSON, 2009; SACHDEVA; NAGPAL, 2009). Trata-se de um tipo de produto que está se tornando popular e amplamente consumido em todo o mundo.

A fabricação de iogurte probiótico envolve a suplementação do leite com ingredientes lácteos, a fim de aumentar a concentração de proteína de 40 a 50 g de proteína.kg^{-1} (SODINI; MONTELLA; TONG, 2005). Depois, o leite fortificado é homogeneizado, aquecido (95˚C por 5 min), resfriado à temperatura de fermentação (42˚C) e inoculado com culturas iniciadoras *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e culturas probióticas. Dois tipos de iogurte podem ser produzidos – batido ou natural – que diferem-se de acordo com o gel (quebrado ou não quebrado, respectivamente). A formação do gel é uma das principais propriedades na fabricação de iogurte. As propriedades reológicas do gel são afetadas pela composição do leite, pela temperatura e pelo tempo de tratamento térmico, pelo tipo e pela quantidade de cultura utilizada, pela temperatura de fermentação, pela quebra do gel ou não e pelas condições de armazenamento até o final da vida de prateleira dos produtos (LUCEY; SINGH, 1998; XU *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que as bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido à falta de atividade proteolítica e não desenvolvem no produto fortes características sensoriais e reológicas (KLAVER; KINGMAN; WEERKAMP, 1993; OLIVEIRA *et al.,* 2001; LUCAS *et al.,* 2004; DAMIN *et al.,* 2008). Assim, estas bactérias requerem a adição de fatores de crescimento (DAVE; SHAH, 1997a; DAVE; SHAH, 1998) e/ou de aminoácidos livres para melhorar sua multiplicação (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; OLIVEIRA *et al.,* 2002). O uso de hidrolisado de caseína é recomendado na produção de iogurtes, com o objetivo de disponibilizar peptídeos e aumentar o teor de aminoácidos livres, que estimulam o crescimento de *S. thermophilus* (TAMIME; ROBINSON, 1999; OLIVEIRA *et al*., 2001; SODINI *et al.*, 2002).

A suplementação do leite é uma estratégia para melhorar o crescimento de probióticos durante a fermentação e aumentar a viabilidade dessas bactérias durante o armazenamento do iogurte (DAVE; SHAH, 1997a, 1997b; SODINI *et al.,* 2005a). A adição de proteínas, peptídeos e aminoácidos é a melhor escolha para fortificar o leite, mas os estudos publicados não são conclusivos sobre as quantidades destas substâncias a serem utilizadas. Dessa forma, é muito importante o estudo de substâncias diferentes para a suplementação de leite, visando à redução do tempo de fermentação e melhorando as características organolépticas do produto (OLIVEIRA *et al*., 2001; McCOMAS; GILLILAND, 2003; LUCAS *et al.,* 2004).

Tradicionalmente, o leite em pó desnatado (SMP) é usado para enriquecer o leite antes da fermentação. No entanto, a disponibilidade e a qualidade de outros ingredientes lácteos fornecem uma alternativa econômica ao leite em pó desnatado. Entre esses ingredientes alternativos estão os concentrados de proteína de soro de leite (cujo teor de proteína pode variar de 340 a 800 $g.kg^{-1}$) e os caseinatos (caseína, sais de sódio e amônio), que, além de melhorar a textura, podem contribuir com as propriedades funcionais do produto (SÉVERIN; WENSHUI, 2005; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O efeito da substituição do leite em pó desnatado por concentrado de proteína de soro (WPC) ou caseinatos nas propriedades de textura e físico-químicas de iogurtes tem sido estudado por muitos pesquisadores (DANNEMBERG; KESSLER, 1988; OLIVEIRA *et al.,* 2001; BHULLAR; UDDIN; SHAH, 2002; AKALIN *et al.*, 2008; DAMIN *et al.,* 2009). No entanto, existem poucos estudos sobre seus efeitos simultâneos na fabricação de iogurte probiótico (TORRIANI *et al.,*1996; KUDELKA, 2008; KUMAR MISHRA, KAUR, 2009). Além disso, estudos utilizando mais de um ingrediente simultaneamente permitem a redução dos montantes individuais de cada um e, quando apropriado, o uso de instrumentos estatísticos possibilitam otimizar essas quantidades.

Outra prática comum é o uso das culturas iniciadoras do iogurte associadas às bactérias probióticas para melhorar o processo de fermentação para a fabricação de leites fermentados probióticos (SAMONA; ROBINSON, 1994; SHAH; LANKAPUTHRA,1997; DAVE; SHAH, 1997b; OLIVEIRA *et al*., 2001). Entretanto, *L. bulgaricus* produz ácido lático durante o armazenamento sob refrigeração. Este fenômeno, conhecido por pós-acidificação, afeta a viabilidade das bactérias probióticas. Para superar o problema da pós-acidificação, a tendência atual é a de se usar culturas iniciadoras isentas de *L. bulgaricus* (DAVE; SHAH, 1997b) ou que contenham este microrganismo em menores proporções.

Iogurtes probióticos não possuem caracterização reológica e sensorial precisa, sobretudo aqueles suplementados com proteínas lácteas e bactérias probióticas. Seu estudo é fundamental para o processamento e a qualidade dos produtos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos otimizar as propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas (proteína concentrada de soro de leite, caseinato de sódio e leite em pó desnatado), através de um delineamento experimental do tipo *simplex centroide*, para modelagem de misturas, visando, além da adequada cinética de acidificação e número de bactérias viáveis no produto, estabelecer as propriedades reológicas e a microestrutura dos iogurtes probióticos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Produtos lácteos e funcionais

Historicamente, o estado nutricional de populações que vivem em países desenvolvidos é afetado por consumo excessivo de gorduras, elevada ingestão de açúcares e diminuição considerável do consumo de fibras, de vitaminas e de sais minerais (DE ANGELIS, 2002); tais hábitos podem ser causadores da elevada incidência de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis (SAAD *et al.,* 2006).

Com o intuito de diminuir o risco de tais doenças, observa-se acelerado desenvolvimento de alimentos que apresentam, além de características nutricionais e tecnológicas adequadas, componentes que exercem funções biológicas, como manutenção do sistema hormonal, eliminação de patogênicos, diminuição do colesterol sérico e do risco de doenças cardiovasculares (ROBERFROID, 2002).

Os consumidores estão cada vez mais atentos à relação alimento/saúde em consequência do *marketing* dos produtos alimentícios com propriedades benéficas à saúde, ou seja, os alimentos funcionais (NUTRITION BUSINESS JOURNAL, 2002).

Os alimentos funcionais, além de compreenderem aqueles que contêm naturalmente substâncias bioativas, são representados pelos alimentos denominados probióticos, prebióticos e simbióticos (LEROY; DE VUYST, 2004).

Esses alimentos possuem em sua composição original, ou são adicionados de, compostos bioativos, como fibras com propriedades prebióticas (SHAH, 2001), oligossacarídeos (ROBERFROID, 1999), e mesmo microrganismos que equilibram a flora intestinal, proporcionando manutenção da saúde corporal (ANDLAUER; FÜRST, 2002).

De acordo com o *site* Milkpoint (2004), os consumidores estão cada vez mais demandando alimentos que promovam a melhoria da saúde, além de benefícios funcionais extras, o que tem levado ao desenvolvimento de produtos como os iogurtes com probióticos.

O pesquisador Komatsu (2008) menciona vários fatores que vêm estimulando o desenvolvimento de alimentos funcionais ao longo dos últimos anos. Dentre eles, destacam-se principalmente: o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos (cujas populações necessitarão de cuidados hospitalares por maior período de tempo), o elevado custo dos

serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes, a maior divulgação que as instituições públicas de pesquisa têm em divulgarem os resultados de suas investigações e a maior cobertura dos diferentes tipos de mídia dada a essas descobertas e às questões de saúde.

2.2 Iogurte

O iogurte é um produto fermentado elaborado a partir de leite enriquecido com alto teor de sólidos, usando uma cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophillus* (PENNA; OLIVEIRA; BARUFFALDI, 1997).

Inicialmente, o consumo de iogurte foi bastante limitado, restringindo-se apenas a certos grupos étnicos. Em meados de 1960, a adição de frutas ao produto com o objetivo de atenuar o seu sabor ácido buscava conquistar maior aceitação popular. Ao mesmo tempo, maior divulgação era dada às suas qualidades nutritivas e terapêuticas, levando a um considerável aumento no seu consumo (TAMIME; ROBINSON, 2002).

No início, a produção do iogurte utilizava uma técnica de processo simples, que se expandiu no mundo inteiro, mas que, atualmente, vem se transformando em processos mais sofisticados e mais elaborados. Assim, com a rápida incorporação deste produto aos hábitos alimentares, a competição industrial desencadeou a busca de novos processos que possibilitem a redução dos custos de fabricação sem prejuízo da qualidade do produto (SALINAS, 1986).

De acordo com a textura, pode-se dividir o iogurte em três categorias: iogurte de massa firme, de massa batida e de textura líquida, conhecidos respectivamente como iogurte tradicional, batido e líquido. O iogurte tradicional adquire consistência mais firme, devido principalmente ao fato da fermentação ocorrer na própria embalagem final e não ocorrer a quebra da massa. O iogurte batido, por sua vez, resulta em um produto menos firme que o anterior, pelo fato de ser incubado em fermenteiras, seguindo-se à quebra do coágulo para o envase (GRANATO, 2007).

A presença ou não de polpa de fruta e aroma adicionado também colabora para a diferenciação do iogurte. Nessa categoria, o iogurte se classifica em três: natural (ausência

de fruta/aroma), com frutas (aromatização natural) ou aromatizado (flavorizantes) (FERREIRA, 2005).

Segundo a Nova Legislação de Produtos Lácteos (2002), os leites fermentados podem ser classificados de acordo com o conteúdo de matéria gorda em: com creme (mínimo de 6% de matéria gorda), integral (mínimo de 3% de matéria gorda), parcialmente desnatado (máximo de 2,9% de matéria gorda) e desnatado (máximo de 0,5% de matéria gorda). A mesma legislação define como leite fermentado com adição os produtos em cuja elaboração foram adicionados ingredientes opcionais não lácteos (máximo 30%m/m), antes, durante ou após a fermentação.

2.2.1 Bactérias láticas e probióticos

O termo "fermentado" refere-se ao processo de inoculação do leite com microrganismos que transformam a lactose em ácido lático, o qual inibe o crescimento de muitos microrganismos patógenos e aqueles que possam alterar o alimento. Por esta razão, os produtos lácteos fermentados se conservam por período maior de tempo do que o leite não fermentado. O pH baixo do meio impede o crescimentos de mofos e bactérias contaminantes no produto, evitando a formação de gás e de reações de proteólise ou lipólise que alteram o sabor e o aroma do alimento (GRANATO, 2007).

O iogurte é um produto elaborado com culturas ativas de bactérias láticas que fermentam o creme e/ou o leite, metabolizando parte da lactose presente a ácido lático. Durante esse processo, que normalmente ocorre em tempo inferior a 4-5 horas de incubação, em temperaturas de 40 a 44 ºC, o leite líquido tem a sua consistência alterada, em virtude da coagulação de suas proteínas. A redução de pH a 5,1-5,2, resultante da produção de ácido lático durante a fermentação, causa a desestabilização das micelas de caseína e a coagulação completa, que ocorre a um pH de 4,6. Quando o pH desejado é atingido, o leite coagulado é resfriado rapidamente, para que a fermentação seja praticamente interrompida (VAN DE WATER, 2003).

O iogurte é produzido com a utilização de cepas de *Lactobacillus delbrueckii* susbp. *bulgaricus* e de *Streptococcus thermophilus*, definidos como cultura *starter*. Essas bactérias utilizam o leite como nicho ecológico. Além disso, existe uma relação simbiótica entre esses

dois microrganismos, na qual cada um deles estimula a multiplicação do outro. Assim, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* libera aminoácidos e peptídeos das proteínas do leite, o que possibilita a multiplicação de *S. thermophilus* nos primeiros estágios da fermentação. *S. thermophilus*, por sua vez, produz ácido fórmico, o qual estimula a multiplicação de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, diminuindo o tempo de fermentação e conferindo ao produto características peculiares (VAN DE WATER, 2003; HOLS *et al.*, 2005).

Uma cultura *starter* pode ser definida como "uma preparação microbiana contendo um grande número de células de pelo menos um microrganismo a ser adicionado à matéria-prima para produzir um produto alimentício fermentado". O grupo das bactérias láticas ocupa papel central nessa técnica, acelerando e conduzindo o processo fermentativo. A adição direta de culturas selecionadas tem representado avanço na elaboração de produtos fermentados, resultando em aumento do controle sobre o processo fermentativo e da padronização do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004).

O metabolismo de bactérias láticas e a interação entre as cepas selecionadas em leites fermentados e iogurtes são responsáveis pela produção de ácido lático, levando à coagulação das proteínas do leite e à produção de diversos compostos. Variáveis como a temperatura, o pH, a presença de oxigênio e a composição do leite contribuem para as características peculiares de um produto específico. De acordo com a temperatura e o tempo de fermentação, são formados diferentes produtos metabólicos (OSTILE; TREIMO; NARVHUSO, 2005). A temperatura de fermentação afeta, primariamente, a multiplicação bacteriana e, consequentemente, a estrutura e o sabor do produto (KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003).

Alguns produtos à base de iogurte foram reformulados para incluir, além das culturas convencionais de iogurte, culturas de *L. acidophilus* e de *Bifidobacterium* spp. (conhecidas como culturas probióticas). Esses produtos passaram a ser denominados de iogurtes probióticos. Durante o seu processo de elaboração, as culturas probióticas podem ser adicionadas antes da fermentação, em conjunto com as culturas convencionais do iogurte ou após a fermentação (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Nos últimos dez anos, período em que os produtos suplementados com culturas probióticas passaram a assumir papel de importância no universo científico, muitas pesquisas com probióticos têm sido voltadas para leites fermentados e iogurtes, sendo estes os produtos

probióticos que predominam no comércio mundial. Entretanto, é importante salientar que diversos fatores podem prejudicar a multiplicação das bactérias probióticas durante a elaboração desses produtos, bem como a sobrevivência desses microrganismos durante o período de armazenamento (KOMATSU *et al.,* 2008)

Segundo Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), a palavra probiótico deriva do grego e significa "para a vida". Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 1990, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos. Em 1910, Metchnikoff foi o primeiro a demonstrar que o consumo regular de leites fermentados oferecia benefícios à saúde (GONÇALVES; EBERLE, 2009).

Probióticos são microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001), tais como controle e estabilização da microbiota intestinal (DOYLE; BEUCHAT; MONTVILLE, 2001); promoção da ingestão da lactose em indivíduos intolerantes aos produtos lácteos (LABAYEN *et al.,* 2001); estimulação do sistema imune (JELEN; LUTZ, 1998); alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SANDERS, 2003).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e lático; estimulação do sistema imune. Outros possíveis efeitos dos probióticos são a sua atuação na prevenção do câncer, na modulação de reações alérgicas, na melhoria da saúde urogenital de mulheres e nos níveis sanguíneos de lipídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MERCENIER *et al.*, 2003; SAAD, 2006; OLIVEIRA, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O interesse nos iogurtes contendo bactérias probióticas iniciou-se nos anos 1980 e vem crescendo muito na Europa, representando um mercado de 5 a 20% do total de iogurtes consumidos. Recentemente, pôde-se observar aumento no interesse da funcionalidade dos iogurtes contendo bactérias probióticas.

Porém, estudos demonstraram ser necessária uma dose mínima diária desses produtos contendo probióticos para a ação dos mesmos nas funções biológicas dos consumidores (SODINI *et al.,* 2005b). Para receber a definição de "alimento probiótico", os leites fermentados e os iogurtes devem conter, no mínimo, 10^7 células viáveis por grama ou ml do produto. Por outro lado, a dose terapêutica mínima exigida é de 10^5 células viáveis por grama

ou ml de produto (HAULY; FUCHS; PRUDÊNCIO-FERREIRA, 2005).

A definição do termo probiótico vem mudando com o passar do tempo em decorrência de maior quantidade de estudos cinéticos, genéticos e dos efeitos comprovados cientificamente sobre a saúde do hospedeiro. Diversas outras definições de probióticos foram publicadas nos últimos anos (Quadro 1), entretanto, a definição aceita internacionalmente é aquela proposta pela FAO/WHO em 2001.

Entre as culturas probióticas, as bifidobactérias apresentam grande interesse do ponto de vista industrial, em função de seu maior envolvimento com os mecanismos metabólicos do organismo, pois estão envolvidas no desenvolvimento de uma classe de produtos com grande potencial de mercado na indústria de alimentos mundial (GONÇALVES; EBERLE, 2009).

As bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal. Sua população é estável, porém, pode ser influenciada por idade, dieta, uso de antibióticos, estresse, entre outros fatores. Atualmente existem mais de 30 espécies do gênero *Bifidobacterium,* dos quais as mais utilizadas são *B. breve* e *B. longum* (VARNAM; SUTHERLAND, 1995; MEILE *et al.,* 2008).

As bifidobactérias produzem ácidos acético, lático e fórmico sem geração de CO_2. Além da glicose, todas as bifidobactérias de origem humana utilizam galactose, lactose e frutose como fontes de carbono (PENNA, 2002; FARNWORTH *et al.,* 2007).

Quadro 1. Definição dos probióticos com o passar dos anos.

Definição publicada	Referência
Substâncias produzidas por microrganismos que estimulam o crescimento de outros.	Lilly; Stillwell, 1965
Organismos ou substâncias que contribuem para o balanço microbiano do intestino.	Parker, 1974
Um suplemento de organismos vivos que beneficiam o hospedeiro, melhorando seu balanço microbiano intestinal.	Fuller, 1989
Um cultivo mono ou misto viável de microrganismos que, quando aplicado em animal ou homem, o afeta beneficamente, melhorando as propriedades da microflora endógena.	Havenaar; Huis In't Veld, 1992
Organismos vivos que, quando ingeridos em certa quantidade, oferecem efeitos benéficos além da nutrição básica.	Schaafsma, 1996
Um auxiliar dietético microbiano que afeta beneficamente a fisiologia do hóspede, modulando a imunidade, assim como melhorando o equilíbrio nutritivo e microbiano no trato intestinal.	Naidu; Bidlack; Clemens, 1999
Uma preparação ou produto que contenha microrganismos viáveis, definidos em números suficientes que alteram a microflora no hóspede e exercem efeitos benéficos.	Schrezenmeir; De Vrese, 2001
Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde dos hospedeiros.	FAO/WHO, 2001

2.2.2. Composição da base láctea

O leite é o ingrediente básico no preparo do iogurte, sendo que sua composição pode ser modificada para atender os aspectos econômicos, práticos e de aceitação do consumidor. Pode ser encontrado na forma integral, desnatado, parcialmente desnatado, fortificado (com adições de leite em pó ou soro em pó) ou modificado (deslactosado) (FERREIRA, 2001).

Os ingredientes obrigatórios na composição do iogurte são: o leite e/ou leite reconstituído padronizado e o cultivo de bactérias láticas e/ou cultivos de bactérias láticas específicas. São considerados ingredientes opcionais: leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, soros lácteos e concentrados de soros lácteos. De acordo com a composição básica do iogurte, o teor mínimo de proteína exigido no produto final é de 2,9 g por 100 g de iogurte (NOVA LEGISLAÇÃO DE PRODUTOS LÁCTEOS, 2002).

Atualmente, grande variedade de proteínas lácteas está disponível em escala comercial, como: caseínas, caseinatos, proteínas de soro (concentradas e isoladas) e ainda algumas frações específicas (lactoalbumina e lactogloblulina); lembrando que o desempenho funcional está diretamente relacionado à composição das diferentes frações de proteína (JOST, 1993).

A caseína é a principal proteína do leite de vaca, representando 80% do total das proteínas existentes no meio, com importante papel funcional e maior aplicação em produtos alimentícios. As caseínas, especialmente os caseinatos, forma solúvel da caseína, têm seu uso bem estabelecido como ingrediente funcional na indústria de alimentos. As características funcionais desta proteína (solubilidade, dispersabilidade, opacidade, viscosidade, emulsificação, estabilidade térmica, ligação com gordura, formação de espumas, gelatinização, adesão e formação de filmes) tornam-a forte concorrente de outras proteínas funcionais, como as do ovo, da soja e do soro. Na fabricação de iogurtes, os caseinatos são comumente adicionados ao leite para regular o conteúdo proteico e agir como regulador de viscosidade, produzindo iogurtes com excelente aparência, consistência, aroma e sabor, além da redução de sinerese (MAISTRO, 2002).

Segundo Bobbio (1992), os leites fermentados são produtos nos quais a caseína foi precipitada pela formação de ácido lático (pH atingindo o ponto isoelétrico ou P.I.) por microrganismos que metabolizam a lactose.

Martinéz *et al.* (2002) mostraram em seus estudos a importância das proteínas lácteas, principalmente as provenientes do soro de queijo, na indústria de alimentos. Observaram que iogurtes enriquecidos com diferentes fontes de proteínas, como concentrado proteico de soro (WPC), concentrado proteico de leite (MPC) e leite em pó desnatado (SMP), apresentaram diferenças durante o processo de fermentação, bem como no gel obtido após a fermentação; também apresentaram diferenças de viscosidade após a quebra do gel e variação no nível de

sinerese. Essas diferenças ocorreram devido às diferentes características de cada fonte de proteína, como, por exemplo, diferentes níveis de lactose. Neste caso, observou-se que os iogurtes enriquecidos com MPC e SMP apresentaram maior viscosidade e maior sinerese quando comparados ao iogurte enriquecido com WPC.

De acordo com outro estudo realizado por Cantunes, Cazetto e Bolini (2005), os concentrados de proteínas de soro (WPC) podem estimular o crescimento das bifidobactérias. Os iogurtes suplementados com WPC têm redução no tempo de fermentação, mas não mostram diminuição na contagem de células de ácido lático e culturas probióticas. O WPC serve como uma fonte de peptídeos e aminoácidos (que são liberados quando o iogurte é tratado termicamente); tais condições favorecem a viabilidade dos probióticos. Espécies de bifidobactérias são microrganismos exigentes que requerem fatores específicos para o seu crescimento. Ambas, α-lactoalbumina e β-lactoglobulina – principais proteínas do soro –, são ótimas promotoras para o crescimento das bifidobactérias. Entretanto, o WPC não influencia o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos produtores de ácido lático (*L.bulgaricus* e *S. thermophilus*).

Segundo Sodini *et al.* (2004), quando o leite é enriquecido com proteínas obtidas por ultrafiltração ou suplementado com concentrado proteico de soro ou caseinato, o iogurte apresenta aumento na firmeza, quando comparado a um iogurte processado com leite suplementado com leite em pó desnatado, devido ao aumento da relação proteína/sólidos totais.

Outra maneira para aumentar a viscosidade e a consistência dos iogurtes é a adição de hidrocoloides. A funcionalidade desses ingredientes é demonstrada por sua capacidade de ligar a água, reagindo com os constituintes do leite que estabilizam a rede proteica, impedindo a circulação de água (SOUKOULIS *et al.,* 2007).

2.2.3. Processamento

A elaboração de iogurte é uma técnica de preparo simples que se expande cada vez mais no mundo inteiro e que, atualmente, vem se transformando em um processo bastante sofisticado. Entretanto, com a rápida incorporação desse produto aos hábitos alimentares, a competição industrial desencadeou a busca de novos processos que possibilitem a redução dos custos de fabricação sem prejuízo da qualidade do produto (GRANATO, 2007).

De acordo com Walstra, Wouters e Geurts (2006) e Tamime e Robinson (2001), o esquema mostrado na Figura 1 representa o processo contínuo de fabricação de iogurte industrialmente. O leite padronizado é misturado com outros ingredientes opcionais, lácteos ou não; passa por um pré-aquecimento em trocador de calor, com o objetivo de deixar a gordura em estado líquido; posteriormente, segue para o homogeneizador, onde é homogeneizado em dois estágios, a fim de reduzir o tamanho dos glóbulos de gordura; seguindo a linha de processo a mistura é encaminhada novamente para o trocador de calor, onde ocorre o processo de pasteurização para garantir a qualidade microbiológica do produto final e desnaturar as proteínas; na sequência, a mistura é resfriada em trocador de calor até a temperatura de fermentação e enviada para tanques encamisados para iniciar o processo de fermentação.

Após a transferência para o tanque de fermentação é adicionada a cultura *starter*; nessa fase a temperatura de 40 a 45°C deve ser controlada até o valor de pH do leite atingir 4,5; posteriormente, o coágulo é quebrado, a mistura é resfriada em trocador de calor, adicionada ou não de frutas e/ou aromas, enviada para o envase e, finalmente, armazenada sob refrigeração.

Outro processo, denominado batelada, também é utilizado na fabricação de iogurte, porém trata-se de um processo mais simples. Nesse caso, todas as etapas de produção ocorrem no tanque de fermentação; ou seja, a pasteurização lenta da mistura e o resfriamento lento (troca térmica em tanques encamisados). Para esse tipo de processo, na maioria dos casos, não há a etapa de homogeneização antes da pasteurização. Após atingir o pH de 4,5 o coágulo é quebrado e resfriado no próprio tanque antes de ser enviado para o envase (EARLY, 1998; FERREIRA, 2001).

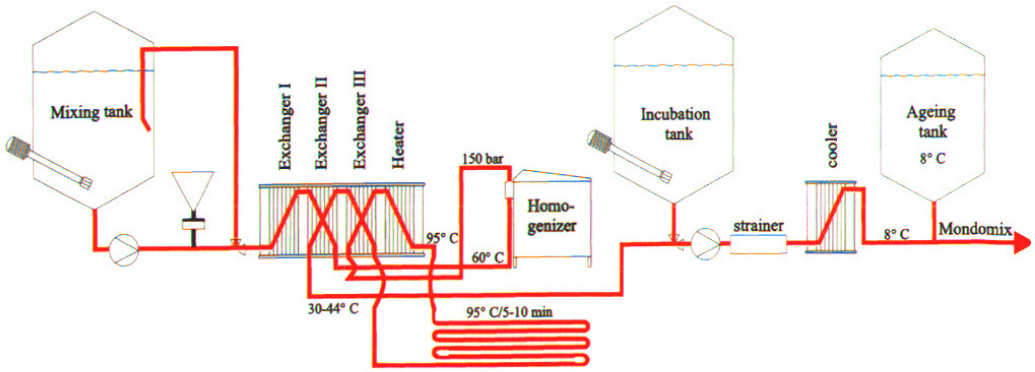


Figura 1. Processo contínuo de fabricação de iogurte industrialmente.

A formação do gel é uma das propriedades mais importantes na obtenção do iogurte. As características reológicas do gel são determinadas principalmente por: composição do leite utilizado, temperatura e tempo do tratamento térmico, tipo e quantidade de cultura utilizada na inoculação, temperatura de fermentação e condições de estocagem do produto até o final da vida de prateleira (XU *et al*., 2008).

Na produção industrial de alguns tipos iogurtes, o uso de determinados equipamentos pode afetar a consistência. Perdas estruturais do iogurte batido podem ocorrer em vários pontos entre o tanque de incubação e a máquina de embalar. O fermentador precisa ser acoplado de um agitador para misturar a cultura *starter* no leite e, opcionalmente, quebrar o coalho após a fermentação. A velocidade de agitação é crítica. Baixas velocidades de agitação são usadas para otimizar a eficiência da mistura e para diminuir as perdas na consistência do iogurte (TAMIME; ROBINSON, 1999). Durante o resfriamento, o iogurte é submetido aos efeitos de cisalhamento e ao tempo de abaixamento da temperatura. A quebra de estrutura está diretamente relacionada com a geometria do equipamento e com as condições de processo, especialmente a temperatura e a taxa de fluxo (BENEZECH; MAINGONNAT, 1994).

As indústrias têm interesse em descobrir produtos diferenciados, com tecnologia de fabricação adequada e com aceitabilidade perante os consumidores em potencial. Já os centros de pesquisas têm o papel de descobrir as propriedades nutricionais, bem como os mecanismos

de ação das bactérias, para se obter melhores condições de processamento (GRANATO, 2007).

2.2.3.1. Homogeneização do leite

De acordo com Tamime e Robinson (2001), o leite utilizado na fabricação de iogurte é uma típica emulsão óleo em água e, como resultado, tem a tendência de se separar, principalmente durante o período de fermentação. A fim de evitar esse problema, o leite ou a mistura da base do iogurte deve ser homogeneizado antes do processo de fermentação.

A homogeneização também ajuda na mistura dos ingredientes secos, devido às forças de cisalhamento que ocorrem em função da alta velocidade que o produto atinge dentro do equipamento e da força exercida na cabeça do homogeneizador (EARLY, 1998).

A formação de uma mistura homogênea pode aumentar a viscosidade e a estabilidade do iogurte, além de melhorar as qualidades organolépticas do produto final. O aumento da viscosidade causado pela homogeneização está relacionado à mudança na capacidade de retenção de água das proteínas do leite, reduzindo também a sinerese (FERREIRA, 2001; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A viscosidade também depende da temperatura e da pressão de homogeneização. A melhor temperatura para esse processo está entre 50 e 60°C, uma vez que nessa temperatura a gordura encontra-se no estado líquido; e a pressão deve ser dividida em dois estágios, sendo 100bar no primeiro e 40bar no segundo estágio (EARLY, 1998; FERREIRA, 2001). Algumas modificações físico-químicas causadas pela homogeneização do leite utilizado na produção de iogurte são apresentadas no Quadro 2.

Quadro 2. Modificações físico-químicas causadas pela homogeneização do leite utilizado na produção de iogurte.

Efeito da homogeneização	Modificações relacionadas ao iogurte
a) Aumento	
Viscosidade	Redução do tamanho do glóbulo de gordura e aumento na adsorção das micelas da caseína.
Cor (branca)	Aumento do número dos glóbulos de gordura, o que afeta a reflexão da luz.
Lipólise	Aumento na área total de superfície da gordura disponível para a atuação da lípase. Destruição da membrana do glóbulo de gordura, o que pode favorecer lipólise pela cultura *starter*.
b) Diminuição	
Tamanho do glóbulo de gordura	Prevenção da formação de camada superior de creme no iogurte durante a fermentação.
Estabilidade da proteína	Mudanças na interação proteína-proteína, como resultado de desnaturação parcial e mudança no equilíbrio salino.
Caseína na fase aquosa	Transferência parcial da caseína da fase aquosa para constituir uma nova membrana nos glóbulos de gordura recém formados.
Sinerese	Aumento na capacidade hidrofílica e de absorção de água, devido à interação caseína-membrana do glóbulo de gordura e outras interações proteína-proteína.

Fonte: TAMIME; ROBINSON (2001).

2.2.3.2. Tratamento térmico do leite

De acordo com Walstra, Wourst e Geurts (2006), os principais objetivos do tratamento térmico do leite são eliminar os microrganismos e inativar as enzimas, ou promover alterações químicas no meio. Porém, esses resultados dependem da combinação da temperatura utilizada e do tempo de aquecimento.

Ferreira (2001) descreve que o melhor tratamento térmico para o iogurte é de 83°C por 30 minutos, pois este binômio tempo-temperatura provoca modificações na estrutura físico-química das proteínas, no pH e nas propriedades nutritivas do substrato – estas modificações são importantes tanto para as bactérias do iogurte quanto para a saúde humana e para as próprias características do produto final. Esta pesquisadora menciona que esse tipo de tratamento térmico causa modificações importantes na caseína e nas proteínas do soro, sendo a desnaturação parcial dessas proteínas de extrema importância para a estabilidade do gel do iogurte. A interação ocasionada pelo calor entre proteínas do soro desnaturadas e a caseína é fundamental, uma vez que aumenta as propriedades hidrofílicas da caseína, facilitando a formação de um coágulo estável, além das proteínas do soro ficarem mais sensíveis ao cálcio por meio desse tipo de tratamento térmico, facilitando a coagulação.

Early (1998) também descreve que a otimização das propriedades hidrofílicas das proteínas e, consequentemente, a coagulação do iogurte, são obtidas quando o leite é aquecido a 85°C por 30 minutos, quando é obtida a máxima hidratação das proteínas. Esse tratamento térmico também é responsável pela desnaturação das proteínas do soro, o que melhora a textura do produto final, além de ajudar na prevenção da sinerese durante a vida de prateleira do produto.

Segundo Walstra, Wourst e Geurts (2006), o leite para o preparo de iogurtes deve ser aquecido a 85-90°C durante 5-10 minutos; pois, segundo eles, esse binômio tempo-temperatura aumenta consideravelmente a firmeza do produto final.

Tamime e Robinson (2001) descrevem inúmeros binômios tempo-temperatura que podem ser utilizados no tratamento térmico do leite para fabricação de iogurte. Porém, os autores citam dois processos como os mais utilizados em escala industrial, sendo: 85°C por 30 minutos ou 90-95°C por 5 minutos.

2.3. Reologia

Eugene C. Bingham foi o primeiro a utilizar a palavra reologia ao definir que “tudo escoa” (STEFFE, 1996). Hoje, a reologia pode ser vista como a ciência da deformação e do escoamento da matéria, ou seja, é o estudo da maneira segundo a qual os materiais respondem à aplicação de uma determinada tensão ou deformação.

Todos os materiais possuem propriedades reológicas, de modo que a reologia é uma ciência que pode ser aplicada em diversas áreas. O estudo das propriedades reológicas dos alimentos, segundo Rao (1977, 1986), é essencial para várias aplicações que incluem desde os projetos e a avaliação de processos até o controle de qualidade, a correlação com a avaliação sensorial e a compreensão da estrutura de materiais.

Steffe (1996) define que a reologia é a ciência dos materiais em alimentos. De acordo com o autor, podem-se destacar diversas áreas na indústria de alimentos nas quais o conhecimento dos dados reológicos é essencial:

a) cálculos em engenharia de processos, envolvendo grande variedade de equipamentos, tais como bombas, tubulações, extrusores, misturadores, trocadores de calor, dentre outros;

b) determinação da funcionalidade de ingredientes no desenvolvimento de produtos;

c) controle intermediário ou final da qualidade de produtos;

d) testes de tempo de prateleira;

e) avaliação da textura de alimentos e correlação com testes sensoriais;

f) análise de equações reológicas de estado ou de equações constitutivas.

As medidas reológicas são bastante relevantes na indústria alimentícia como instrumento para a caracterização física da matéria-prima antes do processamento, de produtos intermediários durante a fabricação e para os alimentos acabados. Existem várias abordagens para conduzir estas caracterizações reológicas, sendo que a escolha da técnica praticamente depende do produto e das características funcionais que precisam ser analisadas. Diversos tipos de equipamentos estão à disposição dos pesquisadores como ferramenta em estudos reológicos de alimentos, levando a resultados aceitáveis na maioria dos ensaios realizados (MUNIZAGA; CÁNOVAS, 2005).

A reologia clássica começa com a consideração de dois materiais ideais: o sólido elástico e o líquido viscoso. O sólido elástico é um material com forma definida que, quando deformado por uma força externa dentro de certos limites, irá retornar à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. O líquido viscoso não tem forma definida e irá escoar, irreversivelmente, com a aplicação de uma força externa (STANLEY *et al.*, 1996).

Na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade, ao passo que, em líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante. A viscosidade de um material pode ser definida como a propriedade física dos fluidos que caracterizam a sua resistência ao escoamento (PARK & LEITE, 2001).

Para materiais viscoelásticos, o valor do módulo elástico (G') é uma medida da energia de deformação armazenada na amostra durante o processo, que representa o comportamento elástico da uma amostra. Ao contrário, o módulo viscoso (G") é o valor de uma medida da energia de deformação utilizada na amostra durante o cisalhamento, que representa o comportamento viscoso de uma amostra. Se G' é muito maior do que G'', o material vai se comportar mais como um sólido, isto é, as deformações serão essencialmente elásticas. No entanto, se G'' é muito maior do que G', a energia utilizada para deformar o material é dissipada viscosamente e o comportamento do material é como um líquido (MUNIZAGA; CÁNOVAS, 2005).

Leites fermentados não possuem caracterização reológica precisa, porém seu estudo é essencial, permitindo, por exemplo, auxiliar na operação dos equipamentos de processamento na indústria láctea e, também, analisar a aceitação dos consumidores através de propriedades físicas (como firmeza e viscosidade) que determinam a consistência e a textura do produto.

Diferentes fatores tecnológicos influenciam as propriedades reológicas dos iogurtes, como: (a) fatores envolvidos durante a preparação da base de leite e seu tratamento térmico, (b) temperatura de incubação e tipo de cultura empregada e (c) o processo de resfriamento (SCHELLHAASS; MORRIS, 1985; BENEZECH; MAINGONNAT, 1994; SODINI *et al.,* 2004*;* PENN; CONVERT; OLIVEIRA, 2006).

A viscoelasticidade do iogurte pode aumentar de 2 a 3 vezes de acordo com os sólidos totais e com o teor de proteína na base do leite. Uma vez aumentando o teor de proteína, aumenta-se a concentração de caseína que reforça a matriz proteica e melhora a capacidade de retenção de água do gel. Sendo que essa propriedade está diretamente ligada à relação proteína do soro/caseína (SODINI *et al.,* 2004).

Kristo *et al*. (2003) também ressaltam a importância das características de textura do gel para qualidade do produto final e citam parâmetros tecnológicos e de composição do leite como fatores que influenciam nas características estruturais do iogurte, reforçando que o teor de sólidos também é fator importante, que afeta a viscosidade e a firmeza do iogurte.

Em outro estudo, Remeuf *et al*. (2003) trabalharam com a suplementação do leite para produção de iogurte com adição de caseinato e concentrado proteico de soro, isolados ou em misturas, com o objetivo de estudar as propriedades físicas dos iogurtes obtidos. Os pesquisadores concluíram que a base suplementada com leite em pó desnatado apresentou o maior aumento de viscosidade, enquanto as bases enriquecidas com caseinato e concentrado

proteico de soro apresentaram alguns defeitos, como baixa capacidade de retenção de água.

Entretanto, Saint-Eve *et al*. (2006) mostraram que ainda há grande contradição entre os pesquisadores sobre o efeito da suplementação dos iogurtes com proteínas lácteas, pois alguns autores observam que o aumento do nível de concentrado proteico de soro dá origem a um gel mais forte; enquanto outros demonstram que, em níveis similares de proteína, a substituição de leite em pó por caseinato na base do leite para produção de iogurte aumenta consideravelmente a viscosidade do produto final.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo geral otimizar as propriedades reológicas e sensoriais de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas.

Os objetivos específicos são:

- Modelar, através da metodologia de superfície de resposta aplicada a misturas, a atividade acidificante das bactérias probióticas, verificando o efeito da suplementação do leite com leite em pó desnatado, proteína concentrada de soro e caseinato de sódio na cinética de acidificação, na contagem de células viáveis e nas propriedades viscoelásticas dos iogurtes.
- Validar os modelos obtidos da otimização da cinética de acidificação, da contagem de bactérias viáveis e das propriedades viscoelásticas durante a vida de prateleira de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas.
- Avaliar sensorialmente os iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas após a fermentação e ao final de sua vida de prateleira.
- Estudar a microestrutura dos iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas após a fermentação e ao final de sua vida de prateleira, através de microscopia eletrônica de varredura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimento experimental

Para estudar a otimização do uso de proteínas lácteas em iogurtes probióticos foi utilizado um delineamento experimental do tipo *simplex centroide* (Tabela 1 e Figura 2), para modelagem de misturas, de acordo com Hare (1974). O projeto que estudou as interações entre os ingredientes incluiu sete experimentos, sendo três com os ingredientes puros, três correspondentes a misturas binárias e um para uma mistura ternária (ensaios 1 a 7). Em paralelo aos sete experimentos delineados, foi realizado um ensaio controle com leite não suplementado.

Tabela 1. Delineamento experimental tipo *simplex centroide* para a otimização do uso de proteínas lácteas em iogurtes probióticos.

Ensaio	Teor de proteína adicionada (g proteína)			Quantidade de ingrediente (g ingrediente.100g^{-1} base)		
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3
Controle	___	___	___	0,00	0,00	0,00
1	1,000	0,000	0,000	2,75	0,00	0,00
2	0,000	1,000	0,000	0,00	1,16	0,00
3	0,000	0,000	1,000	0,00	0,00	3,10
4	0,500	0,500	0,000	1,37	0,58	0,00
5	0,500	0,000	0,500	1,37	0,00	1,55
6	0,000	0,500	0,500	0,00	0,58	1,55
7	0,333	0,333	0,333	0,91	0,39	1,03

x_1: proteína concentrada de soro de leite (WPC); x_2: caseinato de sódio (Na-Cn); x_3: leite em pó desnatado (SMP)

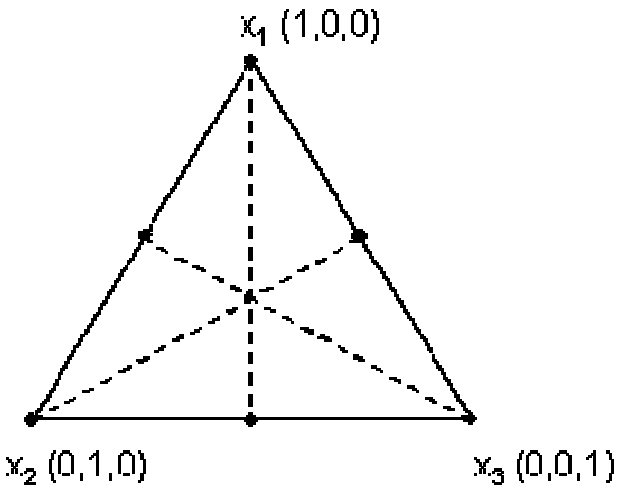


Figura 2. Delineamento experimental tipo *simplex centroide* usado no estudo do efeito simultâneo da suplementação com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado em iogurtes probióticos. x_1: Proteína concentrada de soro de leite (WPC); x_2: Caseinato de sódio (Na-Cn); x_3: Leite em pó desnatado (SMP).

4.1.1 Ingredientes e tratamento das misturas

Foram utilizados os seguintes ingredientes lácteos: leite em pó desnatado (Cooperativa Taquarense de Laticínios Ltda, Taquara, Brasil), proteína concentrada de soro de leite (Lacprodan®-35, Arla Food Ingredients, Viby, Alemanha) e caseinato de sódio (EM 7, DMV International, Veghel, Holanda). Leite em pó desnatado, proteína concentrada de soro de leite e caseinato de sódio continham, respectivamente, 32,3g proteína.100g^{-1}, 36,6g proteína.100g^{-1} e 86,5 g proteína.100g^{-1} determinada pelo método de micro-Kjeldahl (A.O.A.C., 1995).

De acordo com o valor de cada ingrediente demonstrado na segunda parte da Tabela 1 (variáveis originais), as misturas foram preparadas da seguinte forma:

- controle: 12,0g de leite em pó desnatado foram adicionados a 88,0g de água, totalizando 100,0g de mistura;
- ensaios de 1 a 7: 12,0g de leite em pó desnatado foram misturados à quantidade de cada uma das proteínas lácteas (SMP, WPC e Na-Cn), de acordo com os valores mostrados nas variáveis originais da Tabela 1; ao valor

somado em cada um dos ensaios foi adicionada água até completar 100,0g de mistura final.

O teor de proteína teórico do controle foi de 3,8g.100g^{-1}, enquanto nos ensaios testes esse valor foi ajustado em todos os experimentos a um valor de 4,8g.100g^{-1}; ou seja, acréscimo de 1g proteína.100g^{-1} de mistura final.

Seguindo as proporções indicadas acima, foram preparadas misturas de 8kg para cada um dos ensaios, as quais foram pré-aquecidas a 55°C em trocador de calor a placas (Tipo A3-HRB, ALFA LAVAL, Lund, Sweden), homogeneizadas a 150bar em dois estágios em homogeneizador (TREU, Rio de Janeiro, Brasil), sendo 100bar no primeiro estágio e 50bar no segundo estágio de homogeneização, aquecidas a 95°C em trocador de calor a placas, mantidos nessa temperatura durante 5 minutos em circuito fechado e resfriados até 10°C em trocador de calor a placas.

Ao final do tratamento térmico obteve-se 1 kg de cada mistura, as quais foram dividas em três Erlenmeyers de 250 mL para realização da fermentação; o restante das misturas foi utilizado para realização das análises físico-químicas. As análises microbiológicas e reológicas foram realizadas em duplicata para cada um dos Erlenmeyers; ou seja, para cada mistura processada termicamente, obtiveram-se três resultados para a cinética de acidificação e seis resultados para microbiologia e reologia.

O procedimento descrito acima foi realizado em duplicata para todos os ensaios, inclusive o controle, e em dias alternados.

4.1.2 Culturas láticas e preparo do inóculo

Foram utilizadas três culturas comerciais liofilizadas para inoculação direta (DSM, Heerlen, Holanda):

- *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Delvo-Yog™, CY-340 DSL, DSM).
- *Bifidobacterium lactis* subs. *animalis,* B1 (B94 LAFTI, DSM).

Foram preparados dois inóculos separadamente: (i) Inóculo 1 – cultura iniciadora:

foram pesados 10,0g da cultura Delvo-Yog™ CY 340, contendo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus,* e diluídos em 150mL de leite previamente autoclavado a 121ºC por 10 min; (ii) Inóculo 2 – cultura probiótica: foram pesados 10,0g da cultura B94 LAFTI (*Bifidobacterium lactis* subsp. *animalis*) e diluídos em 500mL de leite previamente autoclavado a 121°C. Ambos inóculos foram ativados durante 20min a 42°C antes do uso.

4.1.3 Obtenção do leite fermentado e parâmetros de controle de qualidade

O leite tratado termicamente (250mL) foi transferido para Erlenmeyrs e, a seguir, colocado em banho-maria acoplado ao sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França) até estabilização da temperatura a 42°C. Quando os leites atingiram 42°C, foram adicionados 0,2mL do inóculo contendo *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Inóculo 1) e 2,5mL do inóculo contendo *B. animalis* (Inóculo 2). Testes prévios foram conduzidos para definir a quantidade de inóculo a ser empregada, de modo a assegurar contagem inicial superior a $10^7 \log_{10}$UFC.mL.

Após a inoculação, o leite adicionado de cultura lática foi homogeneizado e a cinética de acidificação seguida pelo Sistema CINAC (Figura 3). Quando o leite atingiu o valor de pH 4,5 a fermentação foi interrompida por resfriamento dos produtos em banho de gelo e a quebra do coágulo foi realizada, movimentando-se o produto durante 60 segundos com auxílio de agitador de aço inox. O iogurte foi então acondicionado em potes plásticos de 50 mL e resfriados a 4°C. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

As misturas, antes da fermentação, foram analisadas quanto ao teor de gordura, sólidos totais e proteína. Os leites fermentados foram submetidos às análises químicas de pH e acidez titulável e à caracterização reológica, através de testes oscilatórios (módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'')). As bactérias iniciadoras e as probióticas foram enumeradas 24h após a fermentação.

4.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

A modelagem da atividade acidificante foi feita através do Sistema CINAC, isto é,

mediante um método automático para a quantificação da atividade de uma cultura iniciadora com base em medidas de valores de pH (SPINNLER; CORRIEU, 1989).

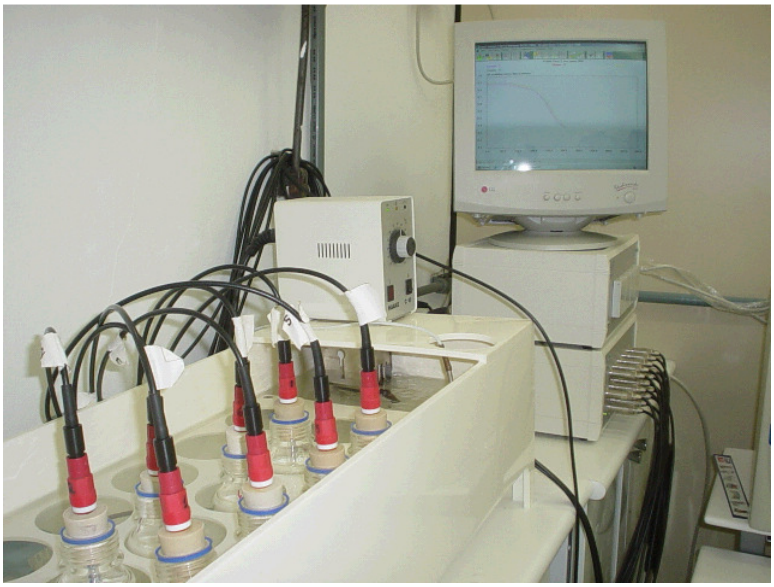


Figura 3. Sistema CINAC

A partir dos dados obtidos, foi calculada a velocidade máxima de acidificação (DpH/Dt) expressa como miliunidades de pH/min (V_{max}). No final do período de incubação foram ainda calculados os seguintes parâmetros cinéticos:

- tv_{max} : tempo no qual se atinge a velocidade máxima de acidificação (h);
- pH tv_{max}: pH na velocidade máxima de acidificação;
- $t_{pH5,0}$: tempo para atingir valor de pH 5,0 (h);
- $t_{pH4,5}$: tempo para atingir valor de pH 4,5 (h) ou tempo de fermentação.

4.3. Determinação dos parâmetros físico-químicos

As análises químicas (gordura, sólidos totais e proteína) foram realizadas a fim de avaliar a composição do leite controle e dos demais ensaios, antes da fermentação. Os iogurtes probióticos foram analisados quanto ao valor de pH e de acidez total titulável.

Gordura, sólidos totais e proteína foram obtidos através de medições efetuadas em aparelho digital Ekomilk (EON Trading & Bulteh 2000, Stara Zagora, Bulgária). Segundo recomendação de Venturoso *et al* .(2007), as medidas dos valores de pH foram realizadas em potenciômetro digital (Quimis, Diadema, São Paulo). Para determinação do teor de acidez total titulável foi utilizado o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados foram expressos em g de ácido lático. As análises de gordura, sólidos totais e proteína foram repetidas cinco vezes, enquanto as análises de pH e acidez titulável foram efetuadas em duplicata.

4.4 Determinação dos parâmetros microbiológicos

Dez gramas de cada amostra de leite fermentado foram suspensos em 90mL de água peptonada (0,1% p/v) e homogeneizados em *stomacker* durante 2min. A suspensão homogeneizada foi submetida a diluições seriadas utilizando-se o mesmo diluente; 1.000µL da diluição apropriada foi inoculada em meios seletivos.

S. thermophilus foi enumerado em M17 após incubação aeróbica a 37°C durante 72h. *L. bulgaricus* foi enumerado em MRS acidificado (Difco, Detroit, Estados Unidos) em de pH 5,4 após incubação a 37°C por 72h em jarra de anaerobiose. *B. lactis* foi enumerado em meio RCA (Oxoid, Basingstoke) adicionado de azul de anilina (0,03%) e dicloxacilina (2µg/mL) após incubação a 37°C por 48h anaerobicamente (SACCARO *et al.*, 2005). Utilizou-se o método do Spiral System (Interscience, La Breteche, França). A seletividade dos meios de cultura foi confirmada por observação microscópica da aparência das células obtidas das colônias.

4.5 Determinação das propriedades viscoelásticas

Os parâmetros reológicos foram realizados nas amostras de leites adicionados de proteínas lácteas e na amostra controle (sem adição de proteínas lácteas) fermentadas a 42°C até pH 4,5 após 24h de armazenamento a 4°C. Esses parâmetros foram determinados por teste oscilatório, a 26 ± 1°C, temperatura aproximada de consumo, a qual foi controlada por um sistema de circulação em banho (Anton Paar, GmbH, Alemanha), em reômetro MCR 300

(Physica, Stutgart, Germany), com geometria de cone placa (25 mm diâmetro e 1,0 mm *gap*), conectado com computador para aquisição de dados.

Testes para avaliação de limite de escoamento (*yield stress* - τ_0) foram conduzidos através de rampa de tensão de cisalhamento (τ) e medida da deformação (γ) resultante. No limite de escoamento a inclinação da curva muda muito, indicando o início do escoamento.

Testes de varredura de amplitude foram realizados a fim de estabelecer o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') dos ensaios. A tensão variou entre 1,0 e 50,0 Pa, usando frequência constante de 1 Hz. Para análise dos parâmetros G' e G'' foi utilizado o ponto no qual indicava a quebra da estrutura das misturas; de acordo com os gráficos obtidos para cada ensaio esse ponto foi fixado em 5,24 Pa.

Todos os testes reológicos foram feitos conduzidos em sextuplicata e as análises foram conduzidas no laboratório da GRESO – Grupo de Reologia em Sistemas Organizados, do Instituto de Química da USP, sob responsabilidade da Profª Drª Maria Regina Alcântara.

4.6 Análise sensorial

Foram realizados testes de aceitação sensorial para avaliar os atributos – aparência, sabor ácido e consistência – dos iogurtes probióticos após 24h (d1) e após 28 dias (d28) de armazenamento do produto a 5°C. As análises foram realizadas por 60 voluntários, utilizando uma escala não estruturada de 9cm com os termos "desgostei muitíssimo" e "gostei muitíssimo" ancorados em seus extremos (ficha apresentada no Anexo I) (STONE; SIDEL, 1993). Todas as amostras foram submetidas ao controle microbiológico de contagem total, coliformes totais e fecais e bolores e leveduras utilizando Petri Film^R (3M do Brasil).

Para as avaliações sensoriais, cerca de 50ml de iogurte foram servidos em copos de plástico branco, codificados com números aleatórios de três dígitos, de acordo com um delineamento experimental de blocos completos casualizados. Foram servidas quatro amostras em cada sessão de análise. As análises foram realizadas sempre duas horas antes ou depois das refeições, por serem os períodos mais adequados para realizações dessas avaliações (DETHEMERS, 1981; MORAES, 1985). Entre uma amostra e outra os provadores tomaram um pouco de água antes de iniciar a análise novamente (MUNÕS *et al.*, 1992). As análises foram realizadas em duplicata.

Antes do início de cada sessão, o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), apresentado no Anexo II, foi assinado pelos voluntários. O projeto recebeu autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (processo número P-449).

4.7 Determinação da microestrutura

Os iogurtes probióticos preparados com leite enriquecido com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado nas proporções indicadas pela região de compromisso estabelecida e com o leite controle (sem suplementação) foram submetidos à análise de microestrutura por microscopia de varredura (SEM), de acordo com Oliveira *et al.* (2002).

As análises de microestrutura foram realizadas em amostras de iogurte controle e suplementado no ponto ótimo, após 24 h (d1) e no final da vida de prateleira (d28), armazenados 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, presa 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).

As análises foram realizadas 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 10,0 quilovolts. As imagens foram registradas sob ampliações de 5.000x a 10.000x e aproximadamente seis campos foram observados.

4.8 Análise estatística e tratamento de dados de otimização

Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias foram

realizados mediante programa Statistica, Statsoft (Tulsa, USA) versão 8.0. Em todas as análises foi considerado nível de significância $P \leq 0,05$.

Aos resultados das respostas analíticas – a) parâmetros cinéticos de acidificação, b) contagem de células viáveis e c) parâmetros viscoelásticos – foram testados três modelos de regressão (linear, quadrática e cúbico especial) aplicados a misturas. A adequação dos modelos aos resultados experimentais foi avaliada em relação à falta de ajuste, à análise de variância e à comparação entre os valores estimados e observados numa mistura selecionada. Quando a avaliação da falta de ajuste do modelo linear foi significativa ($P \leq 0,05$), buscou-se um modelo mais complexo como o quadrático ou o cúbico especial (BARROS NETO *et al*., 1995). Os coeficientes dos modelos por regressão múltipla, a análise de variância (ANOVA), assim como os diagramas triangulares (representação gráfica das curvas de nível), foram calculados com auxílio do programa Statistica, Statsoft (Tulsa, USA) versão 8.0, considerando-se um nível de significância $P \leq 0,05$ para o ajuste dos modelos.

A região ótima (ou região de compromisso) foi estabelecida através da sobreposição dos diagramas triangulares obtidos para as respostas estudadas. No mesmo papel transparente milimetrado, colocado em cima de cada diagrama, foi marcada apenas a região do diagrama cujos valores correspondem às respostas de interesse, nas quais foram considerados o menor tempo de fermentação, a maior contagem de probióticos e a melhor textura. E, pela intersecção destas respostas analisadas, foi determinada a região, cuja porcentagem de ingredientes (proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado) satisfez, simultaneamente, todas as respostas de interesse.

Foram conduzidos testes de confirmação na região de compromisso obtida, isto é, com o leite cuja porcentagem de ingredientes (proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado) satisfez, simultaneamente, todas as respostas de interesse comparado ao leite sem suplementação (controle). Iogurtes probióticos ótimo (leite suplementado) e controle (leite sem suplementação) foram fabricados por meio de dois ensaios independentes, utilizando-se metodologia descrita em 4.1.2 e 4.1.3.

Os produtos foram submetidos às análises de composição química, à caracterização reológica (módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'')) e à contagem das bactérias iniciadoras e probióticas. Todos esses parâmetros foram analisados 24h após a fermentação e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento do produto a 5°C. Finalmente, realizaram-se a análise sensorial e a determinação de microestrutura dos produtos em d1 e d28.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação da composição da matriz láctea

A composição química dos leites adicionados de proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado usados na preparação dos iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas é apresentada na Tabela 2. Observa-se que, em média, os sólidos totais e o teor de proteína foram 12,93 ± 0,26g.100g-1 e 4,83 ± 0,04g.100g-1, respectivamente, sem diferença significativa entre eles ($P \leq 0,05$). Apesar das variações entre os teores de sólidos totais e de proteínas entre o controle e os demais ensaios, mostrados na Tabela 2, essas diferenças não comprometeram a avaliação dos parâmetros analisados, pois a relação entre sólidos totais e proteína não apresentou diferença significativa entre os ensaios (comparados ao controle). Essa relação entre os sólidos totais e o teor de proteína foi em média 0,37 ± 0,01, sem diferença significativa ($P \leq 0,01$).

Segundo Fox (2001) e Tamime, Robinson e Latrille (2001), a suplementação do leite com 5,0g proteína.100,0g^{-1} melhorou as propriedades reológicas do iogurte. Porém, é muito difícil estudar separadamente o efeito da proteína e dos sólidos totais, uma vez que essas duas variáveis não são modificadas independentemente na composição da formulação. Ao aumentar o teor de sólidos totais, a textura do iogurte, o perfil sensorial e as características reológicas melhoram, mesmo que o aumento do teor de sólidos seja devido ao aumento de sacarose ou de outros agentes de texturização.

Os níveis de teor de sólidos totais em iogurte foram estudados por Tamime e Robinson (2007), que relataram que a consistência do iogurte foi melhorada através do aumento de sólidos totais, de 12,0 a 20,0g.100,0g^{-1}. O principal efeito foi observado com suplementação de 12,0 a 14,0g.100,0g^{-1}; em contrapartida, os níveis mais elevados que 16,0g.100,0g^{-1} resultaram em mudanças menores.

Prentice (1992) relatou que o aumento do teor de proteína é o principal fator que afeta a textura e que o enriquecimento do leite com leite em pó desnatado resulta no desenvolvimento da rede das micelas de caseína. Além disso, a concentração e o tipo de proteína afetam a textura e as características reológicas do produto (PUVANENTHIRAN; WILLIAMS; AUGUSTIN, 2002; SODINI *et al.*, 2005b; PENNA; CONVERTI; OLIVEIRA, 2006).

O valor de pH e a acidez titulável dos leites enriquecidos antes da fermentação foram respectivamente 6,57 ± 0,28 e 0,26 ± 0,03g de ácido láctico. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas no valor de pH entre os leites adicionados de proteínas lácteas e o controle antes da fermentação ($P \leq 0,05$). Já a adição de proteínas lácteas afetou ligeiramente a acidez titulável dos leites fermentados ($P \leq 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química dos leites adicionados de concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado usados na preparação de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas.

Ensaio	Proporção de ingredientes						Composição química				
	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)	WPC (x_1)	CS (x_2)	SMP (x_3)	Proteína	Sólidos Totais	pH	Proteína/ Sólidos Totais	Acidez Total
	Teor de proteína adicionada (g proteína)			Quantidade de ingrediente (g ingrediente.100g^{-1} base)			(g.100g^{-1})	(g.100g^{-1})			(g ácido lático)
Controle	—	—	—	0,00	0,00	0,00	3,98±0,00^{a}	11,04±0,09^{a}	4,45±0,01^{a}	0,35±0,00^{a}	0,94±0,05^{a}
1 (WPC)	1,00	0,00	0,00	2,75	0,00	0,00	4,90±0,01^{a}	13,57±0,05^{a}	4,47±0,01^{a}	0,36±0,00^{a}	1,08±0,01^{bc}
2 (Na-Cn)	0,00	1,00	0,00	0,00	1,16	0,00	4,93±0,07^{a}	12,14±0,06^{a}	4,52±0,01^{b}	0,41±0,00^{a}	1,07±0,01^{b}
3 (SMP)	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	3,10	4,92±0,07^{a}	13,89±0,04^{a}	4,51±0,00^{b}	0,35±0,00^{a}	1,09±0,01^{bc}
4 (WPC + Na-Cn)	0,50	0,50	0,00	1,37	0,58	0,00	4,96±0,05^{a}	12,85±0,04^{a}	4,52±0,01^{b}	0,39±0,04^{a}	1,08±0,00^{bc}
5 (WPC + SMP)	0,50	0,00	0,50	1,37	0,00	1,55	4,98±0,04^{a}	13,73±0,05^{a}	4,53±0,01^{b}	0,36±0,00^{a}	1,12±0,01^{bc}
6 (Na-Cn + SMP)	0,00	0,50	0,50	0,00	0,58	1,55	5,01±0,04^{a}	13,02±0,03^{a}	4,53±0,01^{b}	0,38±0,02^{a}	1,13±0,01^{bc}
7(WPC + Na-Cn + SMP)	0,33	0,33	0,33	0,91	0,39	1,03	4,96±0,07^{a}	13,20±0,05^{a}	4,53±0,01^{b}	0,38±0,02^{a}	1,15±0,00^{c}

*Médias (n = 6) ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,01$).

Concentrado proteico de soro (WPC35, 36,6 g proteína.100g^{-1}), caseinato de sódio (Na-Cn, 86,5 g proteína.100g^{-1}) e leite em pó desnatado (SMP, 32,3 g proteína.100g^{-1})

5.2. Efeito da suplementação do leite com leite em pó desnatado, proteína concentrada de soro e caseinato de sódio

5.2.1 Efeito da suplementação do leite nos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos de acidificação ($t_{pH\ 5,0}$, $t_{pH\ 4,5}$, $V_{máx.}$, $T_{Vmáx.}$ e $pH_{Vmáx.}$) de leites adicionados de proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado a 42°C até pH 4,5 são apresentados na Tabela 3. Observa-se que ocorreram diferenças estatisticamente significativas ($P \leq 0,05$) entre os diferentes ensaios para todos os parâmetros cinéticos, exceto para o tempo necessário para atingir pH de 4,5 (tempo de fermentação).

O tempo de fermentação variou de 6,09 a 6,87 h para os leites adicionados de proteínas lácteas, sem diferenças significativas ($P \leq 0,05$). O controle, isto é, leite sem adição de proteínas lácteas, atingiu pH 4,5 em 5,87 h ± 0,13 h. Isto mostra que o enriquecimento do leite afeta ligeiramente o tempo de fermentação (aumento médio de tpH 4,5 de ~ 31,5 min), conforme descrito por vários pesquisadores (OLIVEIRA e*t al.,* 2001; MARTINÉZ, BECERRA, CHAFER, ALBOR, CAROT & CHIRALT, 2002; SODINI *et al.,* 2004). Entretanto, o leite fortificado apenas com leite em pó desnatado apresentou o maior tempo para atingir $pH_{4,5}$ (t = 6,87 h).

5.2.2. Efeito da suplementação do leite nos parâmetros físico-químicos

Após a fermentação, o valor de pH dos leites fermentados variou de 4,45 a 4,63, com ligeira diferença estatística significativa ($P \leq 0,05$) (Figura 4). Já o nível de acidez titulável (g ácido lático), em todos os iogurtes, após 24h de armazenamento a 4°C, pode ser agrupado da seguinte forma: (a) pelo menos 0,94g ácido lático no produto controle, (b) 1,08g ácido lático nos iogurtes suplementados com WPC, Na-Cn, SMP e WPC + NC, (c) entre 1,12 e 1,15g ácido lático nos iogurtes suplementados com WPC + SMP, Na-Cn + SMP e WPC + Na-Cn + SMP. Estes resultados mostram claramente o efeito da adição de proteínas lácteas na acidez dos leites fermentados (Figura 5).

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de acidificação de leite controle e de leite suplementado com diferentes proporções de leite em pó desnatado, proteína concentrada de soro e caseinato de sódio fermentado a 42°C até pH 4,5.

Ensaio	Teor de proteína adicionada (g proteína)			Parâmetros cinéticos de acidificação				
	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)	$V_{max.}$ ($.10^{-3}$upH.min^{-1})	$T_{vmax.}$ (h)	pH_{Vmax}	$t_{pH\ 5,0}$ (h)	$t_{pH\ 4,5}$ (h)
Controle	0,00	0,00	0,00	24,3±0,0^{d}	2,40±0,00^{b}	5,60±0,04^{ab}	2,47±0,00^{a}	5,87±0,13^{a}
1 (WPC)	1,00	0,00	0,00	25,6±0,0^{e}	2,60±0,00^{c}	5,61±0,05 ^{ab}	2,69±0,03^{bc}	6,38±0,43^{a}
2 (Na-Cn)	0,00	1,00	0,00	23,8±0,0^{cd}	2,58±0,04^{c}	5,54±0,03 ^{ab}	2,60±0,00^{b}	6,42±0,41^{a}
3 (SMP)	0,00	0,00	1,00	22,2±0,0^{ab}	2,69±0,03^{de}	5,48±0,06 ^{a}	2,67±0,00^{bc}	6,87±0,46^{a}
4 (WPC + Na-Cn)	0,50	0,50	0,00	22,5±0,0^{ab}	2,60±0,00^{c}	5,53±0,05 ^{a}	2,62±0,04^{b}	6,78±0,39^{a}
5 (WPC + SMP)	0,50	0,00	0,50	22,0±0,0^{a}	2,75±0,04^{e}	5,48±0,07 ^{a}	2,73±0,00^{c}	6,09±0,38^{a}
6 (Na-Cn + SMP)	0,00	0,50	0,50	23,1±0,0^{bc}	2,67±0,00^{d}	5,50±0,06 ^{a}	2,67±0,06^{bc}	6,20±0,41^{a}
7 (WPC + Na-Cn + SMP)	0,33	0,33	0,33	24,7±0,0^{de}	2,33±0,00^{a}	5,69±0,05 ^{b}	2,45±0,04^{a}	6,00±0,35^{a}

*Médias (n = 6) ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

$V_{max.}$: velocidade máxima de acidificação; $T_{vmax.}$: tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação; pH_{Vmax}: pH correspondente a V_{max}; $t_{pH\ 5,0}$ e $t_{pH\ 4,5}$: tempo em h para alcançar pH 5,0 e 4,5, respectivamente.

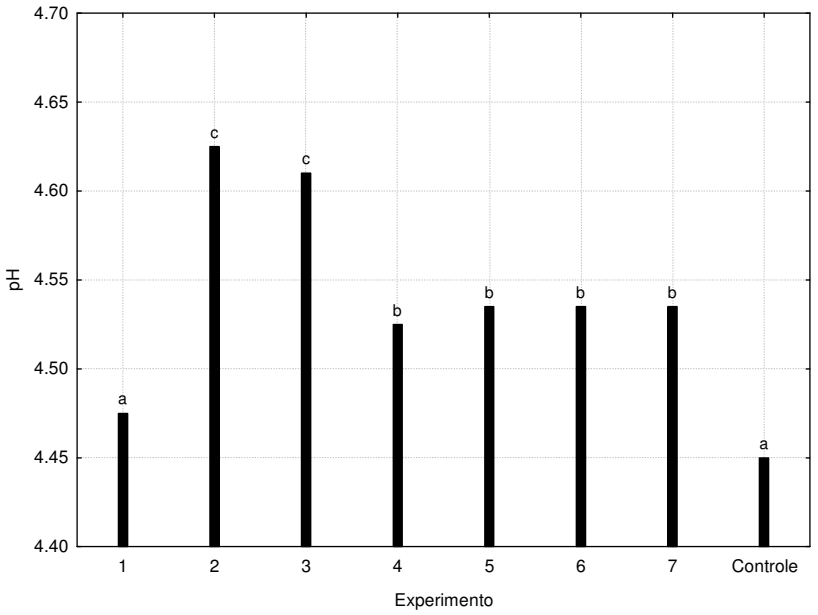


Figura 4. Valor de pH de leites adicionados de concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado, fermentados por S. *thermophilus, L. bulgaricus* e *B. lactis* e armazenados a 4°C durante 24h. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

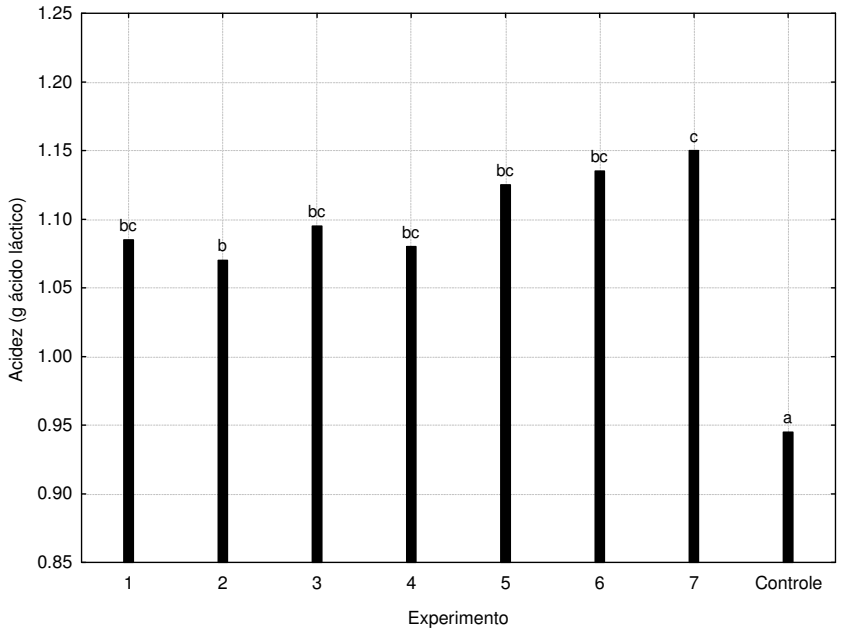


Figura 5. Acidez de leites adicionados de concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado, fermentados por S. *thermophilus, L. bulgaricus* e *B. lactis* e armazenados a 4°C durante 24h. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

5.2.3. Efeito da suplementação do leite nas contagens de microrganismos

A contagem microbiológica das culturas probióticas, *B. lactis*, e das iniciadoras, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus,* no inóculo foram 10,10 ± 0,46, 9,30 ± 0,37 e 5,52 ± 0,19log_{10}UFC.mL^{-1}, respectivamente. A contagem de lactobacilos foi menor, mas como esses são os principais responsáveis por pós-acidificação no iogurte, o que reduz a viabilidade das bactérias probióticas; é recomendado o uso de culturas iniciadoras com contagem menor dessa espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Após 24h do término da fermentação (d1), a contagem microbiológica nos leites adicionados de concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado e fermentados a 42°C até pH 4,5 pode ser vistas na Tabela 4.

B. lactis atingiu em média 7,16log_{10}UFC.mL^{-1}, variando de 6,89log_{10}UFC.mL^{-1} (controle) a 7,80log_{10}UFC.mL^{-1} (iogurte com WPC + Na-Cn + SMP), podendo ser verificada ligeira diferença significativa. Estas contagens em D1 (24h após a fermentação), apesar de atenderem à legislação para alimentos probióticos, podem ser consideradas baixas para o início do tempo de vida de prateleira. Observa-se que o ensaio com maior contagem foi aquele no qual se adicionou concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado em iguais proporções (x_1=x_2=x_3=0,333). No entanto, é seguro considerar uma taxa de inoculação de bifidobactérias maior, a fim de atingir contagens mais elevadas no iogurte.

A contagem de *S. thermophilus* nos produtos fermentados variou de 8,98log_{10}UFC.mL^{-1} (iogurte com WPC) a 9,60log_{10}UFC.mL^{-1} (iogurte com WPC + Na-Cn + SMP). Observou-se ligeira diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$) entre os diferentes ensaios (Tabela 4). Por outro lado, as contagens de estreptococos do iogurte controle foram em média 9,29 ± 0,10log_{10}UFC.mL^{-1}, muito semelhantes aos iogurtes suplementados com proteínas.

No entanto, as contagens de *L. bulgaricus* variaram de 3,86log_{10}UFC.mL^{-1} (iogurte com WPC) a 9,11log_{10}UFC.mL^{-1} (iogurte com SMP), com expressiva diferença estatisticamente significativa ($P \leq 0,05$). No iogurte controle, a contagem média foi de 6,06 ± 0,33log_{10}UFC.mL^{-1}. O enriquecimento do leite com WPC apresentou efeito positivo sobre o crescimento de *L. bulgaricus*. O crescimento desse microrganismo também foi observado na

suplementação com SMP, o que resultou em maior tempo de fermentação.

Tabela 4. Contagem ($log_{10}UFC.mL^{-1}$) de células viáveis em leite adicionado pó desnatado, proteína concentrada de soro e caseinato de sódio nas 24h após a fermentação a 42°C até pH 4,5.

Ensaio	Teor de proteína adicionada (g proteína)			S. *thermophilus*		*L. bulgaricus*		*B. lactis*	
	x_1	x_2	x_3	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
Controle	0,000	0,000	0,000	9,29	0,10	6,06	0,33	6,89	0,03
1 (WPC)	1,000	0,000	0,000	8,98	0,30	3,86	0,21	7,00	0,07
2 (Na-Cn)	0,000	1 ,000	0,000	9,31	0,04	5,05	0,13	7,15	0,05
3 (SMP)	0,000	0,000	1,000	9,11	0,10	9,11	0,10	6,91	0,17
4 (WPC + Na-Cn)	0,500	0,500	0,000	9,35	0,10	5,00	0,00	6,98	0,33
5 (WPC + SMP)	0,500	0,000	0,500	9,23	0,02	5,00	0,00	7,15	0,10
6 (Na-Cn + SMP)	0,000	0,500	0,500	9,00	0,00	5,00	0,00	7,40	0,60
7 (WPC + Na-Cn + SMP)	0,333	0,333	0,333	9,60	0,00	5,66	0,12	7,80	0,05

x_1: concentrado proteico de soro; x_2: caseinato de sódio; x_3: leite em pó desnatado; n = 12; D.P.: Desvio Padrão.

5.2.4. Efeito da suplementação do leite nas propriedades viscoelásticas do iogurte

Os módulos elástico (G') e viscoso (G''), dos iogurtes suplementados com proteína e do controle, obtidos a partir da varredura de cisalhamento, são mostrados na Tabela 5.

Os espectros mecânicos obtidos dentro da zona de viscoelasticidade linear para todos os iogurtes são mostrados na Figura 6(a). Em geral, a tensão de cisalhamento estudada mostra que a forma dos espectros mecânicos foi típica de géis fracos e, dessa maneira, eles podem ser divididos em três grupos: (i) a adição apenas de leite em pó desnatado (SMP) resultou em um gel mais forte; (ii) o iogurte controle, os ensaios adicionados de WPC ou Na-Cn sozinhos, em mistura binária (WPC + Na-Cn) ou mistura ternária (SMP + WPC + Na-Cn), resultaram em géis intermediários, e (iii) as misturas binárias contendo SMP, ou seja, SMP + WPC ou SMP + Na-Cn, apresentaram géis mais fracos. A suplementação da base de leite com proteínas resultou em aumento no valor dos dois módulos, tanto G' como G'', em comparação com o iogurte controle, para os seguintes ensaios: WPC, Na-Cn, SMP, WPC + Na-Cn e SPM + WPC + Na-Cn. Já para as misturas binárias contendo SMP + WPC e SMP + Na-Cn, foi observado fenômeno inverso, uma vez que os dois módulos (G' e G'') apresentaram valores menores quando comparados ao controle. Resultados semelhantes foram relatados por Sanz, Salvador & Jiménez (2008) nos quais a base do leite foi enriquecida com fibras funcionais de aspargo.

No geral, o módulo de perda (G'') foi menor que o módulo de armazenamento (G') em todos os ensaios, independentemente do tipo de proteína adicionada, inclusive no controle (Figura 6b); o que indica um sistema fraco tipo viscoelástico, com características elásticas, resultando em melhor estabilidade durante o armazenamento. Esse fato também foi observado por Damin *et al.* (2009) e Saint-Eve *et al.* (2006) em iogurtes suplementados com diferentes proteínas lácteas.

Com base nas informações obtidas, pode-se classificar os sistemas em estudo como tixotrópicos, por apresentarem decréscimo na viscosidade aparente com o tempo de aplicação da tensão e, após o repouso, tenderem a retornar à condição inicial de viscosidade.

A textura do iogurte pode ser influenciada por vários fatores, tais como o nível de fortificação dos sólidos na base do leite, a temperatura e o tempo do tratamento térmico, a pressão de homogeneização, a cepa de cultura iniciadora e pelo corte (agitação) do gel após a fermentação (SODINI *et al.*, 2004). Além disso, segundo Renan *et al.* (2009), o pH de quebra

do gel pode ser um fator fundamental para a recuperação da estrutura, provavelmente devido a interações eletrostáticas, tanto repelentes como atraentes. Já Martinez *et al.* (2002) relataram a importância da proteína de leite adicionada à base. Eles observaram que iogurtes enriquecidos com WPC, MPC (proteína concentrada do leite) e SMP, apresentaram comportamentos diferentes durante a fermentação; o gel formado foi diferente em termos de viscosidade após a fermentação e ocorreu variação no nível de sinerese, devido às diferentes fontes de proteína. Os iogurtes enriquecidos com MPC ou SMP apresentaram maior viscosidade e sinerese em comparação com o iogurte suplementado com WPC. Além disso, Sodini *et al.* (2004) relataram que, quando a base de leite é suplementada com proteínas obtidas por ultrafiltração, ou WPC ou caseinato, a firmeza dos iogurtes aumentou em comparação ao produto enriquecido com SMP; isso foi devido ao aumento do teor de proteína em relação ao nível de sólidos totais.

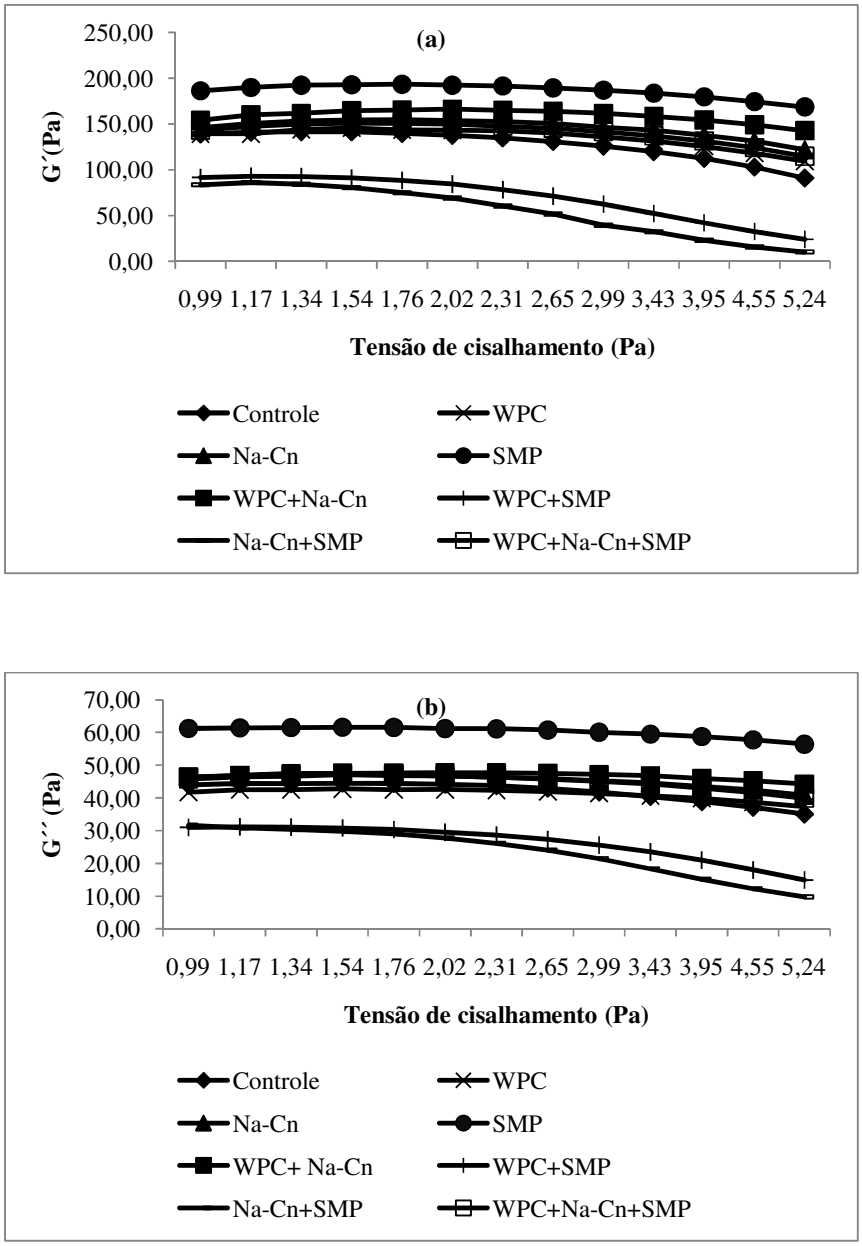


Figura 6. Espectro mecânico de iogurte controle e produtos experimentais preparados com concentrado proteico de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) puros e em misturas binárias ou ternárias a 26°C. (a) Módulo elástico, G'; (b) Módulo viscoso, G''. (n=12)

Tabela 5. Propriedades viscoelásticas (a 5,24 Pa tensão de cisalhamento) de iogurte controle e iogurtes experimentais preparados com concentrado protéico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado fermentado a 42°C até pH 4,5.

Ensaio	Teor de proteína adicionada (g proteína)			Propriedades viscoelásticas	
	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)	G' (Pa)	G'' (Pa)
Controle	0,00	0,00	0,00	90,97± 0,00[ab]	35,07±0,00[ab]
1 (WPC)	1,00	0,00	0,00	109,38± 0,00[ab]	37,33±0,00[ab]
2 (Na-Cn)	0,00	1,00	0,00	121,95±10,98[d]	40,82±2,65[d]
3 (SMP)	0,00	0,00	1,00	168,67±18,33[cd]	53,68±4,62[cd]
4 (WPC + Na-Cn)	0,50	0,50	0,00	142,70±12,43[ab]	44,27±3,32[ab]
5 (WPC + SMP)	0,50	0,00	0,50	24,20± 5,21[a]	14,96±2,09[a]
6 (Na-Cn + SMP)	0,00	0,50	0,50	10,47± 2,90[c]	9,80±1,46[c]
7 (WPC + Na-Cn + SMP)	0,33	0,33	0,33	114,85±20,69[b]	39,95±3,89[b]

*Médias (n = 12) ± desvio padrão com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

G': Módulo elástico; G'': Módulo viscoso.

5.3. Otimização da suplementação do leite com proteínas através da metodologia de superfície de resposta

Os resultados da otimização estão apresentados de acordo com os ensaios de números 1 a 7 do delineamento experimental (Tabela 1) de mistura *simplex centroide* realizado, juntamente com os resultados do leite controle. Os coeficientes dos modelos foram estimados pelo método dos mínimos quadrados para as respostas que apresentaram variância significativa e homogênea para os parâmetros: cinética de acidificação (V_{max}, t_{Vamx}, $t_{pH5,0}$ e $t_{pH4,5}$), contagem de células viáveis (Lb, St e Bl) e propriedades viscoelásticas (G' e G''). Foram testados modelos de regressão linear, quadrático e cúbico especial para todas as respostas selecionadas. Os modelos preditivos ajustados foram testados quanto à falta de ajuste. Modelos preditivos que apresentaram falta de ajuste significativo foram descartados, sendo então selecionados os modelos com falta de ajuste não significativa e com coeficientes de determinação $R^2 \geq 0,65$.

O efeito de cada componente da formulação base do leite pode ser observado pela magnitude, pela significância (erro padrão) e pelo sinal (+ ou -) associado com o respectivo coeficiente no modelo ajustado para cada resposta (Tabela 6).

O número e o sinal dos coeficientes lineares obtidos para cada resposta mostraram que todos os componentes contribuíram para aumentar os parâmetros cinéticos (β1 positivo, β2 e β3 para $t_{VMÁX}$ e tpH 5,5), bem como a contagem de bactérias viáveis (β1 positivo, β2 e β3 para as contagens de estreptococos, lactobacilos e bifidobactérias) e as propriedades viscoelásticas (β1 positivo, β2 e β3 para G'e G"). Os coeficientes do modelo linear polinomial para $V_{MÁX}$ mostraram que todas as interações eram antagônicas. Isto significa que a adição de WPC, Na-Cn ou SMP teve efeito positivo, ou seja, diminuindo as taxas de acidificação máxima, mas teve efeitos negativos sobre outros parâmetros cinéticos, tais como o tempo para atingir a taxa máxima de acidificação e o tempo para atingir pH 5,5. Embora o teor de proteína dos iogurtes experimentais tenha sido semelhante (Tabela 2), as taxas de acidificação/perfis foram diferentes (Tabela 3).

Analisando os coeficientes binários dos modelos (β12, β13 e β23), os iogurtes enriquecidos com SMP e Na-Cn contribuíram para $V_{MÁX}$ crescente, contagens de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e propriedades viscoelásticas. Além disso, não foram observados efeitos significativos quando SMP + Na-Cn foram adicionados à base

do leite ($P \leq 0,05$) para a $T_{VMÁX}$ e tpH 5,0 e para as contagens de *B. animalis* subsp. *lactis*.

No entanto, quando se utilizou WPC como substituto de proteínas de SMP, coeficientes binários do modelo polinomial (β13) mostraram que esse componente contribuiu para o aumento de $V_{máx.}$ Em contrapartida, as interações em relação à contagem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e às propriedades viscoelásticas foram antagônicas, ou seja, contribuíram para diminuir a contagem de lactobacilos e as propriedades viscoelásticas. Nenhuma interação significativa foi encontrada (β13) nos parâmetros cinéticos ($t_{pH\ 5,0}$) e nas contagens de *S. thermophilus* e *B. lactis*.

Tabela 6. Coeficientes dos modelos polinomiais para as variáveis respostas da otimização dos parâmetros cinéticos de acidificação, contagem de bactérias viáveis e propriedades viscoelásticas de iogurtes probióticos adicionados de proteínas lácteas.

Ensaios	Parâmetros Cinéticos			Contagem de bactérias viáveis			Propriedades viscoelásticas	
Fatores	$V_{max.}$	tv_{max}	$t_{ph5.5}$	*S.*	*L.*	*B.*	G'	G''
1 - WPC (β_1)	-0,026	2,60	2,69	8,98	3,86	7,00	109,38	37,33
2 – Na-Cn (β_2)	-0,024	2,58	2,60	9,31	5,05	7,15	121,95	40,82
3 - SMP (β_3)	-0,022	2,69	2,67	9,10	9,11	6,91	168,67	53,68
4 - WPC + Na-Cn (β_{12})	0,009	Ns	Ns	0,79	2,17	ns	108,14	20,77
5 - WPC + SMP (β_{13})	0,008	0,43	Ns	Ns	-5,95	ns	-459,29	-122,19
6 – Na-Cn + SMP (β_{23})	Ns	Ns	Ns	-0,84	-8,31	ns	-539,34	-149,80
7 - WPC + Na-Cn + SMP (β_{123})	-0,071	0,51	-6,30	10,59	26,95	15,48	2172,46	645,82
P (model)	< 0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	<0,01	<0,01
Adjusted R^2	0,946	0,974	0,898	0,790	0,997	0,631	0,967	0,974

WPC: concentrado proteico de soro; Na-Cn: caseinato de sódio; SMP: leite em pó desnatado
V_{max}: velocidade máxima de acidificação; t_{Vmax}: tempo para alcançar a velocidade máxima de acidificação; $t_{pH\ 5,0}$ e $t_{pH\ 4,5}$: tempo em horas para atingir pH 5,0 e 4,5, respectivamente.
S: *S. thermophilus*; L: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; B: *B. animalis* subsp. *lactis*.
G': Módulo elástico; G'': Módulo viscoso

ns: não significativo

Diferentes efeitos foram observados quando SMP foi substituído, em igual proporção, por Na-Cn. Não foi observada interação significativa (β23) sobre os parâmetros cinéticos e as contagens de *B. lactis*. No entanto, os coeficientes binários do modelo polinomial da contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e das propriedades viscoelásticas mostraram que todas as interações foram antagônicas.

Interações significativas das três proteínas do leite usadas em parâmetros cinéticos foram observadas (β23), por exemplo, afetando negativamente o $T_{VMÁX}$ (aumento) e positivamente a $V_{MÁX}$ e o tpH 5,5 (diminuição). Efeitos similares positivos foram observados para a contagem de bactérias viáveis quando a base de leite foi enriquecida com WPC + Na-Cn + SMP, o que aumentou a contagem de *L. bulgaricus* (devido à maior β123). Coeficientes ternários de modelos polinomiais para as propriedades viscoelásticas mostraram que todas as interações foram significativas para G' e G".

O contorno de curvas de respostas obtidas para a cinética (Figura 7) reforça a influência significativa da adição de proteínas na base do leite na taxa de acidificação máxima, no tempo para atingir a taxa máxima de acidificação e no tempo para atingir pH 5,0. Pode-se observar que, no centro dos diagramas triangulares, há a composição ótima da mistura das três proteínas utilizadas, que aumentaram os parâmetros cinéticos, no início do processo de fermentação. Qualquer deslocamento desse ponto permite uma composição da mistura que resulta na diminuição dos parâmetros cinéticos de fermentação dos leites fortificados por *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. lactis*.

O contorno das curvas obtidas para a contagem das respostas viáveis de bactérias (Figura 8) indica que as contagens foram afetadas pela adição de WPC, Na-Cn ou SMP às bases de leite. Na Figura 8a, as contagens de *S. thermophilus* foram superiores a $9{,}3\log_{10}UFC.mL^{-1}$, independentemente da composição da mistura de proteínas, enquanto as contagens de *L. bulgaricus* foram maiores quando SMP foi substituído por WPC (Figura 8b). Entretanto, as contagens de *B. lactis* permaneceram as mesmas ($\sim 7{,}3\log_{10}UFC.mL^{-1}$), com pequeno deslocamento em direção ao Na-Cn que foi utilizado para suplementar o leite (Figura 8c).

A Figura 9 mostra a influência das proteínas do leite nas propriedades viscoelásticas do iogurte probiótico. G', G" e ŋ apresentaram o ótimo quando uma mistura de todas as proteínas foi utilizada (WPC + Na-Cn + SMP) – $x_1 = 0{,}19$, $x_2 = 0{,}36$ e $x_3 = 0{,}45$ (Figura 9a, 9b e 9c).

Além disso, os resultados indicaram que a área ideal para as propriedades viscoelásticas, o que corresponde aos seguintes percentuais de ingredientes: x_1 = 0,52 g.100g^{-1} (WPC), x_2 = 0,42 g.100g^{-1} (Na-Cn) e x_3 = 1,39 g.100g^{-1} (SMP), foi satisfatória em relação aos parâmetros cinéticos, a contagem de bactérias viáveis e as propriedades viscoelásticas.

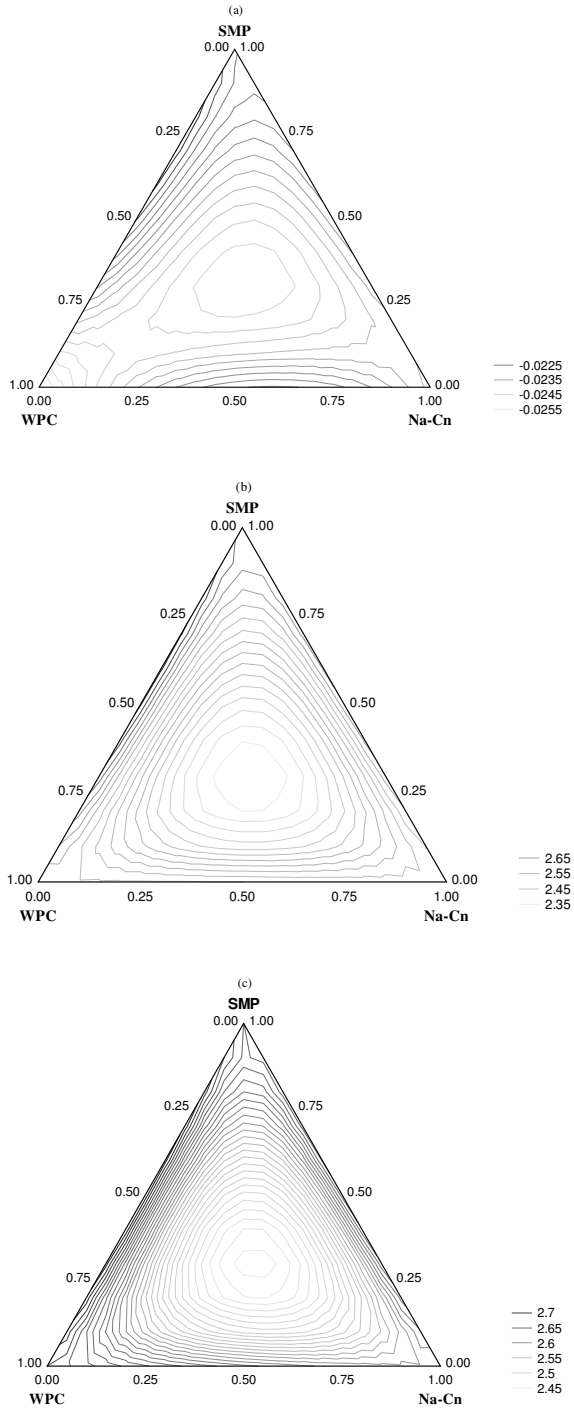


Figura 7. Contornos mostrando o efeito da adição de concentrado proteico de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) na (a) velocidade máxima de acidificação (v_{max}, upH.min^{-1}), (b) no tempo para alcançar a velocidade máxima de acidificação (tv_{max}, h) e (c) no tempo para alcançar pH 5,0 ($t_{pH5,0}$, h). Cada linha corresponde a um dado valor da resposta.

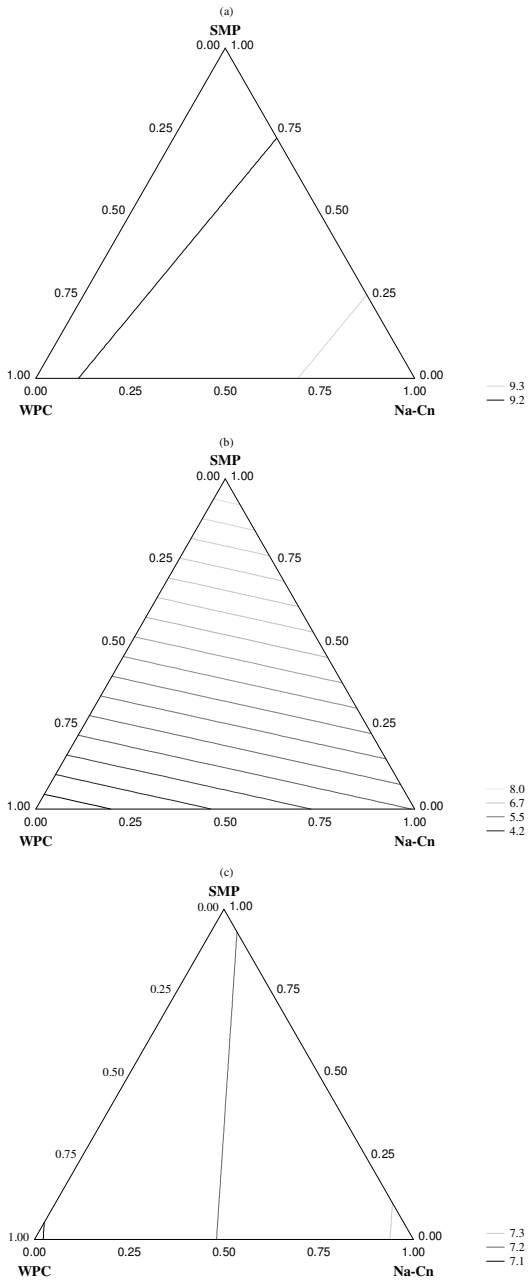
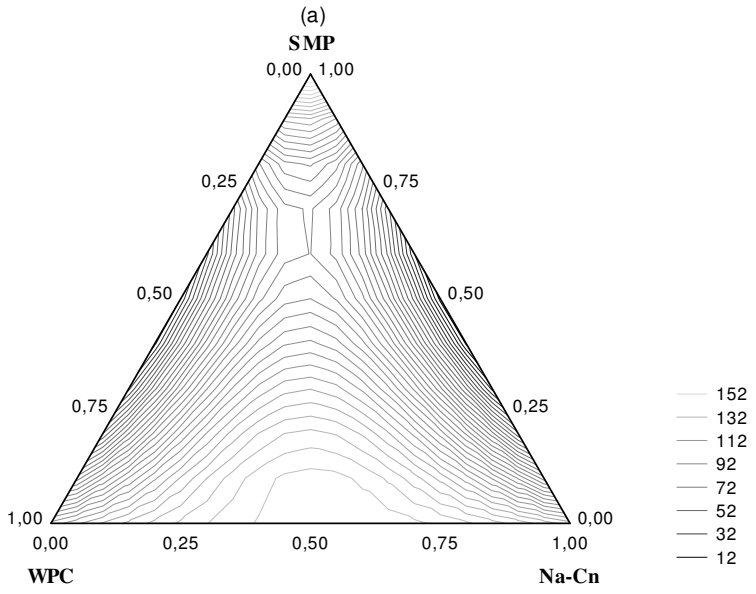


Figura 8. Contornos mostrando o efeito da adição de concentrado proteico de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) na contagem ($\log_{10}$ CFU.mL^{-1}) de: (a) *S. thermophilus*, (b) *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* e (c) *B. animalis* subsp. *lactis*. Cada linha corresponde a um dado valor da resposta.



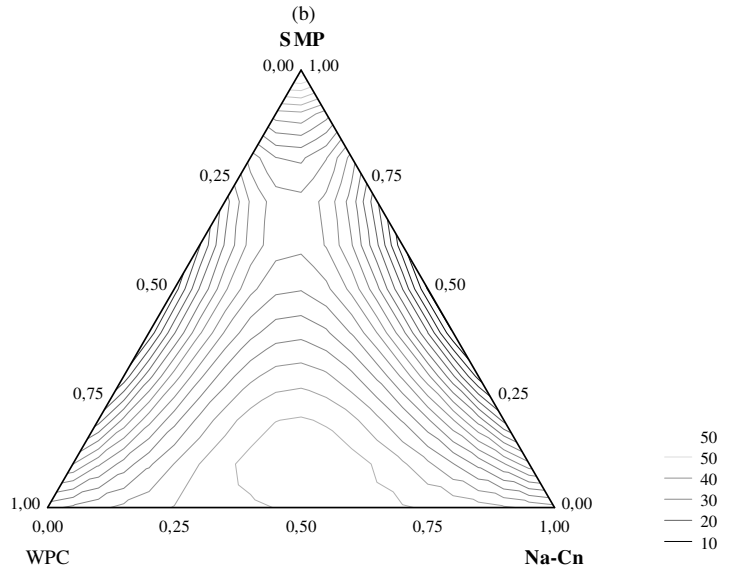


Figura 9. Contornos mostrando o efeito da adição de concentrado proteico de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) nas propriedades reológicas de iogurtes probióticos: (a) Módulo elástico (G'); (b) Módulo viscoso (G''); (c) Viscosidade complexa. Cada linha corresponde a um dado valor da resposta.

5.3.1. Ensaios para validação da otimização da cinética de acidificação e composição físico-química do leite suplementado com leite em pó desnatado, proteína concentrada de soro e caseinato de sódio no ponto ótimo e no controle

Para determinação do ponto ótimo foram considerados os seguintes parâmetros, de acordo com os resultados obtidos na primeira fase do delineamento:

a) cinética de acidificação: redução no tempo de fermentação em relação ao controle;

b) microbiologia: aumento na contagem das bactérias viáveis, principalmente *B. lactis;*

c) propriedades viscoelásticas: aumento da consistência.

Os parâmetros citados acima também foram analisados considerando as necessidades da indústria; ou seja, a redução no tempo de fermentação favorece o aumento da produção, o aumento na contagem de *B. lactic* permite que o produto mantenha suas propriedades probióticas até o final do armazenamento e o aumento na consistência atende às expectativas dos consumidores quanto ao padrão de qualidade, permitindo até a redução de custos na formulação por parte da indústria.

Os novos ensaios foram realizados empregando-se leite suplementado com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado, de acordo com as proporções ótimas obtidas através da metodologia de superfície de resposta mostradas na Tabela 7 (leite ótimo). Leite sem suplementação foi usado como controle.

Tabela 7: Composição química do leite controle e do ótimo suplementado com proteína concentrada de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP).

Ensaio	Teor de proteína adicionada (g proteína)			Quantidade de ingrediente (g ingrediente.100g^{-1} base)		
	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)
Controle	---	---	---	0,00	0,00	0,00
Ótimo	0,19	0,36	0,45	0,52	0,42	1,39

Nessa etapa, foram realizados dois experimentos, independentemente e em duplicata, e avaliados a cinética de acidificação, os parâmetros químicos (pH e acidez total), a contagem de bactérias viáveis e as propriedades viscoelásticas (G' e G'') do iogurte probiótico ótimo e controle, durante a vida de prateleira do produto armazenado a 5°C até o 28º dia após a fermentação. Tais análises foram programadas em cinco períodos: d1, d7, d14, d21 e d28. A composição química (proteína, sólidos totais, pH e acidez total) dos leites ótimo e controle foi analisada antes da fermentação (d0).

A composição química do leite controle e do suplementado com WPC, Na-Cn e SMP no ponto ótimo (Tabela 8) manteve as mesmas características observadas na primeira etapa do delineamento. Porém, pode-se destacar que o teor de sólidos totais do leite suplementado no ponto ótimo (ST = 12,50%) foi muito próximo ao valor previsto, quando comparado aos primeiros experimentos suplementados com as diferentes combinações de proteínas (ST médio = 13,20%). O teor de proteína do leite suplementado no ponto ótimo (proteína = 4,72g/100g) também ficou abaixo da média dos primeiros experimentos suplementados com diferentes combinações de proteínas (proteína média = 4,95g/100g).

Tabela 8: Composição química do leite controle e do ótimo adicionado de concentrado proteico de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) usados na preparação de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas.

Ensaio	Quantidade de ingrediente (g ingrediente.100g^{-1} base)			Sólidos totais* (g/100g)	Proteínas* (g/100g)	Proteína / sólidos totais
	WPC (x_1)	Na-Cn (x_2)	SMP (x_3)			
Controle	0,00	0,00	0,00	11,10 ± 0,03	3,80 ± 0,00	0,33 ± 0,00
Ótimo	0,52	0,42	1,39	12,50 ± 0,02	4,72 ± 0,01	0,38 ± 0,02

*Média ± D.P.

Na Figura 10 pode-se observar a curva de acidificação do leite controle e do ótimo suplementado com WPC, Na-Cn e SMP e verificar que a evolução do pH durante o tempo de fermentação praticamente não foi afetada pela adição de proteínas lácteas, o que possibilita a utilização de tal suplementação em escala industrial sem afetar a produtividade, uma vez que não ocorreu aumento no tempo de fermentação.

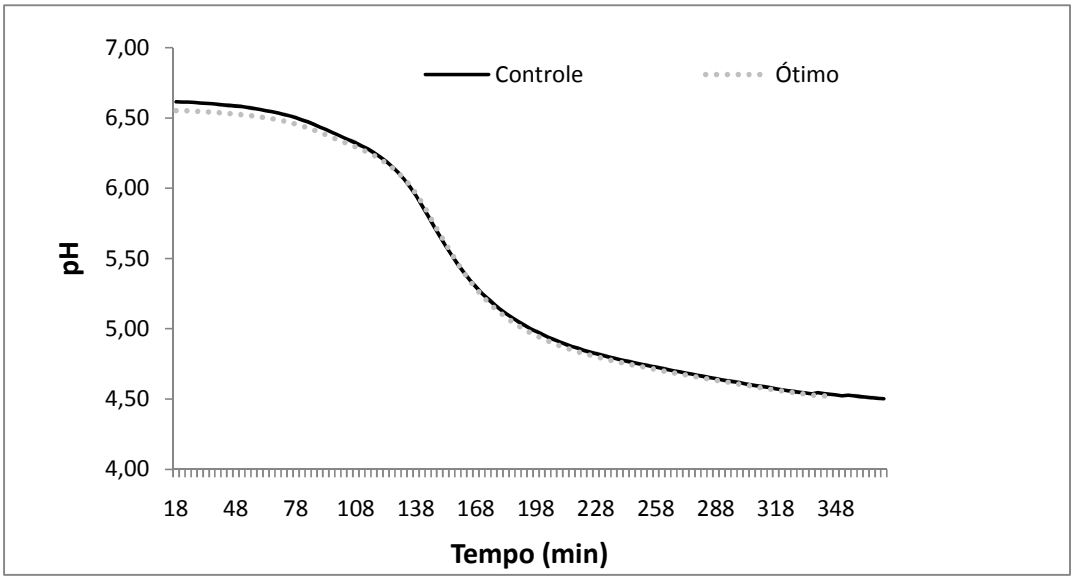


Figura 10. Evolução do pH em função do tempo de fermentação do leite controle e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado a 42°C até pH 4,5.

Os resultados dos parâmetros cinéticos de acidificação ($t_{pH\ 5,0}$, $t_{pH\ 4,5}$, $V_{máx.}$, $T_{Vmáx.}$ e $pH_{Vmáx.}$) do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle são apresentados nas Figuras 11, 12, 13, 14, 15 e 16. Observa-se que na proporção de WPC, Na-Cn e SMP determinadas no ponto ótimo não ocorreu nenhuma diferença significativa entre os parâmetros cinéticos. Porém, estudos realizados por diversos pesquisadores (OLIVEIRA e*t al.,* 2001; MARTINÉZ, BECERRA *et al.,* 2002; SODINI *et al.,* 2004) demonstraram que o enriquecimento do leite com proteínas lácteas podem afetar os parâmetros cinéticos. Contudo, no presente estudo observou-se que as proporções das diferentes proteínas lácteas obtidas no ponto ótimo não afetaram significativamente nenhum dos parâmetros.

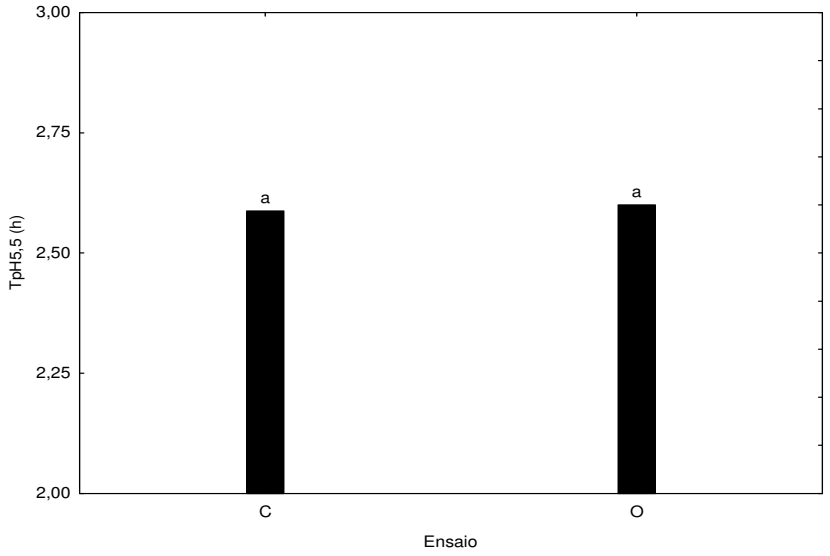


Figura 11. Tempo para atingir pH 5,0 do leite controle (C) e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado (O) durante a fermentação a 42°C até pH 4,5. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

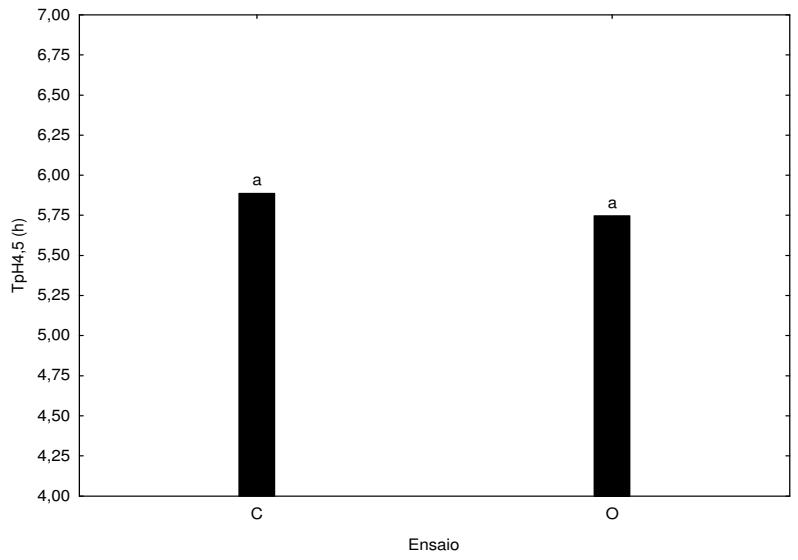


Figura 12. Tempo para atingir pH 4,5 (tempo de fermentação) do leite controle (C) e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado (O) a 42°C. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

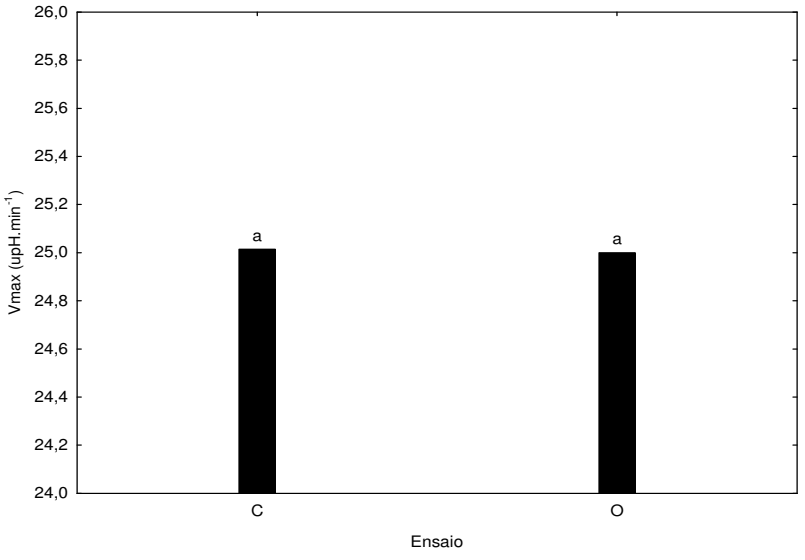


Figura 13. Velocidade máxima de acidificação ($V_{máx.}$) do leite controle (C) e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado (O) a 42°C até pH 4,5. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

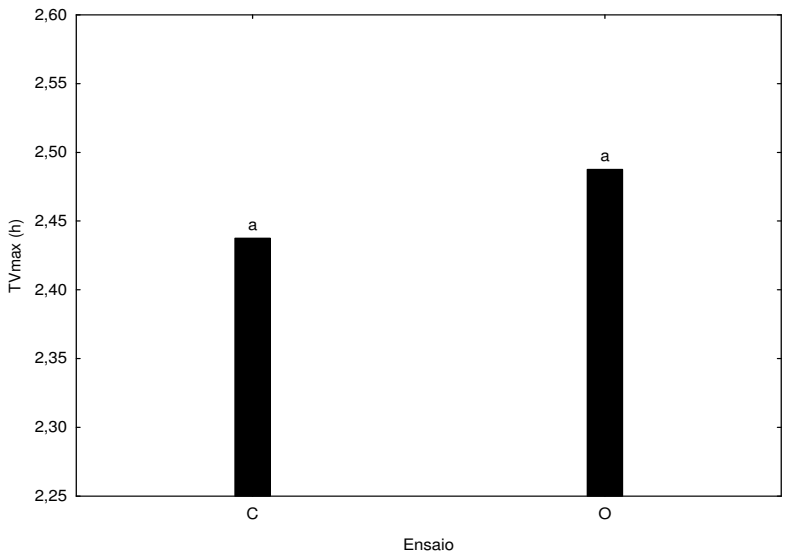


Figura 14. Tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação ($T_{Vmáx.}$) do leite controle (C) e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado (O) a 42°C até pH 4,5. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

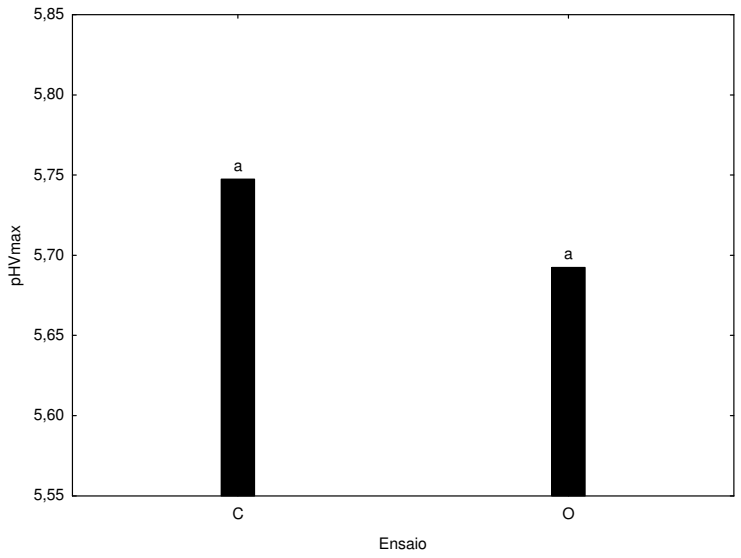


Figura 15. Valor de pH na velocidade máxima de acidificação ($pH_{Vmáx.}$) do leite controle e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado a 42°C até pH 4,5. Médias (n = 6); Valores com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0{,}05$).

5.4. Estudo da vida de prateleira dos iogurtes controle e suplementado no ponto ótimo

5.4.1. Resultado da composição físico-química do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle

A evolução do pH do iogurte controle e do ótimo durante o armazenamento não apresentou diferenças significativas, como demonstrado na Figura 16. O valor de pH dos iogurtes variou entre 4,51 e 4,24 até o 28º dia. Já para acidez total ocorreu aumento significativo no ótimo quando comparado ao controle durante o armazenamento, representando acréscimo de aproximadamente 12% no 28º dia, comparado ao controle no mesmo período. Na média, a acidez total do ótimo foi 10% maior que a do controle (Figura 17).

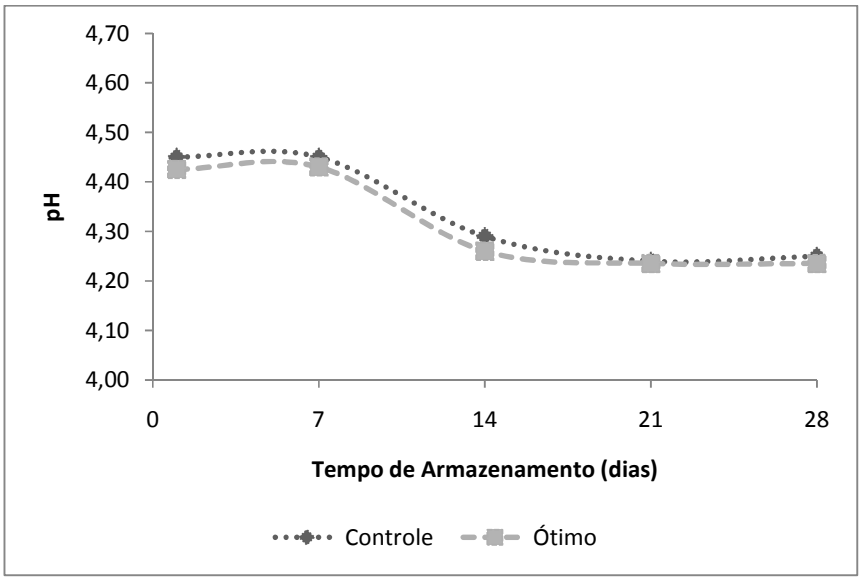


Figura 16. Evolução do pH em função do tempo de armazenamento (a 5°C) dos iogurtes controle e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado.

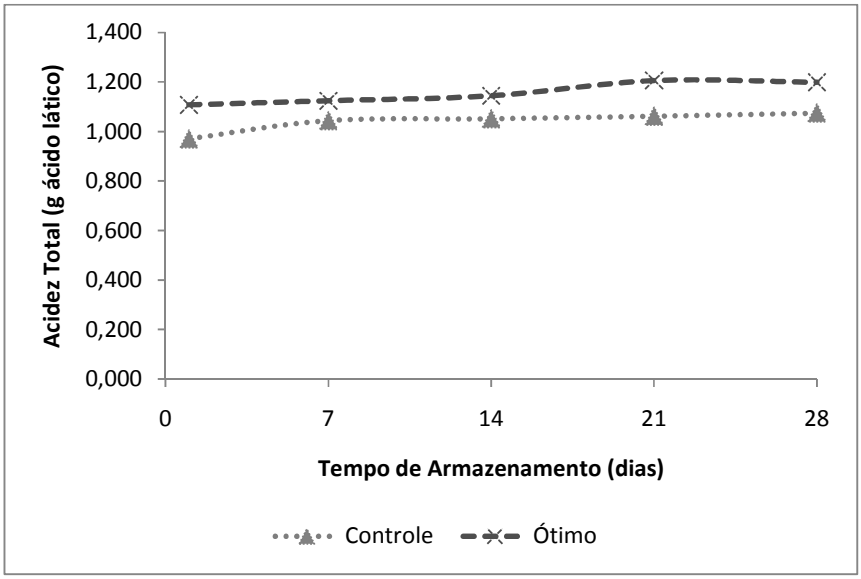


Figura 17. Evolução da acidez total em função do tempo de armazenamento (a 5°C) do iogurte controle e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado.

5.4.2. Resultados das contagens de bactérias viáveis do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle

A contagem de células viáveis da cultura probiótica, *B. lactis*, e das iniciadoras, S. *thermophilus* e *L. bulgaricus,* no inóculo foi 8,47 ± 0,09log_{10}UFC.mL^{-1} e 9,22 ± 0,10log_{10}UFC.mL^{-1}, 7,71 ± 0,01log_{10}UFC.mL^{-1}, respectivamente.

O iogurte controle e o ótimo suplementado com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado foram analisados quanto à contagem de células viáveis 24h após a fermentação (d1) até o 28º dia de armazenamento. Esses resultados podem ser observados nas Figuras 18 (a) e 18 (b).

B. lactis atingiu em média a contagem de 6,77log_{10}UFC.mL^{-1} no iogurte controle, não sendo observada diferença significativa durante os 28 dias de armazenamento, variando de 6,63log_{10}UFC.mL^{-1} (d1) a 6,78log_{10}UFC.mL^{-1} (d28). Já no iogurte ótimo a contagem de *B. lactis* atingiu a média de 7,07log_{10}UFC.mL^{-1}, aumento de aproximadamente 4,5% quando comparado ao controle. No iogurte ótimo suplementado com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado foi observada diminuição na contagem do *B. lactis* durante a vida de prateleira, variando de 7,31log_{10}UFC.mL^{-1} a 6,88log_{10}UFC.mL^{-1} entre d1 e d28, respectivamente; o que representa redução de aproximadamente 6% na contagem microbiológica.

A contagem de S. *thermophilus* no iogurte controle e no ótimo não apresentou diferença significativa entre as amostras, com variação entre 9,31 e 9,78log_{10}UFC.mL^{-1} durante o armazenamento, isto é, redução de ± 3,5% na contagem até o 28º dia.

No entanto, as contagens de *L. bulgaricus* durante a vida de prateleira dos iogurtes variaram entre 5,17 e 5,47log_{10}UFC.mL^{-1}, no controle, e entre 5,73 e 5,54log_{10}UFC.mL^{-1} no ótimo. Destacando-se que para o iogurte controle só foi possível efetuar a contagem até d21 e para o ótimo apenas até d14. Essas contagens baixas confirmam os resultados da fase de delineamento experimental e a característica das culturas iniciadoras comerciais de diminuir a pós-acidificação nos iogurtes durante a vida de prateleira.

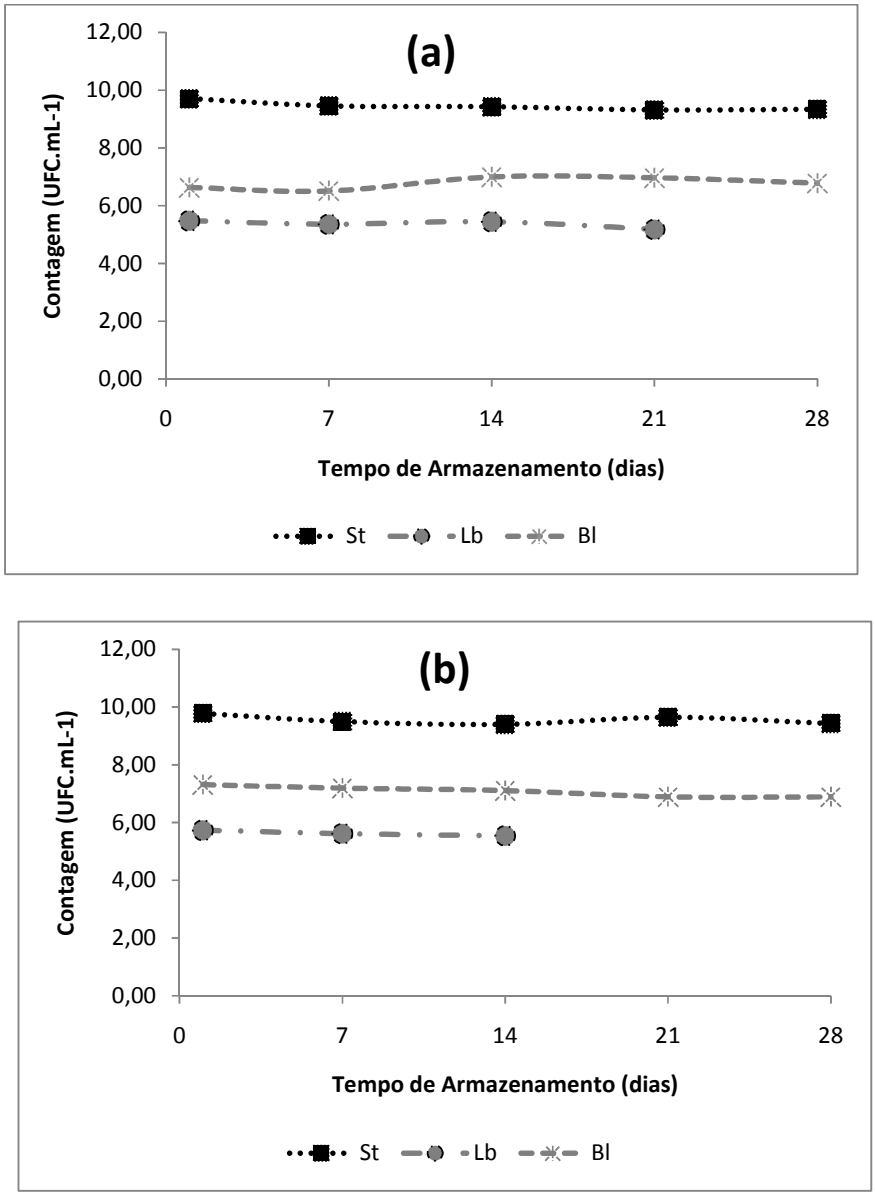


Figura 18. Evolução da contagem de St, Lb e Bl em função do tempo de armazenamento (a 5°C) do iogurte controle (a) e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado (b).

5.4.3. Resultados das propriedades viscoelásticas do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle

Na Figura 19 pode-se observar a evolução do módulo elástico (G') durante a vida de prateleira do iogurte controle e do ótimo.

No iogurte probiótico controle há queda durante o período de 28 dias, redução de quase 80% em relação ao d1, com variação entre 79,68 e 16,15Pa. Enquanto no ótimo há aumento significante até o 14° dia de aproximadamente 60%; contudo, pode-se observar pequeno declínio a partir do d21, que permanece praticamente constante até d28.

O módulo viscoso (G'') apresentou valores bem menores que G' durante o armazenamento, reproduzindo os resultados obtidos na primeira fase de delineamento experimental. No iogurte controle o G'' variou entre 31,63 e 9,56Pa, representando diminuição de até 70% durante o armazenamento. Já para o iogurte suplementado no ponto ótimo, cuja variação foi entre 54,98 e 72,35Pa, pode-se observar aumento expressivo (± 30%) até o 14° dia, quando G'' atingiu o valor máximo; na sequência ocorreu pequeno declínio até d28, porém nesse ponto o valor de G'' foi 25% maior que o determinado em d1 (Figura 20).

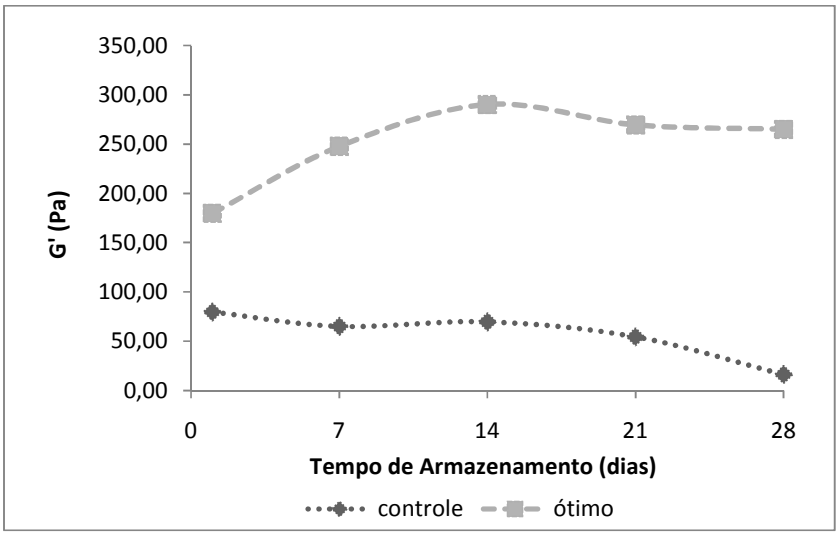


Figura 19. Espectro mecânico do módulo elástico (G') do iogurte controle e do ótimo suplementado com proteína concentrada de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) a 26°C e tensão de cisalhamento de 5,24 Pa (n=12).

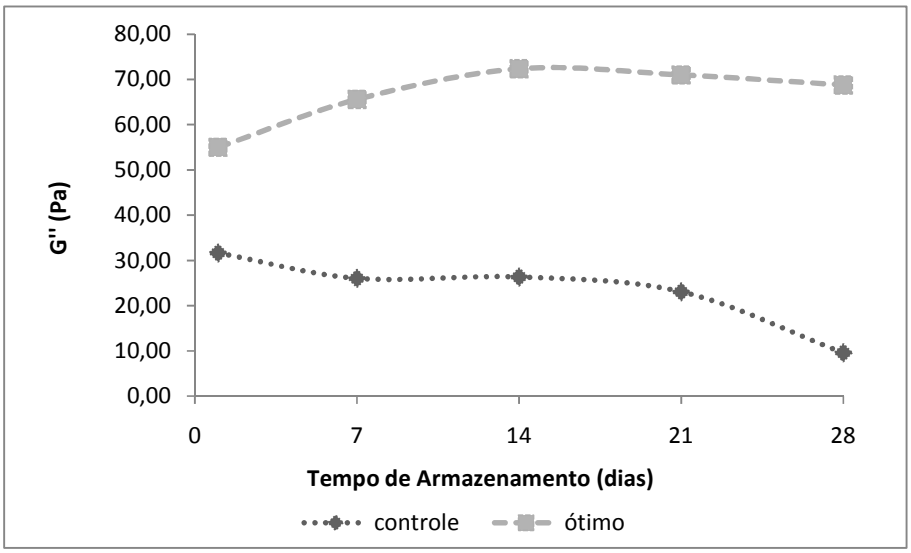


Figura 20. Espectro mecânico do módulo viscoso (G'') do iogurte controle e do ótimo suplementado com proteína concentrada de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) a 26°C e tensão de cisalhamento de 5,24 Pa (n=12).

A análise do módulo elástico (G') com tensão de cisalhamento variando entre 0,974 e 5,24Pa mostra comportamentos bem distintos entre o iogurte controle e o suplementado no ponto ótimo. Na Figura 21 (a) verifica-se que o controle sofre quedas consecutivas na faixa de tensão analisada, permanecendo constante apenas entre d7 e d14, atingindo o menor valor em d28. Já para o iogurte ótimo ocorreu aumento entre d1 e d14, ligeira queda entre d14 e d21; na sequência, pode-se observar estabilidade até d28, ressaltando que nesse ponto os valores são muito maiores que os encontrados em d1, Figura 21 (b).

Para o módulo viscoso (G'') na mesma faixa de tensão de cisalhamento observa-se o mesmo comportamento apresentado em G', tanto para o controle como para o ótimo (Figuras 22a e 22b).

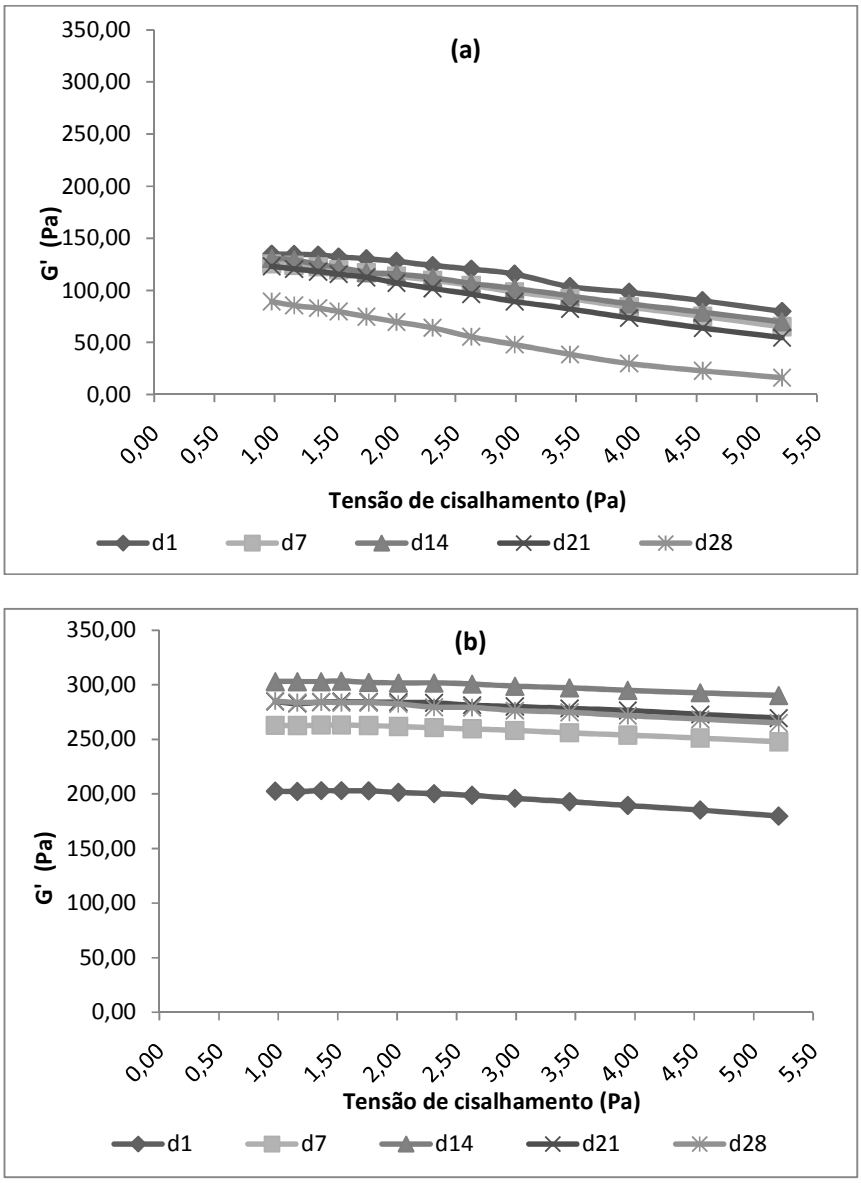
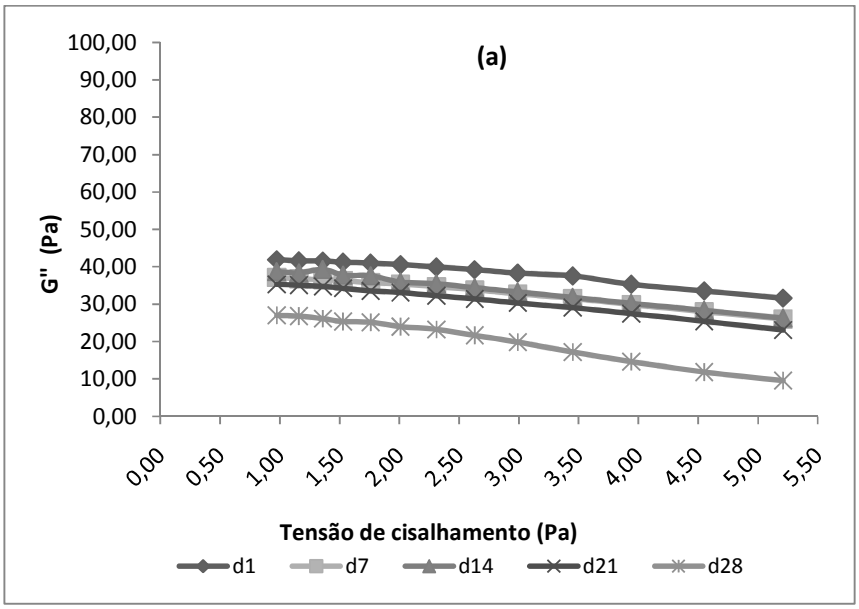


Figura 21. Espectro mecânico do módulo elástico (G') do iogurte controle (a) e do ótimo (b) suplementado com proteína concentrada de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) a 26°C e tensão de cisalhamento entre 0,974 e 5,24 Pa (n=12).



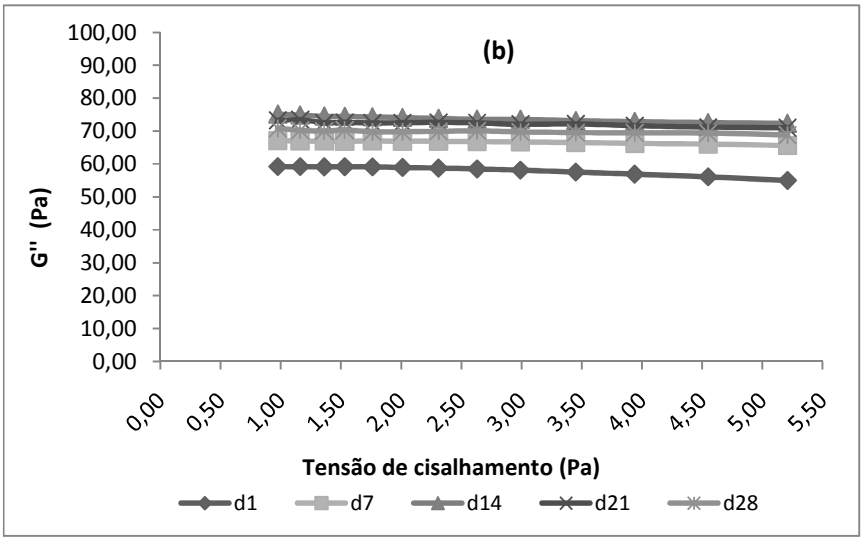


Figura 22. Espectro mecânico do módulo viscoso (G'') do iogurte controle (a) e do ótimo (b) suplementado com proteína concentrada de soro (WPC), caseinato de sódio (Na-Cn) e leite em pó desnatado (SMP) a 26°C e tensão de cisalhamento entre 0,974 e 5,24 Pa (n=12).

5.4.4. Resultados das propriedades sensoriais do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle

Os iogurtes controle e o suplementado com proteínas no ponto ótimo foram avaliados sensorialmente 24h após a fermentação (d1) e no final do armazenamento (d28). A Figura 23 mostra, em escala de 1 a 9, a nota que cada uma das amostras recebeu para os atributos aparência, sabor ácido e consistência. Todos os parâmetros avaliados receberam notas menores após 28 dias de armazenamento para as duas amostras; porém pode-se fazer algumas considerações: (i) aparência: o iogurte controle recebeu nota 12% menor no d28 quando comparado a d1, já o ótimo apresentou queda de apenas 5% no mesmo intervalo; (ii) sabor ácido: o aumento da percepção ácida foi muito maior no iogurte controle (21%) em comparação ao ótimo (6%); (iii) consistência: segundo os provadores, as duas amostras apresentaram resultados semelhantes no período, com redução de 16 e 14%, respectivamente, no controle e no ótimo.

Analisando a amostra controle *versus* ótimo, pode-se observar que em todos os parâmetros o ótimo apresentou as maiores notas, inclusive no sabor ácido, o que pode ser explicado em função da maior consistência e, consequentemente, maior tempo de permanência do produto na boca, o que faz aumentar essa sensação. Pode-se ainda destacar a grande diferença de consistência entre as amostras que foram percebidas pelos provadores; o iogurte suplementado no ponto ótimo recebeu notas equivalentes ao dobro das recebidas pelo controle, tanto em d1 como d28 (Figura 23); confirmando que a suplementação do leite com proteínas lácteas aumenta consideravelmente a consistência do produto final, a ponto de ser percebida por consumidores (REMEUF *et al.*, 2003; SODINI *et al.*, 2005).

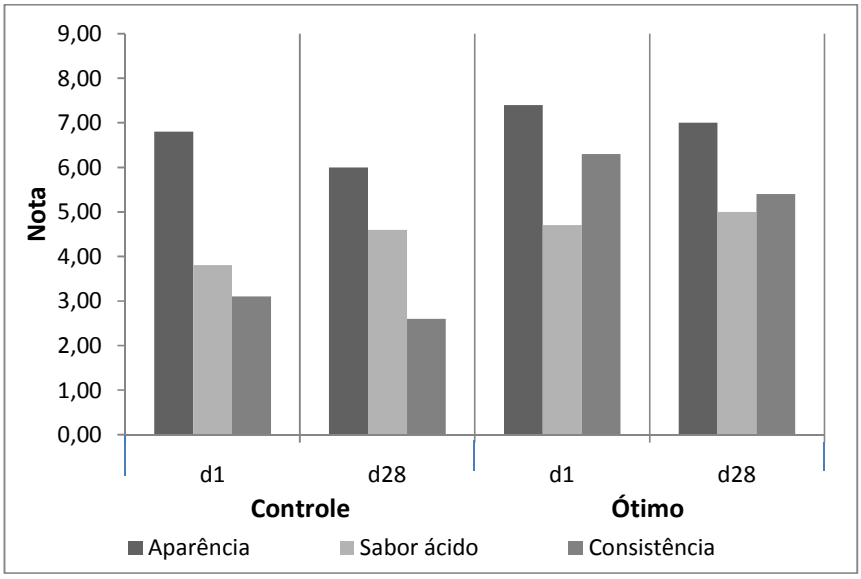


Figura 23. Avaliação da análise sensorial do iogurte controle e do ótimo suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado, após 1 dia da fermentação até o 28º dia de armazenamento a 5°C.

5.4.5. Resultado do estudo exploratório por microscopia eletrônica de varredura do iogurte preparado com leite suplementado no ponto ótimo e do controle

Através da Figura 24 pode-se observar as diferenças entre os tamanhos dos poros e a organização das estruturas das amostras do iogurte controle e do ótimo. Nota-se que amostra do ótimo em d1 apresenta estrutura mais compacta e mais organizada que a do controle, que, por sua vez, aparece com poros maiores. Com o armazenamento (d28) pode-se observar a formação de novas estruturas nas duas amostras, com destaque para o aumento dos poros na amostra do iogurte suplementado no ponto ótimo e da estrutura mais compacta na amostra controle.

Tais diferenças são explicadas pela variação do tamanho dos poros nas duas amostras durante o armazenamento. A amostra controle apresentou diâmetro médio de poro de 0,579µm em d1 e 0,534µm em d28, o que explica a estrutura mais compacta no final do armazenamento. Já para a amostra de iogurte suplementado no ponto ótimo o diâmetro dos poros variou entre 0,405 e 0,443µm, respectivamente para d1 e d28.

Sodini *et al.* (2005) também realizaram análise de microestrutura em iogurte e

verificaram mudanças na organização da rede do gel quando as amostras foram enriquecidas com proteínas lácteas, devido à desnaturação da proteínas.

De acordo com Lee & Lucey (2003), a presença de poros maiores, que são os pontos fracos, sugere que existem interações fracas entre as partículas de caseína. Portanto, pode-se concluir que durante o armazenamento das amostras até o 28º dia ocorreram modificações entre as micelas de proteínas que ocasionaram o aumento do tamanho dos poros, tornando as estruturas mais frágeis após o armazenamento.

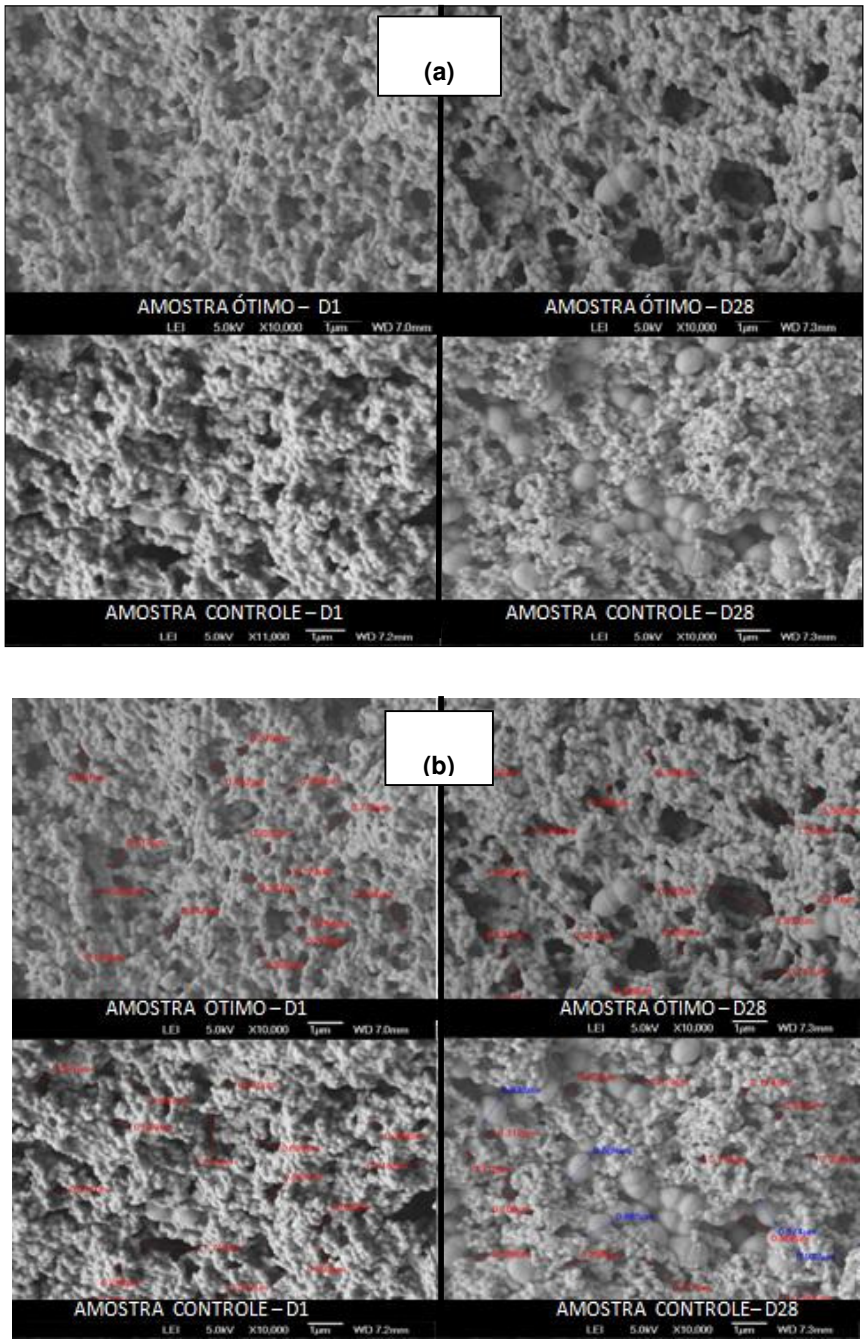


Figura 24. Microscopia eletrônica de varredura do iogurte controle (a) e do ótimo (b) suplementado com concentrado proteico de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado no d1 (24 h após a fermentação) e no d28.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que a fortificação do leite com proteína concentrada de soro, caseinato de sódio e leite em pó desnatado para o mesmo teor de proteína afetou o perfil de acidificação, a contagem de bactérias viáveis e a reologia de iogurtes probióticos.

Além disso, foi possível estimar o perfil de acidificação e a contagem de bactérias no leite suplementado com proteínas do leite em pó, concentrado proteico de soro e caseinato de sódio por metodologia de superfície de resposta, bem como calcular aproximadamente as propriedades viscoelásticas dos iogurtes probióticos.

Pode-se ressaltar que a otimização das propriedades reológicas dos iogurtes probióticos suplementados com proteínas do leite depende da fonte de proteína utilizada.

A substituição parcial de 55% do leite em pó desnatado por concentrado proteico de soro e caseinato de sódio simultaneamente poderá reforçar as propriedades reológicas dos iogurtes probióticos, considerando a cinética de acidificação e a contagem de bactérias viáveis.

Os resultados foram validados ao longo da vida de prateleira dos produtos, confirmando os valores estimados pelos modelos para: a cinética de acidificação, a contagem de bactérias viáveis, as propriedades viscoelásticas, a avaliação sensorial e a análise de microestrutura.

Por fim, como as indústrias têm interesse em descobrir produtos diferenciados, com tecnologia de fabricação adequada e com aceitabilidade perante os consumidores

em potencial, o desenvolvimento de leites fermentados probióticos enriquecidos com proteínas lácteas tende a ser promissor, tanto para as indústrias que irão processá-lo quanto para os consumidores, oferecendo a esses um produto com características nutricionais mais relevantes em relação aos produtos ofertados atualmente.

Outro fator relevante é quanto ao custo da formulação contendo a mistura de proteínas proposta na otimização, pois a utilização de percentual maior do leite em pó desnatado em relação ao concentrado de proteínas de soro e do caseinato de sódio pode ser uma alternativa viável, uma vez que o mercado nacional produz este ingrediente, enquanto os demais são importados, e no caso específico do caseinato de sódio, o preço é muito superior ao leite em pó desnatado.

Finalmente, além de promover a melhoria das qualidades nutricionais e o aumento da consistência do produto final, essa mistura de proteínas torna-se viável para utilização em iogurtes, cujos fabricantes busquem um produto mais nobre e com maior valor agregado para comercialização.

7. REFERÊNCIAS

ACHAGAROVSKII, V.P.; ZHOLKEVSKAYA, I.G. Biotechnology for producing bioyogurts and biokefir: study of their effect on human health. **Microbiology**, v.65, p.67-73, 2003.

AKLIN, A.S.; UNAL, G.; GONC, S.; FENDERYA, S. Effects of whey protein concentrate and fructooligosaccharide on the rheological and sensory properties of reduced-fat probiotic yoghurt. **Milchwissenschaft**, v.63, p.171-174, 2088.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v.35, p.171-176, 2002.

APONTE, G.B.; MANCILLA, C.A.B.; PARIASCA, N.Y.C.; GALARZA, R.A.R. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.4, art.CD007401, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. cap.4.2, p.5.

BAJAJ, J.S.; SAEIAN, K.; CHRISTENSEN, K.M.; HAFEEZULLAH, M.; VARMA, R.R.; FRANCO, J.; PLEUSS, J.A.; KRAKOWER, G.; HOFFMANN, R.G.; BINION, D.G. Probiotic yogurt for the treatment of minimal hepatic encephalopathy. **American Journal of Gastroenterology**, v.103, p.1707-1715, 2008.

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

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.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. p.86-89.

BRASIL. Resolução n.5, de 13 de novembro de 2000. A Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA - determina a entrada em vigor dos "padrões de identidade e qualidade de leites fermentados". **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jan. 2001. Seção I, p.19-22. [Republicado nesta data por ter saído com incorreção no original, DOU de 27/11/00. Seção I, p.9-12].

CANTUNES, A.E.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M. Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.169-173, 2005.

DAMIN, M.R.; ALCÂNTARA, M.R.; NUNES, A.P.; OLIVEIRA, M.N. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p.1744-1750, 2009.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, 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. 1. Firmness and flow properties Syneresis. **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.

DE ANGELIS, R.C. Alimentos de origem vegetal são saudáveis: verdades e alguns questionamentos. **Nutrição em Pauta**, v.10, n.57, p.30-34, 2002.

DOLEYRES, Y.; SCHAUB, L.; LACROIX, C. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4146-4156, 2005.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.16, p.1181-1189, 2006.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. 2.ed. Washington: ASM Press, 2001. p.797-811.

EARLY, R., ed. **The technology of dairy products**. 2.ed. London, New York: Blackie Academic, 1998. p.123-147.

FABIAN, E.; ELMADFA, I. Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.50, n.4, p.387-393, 2006.

FABIAN, E.; MAJCHRZAK, D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. Influence of probiotic and conventional yoghurt on the status of vitamins B1, B2 and B6 in young healthy women. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.52, p.29-36, 2008.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutrition properties of probiotics in food incluiding powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34p., 2001. Disponível em: http://www.ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf Acesso em: 30 junho 2008.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization (FAO)/ Worls Health Organization (WHO), 2002. 11p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf. Acesso em: 20 jun. 2009.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; DARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobateria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174-181, 2007.

FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. 3.ed. Viçosa: UFV, 2005. p.112.

FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. 2.ed. Viçosa: UFV, 2001. p.65-84.

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

FUKUDA, M.; MITSUI, H.; TOYAMA, M.; KOBAYASHI, K.; NOZAKI, K.; IZUOKA, T.; NISHITANI, M.; YAMAGA, K. I. Post marketing surveillance of functional food: the efficacy and safety of yogurt containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on constipation. **Japanese Pharmacology & Therapeutics**, v.36, p.501-507, 2008.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GONÇALVES, A.A.; EBERLE, I.R. Bactérias bífidas: o impacto na indústria de laticínios. **Leite & Derivados**, v.18, n.114, p.34-41, 2009.

GRANATO, D. Leites fermentados: algumas considerações. **Leite & Derivados**, v.16, n.100, p.16-33, 2007.

HARE, L. B. Mixture designs applied to food formulation. ***Food Technology***, Chicago, v.3, p.50-62, 1974.

HAULY, M.C.O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDÊNCIO-FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, n.5, p.613-622, 2005.

HAVENAAR, R.; HUIS IN´T VELD, J.M.J. **Probiotics: a general view.** In: Lactic acid bacteria in health and disease, v.1, Applied Science Publishers, 1992.

HESS, S.J.; ROBERTS, R.F.; ZIEGLER, G.R. Rheological properties of nonfat yogurt stabilized using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* producing exopolysaccharide or using commercial stabilizer systems. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.252-263, 1997.

HOLS, P.; HANCY, F.; FONTAINE, L.; GROSSIORD, B.; PROZZI, D.; LEBLOND-BOURGET, N.; DECARIS, B.; BOLOTIN, A.; DELORME, C.; EHRILICH, D.; GUE'DON, E.; MONNET, V.; RENAULT, P.; KLEEREBEZEM, M. New insights in the molecular biology and physiology of Strepetococcus thermophilus revealed by comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.435-463, 2005.

HUSSAIN, I.; ATTIQ-UR-RAHMAN; ATKINSON, N. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.8, n.1, p.9-12, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 1985. v.1, p.533.

ISOLAURI, E. Probióticos: pesquisas em andamento em indivíduos atópicos. **Food Ingredients**, v.4, n.21, p.60-61, 2002.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G., ed. **Functional foods**: biochemical & processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p.357-381.

JOST, R. Functional characteristics of dairy proteins. **Food Science and Technology**, v.4, p.283–288, 1993.

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.

KAUR, H.; MISHRA, H.N.; KUMAR, P.A. Textural properties of mango soy fortified probiotic yoghurt: optimisation of inoculum level of yoghurt and probiotic culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.415-424, 2009.

KLAVE, 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.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.

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.

KUDELKA, W. Use of response surface methodology to evaluate the survival rate of yogurt bacteria in natural bio-yoghurts of cow and goat milk. **Milchwissenschaft**, v.63, p.290-292, 2008.

KÜCÜKCETIN, A. Effect of heat treatment and casein to whey protein ratio of skim milk on graininess and roughness of stirred yoghurt. **Food Research International**, v.41, p.165-171, 2008.

KURMANN, J.A.; RASIC, J.L. The health potential of products containing bifidobacteria. In: ROBINSON, R.K., ed. **Therapeutic properties of fermented milks**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1991. p.17-158. (Elsevier Applied Food Science Series).

LABAYEN, I.; FORGA, L.; GONZAÃ LEZÀ, A.; LENOIR-WIJNKOOP, I.; NUTRUS, R.; MARTIÂNEZ, J.A. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.15, p.543-549, 2001.

LEE, W.J.; LUCEY, J.A. Rheological properties, whey separation, and microstructure

in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. **Journal of Texture Studies**, v.34, p.515-536, 2004.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, n.2, p.67-78, 2004.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science,** v.147, p.747-748, 1965.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**, v.34, p.791-796, 2001.

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

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; 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, 2004.

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

LUCEY, J.A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P.A. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with bacterial cultures or glucono-δ-lactone. **Food Research International**, v.31, p.147-155, 1998.

MAISTRO, L.C. Caseína: aspectos relevantes de sua estrutura, obtenção e funcionalidade. **Food Ingredients**, v.4, n.21, p.63-66, 2002.

MARTINÉZ, C.G.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBOR, A.; CAROT, J.M.; CHIRALT, A. Influence of substituing milk powder for whey powder on yogurt quality. **Food Science and Technology**, v.13, p.334–340, 2003.

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, p.2090-2095, 2003.

MEILE, L.; LE BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: Propionibacterium and Bifidobacterium. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.316-320, 2008.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, v.9, n.2, p.175-191, 2003.

MUNIZAGA, G.T.; CÁNOVAS, G.V.B. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engeneering,** v.67, p.147-156, 2005.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotics spectra of lactic acid bactéria (LAB). **Critical Review in Food Science and Nutrition,** v.38, p.123-126, 1999.

NOVA legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais - diet, light e enriquecidos. São Paulo: Fonte Comunicações, 1998. p.123-130. [Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.29, de 13 de janeiro de 1998].

NUTRITION BUSINESS JOURNAL. **Functional foods report.** Penton Media, 2002.

O'MAY, G.A.; MACFARLANE, G.T. Health claims associated with probiotics. In: TAMIME, A.Y., ed. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p.138-166.

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

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.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, p.2336-2341, 2002.

PARK, K.J.; LEITE, J.T.C. **Reologia**. ftp://ftp.agr.unicamp.br/pub/disciplinas/fa20/.Reologia. UNICAMP. Última atualização em abril de 2001.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health,** v.29, p.4-8, 1974.

PENNA, A.L.B. Probióticos: uma alternativa para o setor lácteo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18, Porto Alegre, 2002. **Anais**. Porto Alegre: SBCTA, 2002. p.4045-4050.

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.517-520, 2006.

PENNA, A.L.B.; OLIVEIRA, M.; BARUFFALDI, R. Análise de consistência de iogurte: correlação entre medida sensorial e instrumental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.2, p.98-101, 1997.

PRENTICE, J.H. **Dairy rheology**: a concise guide. New York, Cambridge: VHC

Publishers, 1992. 165p.

PURWANDARI, U.; SHAH, N.P.; VASILJEVIC, T. Effects of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yogurt. **International Dairy Journal**, v.17, p.1344-1352, 2007.

PUVANENTHIRAN, A.; WILLIAMS, R.P.W.; AUGUSTIN, M.A. Structure and visco-elastic properties of set yoghurts stabilized with different dairy ingredients. **Milchwissenschaft**, v.50, p.196-200, 2002.

RAO, M.A. Measurement of flow properties of fluid foods: developments, limitations, and interpretation of phenomena. **Journal of Texture Studies,** v.8, n.3, p.257-282, 1977.

RAO, M. A. Rheological properties of fluid foods. In: RAO, M. A.; Rizvi, S. S. H. (eds), **Engineering properties of foods**. New York: Marcel Dekker, 1986, p.1-47.

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.

RENAN, M.; GUYOMARC'H, F.; ARNOULD-DELEST, V.; PÂQUET, D.; BRULÉ, G.; FAMELART, M.H. Rheological properties of stirred yoghurts as affected by gel pH on stirring, storage temperature and pH changes after stirring. **International Dairy Journal**, v.19, p.142-148, 2009.

ROBERFROID, M.B. Concept in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1398-1401, 1999.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.S105S110, 2002.

ROLFE, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v.130, p.396S-402S, 2000.

RYBKA, S.; KALISAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze - dried yoghurts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.51-57, 1995.

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

SACCARO, D. M., A. Y. TAMIME, PILLEGGI, A. L. O. S.; OLIVEIRA, M. N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 degrees C. **International Journal of Dairy Technology,** v.62, n.3, Aug, p.397-404. 2009.

SACHDEVA, A.; NAGPAL, J. Effect of fermented milk-based probiotic preparations on Helicobacter pylori eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.21, p.45-53, 2009.

SAINT-EVE, A.; MARTIN, N.; GUILLEMIN, H.; SÉMON, E.; GUICHARD, E.;

SOUCHON, I. Flavored yogurt complex viscosity influences real-time aroma release in the mouth and sensory properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.7794-7803, 2006.

SAINT-EVE, A.; JUTEAU, A.; ATLAN, S.; MARTIN, N.; SOUCHON, I. Complex viscosity induced by protein composition variation influences the aroma release of flavored stirred yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.3997-4004, 2006.

SALINAS, R.J. Hygiene quality of commercial yoghurts. **Alimentaria**, v.178, p.27-30, 1986.

SANDERS, M.E. Use of probiotics and yogurts in maintenance of health. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.42, suppl.2, p.71-74, 2008.

SANZ, T.; SALVADOR, A.; JIMÉNEZ, A. Yogurt enrichement with functional asparagus fibre: effect of fibre extraction method on rheological properties, colour, and sensory acceptance. **European Food Research and Technology**, v.227, p.1515-1521, 2008.

SARKAR, S. Effect of probiotics on biotechnological characteristics of yoghurt: a review. **British Food Journal**, v.110, p.717-740, 2008.

SCHAAFSMA, G. State of art concerning probiotic strains in milk products. **Nutrition News Letters,** v.5, p.23-24, 1996.

SCHELLHAASS, S.M.; MORRIS, H.A. Rheological an scanning electron microscopic examination of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. **Food Microstructure**, v.4, p.279-287, 1985.

SCHREZENMEIR, J.; DE VERSE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition,** v.73, p.361-364, 2001.

STANLEY, D. W.; GOFF, H. D.; SMITH, A. K. Texture-structure relationships in foamed dairy emulsions. **Food Research International**. v.29, n.1, p.1-33, 1996.

STEEFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2nd edition. East Lansing -Freeman Press. 1996. 412p.

SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.645-656, 2005.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHIRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidoplhilus* and *Bifidobacterium* ssp. in yogurt. **International Dairy Journal**, v.7, p.361-364, 1997.

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

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.; LUCAS, A.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.29-35, 2005a.

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, 2005b.

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.; 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, n.2, p.113-137, 2004.

SOUKOULIS, C.; PANAGIOTIDIS, P.; KOURELI, R.; TZIA, C. Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. **Journal Dairy Science**, v.90, p.2641-2654, 2007.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt**: science and technology. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1999. p.54-79, 134-136, 162-186.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Tamime and Robinson's yoghurt**: science and technology. 3.ed. Cambridge, New York: CRC, 2007. 791p.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K.; LATRILLE, E. Yoghurt and other fermented milks. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A., eds. **Mechanisation and automation in dairy technology**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2001. cap.6, p.152-203. (Sheffield food technology).

TAMIME, A.Y.; SAARELA, M.; SONDERGARD, A.K.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: TAMIME, A., ed. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. p.39-72.

TORRIANI, S.; GARDINI, F.; GUERZONI, M.E.; DELLAGLIO, F. Use of response surface methodology to evaluate some variables affecting the growth and acidification characteristics of yoghurt cultures. **International Dairy Journal**, v.6, p.625-636, 1996.

UYENO, Y.; SEKIGUCHI, Y.; KAMAGATA, Y. Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.16-22, 2008.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. **Leche y productos lácteos**: tecnología, química y microbiologia. Zaragoza: Acribia, 1995. p.461.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics: from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.

VENTUROSO, R.C.; ALMEIDA, K.E.; RODRIGUES, A.M.; DAMIN, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, p.607-613, 2007.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2.ed. Boca Raton, London: CRC Taylor & Francis, 2006. p.279-296, 558-568. (Food science and technology, 146).

XU, Z.M.; EMMANOUELIDOU, D.G.; RAPHAELIDES, S.N.; ANTONIOU, K.D. Effects of heating temperature and fat content on the structure development of set yogurt. **Journal of Food Engineering**, v.85, p.590-597, 2008.

ZUCCOTTI, G.V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. Probiotics in clinical practice: an overview. **Journal of International Medical Research**, v.36, suppl.1, p.1A-53A, 2008.

8. ANEXOS

ANEXO I

Avaliação sensorial de iogurte probiótico

Nome:_____ Rep. No. _____Data: 30/04/2009

Amostra _____

1. Aparência

|_____|
Boa Ruim

2. Sabor ácido

|_____|
Fraco Forte

3. Consistência (textura)

|_____|
Pouca Muita

Amostra _____

1. Aparência

|_____|
Boa Ruim

2. Sabor ácido

|_____|
Fraco Forte

3. Consistência (textura)

|_____|
Pouca Muita

Amostra _____

1. Aparência

|_____|
Boa Ruim

2. Sabor ácido

|_____|
Fraco Forte

3. Consistência (textura)

|_____|
Pouca Muita

Amostra _____

1. Aparência

|_____|
Boa Ruim

2. Sabor ácido

|_____|
Fraco Forte

3. Consistência (textura)

|_____|
Pouca Muita

ANEXO II

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando você para participar de uma análise sensorial de iogurte probiótico.

O iogurte cuja base é enriquecida com proteínas lácteas é preparado e, acondicionado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, no Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O leite pasteurizado é fermentado por bactérias probióticas que são bactérias que trazem benefícios para a saúde do consumidor. Para a preparação deste iogurte misturamos ao leite proteínas lácteas como proteína concentrada de soro e caseinato de sódio, ingredientes adquiridos do comércio e de grau alimentício. Antes da avaliação sensorial o iogurte é submetido a análises microbiológicas.

O objetivo desta pesquisa é verificar como o iogurte é aceito de acordo com sua aparência, sabor e consistência. O produto mantido sob refrigeração será avaliado após um dia de sua fabricação.

Para as avaliações da aparência, do sabor e da consistência dos iogurtes, cerca de 50ml do produto serão servidos em copos de plástico branco, codificados com números de três dígitos. Serão servidas três amostras em cada sessão de análise. As análises serão realizadas sempre duas horas antes ou depois das refeições e, entre uma amostra e outra os provadores tomarão um gole de água antes de iniciar a análise novamente.

O provador poderá desistir da análise a qualquer momento sem nenhum ônus. Todas as informações pessoais serão sigilosas, garantindo a privacidade do provador.

Os resultados desta pesquisa vão nos auxiliar na avaliação das características de aparência, sabor e consistência de iogurtes probióticos enriquecidos com proteínas lácteas 24h após a sua fabricação. Estes dados contribuirão na compreensão da ação dos probióticos no desenvolvimento destas características. Os benefícios serão não só para a melhoria do processo de fabricação como também para que o consumidor tenha acesso a um produto mais gostoso e com melhor consistência e que quando ingerido trará benefícios para sua saúde.

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.