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

O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado

Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Assoc. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2009

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

O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado

Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Assoc. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2009

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

Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza
O48e O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado / Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira. -- São Paulo, 2010.
170p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Maricê Nogueira de

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

664 CDD

Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Assoc. Maricê Nogueira de Oliveira
Orientadora/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, de de 2010.

Dedico esta tese a minha família (Carlos, Zenilda e Dudu).
Mãe... muito obrigado por estar sempre do

meu lado... sempre.

Dedico também esta tese a Andréa Teodoro da Silva

por todo o amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Assoc. Maricê Nogueira de Oliveira pela grande orientação, incentivo, apoio e por sempre acreditar em mim. Declaro a minha grande admiração e muitíssimo obrigado pela confiança.

Ao grandíssimo Prof. Dr. Attilio Converti pela excelente orientação. Muito obrigado por exigir o melhor de mim. Cara…você para mim é o melhor. Só tenho a agradecer por ter um Professor, Mestre e além de tudo um grande amigo. Valeu irmão!!!

Alla Professoressa Patrizia Perego (Pity!!!) per la fiducia fin da subito. Grazie tante per l'aiuto e per avermi seguito durante lo svolgimento del lavoro. Grazie tante per l'amicizia e per la sensibilità.

Ao Prof. Tit. Adalberto Pessoa Júnior pelo exemplo de dedicação e profissionalismo. Muito obrigado pela ajuda e incentivo.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto pela grande amizade que construímos na Itália. Tive o prazer e privilégio de esperá-la horas no aeroporto de Gênova (rsrsrsrsrsrsrs). Faria tudo de novo se fosse preciso.

À Profa. Tit. Thereza Christina Vessoni Pena pela grande amizade e incentivo. Agradeço também à sua família pelos passeios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros e pela bolsa concedida durante o meu Doutorado.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal e de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Estágio de Doutorado no Exterior, sem a qual não poderia ter tido a minha inesquecível experiência.

À Profa. Tit. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela grande ajuda e compreensão durante o meu Estágio de Doutorado no Exterior.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP em especial Prof. Tit. Luiz Antonio Gioielli, Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, Prof. Tit. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo e Profa. Assoc. Susana Marta Isay Saad e Prof. Tit. Michele Vitolo.

À Profa. Tit. Carmen Cecília Tadini, da Escola Politécnica da USP, pela grande ajuda e pelas sugestões para a minha Tese de Doutorado.

Aos professores da ESALQ/USP, Profa. Tit. Marília Oetterer, Profa. Dra. Marisa Aparecida Bismara Regitano D'Arce, Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo e Prof. Dr. Ernani Porto.

Aos funcionários da FCF/USP, em especial Miriam, Elza, Juarez, Alexandre Mariani, Adriana e Leila (biblioteca) pela grandíssima ajuda durante o meu Doutorado. Também um agradecimento especial a Elaine e ao Jorge por sempre acreditarem e confiarem em mim, além da grande amizade.

Aos amigos da USP em especial Ana Carolina Rodrigues Florence, Keila Emilio de Almeida, Maria Regina Damin, Flavia Carolina Alonso Buriti, Angela Faustino Jozala. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas o que vale é a intenção.

À tia Célia e "zio" Vittorio Nobili pelo grande apoio e carinho na Itália.

Uno speciale ringraziamento agli amici del Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo "G. B. Bonino" Beatriz Rivas Torres (bacione Béa), Alessandro Alberto Casazza, Erika Ortiz, Aicha Ben Hamissa, Bahar Aliakbarian, al mio grande amico Maurizio De La Rovere, Raquel Pedrosa, Prof. Di Felice, Carla Scapinello, Prof. Rovatti, Prof. Isola, Marta Incerti, Simona Fumagalli. Ringrazio anche alla mia grandissima amica Daniela Marques Viana per la nostra vera e grande amicizia. Boh! Ce ne sono tanti, non me lo ricordo adesso. Lasciamo perdere.

Non possono mancare da questo elenco di ringraziamenti i miei tesisti Simona e Paolo che ho conosciuto in questo periodo. Spero avervi insegnato qualcosa…

Un particolare ringraziamento a tutti i miei amici che ho conosciuto in Italia, Alessandro "Baresi Fifi", Corrado, Davide, Afshin Memarpoor, Alessandro Pasero, Barbara Casale, Cristiano "Farfallina", Max Furian, Carola Canevello, Chiara Bianchi, Cristiano Palazzi, Daniela Mazzucchelli, Daniele Bitetti, Elena Pietra, Eugenio Angelo Noto, Giorgia de Filippis, Jose Francisco Sáenz, Marco Fato…"Belìn"…ce ne sono parecchi!!! Miei coinquilini Stefano, Ryan, Marco, Fabrizio, la band Viaggio Stereo, La band Nuove Onde, la palestra Royal Club (grande Giorgio) ed altri.

"È doveroso porre i miei più sentiti ringraziamenti alle persone che ho avuto modo di conoscere in questo importante periodo della mia vita e che mi hanno aiutato a crescere sia dal punto di vista intellettuale sia dal punto di vista umano. È difficile in poche righe ricordare tutte le persone che, a vario titolo, hanno contribuito a rendere migliore questo periodo".

OLIVEIRA, R.P.S. **O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado.** 2009. 170f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2009.

RESUMO

Os produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e têm prioridade de pesquisa em diversos países. Os resultados deste trabalho mostraram que a qualidade do leite fermentado foi fortemente influenciada tanto pela composição das co-culturas probióticas quanto por diferentes prebióticos, como oligofrutose, polidextrose, maltodextrina e inulina. A cinética de acidificação foi influenciada pela composição das culturas probióticas e pelos ingredientes prebióticos no leite fermentado. A suplementação do leite com a inulina reduziu o tempo de fermentação das co-culturas *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* (St-La); *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) e *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium lactis* (St-Bl), além de melhorar a firmeza do leite fermentado probiótico. Foram também relatadas que as quantidades de ácido linoléico conjugado (CLA) aumentaram no leite fermentado pela co-cultura de *S. thermophilus* + *L. acidophilus*, suplementado com maltodextrina. No que diz respeito às contagens, a adição de inulina favorece a viabilidade das bactérias probióticas durante o armazenamento a $4^{o}C$ além de causar um efeito bifidogênico, *in vitro*, estimulando o crescimento de *B. lactis*. Em relação ao estudo metabólico entre as co-culturas homofermentativas (St-La e St-Lb), feitas neste presente trabalho, pode-se dizer que a lactose foi apenas parcialmente fermentada a ácido lático, a galactose foi metabolizada em certa medida, e se formaram diacetil e acetoína em níveis apreciáveis. A acetoína e o diacetil provavelmente foram produzidos pelas atividades da α-acetolactato sintase e da α-acetolactato descarboxilase de *S. thermophilus*.

Palavras-chave: Probiótico, Prebiótico, Leite fermentado, Metabolismo.

OLIVEIRA, R.P.S. **L'effetto della composizione della coltura e della implementazione del latte sulla crescita, sul tasso di acidificazione, sulla sopravvivenza e sul metabolismo di batteri probiotici in latte fermentato.** 2009. 170f. Tesi (Dottorato) – Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Università di São Paulo, São Paulo, Brasil. 2009.

RIASSUNTO

I prodotti lattiero-caseari probiotici o simbiotici sono leader nel mercato degli alimenti funzionali e costituiscono priorità di ricerca in diversi paesi. I risultati dei Capitoli che seguono in questo lavoro hanno mostrato che la qualità del latte fermentato è stata fortemente influenzata sia dalla composizione della co-cultura probiotica, sia dai diversi prebiotici impiegati, come inulina, oligofruttosio, polidestrosio e maltodestrina. La cinetica di acidificazione è stata influenzata dalla composizione delle culture probiotiche ed anche dagli ingredienti prebiotici nel latte fermentato. L'arricchimento di latte con inulina ha comportato una riduzione del tempo di fermentazione delle diverse co-culture, *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* (St-La); *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr); *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium lactis* (St-Bl), e perfino un miglioramento della fermezza del latte fermentato probiotico. È stato osservato inoltre che la quantità di acido linoleico coniugato (CLA) è aumentata in presenza di latte arricchito con maltodestrina e fermentato dalla co-cultura *S. thermophilus* + *L. acidophilus*,. Per quanto riguarda la conta batterica, l'aggiunta d'inulina ha promosso o favorito la vitalità dei batteri probiotici durante la conservazione a 4°C e causato un effetto bifidogenico, *in vitro*, stimolando la crescita di *B. lactis*. In relazione agli studi metabolici fra le co-culture omofermentanti (St-La e St-Lb), realizzati in questo lavoro, si può affermare che il lattosio sia stato parzialmente fermentato ad acido lattico, il galattosio metabolizzato in certa qual misura, e diacetile ed acetoina si siano formati a livelli apprezzabili. Il diacetile e l'acetoina probabilmente sono stati prodotti dalle attività dell'α-acetolattato sintetasi e dell'α-acetolattato decarbossilasi di *S. thermophilus*.

Parole-chiave: Probiotico, Prebiotico, Latte fermentato, Metabolismo.

OLIVEIRA, R.P.S **The effect of culture composition and the implementation of milk on the growth, acidification rate, survival and metabolism of probiotic bacteria in fermented milk.** 2009. 170f. Thesis (Ph.D) - Pharmaceutical Science School, São Paulo University, São Paulo, Brazil. 2009.

ABSTRACT

Probiotics dairy products and/or symbiotic are leaders in the functional foods market and have the research priority in several countries. The results of this study showed that the quality of fermented milk was strongly influenced by composition of probiotic co-cultures and different prebiotics, such as oligofructose, polydextrose, maltodextrin and inulin. The acidification kinetics was influenced by the composition of the probiotic co-cultures and prebiotic ingredients in the fermented milk. The milk supplementation with inulin reduced the fermentation time of the co-cultures of *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* (St-La); *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) and *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium lactis* (St-Bl), and improved the firmness of the probiotic fermented milk. It has also been observed that the amount of conjugated linoleic acid (CLA) increased in the milk fermented by the co-culture *S. thermophilus* + *L. acidophilus* supplemented with maltodextrin. As far as the bacterial counts are concerned, the inulin addition promoted the viability of probiotic bacteria during storage at 4°C and led to a bifidogenic effect, *in vitro*, stimulating the growth of *B. lactis*. As regards to the metabolic studies of the homofermentative co-cultures (St-La and St-Lb), studied in this work, it can be said that lactose was only partially fermented to lactic acid, galactose was metabolized to some extent, diacetyl and acetoin formed at appreciable levels. The acetoin and diacetyl were probably produced by the activities of α-acetolactate synthase and α-acetolactate decarboxylase of *S. thermophilus*.

Keywords: Probiotic, Prebiotic, Fermented milk, Metabolism.

SUMÁRIO

Pág.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO 01

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS 03
2.1 Objetivo geral 03
2.2 Objetivos específicos..... 03

CAPÍTULO III

3. REVISÃO DE LITERATURA 04
3.1 Importância dos microrganismos probióticos..... 04
3.2 Definição e legislação 05
3.3 Efeito da cultura probiótica na fermentação..... 06
3.4 Características das culturas do iogurte e das probióticas 07
3.5 Importância dos prebióticos 12
3.5.1 Definição e benefícios dos prebióticos 13
3.5.2 Definição da inulina e os seus efeitos benéficos..... 15
3.5.3 Efeitos prebióticos da inulina..... 17
3.5.4 Aplicação tecnológica da inulina 18
3.5.5 Os benefícios à saúde no consumo da inulina 19

CAPÍTULO IV

4. O EFEITO DA INULINA COMO PREBIÓTICO NA PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO ENRIQUECIDO COM FIBRAS 21
4.1 Resumo 21
4.2 Introdução 21
4.3 Material e métodos 24
4.4 Resultados e discussão 27
4.5 Conclusões 39

CAPÍTULO V

5. EFEITO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS SOBRE A CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE FERMENTADO SIMBIÓTICO DESNATADO 40
5.1 Resumo..... 40
5.2 Introdução 41
5.3 Material e métodos 44
5.4 Resultados e discussão 49
5.5 Conclusões 59

CAPÍTULO VI

6. EFEITO DA INULINA NO CRESCIMENTO E PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO DAS DIFERENTES BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM CO-CULTURAS BINÁRIAS E CULTURA MISTA COM *Streptococcus thermophilus* 60
6.1 Resumo..... 60
6.2 Introdução 61
6.3 Materiais e métodos 63
6.4 Resultados e discussão 66
6.5 Conclusões 76

CAPÍTULO VII

7. CRESCIMENTO E PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO DOS PROBIÓTICOS EM CULTURA PURA E CO-CULTURA COM *Streptococcus thermophilus*: O EFEITO DA INULINA 77
7.1 Resumo 77
7.2 Introdução 78
7.3 Material e métodos 80
7.4 Resultados e discussão..... 84
7.5 Conclusões 96

CAPÍTULO VIII

8. CO-METABOLISMO EM LEITE DESNATADO FERMENTADO DE *Streptococcus thermophilus* EM CO-CULTURA COM *Lactobacillus bulgaricus* ou *Lactobacillus acidophilus*. O EFEITO DA INULINA COMO PREBIÓTICO 97
8.1 Resumo 97
8.2 Introdução 98
8.3 Material e métodos 102
8.4 Resultados e discussão..... 111

CAPÍTULO IX

9. CONCLUSÕES 120

CAPÍTULO X

10. PERSPECTIVAS 122

CAPÍTULO XI

11. REFERÊNCIAS 124

CAPÍTULO XII

12. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM REVISTA INDEXADA 141

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 01. *Streptococcus thermophilus* 08

Figura 02. *Lactobacillus bulgaricus* 09

Figura 03. *Lactobacillus acidophilus* 11

Figura 04. *Lactobacillus rhamnosus* 11

Figura 05. *Bifidobacterium lactis* 12

Figura 06. Estrutura da inulina..... 16

Figura 07. Curva de acidificação do leite (linha tracejada) e leite suplementado com 0,04 g de inulina g^{-1} (linha contínua) a 42°C até o pH 4,5..... 28

Figura 08. Efeito da adição de inulina durante o tempo de fermentação ($t_{pH4,5}$) por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*. Adição de inulina (g g^{-1}): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□) 31

Figura 09. Efeito da adição de inulina na contagem bacteriana de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 24 h de armazenamento do produto a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□). A: Contagem das bactérias probióticas. B: Contagem de *S. thermophilus* 35

Figura 10. Efeito da adição de inulina na contagem bacteriana de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 7 dias de armazenamento do produto a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□). A: Contagem das bactérias probióticas. B: Contagem de *S. thermophilus* 36

Figura 11. Efeito da adição de inulina na firmeza do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* (St-Lb), *Lactobacillus acidophilus* (St-La), *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) e *Bifidobacterium lactis* (St-Bl) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 1 dia de fermentação e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04..... 38

Figura 12. Contagens de células de *S. thermophilus* em leite desnatado fermentado por co-culturas de diferentes probióticos denominado *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$) 56

Figura 13. Contagens de microorganismos probióticos em leite desnatado fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05) 56

Figura 14. Típico gás cromatógrafo para isômeros padrão de ácido linoleico conjugado. CLA foi detectado no tempo de retenção de 23,10 min ... 57

Figura 15. Concentrações médias de ácido linoleico (% w/w) em leite desnatado fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05) 58

Figura 16. Pós-acidificação do leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl ou por cultura bacteriana mista após 1 dia (A) ou após 7 dias (B) de armazenamento a 4 °C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina. g^{-1}; (●) Leite não suplementado 71

Figura 17. Acidez do leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl ou por cultura bacteriana mista após 1 dia (A) ou após 7 dias (B) de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (●) Leite não suplementado..... 72

Figura 18. Contagens de células em leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl (A) por cultura bacteriana mista (B) após 1 dia de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (●) Leite não suplementado..... 74

Figura 19. Contagens de células em leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl (A) por cultura bacteriana mista (B) após 7 dias de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (●) Leite não suplementado..... 75

Figura 20. Efeito da adição de inulina ao leite desnatado sobre as contagens de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ou *B. lactis* (□) em co-cultura com *S. thermophilus* (○), tanto 1 dia após a fermentação (D1) como após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). M = Leite controle; SM = Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}. As barras de erro representam os desvios-padrão dos resultados das fermentações em quadruplicata 94

Figura 21. Efeito da adição de inulina ao leite desnatado sobre as contagens das culturas puras de pure *L. bulgaricus* (□), *L. acidophilus* (●), *L. rhamnosus* (◇), *B. lactis* (△) e *S. thermophilus* (○), tanto 1 dia após a fermentação (D1) como após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). M = Leite controle; SM = Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}. As barras de erro representam os desvios-padrão dos resultados das fermentações em quadruplicata 95

Figura 22. Leite desnatado fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* e *L. acidophilus* a) sem inulina e b) com inulina. (■) Lactose; (○) galactose; (▲) Ácido lático; (□) diacetil; (×) *L. acidophilus*; (△) *S. thermophilus*; (◇) Acetoína; (●) pH. 112

Figura 23. Leite desnatado fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* a) sem inulina e b) com inulina. (■) Lactose; (○) galactose; (▲) Ácido lático; (□) diacetil; (×) *L. acidophilus*; (△) *S. thermophilus*; (◇) Acetoína; (●) pH 113

Figura 24. Porcentagem de lactose consumida pela co-cultura St-La para a produção de diferentes produtos metabólicos: (△) Ácido lático; (○) Diacetil; (◇) Biomassa; (□) Acetoína, com inulina (símbolos cheios) ou sem inulina (símbolos vazios) 116

Figura 25. Porcentagem de lactose consumida pela co-cultura St-Lb para a produção de diferentes produtos metabólicos: (△) Ácido lático; (○) Diacetil; (◇) Biomassa; (□) Acetoína, na presença de inulina (símbolos cheios) e ausência de inulina (símbolos vazios) 117

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 01. Composição química do leite 27

Tabela 02. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) em co-cultura com S*treptococcus thermophilus* (St) 30

Tabela 03. Pós-acidificação e acidez do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (St) 33

Tabela 04. Características das estirpes empregadas na produção de leite desnatado fermentado simbiótico 46

Tabela 05. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado desnatado suplementado com 4% (w/w) de maltodextrina, polidextrose ou oligofrutose por *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) or *B. lactis* (St-Bl) 52

Tabela 06. Resultados de pós-acidificação (pH), acidez, lactose e teor de proteína após 24 h de armazenamento do leite desnatado fermentado, suplementado com 4% (w/w) de maltodextrina, polidextrose ou oligofrutose, por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) ou *B. lactis* (St-Bl). Leite desnatado não foi utilizado como controle 54

Tabela 07. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por co-cultura e cultura mista de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) com *S. thermophilus* 69

Tabela 08. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por co-culturas de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) com *S. thermophilus* (St) 86

Tabela 09. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por culturas puras de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) e *S. thermophilus* (St) 89

Tabela 10. Pós-acidificação (pH) e acidez do leite fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* with *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) e *B. lactis* (St-Bl) em 1 dia após a fermentação (D1) ou após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7) 91

Tabela 11. Pós-acidificação (pH) e acidez do leite fermentado por culturas puras de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl), em 1 dia após a fermentação (D1) ou após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7) 92

Tabela 12. Balanços[a] de carbono (BC) e Graus de Redução (GR) no final da fermentação do leite desnatado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La) e *L. bulgaricus* (St-Lb), na presença de inulina (A) e ausência de inulina (B) 115

Tabela 13. ATP requerido (Y_{ATP}) e porcentagem de galactose metabolizada (Y_{Gal}) durante a fermentação do leite desnatado por *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La) e *L. bulgaricus* (St-Lb), na ausência (A) ou na presença de inulina (B) 119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina Trifosfato
BC	Balanço de Carbono
Bl	*Bifidobacterium lactis*
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
D1	1 dia após a fermentação com armazenamento a 4°C
D7	7 dias após a fermentação com armazenamento a 4°C
FOS	Frutooligossacarídeos
GR	Graus de redução
La	*Lactobacillus acidophilus*
Lb	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* LB340
Lr	*Lactobacillus rhamnosus*
M	Leite não suplementado com a inulina (leite controle)
pH_{Vmax}	Ph do leite quando a velocidade máxima foi atingida
q_{ATP}	Velocidade específica de produção de ATP
q^{DM}_{ATP}	Velocidade específica do consumo de ATP
SM	Leite suplementado com a inulina
St	*Streptococcus thermophilus*
t_f	Tempo para completar a fermentação
t_g	Tempo de geração
t_{max}	Tempo no qual atinge-se a velocidade máxima
$t_{pH4.5}$	Tempo para atingir o pH 4,5(h)
$t_{pH5.0}$	Tempo para atingir o pH 5,0 (h)
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
V_{max}	Velocidade de acidificação
Δn_{Gal}	Valor experimental do consumo de galactose total

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O elevado custo dos cuidados a saúde, o aumento constante na esperança de vida e o desejo das pessoas, no que diz respeito à melhoria da qualidade de suas vidas, são fatores determinantes para a investigação e o desenvolvimento na área de alimentos funcionais (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Atualmente, os consumidores estão exigindo cada vez mais alimentos com propriedades especiais, tais como aroma agradável, baixo valor calórico e teor de gordura, além de efeitos benéficos para a saúde. Dentro deste contexto, a indústria de alimentos vem desenvolvendo produtos com melhor sabor e aparência. Entre esses tipos de produtos destacam-se os conhecidos como lácteos funcionais que além de apresentarem esses requisitos citados, os benefícios à saúde são potencializados com a adição de probióticos, componentes bioativos e também com certos tipos de fibras solúveis conhecidas como compostos prebióticos (RANADHEERA *et al.,* 2009).

As culturas probióticas têm sido amplamente exploradas pelas indústrias de laticínios como um instrumento para o desenvolvimento e fabricação dos produtos funcionais. Estima-se aproximadamente 70 tipos de microrganismos probióticos contidos em produtos comercializados no mundo (SHAH, 2004), assim como diversos tipos de ingredientes prebióticos.

Os probióticos têm sido definidos de várias maneiras, dependendo dos seus efeitos sobre a saúde e o bem-estar dos seres humanos. Esses microorganismos são suplementos microbianos vivos que melhoram a população microbiana intestinal do hospedeiro (ANAL; SINGH, 2007). Para produzir os benefícios desejados, bactérias probióticas devem estar presentes no produto em contagens viáveis durante toda a sua vida-de-prateleira. Dave e Shah (1997) recomendaram que a dose mínima capaz de garantir o efeito terapêutico deve variar entre 7 e 8 $\log UFC.mL^{-1}$. Essas sugestões foram feitas para compensar a eventual diminuição da concentração dos microrganismos probióticos durante o processamento e armazenamento do produto, bem como a passagem pelas partes superior e inferior do trato gastrointestinal (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A fim de maximizar a eficácia dos microrganismos probióticos, ingredientes conhecidos como prebióticos são usados em produtos lácteos. Algumas fibras solúveis, como a inulina, devido a sua estrutura química, são resistentes às enzimas digestivas e, portanto, conseguem passar para o intestino grosso onde eles se tornam disponíveis para a fermentação por bactérias sacaroliticas.

Nesse panorama torna-se cada vez mais importante estudar as interações entres os microrganismos probióticos e as fibras consideradas prebióticas nos produtos lácteos funcionais, tanto durante a fermentação como no armazenamento.

Assim, o presente trabalho é apresentado sob a forma de capítulos. Os Capítulos I e II correspondem a Introdução e Objetivos, respectivamente. O Capítulo III consiste em uma revisão de literatura do tema abordado nesta tese. Os demais foram redigidos sob a forma de artigos já publicados em revistas internacionais de alto fator de impacto (Capítulos IV, V, VI e VII) e artigo submetido aguardando publicação (Capítulo VIII). Finalmente, o Capítulo IX apresenta as conclusões deste trabalho.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, no perfil de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de inulina, em diferentes concentrações, como prebiótico na cinética de acidificação do leite fermentado por *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis;*
- Avaliar a sobrevivência dos probióticos, pós-acidificação e firmeza dos leites fermentados enriquecidos com fibra, armazenadas a 4°C, após 24 horas e sete dias;
- Avaliar os efeitos prebióticos da maltodextrina, polidextrose e oligofrutose sobre probióticos;
- Avaliar a composição química da base do leite (pH, lactose, proteína e teor de ácido lático;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos e conteúdo de CLA do leite fermentado após estocagem a 4°C por 24 h;
- Estudar um novo modelo co-metabólico fazendo o uso de balanço de carbono, graus de redução e balanço de ATP com base no atual conhecimento no metabolismo individual de cada uma destas bactérias estudadas.

CAPÍTULO III

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Importância dos microrganismos probióticos

O estudo sobre alimentos probióticos vem se expandindo há muitos anos, tanto na Europa como em outros países. Nos últimos cinco anos o número de artigos científicos, abordando esse tema, tem aumentado gradativamente. A representação dos probióticos em estudos clínicos vem tomando grande destaque, passando respectivamente de estudos *in vitro*, em animais e atualmente em humanos (BJORKSTEN, 2005).

Os alimentos funcionais proporcionam um benefício fisiológico adicional, além das qualidades nutricionais básicas fornecidas. Estes alimentos são atrativos para alguns consumidores que conhecem a importante associação entre saúde e nutrição (SANDERS, 1998). Os principais desenvolvimentos na área de alimentos funcionais incluem seleção e uso de microrganismos probióticos benéficos e a adição de compostos prebióticos ao produto. Esse último auxilia na normalização da microbiota intestinal (MATILLA-SANDHOLM *et al*., 2002). Além disso, produtos lácteos fermentados contendo bactérias probióticas sempre foram reconhecidos como saudáveis aos consumidores (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

As bactérias ácido-láticas isoladas do trato gastrintestinal dos humanos e dos animais são conhecidas como probióticas. Esses organismos, quando usados em grandes quantidades na preparação de alimentos e laticínios, devem sobreviver à passagem através do trato digestivo superior quando consumidos. Além disso, os microrganismos probióticos devem ser capazes de aderir às células intestinais, trazendo efeitos benéficos ao intestino (GILLILAND, 1989). Quando estes organismos são consumidos em grandes quantidades, eles auxiliam no balanço intestinal (FERREIRA, 2003). Os microrganismos probióticos empregados em produtos lácteos funcionais pertencem a classe de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (GOLDIN; GORBACH, 1984).

Os principais benefícios terapêuticos associados aos humanos através da ingestão de microrganismos probióticos têm sido descritos por muitos pesquisadores e podem ser resumidos como: aumento da modulação imune e prevenção de certas doenças e/ou alterações em humanos como, por exemplo, diarréias, má digestão de lactose, doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritado, constipação, crescimento desordenado de bactérias intestinais, câncer de bexiga, câncer cervical, alergias, colesterol, pressão sanguínea, doenças coronárias, infecção no trato urinário, trato respiratório superior e infecções relacionadas (MATTILA-SANDHOLM *et al*., 1992; GOLDIN, 1998; HOLZAPFEL *et al*.,1998; SALMINEN *et al*.,1998; OUWEHAND *et al*.,2003; AKIN *et al.*, 2007).

Para produzir os benefícios desejados, as bactérias probióticas devem estar presentes no produto em contagens viáveis ao serem consumidas. Kurmann e Rasic (1991) recomendaram que a dose mínima para causar efeito terapêutico está entre 10^8-10^9 UFC.mL^{-1}. Embora este nível não esteja bem estabelecido, ele deve variar de acordo com espécies e estirpes utilizadas. Outros pesquisadores sugeriram contagens entre 10^7-10^8 UFC.mL^{-1} (DAVE; SHAH, 1997; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; RYBKA; KAILASAPATHY, 1995), porém este nível pode ser atingido aplicando doses diárias de 100 mL de produtos lácteos contendo 10^7 UFC.mL^{-1} de bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.,* 2002). Esses microrganismos probióticos freqüentemente apresentam viabilidade baixa em preparações comerciais e muitos fatores que podem afetar sua viabilidade foram identificados em leites fermentados, tais como pH e níveis de acidez, presença de outros microrganismos, temperaturas de incubação e/ou presença de oxigênio (KAILASAPATHY; RIBKA, 1997; SHAH, 2000a; SHAH *et al*.,1995). Além disso, as bactérias probióticas apresentam falta de atividade proteolítica em leite o que dificulta seu emprego tecnológico (KLAVER *et al*.,1993; LUCAS *et al*., 2004; OLIVEIRA *et al*., 2001).

3.2 Definição e legislação

O alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

São permitidas alegações de função e/ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem (ANVISA, 1999).

Segundo ANVISA (1999) as alegações são definidas em:

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

Em relação aos probióticos a alegação é definida como “microrganismo que contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Os valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (ANVISA, 2002).

3.3 Efeito da cultura probiótica na fermentação

Um bom desempenho tecnológico de culturas probióticas resulta em um rápido crescimento no leite, no fornecimento de propriedades sensoriais adequadas ao produto, e na sobrevivência ou viabilidade das bactérias durante o armazenamento (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Na prática comercial é muito comum o uso de culturas iniciadora do iogurte como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* combinados com bactérias probióticas

com o intuito de reduzir o tempo de fermentação. Entretanto, *L. bulgaricus* tende à pós-acidificação no leite fermentado, afetando na viabilidade de bactérias probióticas. Desta maneira, é recomendado o uso de culturas iniciadoras isentas de *L. bulgaricus* (DAVE; SHAH, 1998). Outra técnica utilizada para aumentar o crescimento e a atividade acidificante dos organismos probióticos em leite é aumentar a fonte de energia disponível adicionando glicose, por exemplo, (OLIVEIRA; DAMIN, 2003) e fatores de crescimento como, por exemplo, extrato de levedura e proteína hidrolisada ou antioxidantes adequados, minerais e vitaminas (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; DAVE; SHAH, 1998; GOMES; MALCATA, 1999; NAIDU; CLEMENS, 2000; OLIVEIRA *et al.,* 2001). A influência da suplementação de leite e da composição de culturas nas propriedades cinéticas e firmeza do leite fermentado feita através de bactérias probióticas, incluindo a viabilidade no produto, têm sido estudadas por muitos pesquisadores (SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; NAIDU; CLEMENS, 2000; OLIVEIRA *et al*., 2001; SODINI *et al*., 2002; LUCAS *et al.,* 2004).

3.4 Características das culturas do iogurte e das probióticas

As bactérias lácticas são bactérias Gram-positivas e esporogênicas que acumulam ácido lático como produto primário do metabolismo (FERREIRA, 2003). A fermentação de bactérias láticas em leite utiliza a lactose e o citrato, o qual permite o acúmulo de ácido lático, principal produto, e também de produtos de menor importância, os quais são benéficos para o incremento de qualidades organolépticas e de textura no produto (DE VOS; HUGENHOLTZ, 2004). O composto C4 diacetil é parcialmente reduzido a acetoína, responsável por aroma de manteiga. Estes dois componentes acumulados na fermentação dependem da fonte de carboidrato-lactose, da glicose e do citrato. O ácido lático, o diacetil e a acetoína são derivados do piruvato, o qual é produzido em meio de cultura contendo glicose e citrato. A glicose possui duas unidades de piruvato enquanto o citrato possui somente uma. Então, cada carboidrato e cada citrato estão disponíveis para a biossíntese do ácido lático e produtos aromáticos como diacetil e acetoína (GOUPRY *et al*., 2000; ØSTLIE *et al.,* 2003). Alguns estudos mostram

que o co-metabolismo do citrato com a glicose muda o perfil metabólico produzido durante a fermentação anaeróbica de bactérias ácido-láticas: o ácido lático é derivado principalmente da glicose, mas o diacetil e a acetoína são produzidos primariamente pelo citrato (GOUPRY *et al*., 2000; ØSTLIE *et al.,* 2003; DE VOS; HUGENHOLTZ, 2004).

S. thermophilus tem morfologia de cocos (Figura 01), geralmente dispostos em cadeia curta. Cresce em temperaturas entre 37 e 45ºC, tolerando temperaturas acima de 50ºC. Apresenta alta sensibilidade a NaCl (<2%) e tem uma importante função de bio-ajuste no processo fermentativo na presença de bactérias probióticas (FERREIRA, 2003). Algumas estirpes produzem exopolissacarídeos, sendo completamente benéficos à produção de consistência em iogurtes, mantendo a textura e a viscosidade durante o armazenamento (COLLET, 2005).

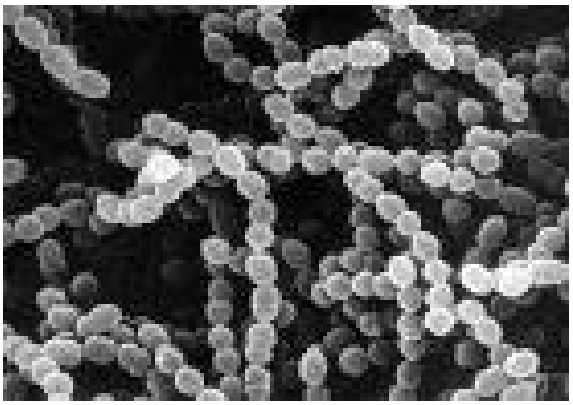


Figura 01. *Streptococcus thermophilus*.
Fonte: Università degli studi di Basilicata, 2007.

L. bulgaricus são pequenos bastonetes (Figura 02), unidos por longas cadeias, com crescimento em temperaturas entre 45 e 50ºC, crescendo também em temperaturas de -15ºC (DELLAGLIO *et al*.,1992). Ambos os microrganismos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são conhecidos como culturas de iogurtes, sendo homofermentativas, com temperatura ideal de crescimento de 42ºC.

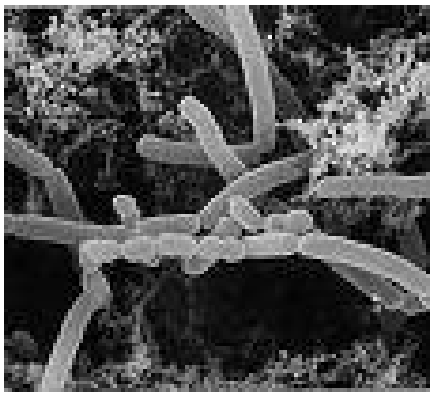


Figura 02. *Lactobacillus bulgaricus*.
Fonte: Hokkaido University, 2007.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* presentes em leite têm uma interação mutuamente favorável e não obrigatória caracterizada pelo fato de cada bactéria produzir substâncias que estimulam o crescimento da outra. Este fenômeno é denominado simbiose.

A simbiose foi estudada por muitos autores que mostraram o efeito benéfico da mistura de culturas em comparação com a correspondente cultura pura no crescimento, acidificação, produção de aromas, exopolissacarídeos e proteólise (BÉAL *et al.*, 1994). Estudos sobre os fatores de estimulação de uma ou de duas bactérias, mostram que o Lb é estimulado pelo ácido fórmico e por CO_2 produzidos por estreptococos e, St por aminoácidos e pequenos peptídeos da atividade metabólica do Lb. O crescimento e a atividade acidificante do Lb são estimulados por ácido fórmico que aparece do tratamento térmico do leite e por St. Esta produção depende de estirpes e também da temperatura. O CO_2 é um fator de estimulação de Lb e provém da descarboxilação da uréia por urease excretada por St. O crescimento de St é estimulado por atividade proteolítica do Lb que gera aminoácidos e pequenos peptídeos. Muitos aminoácidos são mencionados na literatura como fatores de estimulação do crescimento de St: histidina, glicina, ácido glutâmico, metionina, fenilalanina, arginina, cisteína, valina, leucina, triptofano, tirosina, lisina e serina.

Lactobacillus acidophilus (Figura 03) pertence a um grupo geneticamente distante, isto é, dos lactobacilos homofermentativos restritos. É encontrado em diferentes habitats, que o modificaram por muito tempo do ponto de vista fenotípico e genotípico. Dentro do grupo, são encontradas espécies com perfil acidificante (2,7% de ácido lático) e/ou termófilos (temperaturas de crescimento de 40 a 52ºC). *L. acidophilus* produz ácido lático por fermentação de sacarose; é anaeróbico facultativo e é descrito como bacilo circular Gram-positivo, não esporulante, com tamanho geralmente de 0,6 a 0,9 µm, aparecendo em pares ou formando pequenas cadeias. As colônias são geralmente brancas. É exigente nutricionalmente, requerendo nutrição complexa: aminoácidos, e fatores de crescimento essenciais como pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina. O crescimento a 16ºC é raro ou muito lento; em temperaturas superiores, o crescimento depende das estirpes – algumas crescem a 45ºC e outras a 48ºC. *Lactobacillus acidophilus* fermenta hexoses exclusivamente pela via de Embden-Meyerhof-Parnas via lactato, enquanto que pentose e gluconato não são fermentados. Acetoína e diacetil são produzidos por citrato e piruvato. Na presença de lactato ou em pH menor que 4,25, o piruvato não é convertido imediatamente em diacetil e acetoína (DU PLESSIS *et al.*, 1996).

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* (Figura 04) pertence ao grupo dos lactobacilos heterofermentativos facultativos. Como exemplo, fermenta hexoses produzindo ácido lático, mas também, outras pentoses depois da indução do fosfocetolase com produção de ácido lático e acético. A frutose também é fermentada. Este grupo, formado por bactérias muito difundidas na natureza, tem três espécies similares na homologia DNA-DNA e, muitas espécies não apresentam nenhuma relação filogenética bem conhecida (DELLAGLIO *et al.*, 1992; BÉAL *et al.*, 1994). O primeiro complexo é formado geneticamente por espécies *L. plantarum* e espécies fechadas como *L. pentosus*, *L. graminis*, *L. agilis* entre outras. O segundo, denominado como *casei* é formado por espécies heterogênicas no qual o *L. casei* subsp. *rhamnosus* é incluído como fermentador de raminose. O *L. rhamnosus* (GG) é usado como probiótico e foi estudado em modelos experimentais em animais e humanos, em estudos clínicos para humanos, culturas de tecidos e *in vitro* (ALLANDER *et al.*, 1999). Este microrganismo é considerado o mais estudado dos probióticos nos últimos 10 anos.

GG foi isolado de cultura fecal de humanos em 1985. Foi identificado taxonomicamente através de métodos genéticos e eletroforese como *L. rhamnosus*. No entanto, é um *rhamnosum* atípico porque não fermenta a lactose, maltose ou sacarose, fermentando somente a raminose muito lentamente (GOLDIN, 1998).

Figura 03. *Lactobacillus acidophilus*.
Fonte: Magma, 2007.

Figura 04. *Lactobacillus rhamnosus*.
Fonte: Protonutrizione, 2007.

Bifidobacterium spp. são microrganismos Gram-positivos, anaeróbicos, não esporulantes e não possuem motilidade. *Bifidobacterium* spp. produzem ácidos lático e acético sem produzir CO_2, exceto durante a degradação do gluconato. A bifidobactéria originalmente humana fermenta a glicose, galactose, lactose e frutose como fontes de carbono (GOMES; MALCATA, 1999). Segundo ITSARANMUWAT *et al.* (2003), existem diferenças morfológicas, havendo o formato de “Y” e membrana em forma de cocos dependendo da condição de

crescimento e/ou de espécies. *B. lactis* (Figura 05) é encontrado em intestino grosso de humanos.

Figura 05. *Bifidobacterium lactis*.
Fonte: ESCULAP, 2007.

3.5 Importância dos prebióticos

Atualmente os consumidores têm exigido altos padrões para os alimentos. Os alimentos devem apresentar sabor agradável, baixo valor calórico ou conteúdo em gorduras, apresentar benefícios à saúde. Os consumidores estão mais informados da relação que existe entre alimentação e saúde. Logo, estão procurando por alimentos que apresentem benefícios múltiplos associados ao sabor e a aparência. Neste contexto, a indústria de alimentos tem procurado oferecer produtos que apresentem benefícios múltiplos, associados ao sabor e a aparência. Em lácteos funcionais, além de apresentarem esses requisitos citados, os benefícios à saúde são potencializados com a adição de probióticos e também com certos tipos de fibras solúveis conhecidas como compostos prebióticos.

Como as indústrias estão interessadas em manter a viabilidade em seus produtos, a suplementação veio para potencializar o efeito probiótico. Por exemplo, suplementando o leite com hidrolisados de proteína, frutose, proteína do soro concentrado, polpa de suco de tomate e mamão estimula *L. acidophilus*, enquanto a cisteína, ácidos hidrolisados, triptona, vitaminas, dextrinas e maltose aumenta a

viabilidade de Bifidobacteria. Os compostos prebióticos também permite o crescimento de bactérias probióticas (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Os prebióticos possuem propriedades funcionais de grande importância para a indústria de alimentos. Tanto inulina como a oligofrutose vêm sendo utilizadas para enriquecer com fibras produtos alimentares. Diferentemente de outras fibras não tem sabores adicionais, podendo enriquecer os alimentos sem alterar muito a viscosidade, a aparência e o sabor das formulações. As propriedades nutricionais da inulina e das oligofrutoses são similares, assim, a decisão de formular com a inulina ou oligofrutose se dá em função dos atributos desejados no produto final. A inulina é mais indicada quando se pretende obter produtos com menor teor de gordura, enquanto oligofrutoses são adequadas para mascarar o sabor residual de adoçantes de alta intensidade utilizados em preparações alimentares. Estudos têm indicado que a inulina e as oligofrutoses apresentam características de prebiótico, por serem indigeríveis e desenvolverem o efeito bifidogênico, melhorando a microbiota intestinal. Recomenda-se que a inulina e as oligofrutoses sejam utilizadas com probióticos em alimentos para obtenção do efeito simbiótico.

3.5.1 Definição e benefícios dos prebióticos

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam beneficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias que são desejáveis no cólon. Além disso, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (ROBERFROID, 2001; MATTILA-SANDHOLM *et al*., 2002).

Entre os prebióticos encontram-se a inulina e as oligofrutoses que são fibras solúveis e fermentáveis. São denominadas de frutanos, as quais não são digeríveis pela α-amilase e por enzimas hidrolíticas, como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do trato intestinal (CARABIN; FLAMM, 1999).

Segundo ANVISA (2002) as alegações são definidas como:

- **Fibras alimentares** - auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis;
- **Frutooligossacarídeos** - contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis;
- **Inulina** – contribuem para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis;
- **Polidextrose** - auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis;
- **Lactulose** - funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

As quantidades determinadas para fibras alimentares, lactulose, polidextrose, inulina e FOS são de no mínimo 3 g de fibras.$100g^{-1}$ em alimentos sólidos e 1,5 g de fibras.$100g^{-1}$ em alimentos líquidos (ANVISA, 2002).

Os prebióticos são carboidratos não-digeríveis, incluindo a lactulose, a inulina e diversos oligossacarídeos que fornecem carboidratos que as bactérias do cólon são capazes de fermentar. Estes ingredientes funcionais exercem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, resultando melhoria da saúde e em redução no risco de aparecimento de diversas doenças. As principais fontes de inulina e oligofrutose empregadas na indústria de alimentos são a chicória (*Cichorium intybus*) e a alcachofra de Jerusalém (*Helianthus tuberosus*) (KAUR; GUPTA, 2002).

Existe também um polissacarídeo denominado polidextrose, cujos efeitos fisiológicos são similares aos de uma fibra da dieta (JIE *et al*., 2000). A polidextrose é um polissacarídeo sintetizado pela polimerização aleatória da glicose, na presença de quantidades menores de sorbitol e um catalisador ácido adequado, sob alta temperatura e vácuo parcial. É utilizada em muitos países

como agente de corpo e como ingrediente de valor calórico reduzido (1kcal/g) em diversos alimentos (HAMANAKA, 1987).

A polidextrose é parcialmente fermentada no intestino grosso, mas não é digerida nem absorvida no intestino delgado, e em sua maior parte é excretada nas fezes. Esse polissacarídeo se fermenta parcialmente no intestino grosso, aumenta o volume de massa fecal, reduz o tempo de trânsito, suaviza e abaixa o pH do bolo fecal. A fermentação da polidextrose conduz ao crescimento de microflora favorável, a redução da microflora putrefativa, a maior produção de ácidos graxos de cadeia curta e a supressão da produção de metabólitos carcinogênicos como, por exemplo, o indol e o p-cresol (WANG; GIBSON, 1993; ACHOUR *et al*., 1994).

3.5.2 Definição da inulina e os seus efeitos benéficos

A inulina é um polissacarídeo encontrado em uma série de produtos vegetais, principalmente na raiz de chicória (*Chicorium intybus L*.), uma planta nativa da Europa, África e América, que pode ser cultivada em qualquer lugar do mundo. Existem outros vegetais que contêm consideráveis concentrações de inulina e são bastante consumidos entre eles, destacando-se a chicória, e a alcachofra de Jerusalém onde as concentrações podem chegar a 20% do peso fresco (VORAGEN, 1998). A inulina é utilizada na agroindústria para a produção de alimentos de baixa caloria e como ingrediente funcional nas indústrias farmacêuticas. A tecnologia convencional para a produção de inulina é a extração aquosa, que tem alto custo energético devido às etapas de separação (VAN LOO *et al*., 2005).

A inulina é um polímero de D-frutose (Figura 06), sendo importante como carboidrato de reserva de plantas. Pertence ao grupo dos frutanos e é sintetizada por uma grande variedade de plantas (CARPITA *et al*., 1989). A inulina é um polímero linear com ligações glicosídeas β(2→1) (ROBERFROID; GIBSON, 1998).

A inulina é um frutano constituído de uma mistura de polímeros e oligômeros superiores lineares de frutose. As unidades de β-D frutofuranosil são

mantidas entre si por ligações do tipo β(2→1), e possuem molécula de glicose na porção inicial de cada cadeia linear de frutose (COUSSEMENT, 1997).

A oligofrutose tem a mesma estrutura da inulina, mas a cadeia consiste de 10 ou menos unidades de frutose. A oligofrutose tem aproximadamente de 30 a 50% de doçura. A inulina é menos solúvel que a oligofrutose e tem uma suave textura cremosa fornecendo uma sensação de gordura ao paladar. Tanto a inulina quanto a oligofrutose não são digeridas pelas enzimas do intestino de humanos, mas são totalmente fermentadas pela microflora intestinal. A cadeia curta de ácidos graxos e lactatos produzidos pela fermentação formece 1,5 Kcal por grama de inulina ou oligofrutose.A inulina e a oligofrutose são usadas para substituir gordura ou açúcar reduzindo as caloris dos alimentos como sorvetes, confeitos e produtos lácteos (COUSSEMENT, 1997; AKIN *et al.,* 2007).

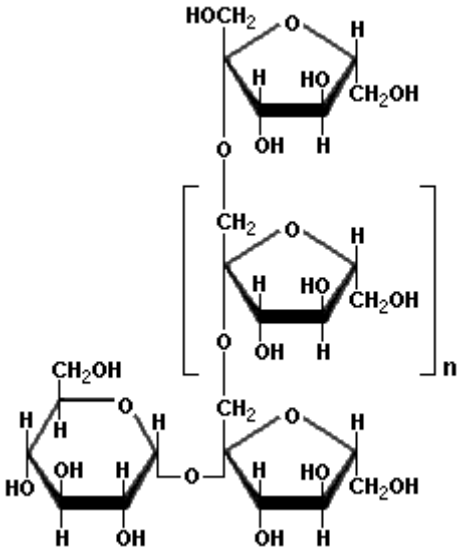


Figura 06. Estrutura da inulina.
Fonte: SCIENTIFIC PSYCHIC, 2007.

A inulina é um carboidrato largamente encontrado na natureza, funcionando como carboidrato de reserva em muitas plantas. As plantas apresentam hidrólise da inulina endógena em moléculas de menor grau de polimerização, permitindo a sobrevivência dessas plantas durante o período de inverno (CARPITA *et al*., 1989). É um frutano, com grau de polimerização 11-60,

composto por uma grande cadeia de frutose correspondente a 94%, e uma molécula terminal de glicose. Sabe-se que a frutose tem maior poder adoçante que a glicose ou sacarose e que, diferentemente desses açúcares, pode ser usada também por diabéticos. Age no organismo de uma forma similar às fibras dietéticas, contribuindo para a melhoria das condições do sistema gastrintestinal. Devido a essas propriedades, as indústrias farmacêuticas e alimentícias têm encontrado aplicações para a inulina na produção de alimentos funcionais, compostos nutricionais e medicamentos (FIGUEIRA *et al*., 2004).

Os frutanos do tipo inulina dividem-se em dois grupos gerais: a inulina e os compostos a ela relacionados – a oligofrutose e os oligofrutossacarídeos (FOS). A inulina, a oligofrutose e os FOS são entidades quimicamente similares, com as mesmas propriedades nutricionais. A única diferença entre a inulina, a oligofrutose e os FOS sintéticos é o grau de polimerização, ou seja, o número de unidades individuais de monossacarídeos que compõem a molécula (CARABIN; FLAMM, 1999). As diferenças no tamanho das cadeias entre a inulina e oligofrutoses causam mudanças nos atributos funcionais tecnológicos destes compostos.

3.5.3 Efeitos prebióticos da inulina

Estudos revelam que há um crescimento interessante de bactérias probióticas utilizando a inulina como substrato. Humanos que ingeriram inulina tiveram em seu sistema gastrintestinal quantidades elevadas de bactérias fecais como bifidobactérias (RAO, 1999).

Os dados científicos indicam que a inulina e a oligofrutose oferecem uma dieta eficiente, além de fortalecer o trato gastrintestinal contra a colonização de patógenos. Estes prebióticos realizam uma seletividade favorecendo uma vantagem competitiva aos microrganismos benéficos como bifidobacteria e bactérias ácido-láticas. Esta estimulação seletiva do crescimento e desenvolvimento desses grupos conhecidos como “promotores de saúde”, é chamada de prebiose, um novo conceito de nutrição (MARTEAU; BOURTRON-RUALT, 2002).

O número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrintestinal pode ser aumentado através da introdução de probióticos pela alimentação ou com o consumo de suplemento alimentar prebiótico, o qual muda a composição da microbiota fornecendo vantagens competitivas sobre outras baterias do ecossistema (CRITTENDEN, 1999; ROBERFROID, 2002).

Os prebióticos como a inulina e a oligofrutose são resistentes à digestão na parte superior do trato intestinal, sendo subsequentemente fermentado no cólon. Também os prebióticos exercem um efeito no volume, devido ao aumento de biomassa que resulta de sua fermentação, promovendo também um aumento na freqüência de evacuações, confirmando a sua classificação como fibra da dieta (KAUR; GUPTA, 2002; ROBERFROID, 2002).

3.5.4 Aplicação tecnológica da inulina

Devido ao fato de apresentar cadeia maior, a inulina é menos solúvel que as oligofrutoses e tem a habilidade de formar microcristais de inulina quando misturada em água ou leite. Estes microcristais não são percebidos na boca, mas interagem para formar uma textura finamente cremosa que promovem na boca uma sensação semelhante ao da gordura. A inulina tem sido usada com sucesso como substituto de gordura em vários produtos alimentares como bolos, chocolates, embutidos e produtos lácteos (NINESS, 1999) podendo, ainda, ser empregada em sorvetes, produtos lácteos, confeitos e produtos de panificação a fim de reduzir calorias destes alimentos. Contudo, é a indigeribilidade da inulina que tem permitido a maior utilização desta como fibra alimentar.

A inulina é mais comumente usada quando se pretende obter produtos com menor teor de gordura, enquanto as oligofrutoses são mais utilizadas para as preparações de frutas para iogurtes de baixa caloria e para balancear a doçura e mascarar o sabor residual de adoçantes de alta intensidade utilizados em preparações alimentares (NINESS, 1999).

3.5.5 Os benefícios à saúde no consumo da inulina

Diversos estudos experimentais mostraram os efeitos da inulina e da oligofrutose como fatores bifidogênicos, ou seja, que estimulam a predominância de bifidobactérias no cólon, havendo então um estímulo do sistema imunológico do hospedeiro, redução nos níveis de bactérias patogênicas no intestino, um alívio na constipação, diminuição do risco de osteoporose resultante da absorção diminuída de minerais, como o cálcio. Com isso haveria uma redução nos riscos de arteriosclerose, através da diminuição na síntese de triglicérides e ácidos graxos no fígado e diminuição do nível desses compostos no sangue (KAUR; GUPTA, 2002; FUCKS *et al*., 2006).

A inulina influencia a função intestinal pelo aumento da frequência das evacuações, particularmente em pacientes constipados. O aumento do peso das fezes nas evacuações e a diminuição do pH fecal devido à fermentação, têm sido relacionados à supressão da produção de substâncias putrefativas no cólon (MENNE *et al.,* 1997; ROBERFROID; GIBSON, 1998). Sendo a inulina resistente à digestão na porção superior do trato intestinal, sua moléculas alcançam o intestino grosso praticamente intactas, onde são fermentadas pelas bactérias, e podem então ser classificadas como fibras alimentares solúveis (ROBERFROID; GIBSON, 1998).

Sendo assim as fibras alimentares, especialmente as fibras solúveis, efetivamente diminuem o colesterol sérico e as concentrações do colesterol LDL, que tem papel central na patogênese da aterosclerose, podendo contribuir na proteção contra doenças coronárias. Os efeitos das fibras solúveis na diminuição do colesterol estão relacionados com suas propriedades de formação de gel, diminuição da absorção de ácidos biliares e ação dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos na fermentação sobre a função hepática. Além disso, verifica-se que as fibras podem também atuar sobre fatores de risco para doenças coronárias como hipertensão, obesidade e diabetes (ANDERSON, 1990).

A inulina estimula seletivamente o crescimento de bifidobactérias e mantém em níveis baixos os bacteróides, clostridia ou coliformes contribuindo na prevenção de câncer de cólon. A administração de inulina aumenta significativamente as bifidobactérias fecais, produtoras do ácido lático, diminuindo o pH fecal e

criando um microambiente bactericida para as bactérias putrefativas, desenvolvendo assim um microambiente que pode envolver a modulação de enzimas bacterianas como β-glucoronidase, que pode converter procarcinógenos em carcinógenos (KULKARNI; REDDY, 1994; ROBERFROID; GIBSON, 1998).

Segundo KARPPINEN *et al.* (2000), a fermentação da inulina é a mais rápida e produz relativamente mais ácido butírico e menos ácido propiônico que os farelos de cereais. Este butirato é capaz de inibir a proliferação de um grande número de células *in vitro*, inclusive de células tumorais.

Outros efeitos adicionais à saúde, como o aumento da absorção de minerais, principalmente o cálcio estão relacionados ao consumo de inulina. A ingestão freqüente de inulina diminui ou previne a perda de massa óssea, cálcio e fósforo dos ossos de ratos gastrectomizados e, a perda de densidade mineral óssea por ratos ovarioctomizados (TAGUCHI *et al.,* 1994; OHTA, 1998). As doenças do coração, câncer, estresse, colesterol alto, controle de peso, osteoporose e diabetes são atualmente, as maiores preocupações de saúde. Sendo assim, o foco na prevenção de doenças por meio dos alimentos está muito forte. Isso faz com que a inulina apareça como importante ingrediente alimentar que pode ser amplamente explorado em pesquisas e pela indústria de alimentos, visando à produção de alimentos funcionais (NINESS, 1999).

CAPÍTULO IV

4. O EFEITO DA INULINA COMO PREBIÓTICO NA PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO ENRIQUECIDO COM FIBRAS[1]

4.1 Resumo

Foi estudado o efeito da inulina como um prebiótico na produção de leite fermentado probiótico enriquecido com fibra. A cinética de acidificação do leite suplementado com inulina (0, 0,01, 0,02 e 0,04 $g.g^{-1}$), bem como sobrevivência dos probióticos, pH e firmeza dos produtos armazenados a 4°C por 24 horas e 7 dias após o preparo foram analisados. A qualidade do leite fermentado probiótico enriquecido com fibra foi influenciada tanto pela quantidade de inulina quanto pela composição da co-cultura. Dependendo da co-cultura, a adição de inulina influenciou nos parâmetros cinéticos de acidificação, na contagem dos probióticos, o pH e na firmeza dos produtos.

4.2 Introdução

Atualmente, os consumidores estão exigindo cada vez mais alimentos com propriedades especiais, tais como aroma agradável, baixo valor calórico e teor de gordura, além de efeitos benéficos para a saúde. Dentro deste contexto, a indústria de alimentos vem desenvolvendo produtos com melhor sabor e aparência. Os produtos lácteos funcionais respondem a diversas exigências nutricionais, juntamente com os benefícios de saúde que são reforçados através da adição de probióticos, assim como por certos tipos de fibras solúveis conhecidas como prebióticos.

---

[1] OLIVEIRA, R. P. S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk. **International Journal of Dairy Techonology**. v. 2, maio, p. 195-203,2009.DOI: 10.1111/j.1471-0307.2009.00471.x.[Fator de impacto: 1,159].

Prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que são benéficos ao hospedeiro, porque estimulam seletivamente a proliferação ou atividade de bactérias desejáveis no cólon. Além disso, prebióticos podem inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais de saúde para o hospedeiro. Esses componentes podem atuar principalmente no intestino grosso, embora também possam causar impacto aos microrganismos presentes no intestino delgado (ROBERFROID, 2000; MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

Entre os prebióticos, inulina e oligofrutoses são fibras solúveis e fermentecíveis. Estes ingredientes alimentares são denominados frutanos e não são digeridas pela α-amilase ou enzimas hidrolíticas na parte superior do trato intestinal (CARABIN; FLAMM, 1999). As principais fontes de inulina e oligofrutose, mais amplamente utilizados pela indústria alimentar, são chicória (*Cichorium intybus*) e alcachofra (*Helianthus tuberosus*) (KAUR; GUPTA, 2002). Inulina é muito utilizada para obter produtos com um baixo teor de gordura, enquanto oligofrutoses são empregadas em preparados de frutas de baixa caloria, tais como iogurtes, e para equilibrar a doçura e mascarar o sabor residual do edulcorante nos alimentos manufaturados (NINESS, 1999; GUVEN *et al.*, 2005). A quantidade estabelecida para fibras alimentares são, pelo menos, 0,03-0,06 g de fibras.g^{-1} em alimentos sólidos e 0,015-0,03 g de fibras.g^{-1} em alimentos líquidos (ANVISA, 2002).

Estes ingredientes alimentares funcionais influenciam nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo, resultando na melhoria da saúde e na redução do risco de muitas doenças. Vários estudos experimentais *in vivo* têm mostrado os efeitos inulina e oligofrutoses, as quais estimulam o sistema imunológico do hospedeiro e também promovem o predomínio de bifidobactérias no cólon, reduzindo os níveis de patogenicidade no intestino, aliviando a constipação e diminuindo o risco de osteoporose, o qual pode reduzir a absorção de minerais, tais como o cálcio. Esses prebióticos em questão também reduzem o risco de arteriosclerose por uma diminuição na síntese de triglicerídeos e ácidos graxos (KAUR; GUPTA, 2002; FUCKS *et al.*, 2006). A inulina regula a função intestinal, aumentando a frequência de evacuações, especialmente em pacientes com prisão de ventre. O aumento no peso das fezes e redução do pH fecal causada pela fermentação são consequências da supressão da produção de

substâncias putrefativas no cólon (MENNE *et al.*, 1997; ROBERFROID; GIBSON 1998). Como a inulina é resistente à digestão na parte superior do trato intestinal, atinge o intestino grosso praticamente intacta - onde ocorre a fermentação por bactérias, este ingrediente pode ser classificado como uma fibra alimentar solúvel (ANDERSON, 1990; ROBERFROID; GIBSON, 1998).

Bactérias ácido-lácticas (LAB) isoladas do trato gastrointestinal de humanos e animais gastrointestinal são conhecidas como probióticos. Estes organismos, quando utilizados em grandes quantidades na preparação de alimentos e produtos lácteos, devem sobreviver à passagem pelo trato digestivo superior. Microrganismos probióticos devem também ser capazes de aderir à células intestinais, causando efeitos benéficos ao trato intestinal (GILLILAND, 1989). Quando esses organismos são consumidos em grandes quantidades, ajudam no equilíbrio intestinal (FERREIRA, 2003). Microrganismos probióticos utilizados em produtos lácteos funcionais pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (GOLDIN; GORBACH, 1984).

Vários pesquisadores têm descrito os principais benefícios terapêuticos para os seres humanos através da ingestão de microrganismos probióticos. Esses benefícios podem ser resumidos da seguinte forma: aumento da modulação imunológica e prevenção de determinadas doenças como, por exemplo, diarréias, intolerância à lactose, doenças inflamatórias intestinais, síndrome de intestino irritado, constipação, crescimento desordenado das bactérias intestinais, cancêr de bexiga e de cólon, alergias, colesterol elevado, hipertensão arterial, doenças coronárias e infecção do trato urinário, bem como superior e as infecções do trato respiratório (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 1992; GOLDIN, 1998; HOLZAPFEL *et al.*, 1998; SALMINEN *et al.*, 1998; OUWEHAND *et al.*, 2003; AKIN *et al.*, 2007).

A fim de produzir os benefícios desejados, bactérias probióticas devem estar presentes nos produtos em quantidades de células viáveis desejadas durante toda a sua vida-de-prateleira. Kurmann e Rasic (1991) recomendam que a dose mínima para o efeito terapêutico ser 10^8-10^9 UFC.mL^{-1}. Esta concentração ótima desejável ainda é muito discutida e estudada. Outros pesquisadores sugeriram contagens de 10^7-10^8 UFC.mL^{-1} (RYBKA; KAILASAPATHY, 1995; DAVE; SHAH, 1997; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997). Este nível pode ser alcançado com doses diárias de 100 mL de produtos lácteos contendo 10^7 UFC.mL^{-1} de bactérias

probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Normalmente, microrganismos probióticos têm baixa viabilidade em preparações comerciais; vários fatores que podem afetar a sua viabilidade como, o pH, níveis elevados de acidez, outros microorganismos, temperaturas de incubação e presença de oxigênio (SHAH *et al.*, 1995; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; SHAH, 2000b; DAMIN *et al.*, 2008). Além disso, bactérias probióticas não têm atividade proteolítica em leite, o que torna a sua utilização e inclusão tecnologicamente difícil (KLAVER *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2001; LUCAS *et al.*, 2004).

O foco na prevenção das doenças por meio de alimentos funcionais é atualmente muito forte. Inulina e probióticos aparecem como importantes ingredientes alimentares, os quais poderiam ser amplamente exploradas através de pesquisas científicas e também pela indústria alimentar para a produção de alimentos funcionais (NINESS, 1999; GUVEN *et al.*, 2005). O efeito de inulina como prebiótico na produção leite fermentado probiótico rico em fibra, a cinética de acidificação do leite enriquecido com inulina em diferentes concentrações (1, 2 e 4 g 100 g^{-1}) fermentados por *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* foram avaliados. Finalmente, a sobrevivência dos probióticos, a pós-acidificação e a firmeza dos leites fermentados enriquecidos com fibra, armazenadas a 4°C, após 24 horas e sete dias foram analisados.

4.3 Material e métodos

Culturas microbianas

Foram utilizadas cinco estirpes de culturas puras iniciadoras comerciais liofilizadas (Danisco, ZA des Engenières, France): *S. thermophilus* TA040 (St) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 (Lb) - microrganismos do iogurte, e *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr) e *Bifidobacterium lactis* BL 04 (Bl) - microrganismos probióticos.

Procedimento experimental

Preparação do leite

O leite foi preparado adicionando-se 13 g de leite em pó desnatado Molico (Nestlé) em 100 g de água destilada (base de leite). A seguir, foram preparadas as bases de leite suplementadas com inulina a 1, 2 e 4 g.100 g $^{-1}$.

As bases de leite controle e suplementadas foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético por 15 min e tratadas termicamente a 90°C durante 5 minutos em equipamento de banho-maria (Fisatom, Modelo 550 A, local). O leite tratado foi recolhido e transferido a garrafas estéreis de 1 L, imediatamente resfriado em banho de gelo, distribuído em erlenmeyrs estéreis de 250 mL em câmara de fluxo laminar e, acondicionados em câmara fria a 4°C por 24h antes da utilização.

Preparação do inóculo

Foi preparada uma pré-cultura com La na qual se adicionou 100 mg de cultura pura em 50 mL de leite autoclavado reconstituído a 10% de sólidos totais. Após a homogeneização, 1 mL da pré-cultura (ativada em banho-maria a 42ºC por 30 minutos) foi inoculado em frascos de 250 mL. O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação de pré-culturas de Lb, Lr, Bl e St adicionando 400 mg, 130 mg, 45 mg e 90 mg respectivamente de cultura pura em 50 mL de leite a 10% autoclavado a 121°C/20 minutos. As valores das contagens em média nas diferentes pré-culturas variaram de 6,1 a 6,5 logUFC.mL^{-1}.

Fermentação

Após a inoculação, as amostras foram colocadas em banho-maria acoplado ao sistema Cinétique d´acidification (CINAC), Ysebaert, Frépillon, França até obter a estabilização da temperatura a 42°C. Após a inoculação, as amostras adicionadas de cultura láctica foram homogeneizadas e a cinética de acidificação

seguida pelo sistema CINAC até valores de pH 4,5, correspondente ao tempo de fermentação final. A fermentação experimental foi monitorada utilizando o sistema CINAC de acordo com o descrito por Spinnler e Corrieu (1989), o qual permite a medição contínua e gravação do nível de pH computando a taxa de acidificação durante o período de fermentação.

A partir dos dados obtidos, calcularam-se as velocidades 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: (i)t_{max}: tempo no qual atinge-se a velocidade máxima (V_{max}); (ii) pH_{Vmax}: pH do leite quando a velocidade máxima foi atingida; (iii) $t_{pH5.0}$: tempo para atingir o pH 5,0 (h); (iv) $t_{pH4.5}$: tempo para atingir o pH 4,5(h).

Quando o pH 4,5 foi atingido, a fermentação foi interrompida manualmente através da agitação do coágulo com auxílio de um bastão de aço inoxidável com disco perfurado; o bastão foi movimentado para cima e para baixo por 80 segundos. O produto fermentado foi colocado em copos plásticos de polipropileno de 50 mL e selados termicamente usando o equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) e rapidamente resfriados em banho de gelo. O produto fermentado foi estocado a 4ºC.

Foram investigados a cinética de acidificação durante toda a fermentação do leite suplementado com 1 (SM1), 2 (SM2) ou 4 (SM4) g inulina. 100 g^{-1} por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* , *L. rhamnosus* e *B. lactis*. Foram também examinados a sobrevivência dos microrganismos probiótico, pós-acidificação e firmeza dos leites fermentados enriquecido com fibra, armazenados a 4°C por 24 h e/ou 7 dias após a preparação. Leite não suplementado (M) foi utilizado como controle.

Análises físico-químicas

Análises físico-químicas foram feitas com amostras de leite suplementadas com inulina em triplicata, e os resultados foram expressos em g.100 g^{-1}. A gordura foi determinada pelo método de Gerber, de acordo com Schmidt-Hebbel (1956). O teor de proteína foi calculado em função do teor de nitrogênio total, através do

método de micro-Kjeldahl, usando 6,38 como um factor de conversão (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995). Teor de lactose foi determinado por titulação utilizando a solução da Fehling (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). O teor de sólidos totais foi determinada pelo peso seco de 100-105°C, seguindo o método recomendado pela ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1995).

4.4 Resultados e discussão

Composição química do leite

A composição do leite sem e com adição de inulina são apresentadas na Tabela 01. Gordura, proteína e sólidos totais variaram de 0,03 a 0,06 mg.g^{-1}, 4,00 a 4,10 mg.g^{-1}, e de 13,20 a 15,63 g.100 g^{-1}, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nos teores de gordura e proteína, no entanto, valores de sólidos totais variaram de forma significativa. Teor de lactose variou de 4,43 a 4,63 g.100 g^{-1}; esta foi significativamente afetada pela adição de 4,0 g de inulina por 100 g de leite.

Tabela 01. Composição química do leite*.

Leite	Inulina (g· g^{-1})	Gordura (mg· g^{-1})	Proteína (mg· g^{-1})	Lactose (g· g^{-1})	Sólidos Totais (g· g^{-1})
M	0	0,6^{a}	40,7^{a}	0,044^{a}	0,132^{a}
SM1	0,01	0,3^{a}	40,0^{a}	0,045^{ab}	0,140^{b}
SM2	0,02	0,6^{a}	40,3^{a}	0,046^{ab}	0,148^{c}
SM4	0,04	0,3^{a}	41,0^{a}	0,046^{b}	0,156^{d}

* Médias dos resultados em triplicata, média do desvio padrão ≥0,03.
Médias na mesma coluna com diferentes letras são diferenças significativas; $P < 0,05$
M: Leite não suplementado; SM1: Leite suplementado com 0,01 g de inulina.g^{-1}; SM2: Leite suplementado com 0,02 g de inulina.g^{-1} ; SM4: Leite suplementado com 0,04 g de inulina.g^{-1}.

Cinética de acidificação

As curvas de acidificação do leite suplementado com a inulina são mostradas na Figura 07. O tempo de fermentação foi curto para todas as co-culturas (St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl), quando foram adicionados 4,0g de inulina por 100 g de leite, demonstrando que o prebiótico diminui o tempo de fermentação.

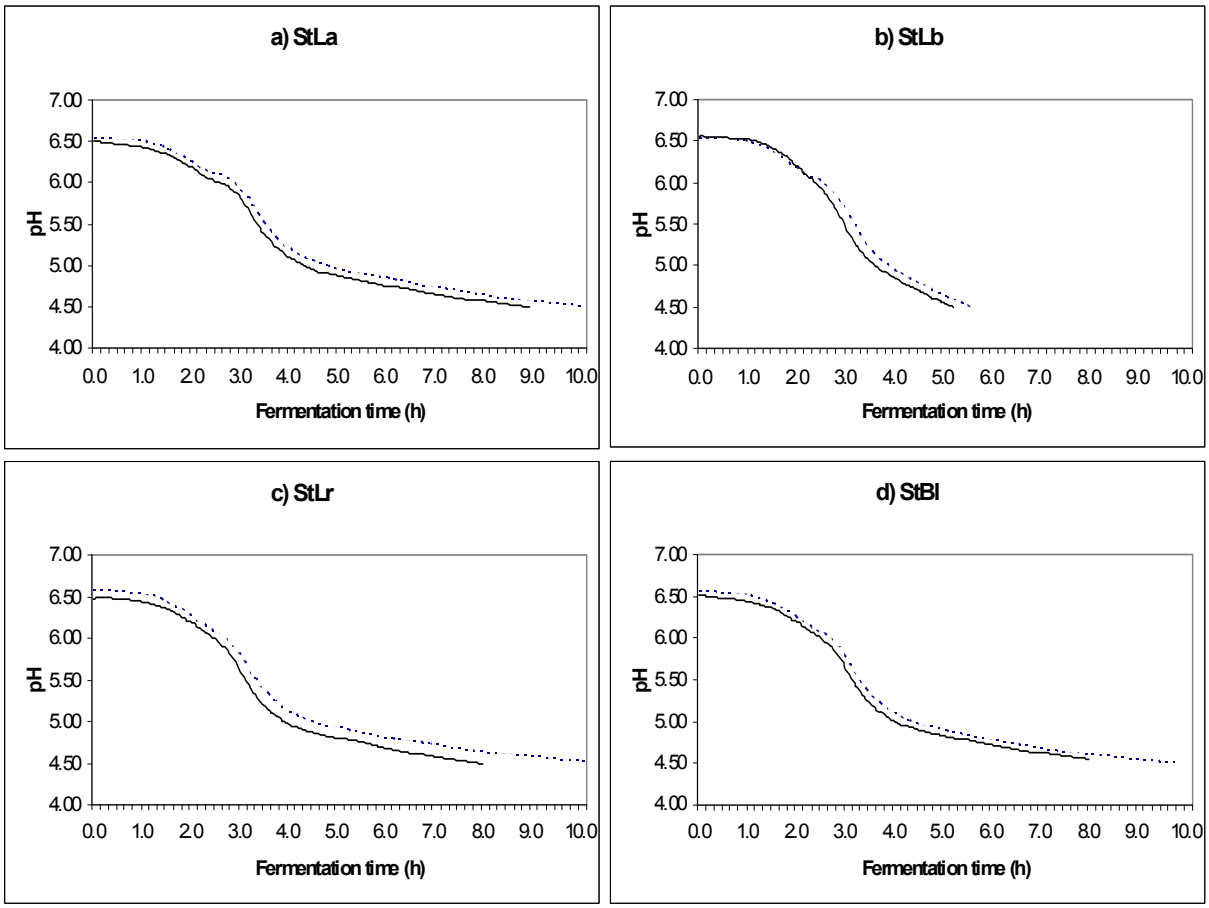


Figura 07. Curva de acidificação do leite (linha tracejada) e leite suplementado com 0,04 g de inulina g^{-1} (linha contínua) a 42°C até o pH 4,5.

Os parâmetros cinéticos acidificação do leite fermentado por *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* são apresentados na Tabela 02. A taxa máxima de acidificação (V_{max}) variou de 14,65 x 10^{-3} upH min^{-1} (St-Bl/SM1) a 18,78 x 10^{-3} upH.min^{-1} (St-Lb/SM), com diferenças significativas entre os ensaios. Os valores de V_{max} foram

significativamente mais elevados quando inulina foi utilizada. Os valores de t_{max} variaram significativamente, de 2,91 h (St-Lb/SM1) a 3,53 h (St-Bl/SM1). Em todas as culturas, t_{max} diminuiu com o aumento da suplementação de inulina; no entanto t_{max} foi ligeiramente influenciado quando a co-cultura St-Lr foi utilizada. A co-cultura St-Bl no SM1 obteve o maior valor de t_{max}; no entanto, o valor desse parâmetro foi significativamente menor em SM2 e SM4. Os valores de V_{max} descritos nesse estudo foram similares aos aqueles obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2001), no qual o leite fermentado suplementado com hidrolisado de caseína com *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* em culturas mistas com *S. thermophilus*, mas os valores de t_{max} do trabalho em questão foram maiores.

Embora pH_{Vmax} tivesse variado de 5,51 (St-Lb/SM4) a 6,11 (St-Lb/SM1), as diferenças não foram significativas. Diferenças significativas foram observadas para os valores de $t_{pH5.0}$: de 3,55 (St-Lb/SM4) a 5,43 (St-Bl/SM1). No geral, esses valores foram reduzidos nos leites que foram suplementados com inulina, exceto no caso da co-cultura St-Lb, o qual obteve valores maiores em 1 e 2 g.100 g^{-1}, co-cultura St-Lr em 1, 2 e 4 g.100 g^{-1}, e co-cultura St-Bl, o qual alcançou maiores valores de $t_{pH5.0}$ em 1 e 2 g.100 g^{-1} (Tabela 02).

Os tempos de fermentação ($t_{pH4.5}$) variaram de 5,2 a 11,2h. Existem diferenças significativas neste parâmetro; os tempos foram menores no leite suplementado com inulina, especialmente a 4 g.100g^{-1}. A co-cultura St-Lr foi fortemente afetada com a inulina. No entanto, o tempo de fermentação nas co-culturas St-Lb (SM1), St-Lr (SM1 e SM2), e St-Bl (SM1), foram próximos aos obtidos nas outras concentrações (Figura 08).

Özer *et al*. (2005) observaram que o tempo de fermentação da cultura St-Lb para alcançar o pH 4,6 foi de 3,5 h, enquanto que na co-cultura St-Lb-La-Bb foram necessárias mais que 8 h de fermentação. A adição de inulina e/ou lactulose para estas co-culturas reduziu este parâmetro para 7,0 e 7,3 h, respectivamente. Após 14 dias de armazenamento, o pH variou de 4,03 a 4,42 para St-Lb-La-Bb no leite suplementado com inulina e lactulose, respectivamente. OLIVEIRA *et al.* (2002).

Tabela 02. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) em co-cultura com S*treptococcus thermophilus* (St)

Leite	Co-cultura	V_{max} (10^{-3} upH.min^{-1})	t_{max} (h)	pH_{Vmax}	$t_{pH5.0}$ (h)
M	St-Lb	17,9^{cd}	3,03^{abc}	5,53^{a}	3,68^{ab}
M	St-La	16,4^{abc}	3,23^{cde}	5,71^{a}	4,70^{de}
M	St-Lr	15,3^{ab}	3,03^{abc}	5,71^{a}	4,26^{bcd}
M	St-Bl	16,0^{abc}	3,35^{ef}	5,68^{a}	4,83^{de}
SM1	St-Lb	17,8^{cd}	2,91^{a}	6,11^{a}	3,75^{abc}
SM1	St-La	16,6^{abcd}	3,20^{cde}	5,73^{a}	4,85^{def}
SM1	St-Lr	16,0^{abc}	3,05^{abc}	5,74^{a}	4,63^{de}
SM1	St-Bl	14,6^{a}	3,53^{f}	5,76^{a}	5,43^{f}
SM2	St-Lb	17,2^{cd}	3,03^{abc}	5,59^{a}	3,73^{abc}
SM2	St-La	16,7^{abcd}	3,18^{cde}	5,73^{a}	4,76^{de}
SM2	St-Lr	16,3^{abc}	3,16^{bcde}	5,76^{a}	4,95^{ef}
SM2	St-Bl	15,5^{ab}	3,31^{def}	5,88^{a}	5,01^{ef}
SM4	St-Lb	18, 8^{d}	2,93^{ab}	5,51^{a}	3,55^{a}
SM4	St-La	17,1^{bcd}	3,16^{bcde}	5,64^{a}	4,31^{cd}
SM4	St-Lr	16,3^{abc}	3,10^{abcd}	5,58^{a}	4,45^{de}
SM4	St-Bl	16,3^{abc}	3,23^{cde}	5,62^{a}	4,80^{de}

M: Leite não suplementado; SM1: Leite suplementado com 0,01 g de inulina.g^{-1}; SM2: Leite suplementado com 0,02 g de inulina.g^{-1} ; SM4: Leite suplementado com 0,04 g de inulina.g^{-1}.
V_{max}: máxima taxa de acidificação; t_{max}: tempo para alcançar a máxima taxa de acidificação; pH_{Vmax}: pH do leite qundo a máxima taxa de acidificação foi alcançada; $t_{pH5.0}$: tempo para alcançar o pH 5,0.
Valores com diferentes letras na mesma coluna mostram diferenças significativas ($P < 0,05$).

SODINI *et al.* (2002) relataram que o tempo fermentação foi curto para a co-cultura St-La (8,8 h), quando comparado a St-Lr (13,2 h), o qual pode ser explicado pela maior taxa de acidificação do La.

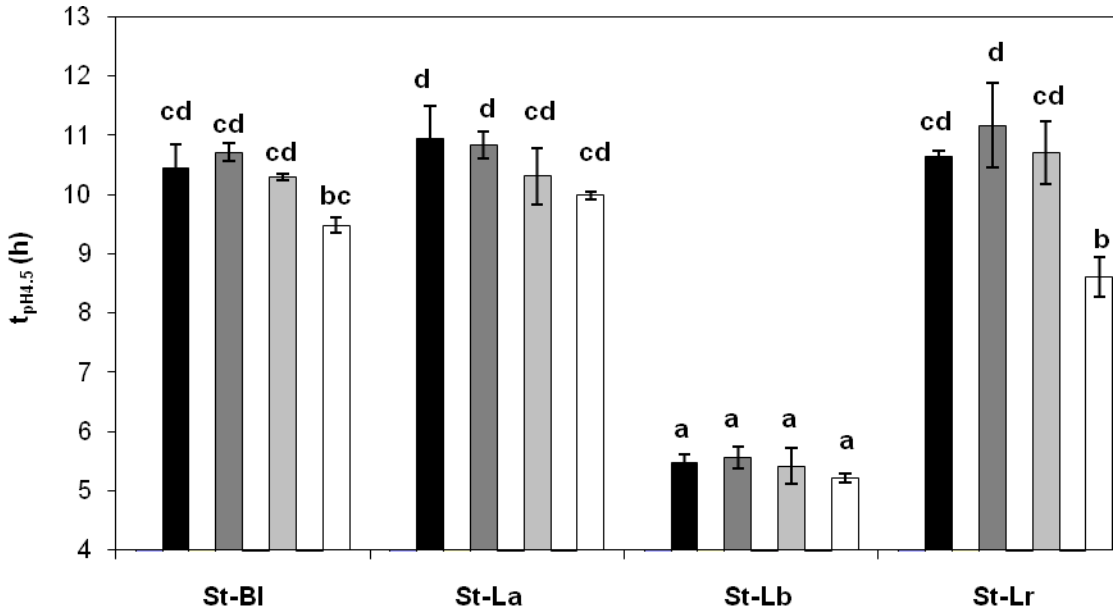


Figura 08. Efeito da adição de inulina durante o tempo de fermentação ($t_{pH4,5}$) por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*. Adição de inulina (g g^{-1}): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□).

pH e acidez

A Tabela 03 apresenta os resultados de pós-acidificação e acidez do leite fermentado por *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em co-cultura com *S. thermophilus*. Os valores de pH variaram de 4,32 (St-La/M) a 4,48 (St-Lr/M) em 1 dia após a fermentação (D1), e de 4,15 (St-La/SM4) a 4,37 (St-La/M) após 7 dias (D7).

Na média, houve um decréscimo de 0,14 upH após 7 dias de armazenamento a 4°C. Usando-se as co-culturas St-Lb e St-La, a pós-acidificação foi maior no leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}, enquanto houve uma grande acidificação no leite suplementado com 1 g de inulina.100 g^{-1} com o uso das co-culturas St-Lr e St-Bl.

BIROLLO *et al.* (2000) observaram que o pH do leite fermentado era inicialmente 4,7, diminuindo para 4,25 após 45 dias. A suplementação do leite com a inulina provocou uma maior pós-acidificação para todas as co-culturas, o qual pode ser explicado através do efeito da proteína não nitrogenada, que

estimula a atividade metabólica durante o armazenamento a frio (DAVE; SHAH, 1998; BÉAL *et al.*, 1999).

Após D1, a acidez variou de 0,81 (St-Bl/M) a 1,03 g.100g^{-1}de ácido lático (St-La/SM2). Quando foi usada a co-cultura St-Lb, a quantidade de ácido lático aumentou com o aumento da concentração de inulina na formulação, mas somente o maior teor de inulina (4 g.100 g^{-1}) produziu uma diferença significativa. Com a co-cultura St-La, a adição de 2 g.100 g^{-1} de inulina causou uma maior produção de ácido lático, em comparação com todas as outras co-culturas. Com a co-cultura St-Lr, a maior produção de ácido lático (0,94 g.100 g^{-1}) foi obtida com 1 g.100 g^{-1}.

Os valores mais baixos de ácido lático foram encontrados quando a co-cultura St-Bl foi utilizada, variando de 0,81g.100 g^{-1} de ácido lático em MI a 0,86 g.100 g^{-1} em SM1; esta diferença foi significativa. A produção de ácido lático foi sempre maior após sete dias a fermentação (D7) que após D1, variando de 0,9 g.100 g^{-1} (St-Lr/M) a 1,20 g.100 g^{-1} de ácido lático (St-La/SM2). O principal valor de produção de ácido lático foi 0,13 g.100 g^{-1} (Tabela 03). Özer *et al.* (2005) observaram uma produção de ácido lático variando de 0,99 a 1,18 g.100 g^{-1} após um dia de fermentação, e de 1,33 a 1,58 g.100 g^{-1} após 14 dias de armazenamento, que é semelhante aos valores encontrados no presente trabalho.

Contagens das bactérias probióticas

A Figura 09 ilustra as contagens de bactérias probióticas (*L. bulgaricus, L. acidophilus, L. rhamnosus* e *B. lactis*) e *S. thermophilus* (St) em leite fermentado suplementado ou não com inulina após 24h (D1) e sete dias (D7) de fermentação.

As contagens de *S. thermophilus* após 1 dia da fermentação variou de 8,67 (St-Bl) para 9,45 logUFC.mL^{-1}(St-Lr) em SM1, sem diferenças significativas entre as culturas (Figura 09a). Após 7 dias da fermentação, as contagens variaram de 8,18 (St-Bl) a 9,42 logUFC.mL^{-1}(St-Lr) com diferenças significativas entre eles (Figura 09b). Em média, a adição de 4 g.100 g^{-1} de inulina resultando em um decréscimo 0,40 logUFC.mL^{-1}para a cultura La e 0,69 logUFC.mL^{-1}para Lr.

Tabela 03. Pós-acidificação e acidez do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (St)

Leite	Co-cultura	pH		Acidez (mg de ácido lático g^{-1})	
		D1	D7	D1	D7
M	St-Lb	$4,41^{fg}$	$4,25^{fg}$	$8,3^{ab}$	$10,1^{ef}$
M	St-La	$4,32^{a}$	$4,22^{cde}$	$10,2^{hi}$	$11,6^{g}$
M	St-Lr	$4,48^{k}$	$4,37^{j}$	$8,9^{cd}$	$9,0^{a}$
M	St-Bl	$4,44^{ij}$	$4,25^{efg}$	$8,1^{a}$	$10,0^{cdef}$
SM1	St-Lb	$4,37^{de}$	$4,22^{cde}$	$8,4^{ab}$	$10,1^{def}$
SM1	St-La	$4,35^{bc}$	$4,24^{ef}$	$9,9^{gh}$	$11,7^{g}$
SM1	St-Lr	$4,39^{ef}$	$4,32^{h}$	$9,4^{ef}$	$9,7^{bc}$
SM1	St-Bl	$4,40^{fg}$	$4,23^{def}$	$8,6^{bc}$	$10,2^{f}$
SM2	St-Lb	$4,41^{fg}$	$4,21^{bcd}$	$8,4^{ab}$	$9,6^{b}$
SM2	St-La	$4,34^{abc}$	$4,20^{bc}$	$10,3^{i}$	$12,0^{h}$
SM2	St-Lr	$4,46^{jk}$	$4,36^{ij}$	$9,1^{de}$	$9,0^{a}$
SM2	St-Bl	$4,42^{gh}$	$4,25^{fg}$	$8,4^{ab}$	$10,2^{ef}$
SM4	St-Lb	$4,33^{ab}$	$4,18^{b}$	$9,1^{de}$	$9,8^{bcde}$
SM4	St-La	$4,35^{cd}$	$4,15^{a}$	$9,7^{fg}$	$12,4^{i}$
SM4	St-Lr	$4,41^{g}$	$4,34^{hi}$	$9,1^{de}$	$9,7^{b}$
SM4	St-Bl	$4,44^{hi}$	$4,27^{g}$	$8,3^{ab}$	$9,8^{bcd}$

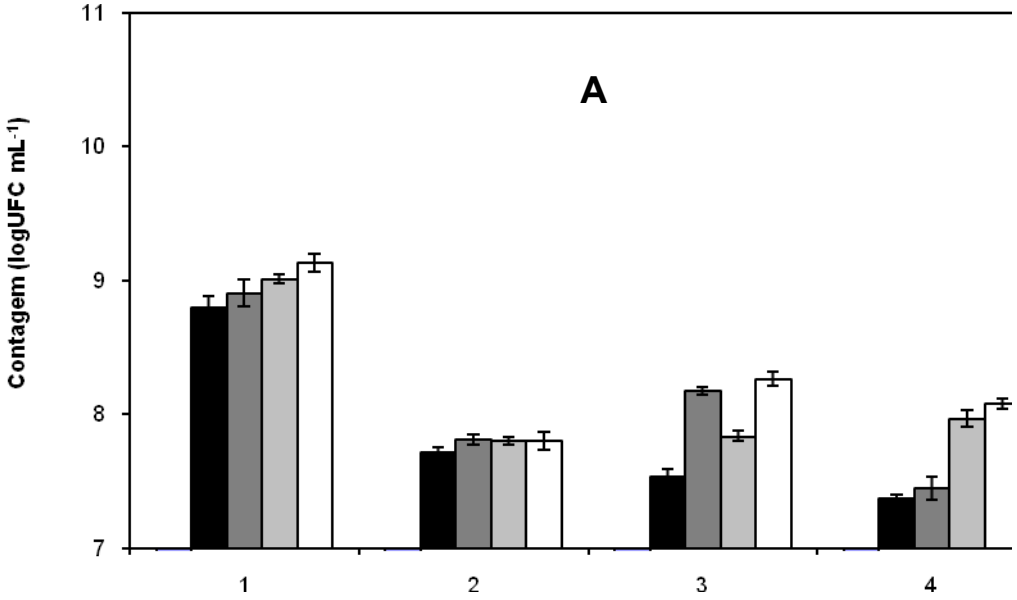
M: Leite não suplementado; SM1: Leite suplementado com 0,01 g de inulina g^{-1}; SM2: Leite suplementado com 0,02 g de inulina g^{-1} ; SM4: Leite suplementado com 0,04 g de inulina g^{-1}.
D1: após 24 h de fermentação do produto a 4°C.
D7: após 7 dias de armazenamento do produto a 4°C.
Valores com diferentes letras na mesma coluna mostram diferenças significativas ($P < 0,05$).

Birollo *et al.* (2000) observaram que *S. thermophilus* permaneceram em condições viáveis (~ 10^9 logUFC.mL^{-1}) após 40 dias de armazenamento a 6°C. As contagens de *Lactobacillus bulgaricus* atingiram 10^8 logUFC.mL^{-1} nos 10 primeiros dias, sob as mesmas condições de armazenamento, e após 45 dias, as contagens continuavam a ser ~ 10^7 logUFC.mL^{-1}. Lucas *et al.* (2004) observaram que a adição de hidrolisado de proteína incrementou as contagens de *S. thermophilus* e acidificação, reduzindo o tempo de fermentação e o crescimento das bactérias probióticas *(L. acidophilus* e *L. rhamnosus).* O tempo de fermentação foi mais curto quando o hidrolisado de proteína foi adicionado; afetando o crescimento das bactérias probióticas, levando a um crescimento mais lento comparado com o *S. thermophilus,* semelhante aos resultados encontrados por Dave e Shah (1998).

Após D1, as contagens dos probióticos variaram de 7,37 (St-Lr / M) a 9,13 logUFC.mL^{-1} (St-Bl/SM4). Houve um crescimento significativo de St-Lb no leite suplementado com inulina. Comparado ao controle, o crescimento de La no leite suplementado com inulina foi significativamente maior. No entanto, nenhum aumento significativo nas contagens de Lr no leite suplementado com 1 g.100 g^{-1} de inulina foi observada; entretanto, as mudanças foram significativas quando 2 e 4 g.100 g^{-1} de inulina foram adicionadas. De fato, a inulina também aumentou significativamente a viabilidade de Bl, demonstrando o efeito bifidogênico por ela causada (Figura 09).

Özer *et al.* (2005) compararam o efeito de 0,5g.100 g^{-1} a 1 g.100 g^{-1} de inulina e 0,25g.100g^{-1} a 2,5g.100 g^{-1} de lactulose no crescimento de *L. acidophilus* e *B. bifidum*. Tanto inulina e lactulose não influenciaram no crescimento de St-Lb, enquanto estes dois ingredientes estimularam o crescimento de *B. bifidum*. A lactulose aumentou o crescimento das bactérias probióticas mais do que a inulina; e este último não estimulou o crescimento de La.

Em D7, a viabilidade das bactérias probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis* diminuiu de ~ 0,04 e ~ 0,15 logUFC.mL^{-1}, respectivamente. No entanto, as contagens permaneceram estáveis para as culturas de *L. rhamnosus e L. bulgaricus*. A suplementação do leite fermentado com a inulina influenciou na sobrevivência das bactérias probióticas (Figura 10).



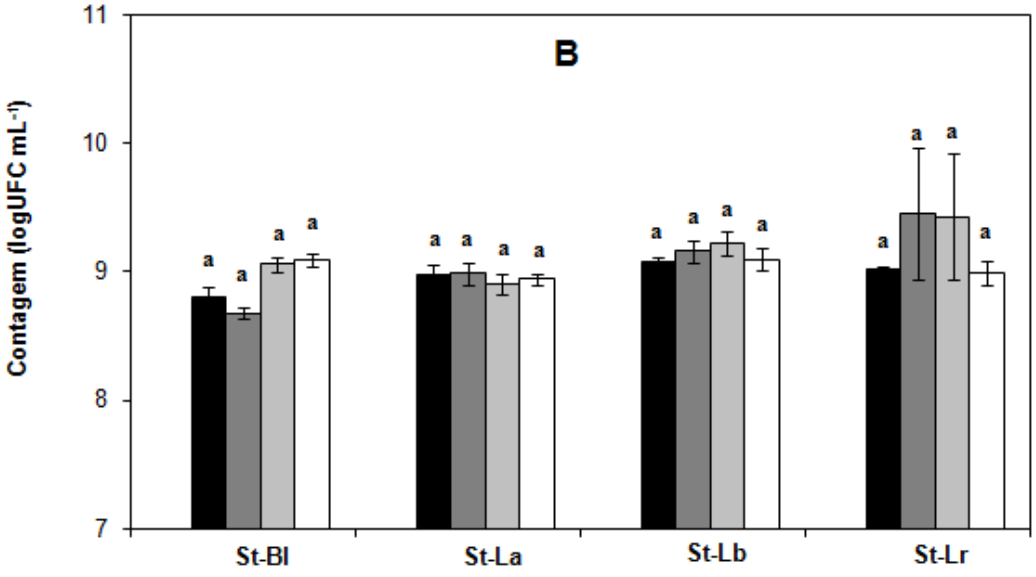


Figura 09. Efeito da adição de inulina na contagem bacteriana de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 24 h de armazenamento do produto a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□). A: Contagem das bactérias probióticas. B: Contagem de *S. thermophilus*.

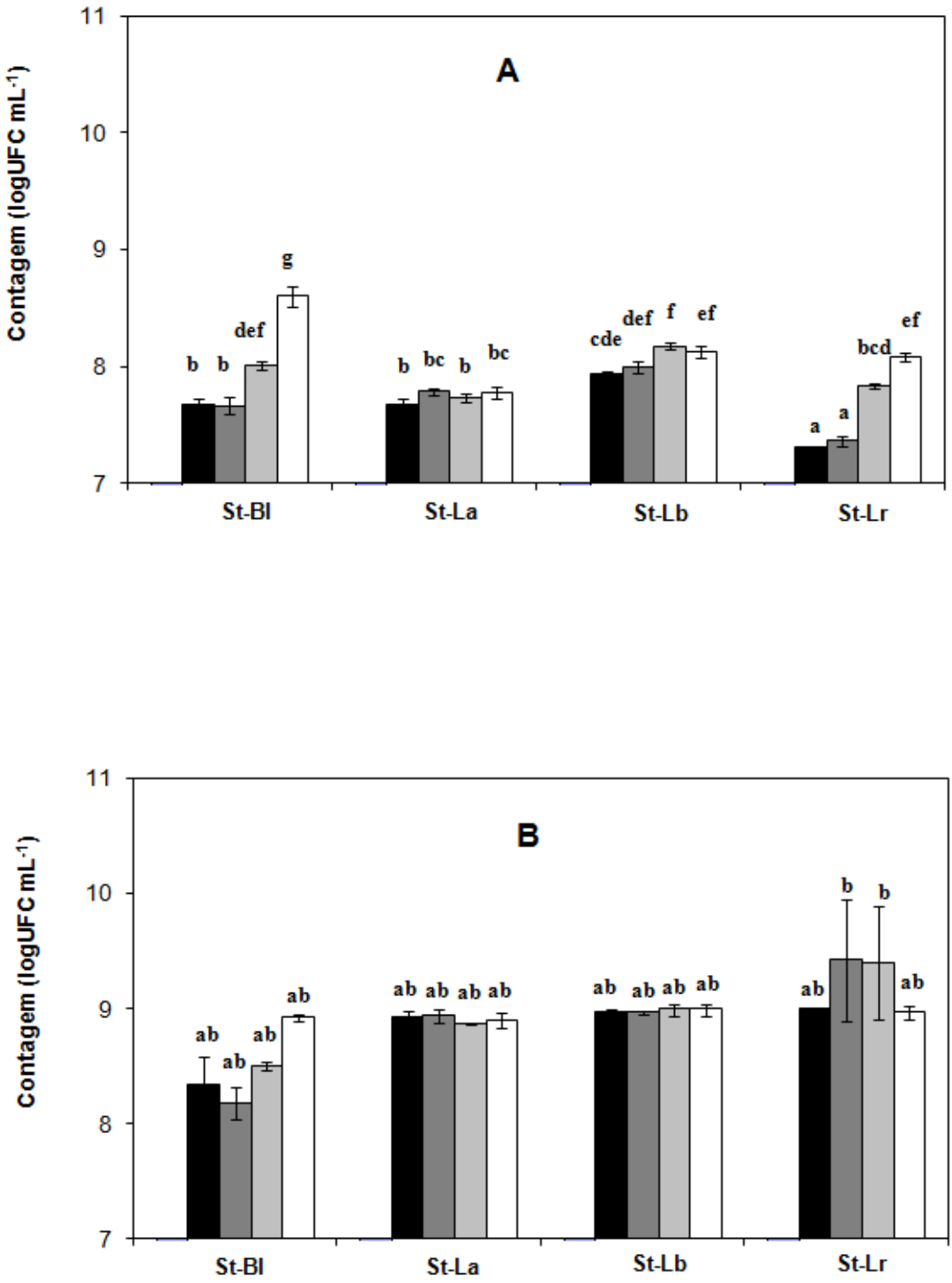


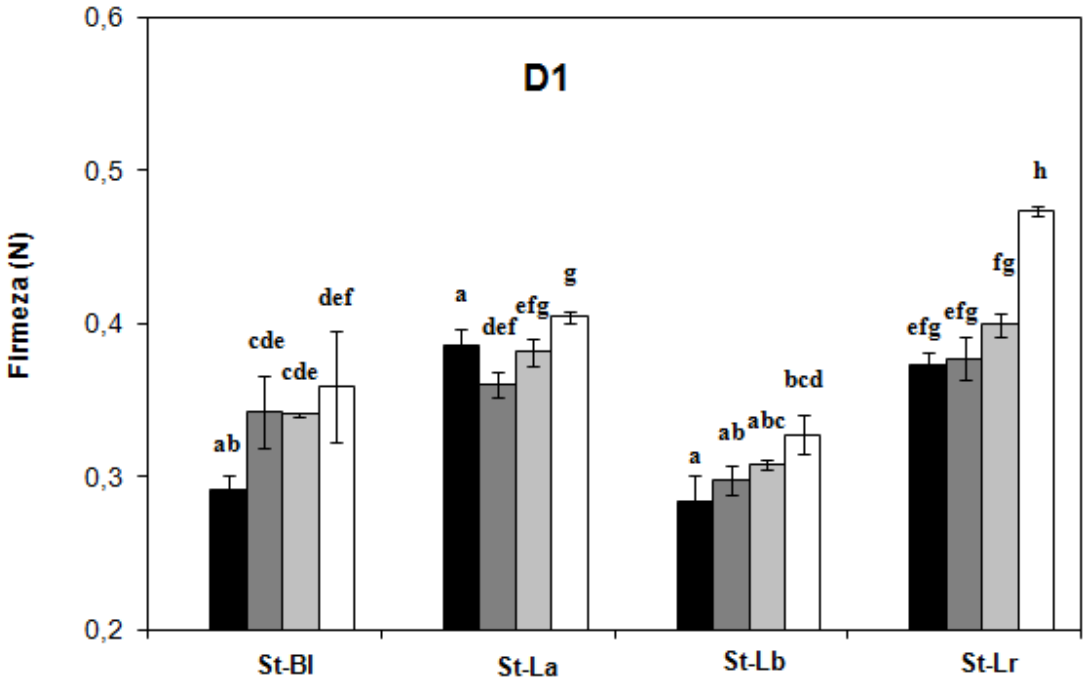
Figura 10. Efeito da adição de inulina na contagem bacteriana de *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 7 dias de armazenamento do produto a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04 (□). A: Contagem das bactérias probióticas. B: Contagem de *S. thermophilus*.

De acordo com Akin *et al.* (2007), a adição de inulina influenciou nas contagens de St e Lb, enquanto para La e Bl a viabilidade foi aumentada com o uso desta fibra. Em sorvetes, as contagens de La e Bl alcançou 10^5 CFU.mL^{-1} depois de 90 dias de armazenamento; quando a inulina foi adicionada, este decréscimo foi mais lento (10^6 logUFC.mL^{-1}). Lucas *et al.* (2004) observaram que as contagens de *L. rhamnosus* não foram significativamente afetadas pela adição de hidrolisado de proteína. As contagens de La diminuiram mais rapidamente que as contagens de Lr, ambos foram maiores com a suplementação. A adição deste ingrediente tem um forte efeito no tempo de fermentação e na pós-acidificação.

Firmeza

A firmeza do iogurte e do leite fermentado está diretamente associada ao teor de sólidos totais (PENNA *et al.*, 1997; DAVE; SHAH 1998; TRACHOO; MISTRY 1998; TAMIME, 2005), e com o tipo de proteína (CHO *et al.*, 1999; TAMIME, 2005) . No presente estudo, o teor de sólidos totais variaram de 0,132 a 0,156 g.g^{-1}, e a e a quantidade de proteína no leite foi, em média, 40,5 mg.g^{-1}.

Após D1, firmeza variou de 0,28 (St-Lb/M) a 0,47 N (St-Lr/SM4), enquanto em D7, aumentou, em média, ~0,06 N quando comparado ao D1, variando de 0,33 (St-Lb / M) a 0,54 N (St-Lr/SM4). Isto significa que a suplementação do leite com inulina aumentou a firmeza de todos os produtos em questão (Figura 11), bem como relatado por Martin *et al.* (1999) e Oliveira *et al.* (2001).



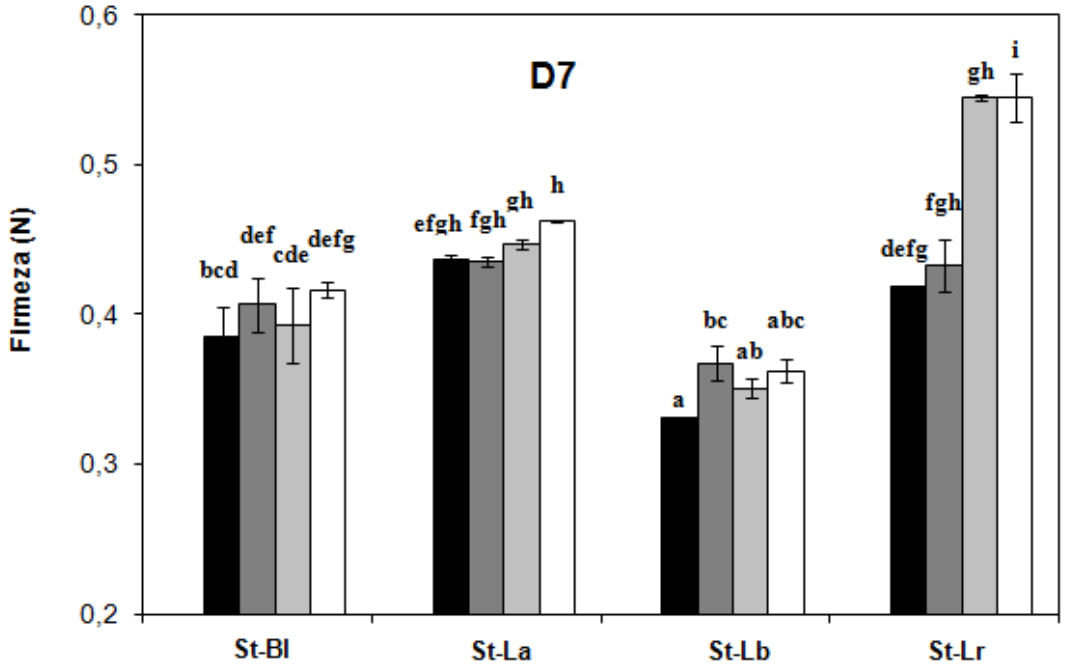


Figura 11. Efeito da adição de inulina na firmeza do leite fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* (St-Lb), *Lactobacillus acidophilus* (St-La), *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) e *Bifidobacterium lactis* (St-Bl) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* após 1 dia de fermentação e 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C. Adição de inulina ($g.g^{-1}$): 0 (■); 0,01 (■); 0,02 (■); 0,04.

De acordo com Damin *et al.* (2006), a firmeza em marcas comerciais de iogurtes no Brasil varia de 0,32 a 0,79 N a 5°C. Segundo Oliveira *et al.* (2001), a suplementação de leite (com hidrolisado de caseína, soro e proteínas do leite) e a composição de cultura afetam diretamente a firmeza do produto final.

4.5 Conclusões

- A inulina influenciou significativamente a cinética de acidificação das culturas probióticas no leite;
- A taxa máxima de acidificação aumentou com o teor de inulina; a suplementação do leite com 4 g.100 g^{-1} de inulina reduziu o tempo de fermentação de *S. thermophilus* e *L. rhamnosus*, em co-cultura;
- A adição de inulina resultou em uma maior pos-acidificação em todas as co-culturas estudadas;
- As contagens dos probióticos foram superiores a 7,37 logUFC.mL^{-1}; a inulina causou um efeito bifidogênico, *in vitro*, estimulando o crescimento de *B. lactis* e aumentou a viabilidade dos microrganismos probióticos; em *B. lactis* esse parâmetro foi mais evidenciado. As contagens permaneceram praticamente estáveis após 7 dias de armazenamento a 4°C;
- A suplementação do leite com a inulina resultou uma maior firmeza do leite fermentado probiótico.

CAPÍTULO V

5. EFEITO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS SOBRE A CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO, SOBREVIVÊNCIA DE PROBIÓTICO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE FERMENTADO SIMBIÓTICO DESNATADO[2]

5.1 Resumo

Os efeitos simultâneos das diversas co-culturas binárias de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* com *Streptococcus thermophilus* e de diferentes prebióticos sobre a produção do leite fermentado foram investigadas. Em particular, foram determinados e comparados a cinética de acidificação do leite, tanto na ausência como presença de 4% (w/w) de maltodextrina, oligofrutose e polidextrose, bem como a sobrevivência dos probióticos, composição química (pH, lactose, ácido lático e conteúdo de proteínas), perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado (CLA) do leite fermentado após armazenamento a 4°C por 24 h. A qualidade do leite fermentado foi fortemente influenciada tanto pela composição da co-cultura quanto pelos diferentes prebióticos. Dependendo da co-cultura, a adição de prebiótico no leite influenciou os parâmetros cinéticos acidificação. Todas as contagens de probióticos foram estimuladas pela oligofrutose e polidextrose, e entre estes *B. lactis* exibiu as maiores contagens em todas as amostras de leite suplementadas. A adição de polidextrose levou a maior pós-acidificação. Embora o conteúdo dos principais ácidos graxos fosse apenas pouco influenciado, as maiores quantidades de ácido linoléico conjugado (38% superior ao do controle) foram encontrados no leite fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* - *L. acidophilus* e suplementado com maltodextrina.

---

[2] OLIVEIRA, R. P. S.; FLORENCE, A.C.R.; SILVA, R. C.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. ***International Journal of Food Microbiology,*** v.128, p.467-472, 2009. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.012. [Fator de Impacto: 2,753].

5.2 Introdução

Atualmente, os consumidores estão cada vez mais atentos e informados com relação às propriedades que os alimentos oferecem, tais como, sabor agradável, baixo valor calórico e baixo teor de gordura além dos efeitos benéficos para a saúde. Dentro deste contexto, a indústria alimentar tem buscado oferecer produtos com melhor sabor e aparência. Além disso, os produtos lácteos funcionais cumprem estes requisitos, ou seja, proporcionam benefícios para a saúde, os quais são reforçados com a adição de probióticos, assim como por certos tipos de fibras solúveis conhecidos como prebióticos. As quantidades estabelecidas para fibras alimentares são de pelo menos 3-6% (w/w) em alimentos sólidos e 1,5-3% (w/w) em alimentos líquidos (ANVISA, 2002).

Os probióticos têm sido definidos de várias maneiras, dependendo dos seus efeitos sobre a saúde e o bem-estar aos seres humanos. Esses microorganismos são suplementos microbianos vivos alimentos que melhoram a população microbiana intestinal do hospedeiro. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na utilização de microrganismos probióticos na indústria de laticínios. Os produtos foram desenvolvidos e estão no mercado mundial (ANAL; SINGH, 2007). Para produzir os benefícios desejados, bactérias probióticas devem estar presentes no produto em contagens viáveis durante toda a sua vida-de-prateleira. Kurmann e Rasic (1991) recomendaram que a dose mínima capaz de garantir o efeito terapêutico deve variar entre 7 e 9 logUFC.mL^{-1}. Embora este nível não seja bem estabelecido, deve variar de acordo com as estirpes utilizadas. Outros pesquisadores sugeriram contagens no intervalo de 7-8 logUFC.mL-1 UFC/mL (DAVE; SHAH, 1997), que pode ser alcançado aplicando doses diárias de 100 mL de produtos lácteos contendo 7 logUFC.mL^{-1} de bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que atuam beneficamente sobre o hospedeiro, porque estimulam seletivamente a proliferação ou a atividade das populações bacterianas que são desejáveis ao cólon (MATTILA-SANDHOLM *et al.,* 2002).

Os prebióticos mais importantes são inulina e oligofrutoses, que são fibras solúveis e fermentescíveis (GIBSON *et al*., 2004). Estas substâncias são denominados frutanos e não podem ser digeridas pela α-amilase ou outras hidrolases na parte superior do trato intestinal (CARABIN; FLAMM, 1999). Inulina e outros fructo-oligossacarídeos são freqüentemente empregados em estudos como resistência à digestão pelo ácido gástrico e enzimas pancreáticas *in vivo* (CUMMINGS *et al.,* 2001). Os oligossacáridos em geral podem servir como agentes prebióticos e também suprimem as bactérias potencialmente deletérias presentes na microbiota gastrointestinal (KAJIWARA *et al.,* 2002). Na maioria dos casos, o aumento do número de *Bifidobacterium* spp. na microbiota intestinal tem sido o principal foco de ação de prebióticos (AKALIN *et al.,* 2004, GIBSON *et al.,* 2004), embora também lactobacilos, que merecem atenção devido ao seu efeitos de promoção da saúde. A inulina é principalmente aplicada para obter produtos com baixo teor de gordura, enquanto oligofrutoses são empregados em preparados de frutas com baixas calorias, tais como em iogurtes, bem como para equilibrar a doçura e mascarar o sabor residual do edulcorante utilizado em preparações alimentícias (NINESS, 1999).

A polidextrose é um polissacarídeo da glicose com teor calórico de 1 kcal/g (ACHOUR *et al.,* 1994). Todas as possíveis ligações glicosídicas presentes são: α e β 1-2, 1-3, 1-4 e 1-6, entre os quais as ligações 1-6 são predominantes. Possui um de grau de polimerização médio (DP) de 12 e um peso molecular médio de 2000 $g.moL^{-1}$ (FLOOD *et al.,* 2004). O baixo teor de calorias da polidextrose é um resultado da sua má digestibilidade no intestino delgado e incompleta fermentação no intestino grosso. Esta propriedade tem levado à aceitação de polidextrose como uma fibra alimentar em muitos países (CRAIG *et al.,* 1999).

As maltodextrinas têm propriedades físicas bem definidas e, ao contrário dos amidos naturais, são solúveis em água, propriedade esta que as popularizou como aditivo na indústria alimentar. Estas são aplicadas, por exemplo, através de aspersão como veículos de sabores e temperos, transportadores de adoçantes sintéticos, potenciadores de sabor e substitutos de gordura. Além disso, maltodextrinas também foram usadas como modelo alimentar, pois apresentam uma ampla distribuição de massa molecular entre oligossacarídeos e polissacarídeos (JAYA; DAS, 2004).

Produto simbiótico tem sido definido como uma mistura de probióticos e prebióticos que tem efeito positivo sobre o hospedeiro, melhorando a sobrevivência dos microorganismos benéficos do trato gastrointestinal, por estimular seletivamente o crescimento e/ou ativar o metabolismo de uma ou um número limitado de bactérias promotoras de saúde (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O ácido linoléico conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros geométricos de ácidos octadecadienóicos (C18:2) com ligações duplas conjugadas, o qual ganhou uma atenção considerável devido aos seus potenciais efeitos biológicos benéficos. Estudos com animais modelos têm demonstrado que o consumo de CLA inibe o início de carcinogênese (DEVERY *et al*., 2001), reduz teor de gordura corporal e aumenta a massa muscular (CHIN *et al*., 1992), diminui aterosclerose (NICOLOSI *et al.,* 1997), melhora a hiperinsulinemia (HOUSEKNECHT *et al.,* 1998), reforça o sistema imunológico (MILLER *et al.,* 1994) e altera a taxa de colesterol de lipoproteínas de baixa densidade/lipoproteínas de alta densidade (LEE *et al.,* 1994). Existem muitos estudos sobre a produção de CLA por culturas láticas (KIM; LIU, 2002; SIEBER *et al.,* 2004), mas apenas poucos esforços têm sido feitos sobre os efeitos da adição de prebióticos sobre o teor de CLA em alimentos lácteos (AKALIN *et al.*, 2007).

Com base neste contexto, oligofrutoses, polidextrose e maltodextrina aparecem como importante ingrediente alimentar que devem ser exploradas para produção de alimentos funcionais. No entanto, diversas questões microbiológicas têm que ser resolvidas para se poder avançar no campo. Por comparação dos comportamentos dos diferentes probióticos (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis*) em co-culturas binárias com *Streptococcus thermophilus*, o presente estudo visa contribuir para o conhecimento: a) dos efeitos sinérgicos entre estes probióticos; b) dos efeitos prebióticos da maltodextrina, polidextrose e oligofrutose sobre probióticos; c) das características do leite fermentado simbiótico; d) da cinética de acidificação do leite suplementado com 4% (w/w) de prebióticos; e) da sobrevivência dos probiótico e da composição química do produto (pH, lactose, proteína e teor de ácido lático); f) do perfil de ácidos graxos e conteúdo de CLA do leite fermentado após estocagem a 4°C por 24 h.

5.3 Material e métodos

Preparação das culturas

Cinco culturas comerciais liofilizadas (Danisco, Sassenage, França), foram utilizadas neste estudo, especificamente microorganismos do iogurte *Streptococcus thermophilus* TA040 (ST) e *Lactobacillus* delbrueckii subsp. *bulgaricus* LB340 conhecido como *L. bulgaricus* (LB) e os probióticos *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr), e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL 04 denominado *B. lactis* (BL). A Tabela 04 mostra as principais características das estirpes selecionadas.

As referidas estirpes foram quantificadas para obter contagens iniciais de 10^6 UFC/mL. As pré-culturas foram inoculadas em 50 mL de leite desnatado esterilizado (121° por 15 min), e posteriormente foram ativadas a 42°C durante 15 minutos antes do emprego.

Preparação do leite

O leite comercial desnatado em pó (Molico, Nestlé, Brasil) foi diluído em água destilada para obter 13% (w/w) de sólidos totais e suplementada com 4% (w/w) de maltodextrina (Fibersol®, Matsutani Indústria Química, Hyogo, Japão), ou oligofrutose (Beneo™, Clariant, São Paulo, Brasil) ou polidextrose (Litesse®, Danisco, São Paulo, Brasil). Os leites não-suplementados foram usados como controle. O leite foi submetido a tratamento térmico até alcançar 85°C e, em seguida, foi mantida a esta temperatura durante 15 minutos e, posteriormente resfriada em banho de gelo a 10°C.

Fermentações

Após a inoculação, os leites foram incubados a 42°C para a realização da fermentação em banho-maria controlado termostaticamente até a obtenção do pH 4,5. Cada fermentação foi realizada em quadruplicata e monitorada usando o sistema Cinac (*Cinétique d'acidification*) (Ysebaert, Frépillon, França). Ao atingir o pH 4,5, as fermentações foram interrompidas manualmente agitando o coágulo, através de um bastão acoplado a um disco perfurado em aço inoxidável, por 80 s. O produto fermentado foi colocado em copos de polipropileno com capacidade de 50 mL de volume, selado termicamente utilizando o Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil), e, posteriormente resfriado em gelo e armazenadas a 4ºC.

Tabela 04. Características das estirpes empregadas na produção de leite desnatado fermentado simbiótico (LAMMERS *et al*., 2003; FOLIGNE *et al*., 2007; BURNS *et al.,* 2008).

Características	***Lactobacillus acidophilus*** LAC4	***Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*** LB340	***Lactobacillus rhamnosus*** LBA	***Bifidobacterium lactis*** BL04	***Streptococcus thermophilus*** TA040
Fermentação de lactose	+	+	-	+	+
Isômeros de ácido lático	DL	D	L	L	L
Crescimento 15-45 (°C)	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+
Tolerância a sais biliares	****	–	***	****	****
Tolerância a acidez	****	–	****	****	*
Resistência a pepsina	***	–	***	–	–
Resistência a pancreatina	***	–	***	–	–
Produção de Exopolysacarídeos	–	–	–	–	*
Adesão a mucosa intestinal	HT-29: **** Caco-2: ***	HT-29: * Caco-2: *	HT-29: **** Caco-2: ****	HT-29: *** Caco-2: ***	HT-29: *** Caco-2: ****
Efeitos benéficos	Inibe patógenos comuns, melhora a resposta imune específica (estudo clínico em humanos); influencia a indução de IL-2 e moderada indução de fatores de necrose tumoral *(in vitro).*	Coloniza e adere ao cólon e reforça a função de barreira da mucosa intestinal, ajudando no tratamento de infecções intestinais e alergias alimentares.	Aumenta a indução de IL-10 *(in vitro);* propriedades anti-inflamatórias como a protecção contra TNBS-induced colitis induzida (modelo animal).	Mantém e restaura a microbiota após o tratamento antibiótico, melhora a resposta imune específica (estudo clínico em humanos); induz a IL-10 *(in vitro),* protege contra a inflamação (modelo animal).	Aumenta a indução de IL-10 *(in vitro);*

**** excelente; *** muito bom; ** bom; * suficiente.

Parâmetros cinéticos

A taxa de acidificação (V_{max}) foi calculada através da variação do tempo e pH (dpH/dt) e expressa como unidades de $pH.min^{-1}$. Ao final da incubação, os seguintes parâmetros cinéticos também foram calculados: (i) t_{max} (h), tempo em que foi atingido V_{max}, (ii) $t_{pH5.0}$ (h), tempo para atingir o pH 5,0, e (iii) t_f (h), tempo para completar a fermentação.

Composição química

A pós-acidificação do leite fermentado foi determinada após 1 dia de armazenamento a 4°C utilizado um equipamento de medição do pH modelo Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brasil). A acidez, expressa em mg de ácido lático por g, foi avaliada por titulação usando uma solução de NaOH 0,11 N de acordo com a metodologia n. 907.124, da ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1995).

O teor de proteína e de sólidos totais do leite fermentado foram determinados por um analisador ultra-sônico Ekomilk (Eon Trading, Bulgária). O conteúdo de lactose foi determinado por titulação utilizando uma solução Fehling. Todas as análises de composição do leite foram realizadas em duplicata.

Contagens

A contagem das culturas iniciadoras e dos probióticos foram feitas em triplicada depois da fermentação. Nas amostras (1,0 mL) foram adicionados 9,0 mL de água peptonada estéril a 0,1% e, em seguida, foram feitas diluições apropriadas. Posteriormente, St e Lb foram plaqueadas em meio M17 e em ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), previamente acidificada a pH 5,4 através da adição de ácido acético, respectivamente, e incubados a 37°C por 48 h (DAVE; SHAH, 1996). La, Lr e Bl foram enumerados em meio de cultura MRS com a adição de

10 $\mu L.mL^{-1}$ de clindamicina (pH 6,2), RCA adicionado com 1 $\mu L.mL^{-1}$ de dicloxacilina (pH 7,1) e MRS com 0,5 $\mu L.mL^{-1}$ de vancomicina (pH 6,2), respectivamente, seguidos de incubação anaeróbica a 37°C por 72 h.

Os meios de cultura M17 e MRS (pH 5,4) foram preparados de acordo com Dave e Shah (1996). Os meios de cultura MRS com a adição de clindamicina e vancomicina foram preparados de acordo com Lankaphuthra e Shah (1996) e Tharmaraj e Shah (2003), respectivamente.

As condições anaeróbias foram asseguradas pela utilização de AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As unidades formadoras de colônia (UFC) foram enumeradas em placas contendo de 30 a 300 colônias, e a concentração celular foi expressa como $logUFC.mL^{-1}$ de leite fermentado. A selectividade dos meios de cultura foi confirmada por exame microscópico das colônias.

Extração de lipídios e análise de ácido linoléico conjugado

Os lipídios foram extraídos dos leites frescos, iogurtes e leites fermentados de acordo com o método ISO:14156:2001 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2001). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram preparados por esterificação, segundo o método ISO:15884:2002 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002).

As análises dos EMAG foram realizadas em cromatógrafo gasoso, modelo 3400CX (Varian, São Paulo, Brasil), equipado com detector de ionização de chama e um pacote de *software* para sistema de controle e aquisição de dados (modelo Star Chromatography Workstation versão 5.5).

Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida Chrompack CP-Wax 52CB (ChromTech Apple Valley MN. EUA), com 30 metros de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e contendo 0,25 µm de polietilenoglicol dentro da coluna, utilizando como gás de arraste o hélio, com vasão de 1,5 $mL.min^{-1}$ e razão de *split* de 50:1. A temperatura do injetor foi fixada em 250°C e do detector em 280°C. A temperatura da coluna foi inicialmente fixada em 75°C por 3 min, programada até 150°C, numa razão de 37,5$°C.min^{-1}$, e novamente programada até 215°C a 3$°C.min^{-1}$.

Amostras de 1 µL foram injetadas manualmente com tempo de injeção de cerca de 2 segundos. A composição qualitativa das amostras foi determinada por comparação dos tempos de retenção dos picos com os respectivos padrões de ácidos graxos. A composição quantitativa foi realizada por normalização de área, sendo expressa como porcentagem em massa, de acordo com o método oficial Ce 1-62 (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, 1998). Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo os resultados expressos como valores médios.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o software Statistica 6.0. Os valores foram comparados usando o teste de Tukey (Sokal e Rohlf, 1979) a $P < 0,05$, e a diferentes letras foram usadas para identificar as diferenças estatísticas entre eles.

5.4 Resultados e discussão

Cinética de fermentação

Os resultados da cinética das fermentações realizados com as selecionadas co-culturas suplementadas com três diferentes prebióticos, especificamente maltodextrina, polidextrose e a oligofrutose, são comparadas na Tabela 05 com as co-culturas controle o qual não foi suplementada com os prebióticos. Deve ser notado que, para cada prebiótico, bem como para o controle, 87 e 75% das variações de uma co-cultura com as demais foram estatisticamente significativas para V_{max} e t_f, respectivamente, mas apenas 42% para ambos os t_{max} e $t_{pH5,0}$.

No que diz respeito aos ensaios realizados na ausência de prebióticos (controles), os valores de V_{max} observados neste estudo com todas as binárias co-culturas são praticamente coincidentes com os obtidos por Almeida *et al.* (2009)

com St-La em pH 4,5 (16,3 x 10^{-3} upH/min) e pouco mais elevados do que aqueles obtidos com St-Lr em pH 5,5 (12,3 x 10^{-3} pH unidades/min), quando 12 % (w/w) de soro de leite foi usado. O tempo de fermentação da co-cultura binária St-Lr (t_f = 10,59 h) foi de cerca de 1 h menor do que o relatado por aqueles autores que utilizaram soro de leite, que pode ser justificada pela variação da atividade de acidificação de LAB relacionada com a sua aptidão específica para assimilar os compostos nutritivos do meio (BADIS *et al.,* 2004).

Os dois prebióticos, cuja suplementação acelerou a acidificação foram oligofrutose e polidextrose, mostrando V_{max} aumentou em de 39 e 20%, respectivamente, enquanto reduziram em 5,5 % os valores de t_{max}. Entretanto, estes dois prebióticos puderam quase que igualmente acelerar as fermentações, apresentando reduções de t_f por cerca de 30% e de $t_{pH5,0}$ por cerca de 16%, em comparação ao controle. Por outro lado, maltodextrina apresentou a menor variação, comportando, por conseguinte, como o prebiótico menos eficiente no que diz respeito a estes parâmetros.

Outra comparação interessante pode ser feita usando-se o raciocínio inverso, ou seja, reunindo as variações induzidas por todos os prebióticos, assim como evidenciar uma possível influência significativa das diferentes co-culturas sobre os parâmetros cinéticos. Nesta base, St-Bl foi a co-cultura mais lenta em termos de acidificação e St-Lb a mais rápida em termos de uma fermentação.

Oliveira *et al.* (2009) recentemente relataram um efeito semelhante com o utilizo da inulina, que reduziu em cerca de 10% o tempo de fermentação das diferentes co-culturas binárias tomado como média, confirmando assim o seu efeito prebiótico já evidenciado por outros autores para ambos bifidobacteria (AKALIN *et al*., 2004; DONKOR *et al.,* 2007) e lactobacilos (DONKOR *et al.,* 2007).

Estes resultados como um todo, não só confirmam que St-Lb é o melhor co-cultura para a preparação iogurte, mas também que a alternativa de probióticos empregados neste estudo (La, Lr, e Bl) seria capaz de garantir resultados satisfatórios em termos de acidificação e tempo de fermentação. Este resultado é de particular importância para Lr, que é menos investigada como um probiótico alternativo na preparação de leite fermentado (TANNOCK *et al.,* 2000; THARMARAJ; SHAH, 2003; CAPELA *et al.,* 2006). Além disso, oligofrutose e,

também a polidextrose mostraram acelerar significativamente a acidificação ou a fermentação, o que demonstra que prebióticos podem ser usados para melhorar a produção de iogurtes. Estes resultados aparecem para confirmar o efeito prebiótico da polidextrose realçada por Jie *et al.* (2000) e Probert *et al.* (2004), que, em desacordo com as observações de Ghoddusi *et al.* (2007), alegou que polidextrose parecia não mostrar quase nenhuma seletividade para bifidobacteria e lactobacilos/enterococos quando utilizado isoladamente ou misturado com outros carboidratos.

Tabela 05. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado desnatado suplementado com 4% (w/w) de maltodextrina, polidextrose ou oligofrutose por *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) or *B. lactis* (St-Bl)*

Prebiótico	Co-cultura	V_{max} (10^{-3} pH units/min)[A]	t_{max}(h)[B]	$t_{pH5.0}$ (h)[C]	t_f (h)[D]
Control[E]	St-La	16,11± 0,15[b]	3,25±0,03[fgh]	4,65±0,11[f]	9,92±0,21[h]
Control	St-Lb	17,87±0,01[d]	3,03±0,05[bc]	3,68±0,07[abc]	5,47±0,14[b]
Control	St-Lr	16,51±0,01[c]	3,18±0,07[def]	4,60±0,24[f]	10,59±0,30[i]
Control	St-Bl	15,49±0,24[a]	3,24±0,09[efgh]	4,73±0,19[f]	10,02±0,21[h]
Maltodextrin	St-La	18,27±0,01[e]	3,36±0,00[h]	4,03±0,01[de]	7,61±0,01[f]
Maltodextrin	St-Lb	15,84±0,01[b]	2,63±0,01[a]	3,74±0,05[bcd]	5,11±0,01[b]
Maltodextrin	St-Lr	18,20±0,01[e]	3,30±0,01[fgh]	4,26±0,01[e]	8,81±0,01[g]
Maltodextrin	St-Bl	18,63±0,01[f]	3,32±0,01[gh]	4,26±0,04[e]	9,16±0,00[g]
Oligofructose	St-La	24,09±0,01[l]	3,01±0,01[bc]	3,83±0,01[cd]	7,06±0,00[de]
Oligofructose	St-Lb	23,18±0,01[k]	2,91±0,01[b]	3,41±0,01[ab]	4,61±0,01[a]
Oligofructose	St-Lr	23,30±0,01[k]	3,01±0,01[bc]	3,76±0,00[cd]	6,91±0,01[cde]
Oligofructose	St-Bl	21,08±0,01[j]	3,06±0,00[cd]	3,81±0,01[cd]	6,73±0,01[cde]
Polydextrose	St-La	19,21±0,01[g]	3,24±0,00[fgh]	3,81±0,01[cd]	6,53±0,01[c]
Polydextrose	St-Lb	20,55±0,01[i]	3,06±0,00[cd]	3,36±0,00[a]	4,61±0,01[a]
Polydextrose	St-Lr	19,93±0,01[h]	3,21±0,01[efg]	3,86±0,00[cd]	7,16±0,00[ef]
Polydextrose	St-Bl	19,31±0,01[g]	3,11±0,01[cde]	3,73±0,01[bcd]	6,71±0,01[cd]

[A] Taxa máxima de acidificação.
[B] Tempo necessário para atingirV_{max}.
[C] Tempo necessário para atingir o pH 5,0.
[D] tempo para completar a fermentação (pH 4,5).
[E] Leite desnatado não suplementado foi utilizado para testes controle
* Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatistica significativa entre os valores do mesmo parâmetro, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).
± Desvio padrão em relação aos valores médios obtidos em quadruplicata.

Pós-acidificação

A Figura 14 apresenta os resultados de pós-acidificação, ácido lático e níveis residuais de lactose e de proteínas após 1 dia de armazenamento a 4°C desde o final da fermentação pelas co-culturas selecionadas. Analisando as variações do ponto de vista estatístico, é importante salientar que apenas os valores de pH final foi estatisticamente significativa em quase 80% dos experimentos, enquanto que nenhum desses relacionados à lactose foram assim. Comparando os valores médios do pH e da concentração em ácido lático, de acordo com os mesmos critérios que para os parâmetros da Tabela 06, pode-se observar que os mais altos níveis de ácido lático foram associadas ao menor pH final e vice-versa, sugerindo que esses parâmetros são fortemente relacionados entre si. A oligofrutose e principalmente polidextrose levaram a uma menor pós-acidificação e formação de ácido lático com respeito à maltodextrina, cujos efeitos, ao contrário, foram poucos significativos quando comparados ao controle.

Esses resultados sugerem que a adição de ambos os prebióticos no leite poderia melhorar a sua estabilidade durante o armazenamento refrigerado, desacelerando a pós-acidificação. Comparando as diferentes co-culturas, é possível constatar que, embora as variações fossem pequenas, o La induziu a uma maior pós-acidificação e liberação de ácido lático, enquanto o oposto ocorreu com o Bl e, os outros dois microrganismos mostraram um comportamento intermediário.

Estes resultados confirmam que as além das conhecidas espécies de Lb e La, as culturas probióticas Lr e Bl poderiam ser usadas com sucesso em co-cultura com *S. thermophilus* como uma alternativa para a preparação de leite fermentado probiótico em escala industrial.

Tabela 06. Resultados de pós-acidificação (pH), acidez, lactose e teor de proteína após 24 h de armazenamento do leite desnatado fermentado, suplementado com 4% (w/w) de maltodextrina, polidextrose ou oligofrutose, por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) ou *B. lactis* (St-Bl). Leite desnatado não foi utilizado como controle *

Prebiótico	Co-cultura	pH	Ácido Lático (mg/g)	Lactose (mg/g)	Proteína (mg./g)
Controle	St-La	4,33±0,02^{ab}	9,2±0,3^{ab}	38,2±0,1^{abc}	37,1±0,3^{ab}
Controle	St-Lb	4,32±0,01^{ab}	9,7±0,2^{defgh}	38,0±0,2^{abc}	36,7±0,5^{a}
Controle	St-Lr	4,34±0,01^{bc}	9,9±0,4^{gh}	38,7±0,5^{abcd}	37,0±0,4^{ab}
Controle	St-Bl	4,37±0,01^{d}	9,8±0,1^{fgh}	39,7±0,1^{bcde}	37,8±0,4^{abc}
Maltodextrina	St-La	4,31±0,01^{a}	9,9±0,2^{gh}	38,2±0,1^{abc}	38,8±0,4^{abcde}
Maltodextrina	St-Lb	4,40±0,02^{e}	9,5±0,3^{abcdef}	36,8±0,2^{a}	41,6±0,1^{fg}
Maltodextrina	St-Lr	4,36±0,03^{cd}	9,6±0,1^{cdefg}	37,6±0,4^{ab}	43,4±0,1^{g}
Maltodextrina	St-Bl	4,37±0,01^{d}	9,5±0,4^{bcdef}	38,2±0,5^{abc}	40,5±0,5^{def}
Oligofructose	St-La	4,31±0,02^{a}	9,8±0,2^{efgh}	41,6±0,1^{ef}	39,5±0,5^{bcdef}
Oligofructose	St-Lb	4,37±0,04^{d}	9,4±0,2^{abcde}	39,7±0,1^{bcdef}	36,5±0,1^{a}
Oligofructose	St-Lr	4,42±0,01^{e}	9,3±0,1^{abc}	41,8±0,4^{ef}	36,8±0,1^{a}
Oligofructose	St-Bl	4,45±0,01^{f}	9,1±0,2^{a}	41,8±0,1^{ef}	40,9±0,1^{efg}
Polidextrose	St-La	4,32±0,03^{ab}	10,0±0,2^{h}	41,0±0,4^{def}	38,0±0,7^{abcd}
Polidextrose	St-Lb	4,46±0,03^{f}	9,4±0,1^{abcd}	42,3±0,6^{f}	40,3±0,2^{cdef}
Polidextrose	St-Lr	4,46±0,01^{f}	9,3±0,4^{abcd}	42,1±0,1^{ef}	37,4±0,4^{ab}
Polidextrose	St-Bl	4,49±0,01^{g}	9,2±0,1^{ab}	40,2±0,6^{cdef}	40,6±0,4^{ef}

* Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatistica significativa entre os valores do mesmo parâmetro, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).
± Desvio padrão em relação aos valores médios obtidos em quadruplicata.

Como esperado, os microorganismos (Lr e Bl), bem como os prebióticos (oligofrutose e polidextrose), de um modo geral, levaram a menor quantidade de ácido lático e apresentaram elevados níveis residuais de lactose (3,68-4,23% do conteúdo inicial). O conteúdo protéico do leite diminuiu de 3,65-4,34% comparado com a quantidade inicial, devido ao utilizzo da fonte de nitrogênio pelos microrganismos.

Contagens

As Figuras 12 e 13 mostram as contagens após 1 dia de armazenamento a 4°C desde o final das fermentações por misturas binárias de *S. thermophilus* e os probióticos selecionados, respectivamente, ambos na presença e na ausência dos diferentes prebióticos. Em particular, as contagens de St (Figura 12) não foram significativamente influenciadas pelo tipo de prebiótico ou probiótico utilizado, variando entre 8,7 e 9,2 logUFC.mL^{-1}. Por outro lado, foram observadas diferenças significativas nas contagens dos outros microorganismos, que também foram fortemente influenciadas pelos prebióticos (Figura 13). Como esperado, devido às considerações acima expostas, em média, polidextrose e oligofrutose se comportaram como os melhores prebióticos, garantindo a mais alta contagem (7,89 e 7,97 logUFC.mL^{-1}, respectivamente), enquanto as contagens, na presença de maltodextrina (7,45 logUFC.mL^{-1}) eram apenas um pouco mais elevadas comparadas ao controle (7,31 logUFC.mL^{-1}). Tal efeito da oligofrutose é condizente com as observações de diversos autores, que observaram uma clara ação benéfica deste prebiótico sobre a viabilidade de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. em iogurtes e em outros produtos alimentares (CAPELA *et al.,* 2006).

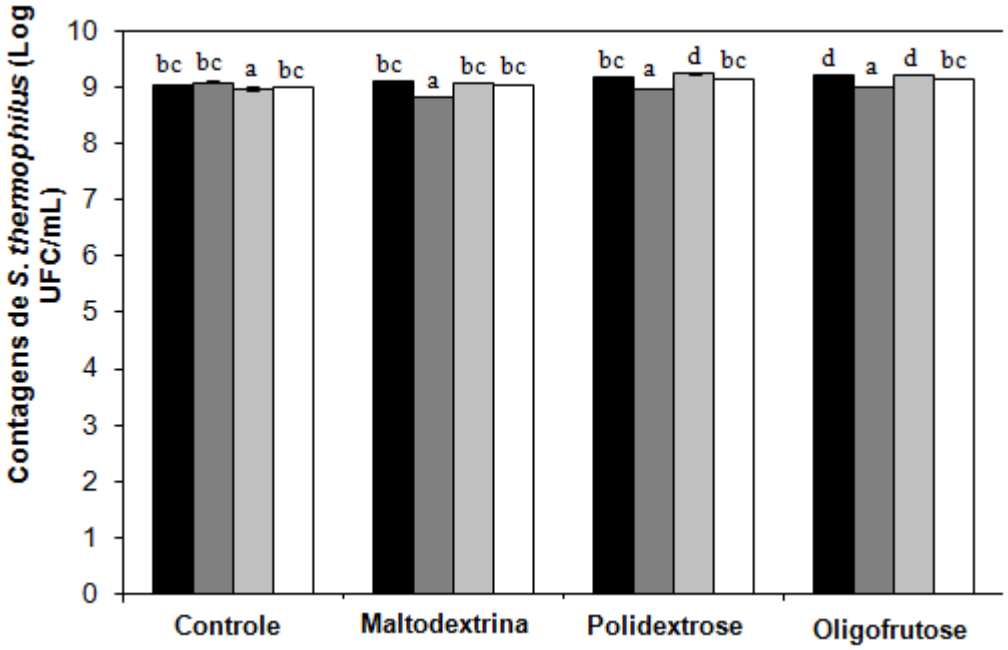


Figura 12. Contagens de células de *S. thermophilus* em leite desnatado fermentado por co-culturas de diferentes probióticos denominado *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

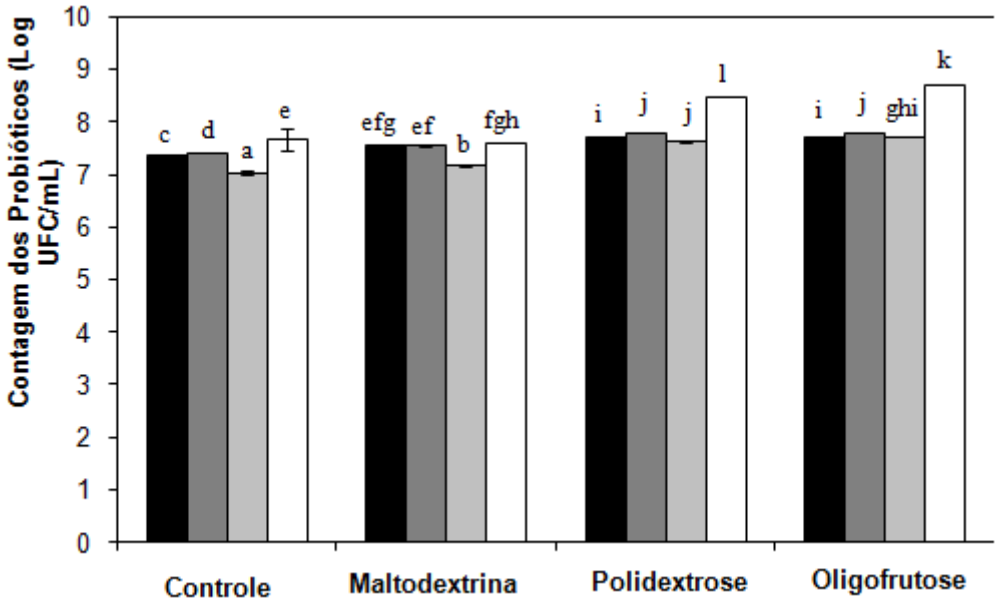


Figura 13. Contagens de microorganismos probióticos em leite desnatado fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

Finalmente, a cultura Bl foi o probiótico cujo crescimento foi o mais estimulado pela presença dos prebióticos em questão. De fato, a contagem média (8,06 logUFC.mL^{-1}), até mesmo superiores que Lb (7,63 logUFC.mL^{-1}), ou seja, o microrganismo que tem o sinergismo metabólico com St mais conhecido. Por outro lado, Lr exibiu em co-cultura com St, uma satisfatória contagem apenas na presença de oligofrutose e polidextrose (7,65 logUFC.mL^{-1} em média).

Perfil de ácidos graxos e teor de CLA

A Figura 14 mostra que o tempo de retenção observado no gás cromatógrafo de ésteres metílicos de ácidos graxos em meio de cultura foi de 23,10 min. A área do pico de t10, c12-CLA, que apareceu depois de 23,47 minutos, foi muito pequena, não sendo consideravelmente significativa.

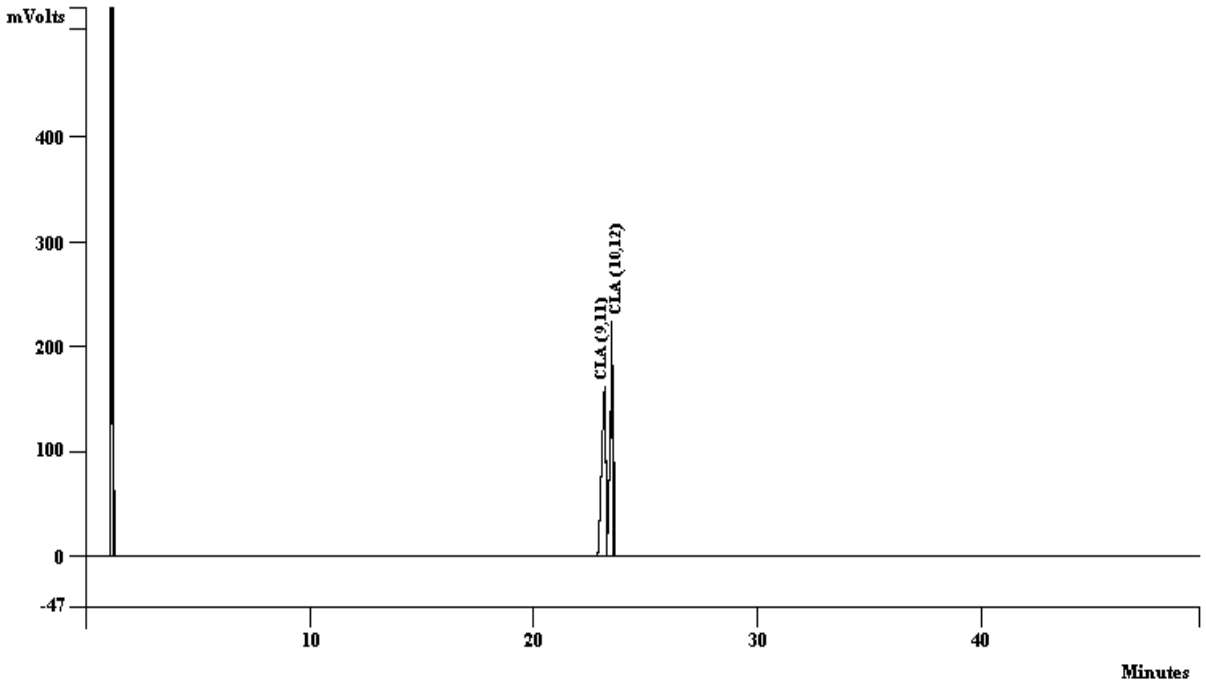


Figura 14. Típico gás cromatógrafo para isômeros padrão de ácido linoleico conjugado. CLA foi detectado no tempo de retenção de 23,10 min.

Considerando que, não foi encontrada nenhuma diferença significativa na concentração de isômero de CLA c9t11 entre os leites fermentados controle pelas diferentes co-culturas, os efeitos da adição de 4% (w/w) dos diferentes prebióticos no leite desnatado modificou os níveis de CLA c9t11, além da composição de cultura influenciar no teor do mesmo (Figura 15). Embora a adição de todos eles tivesse aumentado sensivelmente o nível de c9t11-CLA, o maior efeito foi observado com maltodextrina. Este prebiótico fez, de fato, induzir um aumento na concentração deste composto em 21% usando St-Lb e não inferior a 38% usando St-la com relação ao controle. Por outro lado, a suplementação do leite com oligofrutose e polidextrose levou ao maior incremento no nível de CLA c9t11-St-Lr (24%) e St-Bl (30%), respectivamente.

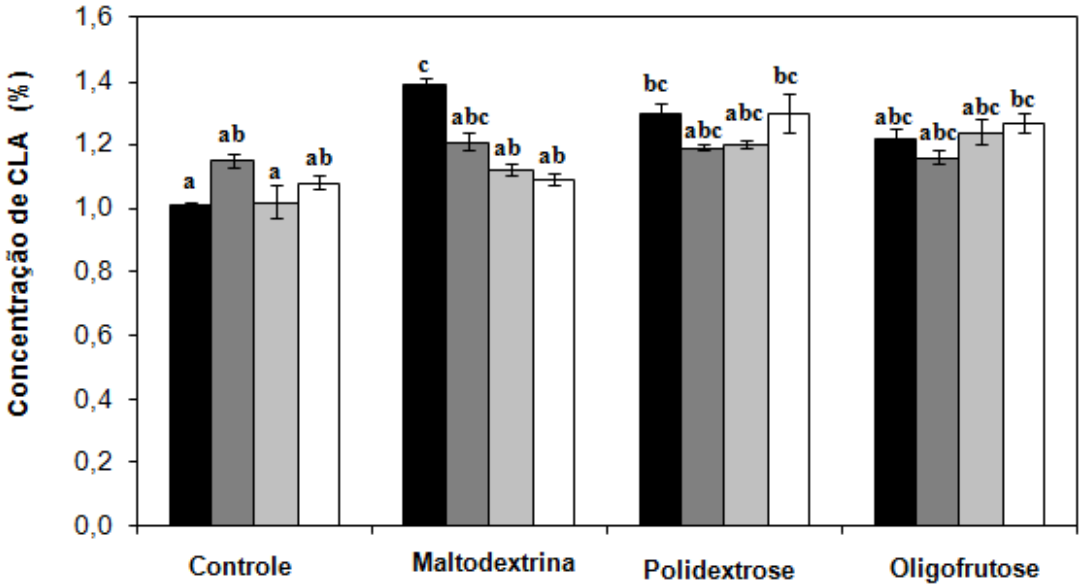


Figura 15. Concentrações médias de ácido linoleico (% w/w) em leite desnatado fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La, ■), *L. bulgaricus* (St-Lb, ■), *L. rhamnosus* (St-Lr, ■) e *B. lactis* (St-Bl, □), na presença de diferentes prebióticos (maltodextrina, polidextrose e oligofrutose) e ausência (controle). As diferentes letras mostram diferenças estatísticas de acordo com o teste de Tukey (P < 0,05).

Para explicar as variações observadas nos níveis de CLA, deve ser levado em conta que as diferentes atividades enzimáticas das culturas iniciadoras foram identificadas como fatores que podem contribuir para influenciar o teor de CLA dos produtos lácteos (SIEBER *et al.,* 2004). Em particular, Lin *et al.* (2003) demonstraram que o maior teor de ácido linoléico isomerase em *L. acidophilus* aumentou o conteúdo de CLA nos leites fermentados. O teor de CLA pela observado pela co-cultura St-Bl está de acordo com o encontrado em *Bifidobacteria* anteriormente observado por outros autores (COAKLEY *et al*., 2003; OH *et al.,* 2003).

5.5 Conclusões

- Os parâmetros cinéticos de acidificação e a qualidade do leite foram fortemente influenciados tanto pela composição da co-cultura quanto pelos diferentes prebióticos;
- Todas as contagens de probióticos foram estimuladas pela oligofrutose e polidextrose, e entre estes *B. lactis* exibiu as maiores contagens em todas as amostras de leite suplementadas;
- As maiores quantidades de ácido linoléico conjugado (38% superior ao do controle) foram encontrados no leite fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* - *L. acidophilus* e suplementado com maltodextrina;
- Os níveis de CLA no leite fermentado podem ser melhorados através da adição de bactérias probióticas com alto potencial de produção de CLA em combinação adequada com prebióticos durante o processamento do leite fermentado.

CAPÍTULO VI

6. EFEITO DA INULINA NO CRESCIMENTO E PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO DAS DIFERENTES BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM CO-CULTURAS BINÁRIAS E CULTURA MISTA COM *Streptococcus thermophilus*[3]

6.1 Resumo

A inulina foi utilizada como um prebiótico para melhorar a qualidade e a consistência de leite desnatado fermentado por *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) e *Bifidobacterium lactis* (Bl) com *Streptococcus thermophilus* (St), quer em co-culturas binárias ou em coquetel contendo todos os microorganismos. Foram comparadas, tanto na presença de 40 $mg.g^{-1}$ inulina ou não, os resultados da máxima taxa de acidificação (V_{max}) e os tempos para atingi-lo (t_{max}), para alcançar o pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) e para completar a fermentação (t_f). Pós-acidificação, formação de ácido lático e contagens de células também foram comparadas após 1 dia (D1) e/ou 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). Em co-cultura, a adição de inulina ao leite aumentou V_{max}, diminuiu t_{max} e t_f, favoreceu a pós-acidificação e exerceram um efeito bifidogênico. *S. thermophilus* estimulou o metabolismo das outras bactérias láticas e reforçou as características do produto. Após D7, significativo efeito prebiótico da inulina foi observado em todas as co-culturas. Tanto depois de D1 como em D7, as enumerações de Lr e Bl em cultura mista diminuiram acentuadamente em comparação com as respectivas co-culturas devido a uma maior competição pelos mesmos substratos.

[3] OLIVEIRA, R. P. S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*. ***Journal of Food Engineering***, v.91, p.133-139, 2009. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.08.013. [Fator de Impacto: 2,081].

6.2 Introdução

Os alimentos funcionais têm demonstrado um elevado potencial de crescimento nos últimos anos. Os consumidores estão cada vez mais exigentes por alimentos com propriedades, tais como o sabor agradável, de baixo valor calórico e baixo teor de gordura, e que produzem efeitos benéficos para a saúde (GONZALEZ-TOMÁS *et al.*, 2008). Na tentativa de obter produtos com melhor sabor e aparência e de oferecer benefícios para a saúde dos consumidores, microrganismos probióticos, assim como certo número de prebióticos, como fibras solúveis são adicionadas em produtos lácteos funcionais.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que inibem a multiplicação de patógenos e estimular seletivamente a proliferação e a atividade de populações bacterianas importantes do cólon, do intestino grosso e até as do intestino delgado (MATTILA-SANDHOLM *et al*., 2002; ROBERFROID, 2000). Para exercer os efeitos prebióticos, as fibras têm de estar presentes em alimentos sólidos e líquidos em quantidades de 30-60 $mg.g^{-1}$ e 15-30 $mg.g^{-1}$, respectivamente (ANVISA, 2002). A inulina é um componente natural presente em várias frutas e vegetais apresentando efeitos benéficos sobre a saúde além de interessantes propriedades tecnológicas. É um ingrediente alimentar solúvel e fermentescível e que não pode ser digerido pela α-amilase ou outras enzimas hidrolíticas na parte superior do trato intestinal (CARABIN; FLAMM, 1999); é aplicada principalmente para obtenção de produtos com baixo teor de gordura (NINESS, 1999).

Probióticos são microrganismos que, quando utilizado em grandes quantidades na preparação de alimentos e produtos lácteos, são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo superior, bem como a aderir a células intestinais, proporcionando efeitos benéficos para o intestino (GILLILAND, 1989). Probióticos mais comuns utilizados nos produtos lácteos funcionais pertencem aos gêneros *Lactobacillus, Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (GOLDIN; GORBACH, 1984). Entre estes, bactérias ácido-lácticas (LAB) isoladas do trato gastrintestinal de humanos e animais, quando consumido em grande quantidade, auxiliam no equilíbrio intestinal (FERREIRA, 2003).

Várias investigações têm focado na utilização de prebióticos para melhorar o crescimento e as atividades dos probióticos. Inulina e amido foram empregados para estimular o metabolismo do *Bifidobacterium* spp. (SHIN *et al*., 2000; BRUNO *et al*., 2002; AKALIN *et al.,* 2004) no entanto, não existem relatos sobre os efeitos destes prebióticos sobre *Lactobacillus* spp.

A fim de produzir os benefícios desejados, bactérias probióticas devem estar presentes no produto em contagens viáveis (7-9 logUFC.mL^{-1}) durante toda a sua vida de prateleira (KURMANN; RASIC, 1991). Embora este nível não seja bem estabelecido, parece que também depende da espécie e das estirpes utilizadas.

Devido ao rápido declínio da *Bifidobacterium* spp. após a fabricação do iogurte (DAVE; SHAH, 1997), a inulina foi freqüentemente empregada nos estudos principalmente para melhorar a sua viabilidade a longo prazo durante o armazenamento refrigerado (SHIN *et al*., 2000; BRUNO *et al*., 2002; AKALIN *et al.,* 2004). Foi demonstrado que a suplementação do iogurte com inulina em baixa concentração também melhora significativamente o crescimento e a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* como probióticos utilizados no iogurte durante o armazenamento a frio (KURIEN *et al.,* 2005; DONKOR *et al.,* 2007). No entanto, outros lactobacilos que merecem atenção devido aos seus efeitos de promoção da saúde (SHAH, 2000b, 2001).

Portanto, inulina aparece como um importante ingrediente alimentar o que pode ser explorada para a produção de alimentos funcionais (NINESS, 1999). No entanto, os efeitos sinérgicos ou antagônicos dos diferentes probióticos (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) com *Streptococcus thermophilus* foram mal explorados (OLIVEIRA *et al.,* 2009). Portanto, o presente estudo relata o efeito de inulina em co-culturas binárias e em culturas mistas, os efeitos sinérgicos entre os microrganismos, produção de iogurte com co-culturas binárias e mistas e a capacidade de sobrevivência do *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* na produção de iogurtes probióticos.

6.3. Materiais e métodos

Culturas microbianas

Cinco comerciais estirpes de culturas puras iniciadoras e liofilizadas foram utilizadas (Danisco, ZA des Engenières, France): *S. thermophilus* TA040 (St) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 (Lb) - microrganismos do iogurte, e *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr) e *Bifidus lactis* BL 04 (Bl) - microrganismos probióticos.

Preparação do leite

O leite foi preparado adicionando-se 13 g de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brasil) em 100g de água destilada (base de leite) sem adição de inulina (M) e suplementada (SM) com 4 $g.100g^{-1}$ de da fibra em questão (nome comercial: Beneo TM) (Orafti Active Food Ingredients, Oreye, Bélgica). O conteúdo de sólidos totais da base do leite corresponde ao valor médio relatado por Restle *et al.* (2003).

As bases do leite controle e suplementadas foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético por 15 min e tratadas termicamente a 90°C durante 5 min em equipamento de banho-maria (Fisatom, Modelo 550 A, local). O leite tratado foi recolhido e transferido a garrafas estéreis de 1 L, imediatamente resfriado em banho de gelo e distribuído em erlenmeyrs estéreis de 250 mL em câmara de fluxo laminar e, acondicionados em câmara fria a 4°C por 24h antes da utilização.

Preparação do inóculo

A fim de obter praticamente a mesma média de contagens iniciais para cada bactéria em diferentes co-culturas, assim como na cultura mista (6,1 a 6,5 $logUFC.mL^{-1}$), pré-cultivos de células bacterianas (BL, St, La, Lb e Lr) foram preparadas por

dissolução de 45, 90, 100, 130 e 400 mg de suas respectivas culturas liofilizadas em 50 mL de leite (10 % de sólidos totais; autoclavadas a 121ºC por 20 minutos). Após a mistura e ativação de 42ºC por 30 minutos, 1,0 mL de cada pré-cultura foi inoculada no leite e/ou no leite suplementado com inulina até um volume final de 250 mL.

Fermentações

Após a inoculação, os frascos contendo as amostras foram transferidas para um sistema em banho-maria acoplado a um equipamento denominado CINAC (Cynetique d'acidificação, Ysebaert, Frépillon, França), o qual permite a medição contínua e gravação de pH, bem como a avaliação da taxa de acidificação durante todo o período da fermentação (SPINNLER; CORRIEU, 1989), que foi conduzida a 42 ^{o}C e interrompida quando se foi atingido o pH 4,5.

Parâmetros cinéticos

A taxa de acidificação (V_{max}) foi calculada como a variação do tempo com pH (dpH/dt) e expresso em unidades de pH 10^{-3} min^{-1}. Ao final da incubação, os seguintes parâmetros cinéticos também foram calculados: (i) t_{max} (h), tempo em que foi atingido V_{max}, (ii) $t_{pH5,0}$ (h), tempo para atingir pH 5,0, e (iii) t_f (h), tempo para completar a fermentação. Após a realização do pH 4,5 as fermentações foram manualmente interrompidas agitando o coágulo, durante 80 segundos, através de uma haste acoplada a disco perfurado de aço inoxidável.

O produto fermentado foi distribuido em copos de 50 mL de polipropileno, selados termicamente utilizando um equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil), e rapidamente resfriado em banho de gelo e armazenadas a 4ºC (OLIVEIRA *et al.,* 2001; DAMIN *et al.,* 2006).

As cinéticas de acidificação foram investigadas durante toda a fermentação do leite, tanto no controle (M) ou suplementadas com 40 mg de inulina g^{-1} (SM), por *S. thermophilus*, quer em co-cultura binária com *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*,

L. rhamnosus ou *B. lactis*, ou em culturas mistas contendo todos eles. No final de fermentações determinaram-se os parâmetros de pós-acidificação e sobrevivência dos probióticos em leites fermentados, após 1 dia (D1) e/ou 7 dias (D7) de armazenamento a 4°C.

Pós-acidificação e acidez

A pós-acidificação do leite fermentado foi determinada depois D1 e D7 pela medição do pH utilizando um equipamento modelo Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brasil). A acidez, expressa em mg de ácido lático g^{-1}, foi avaliada por titulação com uma solução 0,11 N de NaOH (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

Contagens de bactérias probióticas

As enumerações das bactérias foram efetuadas em D1 e/ou D7. Um mL da amostra foi diluída em 9 mL de água peptonada estéril de concentração 0,1%. Posteriormente, foram feitas diluições em séries, e as bactérias foram contadas applicando a técnica de microbiologia semeadura em profundidade (KODAKA *et al.,* 2005). Todos os meios de cultura foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Em co-culturas, colônias de St foram enumeradas no meio de cultura M17 Agar em condições aeróbicas de incubação a 37ºC por 48 h, enquanto as enumerações de Lb, La e Lr foram realizadas em meio MRS agar, após ajuste para o pH 5,4 através da adição de ácido acético, e posteriormente incubação anaeróbica a 37ºC por 48, 72 e 72 h, respectivamente. Bl foi enumerado no meio MRS Agar contendo 5% cisteína sem qualquer ajuste de pH (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1996, 1997, 2003).

Em culturas mistas, St e Lb foram enumeradas nos meios M17 e MRS acidificado a valor de pH 5,4, respectivamente, e posterior incubação aeróbica a 37°C por 48 h. Após incubação a 37°C por 72 h em jarra anaeróbica, La, Bl e Lr

foram enumerados em meio seletivo MRS acrescido de 10 $\mu L.mL^{-1}$ de clindamicina (pH 6,2), *Reinforced Clostridial Agar* com 1 $\mu L.mL^{-1}$ dicloxacillina (pH 7,1) e MRS com 0,5 $\mu L.mL^{-1}$ vancomicina (pH 6,2), respectivamente. O meio de cultura M17 e o MRS (pH 5,4) foram preparados de acordo com Jordano *et al.* (1992) e Dave e Shah (1996), e o MRS adicionado com a clindamicina e vancomicina, de acordo com Lankaphuthra e Shah (1996) e Tharmaraj e Shah (2003), respectivamente.

As condições anaeróbicas foram asseguradas pela utilização de AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As unidades formadoras de colônia (UFC) foram enumeradas em placas contendo de 30 a 300 colônias, e a concentração celular foi expressa em $logUFC.g^{-1}$ de leite fermentado. A seletividade dos meios de cultura foi confirmada por análise microscópica das células nas colônias.

Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) bifatorial, utilizando o software Statistica 6.0. Os valores médios foram comparados usando o teste de Tukey (SOKAL; ROHLF, 1979), a $P < 0,05$, e diferentes letras foram utilizadas para ilustrar os valores com diferenças estatisticamente significativas entre eles.

6.4 Resultados e discussão

Cinética de acidificação

O maior valor de V_{max} foi obtida com a co-cultura binária St-Lb na presença de inulina ($19,0.10^{-3}$ upH min^{-1}) (Tabela 07), confirmando a observação feita por Kristo *et al.* (2003) sobre o importante papel exercido por St e Lb na cinética de acidificação de iogurtes. Como observado neste estudo, o uso combinado de todas as bactérias se pode observar que os valores de V_{max} foram muito próximos

aos resultados de St-Lb, tanto na presença ou a ausência de inulina. Por outro lado, o menor valor de V_{max} foi observado com a co-cultura St-Lr ($15,9 \cdot 10^{-3}$ upH.min^{-1}) na ausência de inulina, demonstrando a baixa capacidade de acidificação do Lr, proposto no presente estudo como um novo probiótico, com relação às tradicionais bactérias.

É também evidente o efeito do prebiótico da inulina, o qual aumentou a média da taxa de acidificação ($16,5.10^{-3}$ upH.min^{-1}) das co-culturas binárias em cerca de 6% e das culturas mistas ($17,8.10^{-3}$ upH.min^{-1}) por cerca de 4%, sendo estas duas variações estatisticamente significativas. Oliveira *et al.* (2001) observaram para St-Lr e St-La no leite suplementado com hidrolisado de caseína valores significativamente maiores de V_{max} ($20\text{-}21.10^{-3}$ upH.min^{-1}), o que significa que o efeito do prebiótico da inulina é menos acentuado que a de caseína hidrolisada .

O tempo para atingir V_{max} (t_{max}) variou de 2,97 h (St-Lb em SM) a 3,25 h (St-Bl em M), mostrando efeitos estatisticamente significativos tanto da inulina quanto do tipo de co-cultura binária. Como esperado, o efeito prebiótico da inulina, o qual reduziu a média de t_{max} das co-culturas binárias em apenas 2%, foi mais fraco do que o observado por Oliveira *et al.* (2001) para a caseína hidrolisada. Aparentemente, não houve relação direta entre V_{max} e t_{max}, quer na presença ou na ausência de inulina; no entanto, a utilização de culturas mistas reduziu t_{max} significativamente no que diz respeito não somente às co-culturas binárias (11a 12%), e mesmo para o mais rápido deles, ou seja, St-Lb (7 a 9%). Porque Kristo *et al.* (2003) obtiveram em co-culturas ternárias de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei*, em leite semelhante, um valor de t_{max} (2,65 h) comparável à observada em culturas mistas (2,77 h); é possível que a presença simultânea de vários microorganismos poderiam ter conduzido a efeitos sinérgicos entre eles, associado à liberação de produtos metabólicos, o quais estimulararam o metabolismo dos outros (BRACQUART *et al.,* 1978; RADKE-MITCHELL, SANDINE; 1986).

Na cultura mista, o efeito sinérgico ocorreu entre os microorganismos aqui estudados. A fermentação foi, de fato, concluída mais rapidamente (t_f = 4,06-4,23 h), ainda que com a co-cultura St-Lb. Este efeito pode ter estimulado o crescimento de microorganismos, de tal forma, de modo a tornar o efeito exercido pela inulina negligenciável.

Um comportamento qualitativamente semelhante ao de t_{max} foi observado para ambos os tempos necessários para alcançar o pH 5,0 ($t_{pH5,0}$) ou para completar a fermentação (t_f) (Tabela 07). Como esperado, os valores mais baixos de ambos os t_f (5,47 h em M e 5,25 h em SM) e $t_{pH5,0}$ (3,72 h em M e 3,61 em SM) foram obtidos na presença das bactérias típicas iogurte (St-Lb), enquanto que as outras co-culturas probióticas durou quase o dobro do tempo. Quando se utiliza a cultura mista, ambos os parâmetros foram significativamente reduzidos em relação a St-Lb (15 e 23%, respectivamente), quer na ausência ou na presença de inulina. No que diz respeito ao efeito prebiótico da inulina, pode-se observar que a suplementação do leite desnatado reduziu o $t_{pH5.0}$ em co-culturas binárias em 5,3% e na cultura mista em 3,5%. Mesmo as maiores reduções (4,0 e 12%, respectivamente) foram induzidas por esse prebiótico no t_f (Tabela 07). Embora o efeito das diferentes co-culturas binárias não tenha sido no geral, estatisticamente significativo, as combinações do uso de culturas mistas com a inulina o foram.

Tabela 07. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por co-cultura e cultura mista de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) com *S. thermophilus.*

Ensaio	Cultura	V_{max} (10^{-3} upH/min)	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	t_f (h)
Leite sem inulina (M)					
1	St-Lb	$18,0 \pm 0,4^{d}$	$3,04 \pm 0,06^{c}$	$3,72 \pm 0,09^{d}$	$5,47 \pm 0,09^{b}$
2	St-La	$16,3 \pm 0,7^{b}$	$3,24 \pm 0,03^{g}$	$4,67 \pm 0,09^{g}$	$10,4 \pm 0,68^{f}$
3	St-Lr	$15,9 \pm 0,7^{a}$	$3,10 \pm 0,11^{de}$	$4,43 \pm 0,27^{f}$	$10,6 \pm 0,19^{f}$
4	St-Bl	$16,0 \pm 1,1^{ab}$	$3,25 \pm 0,12^{g}$	$4,64 \pm 0,24^{g}$	$10,1 \pm 0,44^{ef}$
5	Cultura mista	$17,8 \pm 1,1^{d}$	$2,77 \pm 1,1^{a}$	$3,16 \pm 1,1^{b}$	$4,23 \pm 1,1^{a}$
Leite suplementado com 40 mg de inulina g^{-1} (SM)					
6	St-Lb	$19,0 \pm 0,8^{f}$	$2,97 \pm 0,09^{b}$	$3,61 \pm 0,09c$	$5,25 \pm 0,07^{b}$
7	St-La	$17,3 \pm 0,8^{c}$	$3,16 \pm 0,03^{f}$	$4,25 \pm 0,12^{e}$	$9,42 \pm 0,66^{de}$
8	St-Lr	$17,1 \pm 1,0^{c}$	$3,10 \pm 0,08^{cd}$	$4,21 \pm 0,29^{e}$	$8,35 \pm 0,39^{c}$
9	St-Bl	$17,0 \pm 0,9^{c}$	$3,15 \pm 0,11^{ef}$	$4,46 \pm 0,40^{f}$	$9,24 \pm 0,33^{cd}$
10	Cultura mista	$18,5 \pm 1,1^{e}$	$2,75 \pm 1,1^{a}$	$3,05 \pm 1,1^{a}$	$4,06 \pm 1,1^{a}$

V_{max} = taxa máxima de acidificação; t_{max} = tempo para atingir V_{max}; pH_{Vmax} = pH detectado em V_{max}; $t_{pH5.0}$ = tempo para atingir pH 5,0; t_f = tempo para completar a fermentação (pH 4,5). Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa entre os valores do mesmo parâmetro, de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$) ± Desvio padrão em relação aos valores obtidos em quadriplicata.

Pós-acidificação e acidez

Souza (1991) sugeriu a utilização da pós-acidificação (pH) e acidez (teor de ácido lático), do leite fermentado, quer depois de 1 dia (D1) ou após 7 dias de armazenamento a 4 °C desde o final da fermentação (D7) como os melhores critérios para expressar a acidez dos iogurtes. De acordo com esta sugestão, as Figuras 16 e 17 mostram os resultados destes parâmetros obtidos, usando tanto co-culturas binárias quanto culturas mistas, na presença ou não de inulina.

Em co-culturas, os valores de pH após D1 variaram de 4,36 (St-La em M e St-Lb em SM) a 4,46 (St-Lr e St-Lb em M) e os após D7 de 4,21 (St-Lb em SM) a 4,35 (St-Lr em M) (Figura 16). As mais significativas variações estatisticas foram aquelas entres as co-culturas St-La e St-Lb, mostrando maior poder de pós-acidificação (pH 4,36-4,39 após D1 e 4,21-4,26 após D7), e as co-culturas St-Lr e St-Bl, por um outro lado (pH 4,42-4,45 após D1 e 4,30-4,34 após D7). Este resultado sugere que os probióticos alternativos propostos neste estudo (Lr e Bl) poderiam garantir a produção de menos ácido com respeito às tradicionais. Outro efeito estatisticamente significativo foi relacionado ao armazenamento a frio, durante 7 dias, o que levou a acidificação com relação a D1 de 0,11-0,13 unidade de pH, enquanto que nenhum efeito significativo foi exercido pela inulina, a parte um caso.

No que se refere às culturas mistas, estas mostraram um comportamento praticamente coincidente com as das promissoras co-culturas St-Lr e St-Bl, bem como a mesma média de pH reduzido após armazenamento refrigerado.

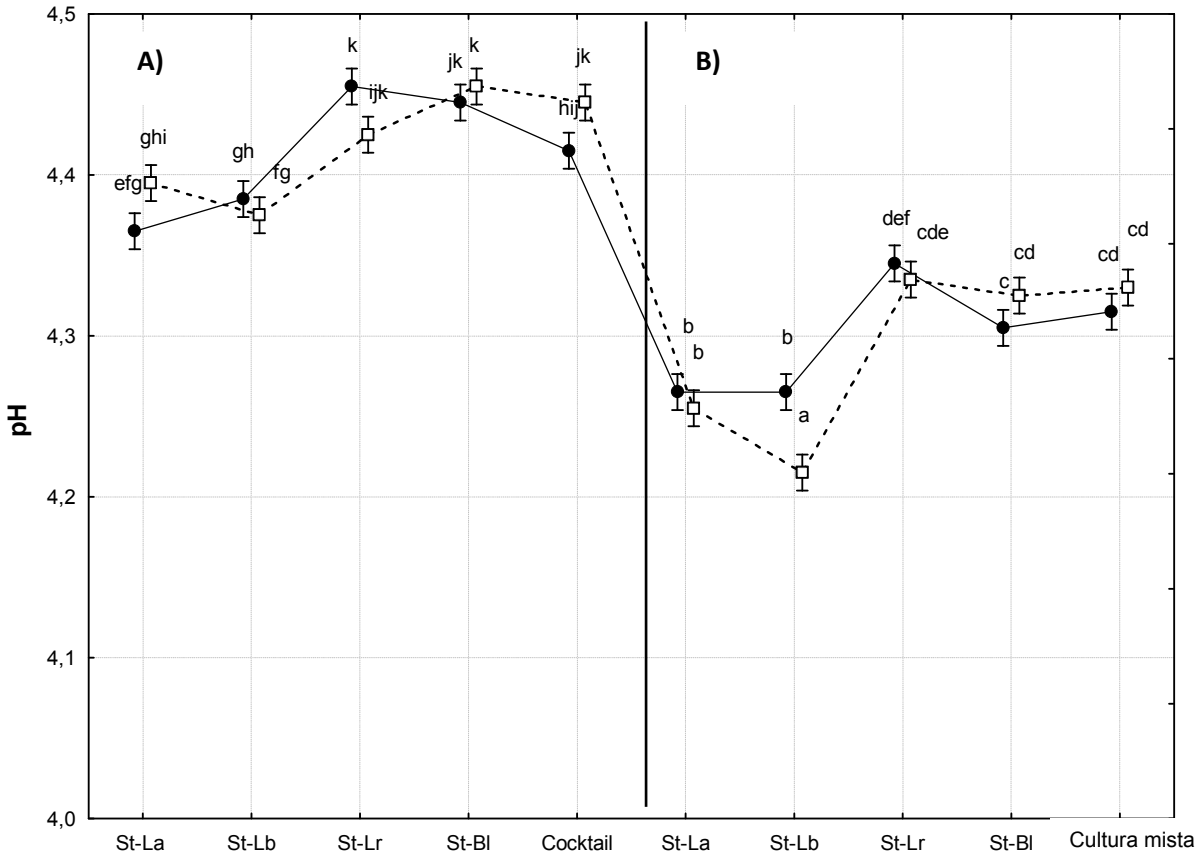


Figura 16. Pós-acidificação do leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl ou por cultura bacteriana mista após 1 dia (A) ou após 7 dias (B) de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina. g^{-1}; (□) Leite não suplementado.

Estes resultados como um todo estão em conformidade com a acidez devido a que somente o ácido lático variou após D1 de 8,4 $mg.g^{-1}$ (St-Bl em M) a 9,8 $mg.g^{-1}$ (St-La em M) e, após D7 de 9,3 $mg.g^{-1}$ (St-Lr em M) e 10,9 $mg.g^{-1}$ (St-la em SM) (Figura 17). Em média, houve um aumento significativo (de 0,9-1,0 $mg.g^{-1}$) passando a partir de D1 para D7. Embora o efeito da inulina fosse apenas em alguns casos significativo, a sua presença no leite implica, no geral, em menor acidificação. Em particular, a utilização da cultura mista, com relação às co-culturas binárias, assegurou praticamente a mesma baixa acidez, como St-Bl, tanto após D1 (8,3-8,5 $mg.g^{-1}$) quanto em D7 (9,5-9,6 $mg.g^{-1}$).

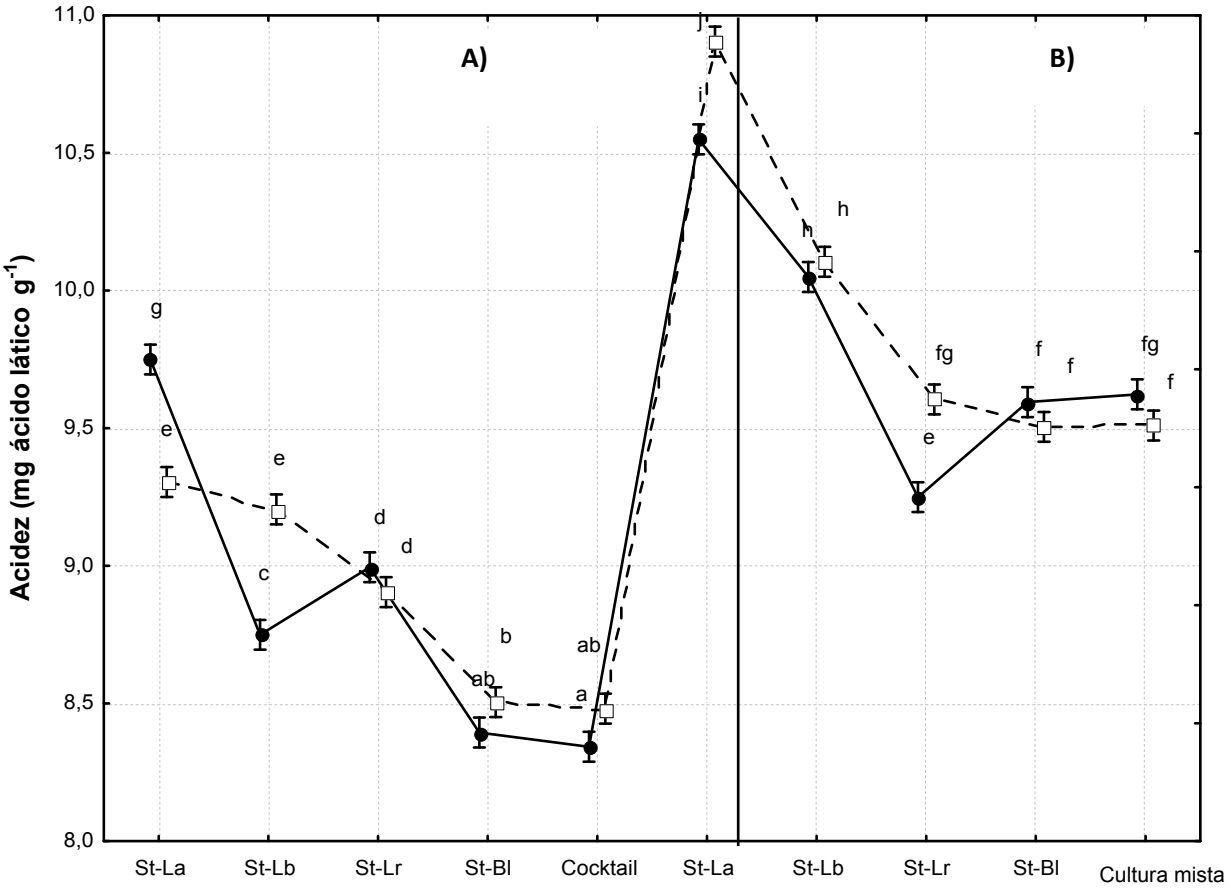


Figura 17. Acidez do leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl ou por cultura bacteriana mista após 1 dia (A) ou após 7 dias (B) de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (□) Leite não suplementado.

Estes resultados, bem como os de pós-acidificação podem ser interpretados em base ao comportamento metabólico de cada microorganismo. A maior produção de ácido lático, tanto em D1 quanto em D7, por St-La com respeito às outras co-culturas, foi provavelmente resultado do metabolismo homolático do *L. acidophilus* (ZHAO *et al.,* 2007). A menor acidez associada a St-Lb poderia ter sido devido à mudança de comportamento homolático para heterolático do Lb consequente da alteração do pH do ambiente (RHEE; PACK, 1980), enquanto que o pós-acidificação comparável à de St-La foi resultado da liberação do ácido acético. Finalmente, os maiores valores de pH e menor acidez, obtidos por St-Lr e St-Bl e com respeito às outras duas co-culturas são

consistentes com a natureza de ambos os heteroláticos Lr (JYOTI *et al.,* 2003) e Bl (BONGAERTS *et al.,* 2005), e ao menor pH após D7 com St-Lb em comparação com St-Lr para a formação de ácido acético, em vez de etanol (BONGAERTS *et al.,* 2005).

Os valores de pH após D1 não estão tão longe daqueles relatados por Moreira *et al.* (2000) (3,76-4,39), que analisaram amostras de leite fermentado por diferentes estirpes de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, e por Martin *et al.* (1999), após 30 dias de armazenamento a 5°C (4,18-4,36). Além disso, Damin *et al.* (2006) detectaram uma média de acidez em iogurtes comerciais (10,1 $mg.g^{-1}$) praticamente coincidente com o valor médio do presente estudo após D7. De acordo com Souza (1991), a acidez de iogurtes comerciais é amplamente variável, ou seja, de 7,0 a 12,5 $mg.g^{-1}$ ou pH 3,7-4,6. No entanto, para evitar sabor insípido ou excesso de acidez ao paladar, os valores ótimos devem ser 7,0-9,0 $mg.g^{-1}$ e pH 4,0-4,4, respectivamente.

Análise microbiológica

As Figuras 18 e 19 mostram a enumeração das bactérias láticas em leites fermentados tanto em co-culturas com *S. thermophilus* quanto em culturas mistas após 1 dia (D1) e 7 dias (D7) de armazenamento refrigerado, respectivamente. As enumerações de *S. thermophilus* em co-culturas praticamente não variaram significativamente com o tipo de co-cultura (8,98-9,05 $logUFC.mL^{-1}$), a presença de inulina (9,05-9,14 $logUFC.mL^{-1}$) e o armazenamento refrigerado (8,95-9,05 $logUFC.mL^{-1}$).

No que diz respeito às enumerações das outras bactérias láticas, os valores após D1 variaram de 7,3 $logUFC.mL^{-1}$ (St-Lr em M) a 9,1 $logUFC.mL^{-1}$ (St-Bl em SM), com um efeito estimulante estatisticamente significativo da inulina sobre o crescimento de quase todos eles.

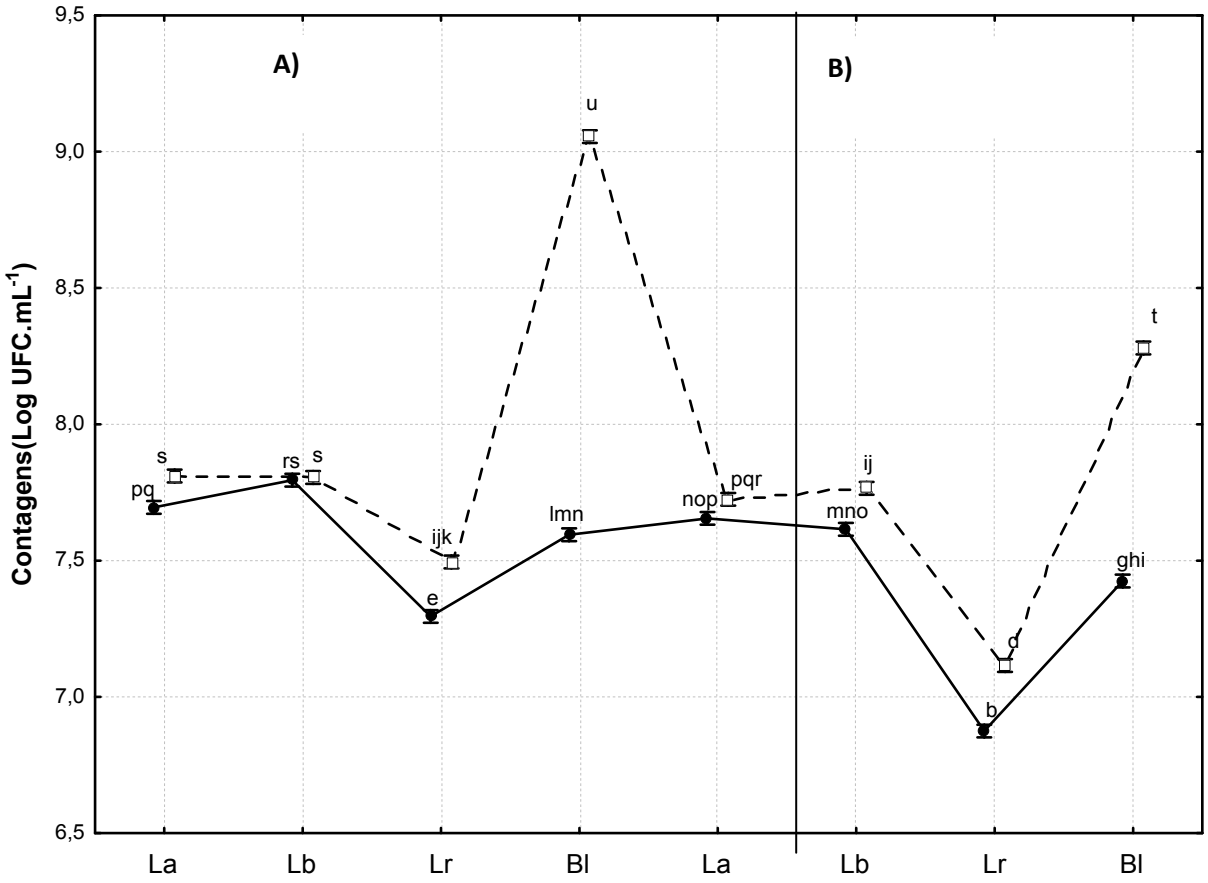


Figura 18. Contagens de células em leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl (A) por cultura bacteriana mista (B) após 1 dia de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (□) Leite não suplementado.

Por exemplo, a enumeração de Bl quando em co-cultura com St aumentou na presença de inulina em 1,4 logUFC.mL^{-1}, comprovando assim um efeito bifidogênico exercido pelo prebiótico selecionado. Comparado com os resultados obtidos no presente estudo, Özer *et al.* (2005) encontraram consideravelmente maiores enumerações para Lb e La (9,6 e 8,3-8,8 logUFC.mL^{-1}, respectivamente), que são comparáveis aos relatados por Dave e Shah (1997), provavelmente devido não só à maior quantidade de inóculo, mas também devido ao teor de sólidos totais e de nutrientes disponíveis no leite (KRISTO *et al*., 2003).

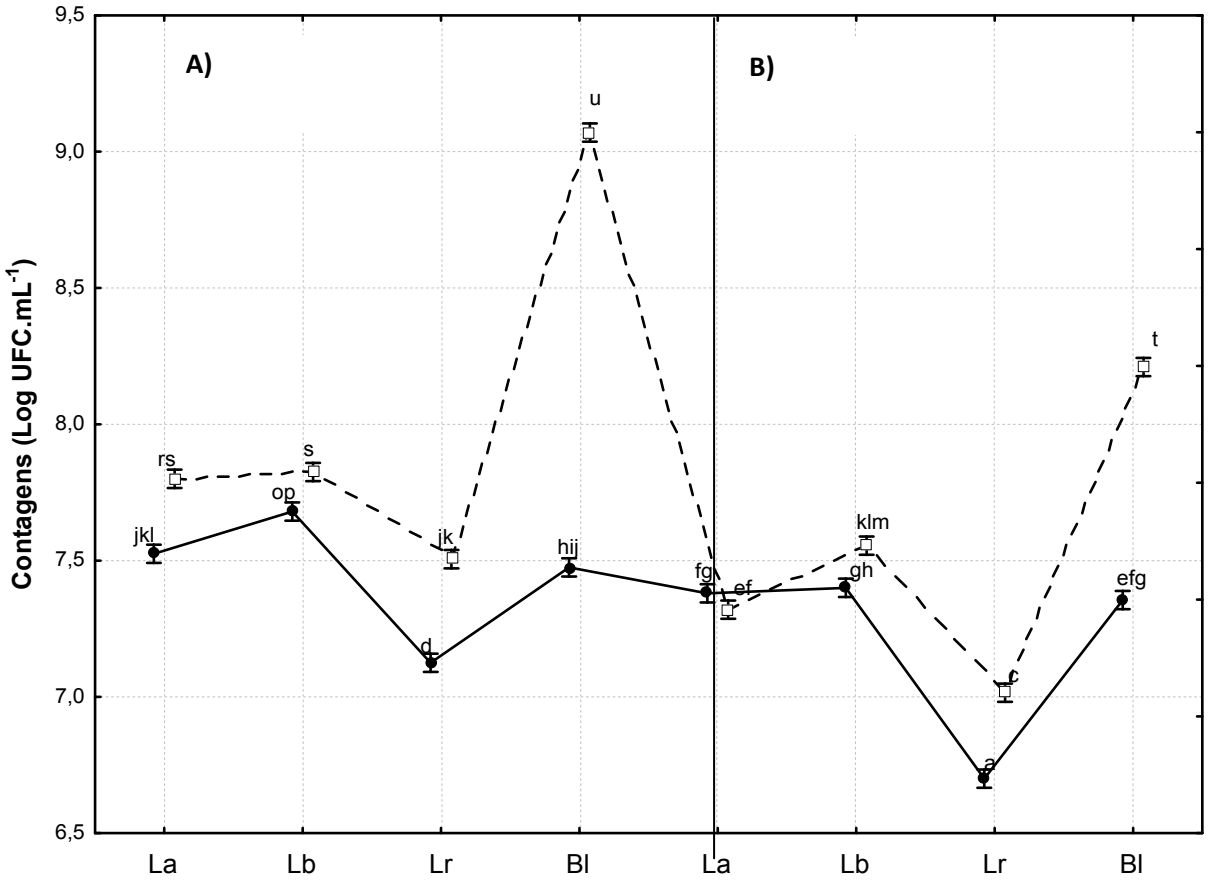


Figura 19. Contagens de células em leite desnatado fermentado, quer por co-culturas binárias de St-La, St-Lb, St-Lr e St-Bl (A) por cultura bacteriana mista (B) após 7 dias de armazenamento a 4°C. (□) Leite suplementado com 40 mg de inulina.g^{-1}; (□) Leite não suplementado.

Após D7, a contagem das outras bactérias, exceto St, diminuiu ligeiramente, em comparação com D1, embora apenas 62,5% dessas variações foram estatisticamente significativas. Por outro lado, o efeito do prebiótico da inulina foi significativo em todos os casos (Figuras 18 e 19).

Tanto após D1 e D7, a utilização de microorganismos em mistura, levou a um decréscimo nas contagens de Lr e Bl comparados com suas respectivas co-culturas. Houve também uma ligeira queda na viabilidade de La e Lb, embora estatisticamente significativa. Esses resultados em conjunto sugerem que, apesar dos benefícios acima descritos em termos da qualidade do produto, a utilização de microorganismos na mais complexa mistura conduz à redução acentuada do crescimento de todos eles, como a consequência lógica de uma maior concorrência

para os mesmos substratos. No entanto, a única bactéria cuja contagem na cultura mista mantido abaixo do limite recomendado de 7,0 logUFC.mL^{-1} foi Lr no meio, sem inulina; portanto, a suplementação de leite desnatado com inulina parece ser um requisito fundamental para atingir todas as desejadas características microbiológicas do produto.

6.5 Conclusões

- Em co-cultura, a mais alta taxa de acidificação, foi obtida com St-Lb, na presença de inulina, confirmando o papel exercido por St Lb sobre a acidificação do iogurte;
- Consistentemente com o efeito prebiótico da inulina, o qual aumentou sensivelmente à média da taxa de acidificação, quer em co-culturas binárias como em cultura mista, e reduziu em média o tempo para atingir V_{max} na cultura mista;
- Ambos os tempos necessários para atingir pH 5,0 ou para completar a fermentação foram significativamente reduzidos na cultura mista com respeito à co-culturas binárias, quer na ausência ou na presença de inulina; O efeito sinérgico entre os selecionados microorganismos observados na cultura mista foi mais forte do que o próprio efeit prebiótico qua a inulina proporciona;
- A inulina reduziu um pouco a acidez, especialmente no caso da cultura mista;
- Depois de D1, o efeito do prebiótico da inulina foi notável apenas para a co-cultura St-Bl, enquanto que após D7, foi-lo para todas as co-culturas. Tanto em D1 e D7, as enumerações de Lr Bl na cultura mista diminuiram acentuadamente em comparação com as respectivas co-culturas binárias, em consequência de uma maior concorrência dos microorganismos pelos mesmos substratos.

CAPÍTULO VII

7. CRESCIMENTO E PERFIL DE ACIDIFICAÇÃO DOS PROBIÓTICOS EM CULTURA PURA E CO-CULTURA COM *Streptococcus thermophilus*: O EFEITO DA INULINA[4]

7.1 Resumo

A inulina foi usada como prebiótico para melhorar a qualidade e a consistência do leite desnatado fermentado por *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus bulgaricus* e *Bifidobacterium lactis* em culturas puras e em co-culturas com *Streptococcus thermophilus*. Foram comparados, tanto na presença ou ausência de 4 g inulina.100 g^{-1}, os resultados para os principais parâmetros cinéticos, especialmente o tempo de geração (t_g), a taxa máxima de acidificação (V_{max}) e os tempos para se alcançar V_{max} (t_{max}), para atingir o pH 5,0 ($t_{pH5.0}$) e para completar a fermentação ($t_{pH4.5}$). Pós-acidificação, formação de ácido lático e contagens celulares foram também determinadas e comparadas, tanto em 1 dia após a fermentação e/ou 7 dias de armazenamento a 4°C. Em geral, a adição de inulina aumentou, nas co-culturas, V_{max}, diminuiu t_{max}, t_g e $t_{pH4.5}$, favoreceu a pós-acidificação, exerceu um efeito bifidogênico, e preservou quase que intacta a viabilidade celular durante o armazenamento. Além disso, *S. thermophilus* estimulou o metabolismo das outras bactérias láticas. Contrariamente das co-culturas, a maioria dos efeitos não foram estatisticamente significativos em culturas puras. O mais importante aspecto do presente estudo foi o uso do tempo de geração como ferramenta pra investigar o comportamento de probióticos em leite em presença de inulina.

[4] OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. ***LWT – Food Science and Technology***, v.42, p.1015-1021, 2009. DOI:10.1016/j.lwt.2009.01.002. [Fator de Impacto: 1,887].

7.2 Introdução

Prebióticos são componentes não digestíveis de alimentos funcionais que estimulam a proliferação e a atividade das populações bacterianas desejáveis no cólon e inibem multiplicação de patógenos, por conseguinte, agindo beneficamente sobre o hospedeiro (ROBERFROID, 2000; MATTILA-SANDHOLM *et al.,* 2002). Os mais importantes prebióticos são glucanos, frutanos, mananos e, muitas vezes substâncias contidas em resíduos agroindustriais (PIAD *et al.,* 2006). Entre frutanos, inulina e oligofrutoses, fibras solúveis e fermentecíveis, são as mais conhecidas. Estas atingem o intestino grosso praticamente intactos, são então hidrolisados na parte superior do intestino (CARABIN; FLAMM, 1999) e fermentados por bactérias (ROBERFROID; GIBSON, 1998).

Além disso, prebióticos podem exercer um efeito protetor aos probióticos, melhorando a sobrevivência durante o armazenamento do produto (DONKOR *et al*., 2007). Bactérias ácido-lácticas isoladas do trato gastrointestinal de humanos e animais são conhecidos como probióticos. Quando usados em grandes quantidades na preparação de alimentos, são capazes de sobreviver à passagem pelo trato digestivo superior e aderir a células intestinais, ajudando no equilíbrio intestinal. Probióticos utilizados em produtos lácteos funcionais pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces*. Para realizar os benefícios desejados, os probióticos devem estar presentes no produto em contagens viáveis durante toda a sua vida-de-prateleira. Foi recomendado que a dose mínima capaz de assegurar os efeitos terapêuticos devem estar no intervalo 7-9 $logUFC.mL^{-1}$ (DAVE; SHAH, 1997; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997). No entanto, a viabilidade dos probióticos em preparações comerciais é afetada por vários fatores, tais como temperatura, acidez e presença de outros microorganismos e oxigênio (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; SHAH, 2000a).

Inulina ou oligofrutoses foram freqüentemente empregadas principalmente nos estudos dedicados a melhorar a viabilidade bacteriana durante o armazenamento de longo prazo, onde *Bifidobacterium* spp. foi o principal foco da pesquisa (SHIN *et al*., 2000; BRUNO *et al.,* 2002; AKALIN *et al.,* 2004), devido a perda de viabilidade celular após a fabricação do iogurte (DAVE; SHAH, 1997).

Donkor *et al.* (2007) recentemente demonstraram que a suplementação de iogurte com inulina em baixa concentração melhora significativamente o crescimento e a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* como probióticos utilizados no iogurte durante o armazenamento refrigerado. No entanto, outros lactobacilos merecem atenção por causa de seus efeitos de promoção da saúde (SHAH, 2000b, 2001).

Embora alguns autores tenham proposto utilizar o tempo de geração como uma ferramenta para investigar a dinâmica microbiana tanto em cultura pura como mista (BRUNO *et al.,* 2002; LIONG; SHAH, 2005), ainda a literatura é escassa com relação a essa questão. Os primeiros autores usaram este parâmetro para confirmar o efeito estimulador da inulina sobre o crescimento da bifidobactéria, já evidenciado por outros autores (GIBSON; WANG, 1994; ROBERFROID; GIBSON 1998). Contrariamente, um efeito prebiótico não desejado foi relatada pelo uso da inulina por Shin *et al.* (2000), provavelmente devido ao uso de uma determinada estirpes de *Bifidobacterium*. Também a este respeito, há poucas referências com relação ao uso de lactobacilos. Foram realizados poucos estudos em culturas puras de *L. acidophilus* (DU PLESSIS *et al*.,1996; CHOU; WEIMER, 1999; ORDONEZ *et al*., 2000; BRIZUELA *et al*., 2001), *Lactobacillus rhamnosus* (GOLDIN, 1998; JYOTI *et al*., 2004), *Lactobacillus bulgaricus* (RADKE-MITCHELL; SANDINE, 1986; KIMMEL; ROBERTS, 1998), *Lactobacillus plantarum* e *L. casei* (GONZÁLEZ *et al*., 2008).

Com base neste cenário, inulina aparece como um importante ingrediente alimentar que possa ser ainda explorada para a produção de alimentos funcionais (NINESS, 1999); no entanto, diversas questões têm de ser respondidas para se avançar nesse campo. Para este propósito, os comportamentos de diferentes probióticos (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) foram comparados em cultura pura ou em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*, usando o tempo de geração como o principal parâmetro cinético.

Assim, os principais objetivos são: a) investigar o efeito sinérgico entre esses microrganismos em co-cultura com *S. thermophilus*; b) avaliar a capacidade de *L. rhamnosus* para ser utilizado potencialmente como probiótico em preparação de leites fermentados; c) destacar o efeito prebiótico da inulina sobre produção de

leite fermentado seja em mono como em co-culturas; d) produzir leite fermentado com uma carga de bactérias probióticas mais estável com respeito aos produtos comerciais, e) aumentar a produtividade industrial dos leites fermentados.

7.3 Material e métodos

Culturas microbianas

Foram utilizadas cinco estirpes de culturas puras iniciadoras comerciais liofilizadas (Danisco, ZA des Engenières, France): *S. thermophilus* TA040 (St) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 (Lb) - microrganismos do iogurte, e *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr) e *Bifidus lactis* BL 04 (Bl) - microrganismos probióticos.

Preparação do leite

O leite foi preparado adicionando-se 13 g de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brasil) em 100 g de água destilada (base de leite) sem adição de inulina (M) e suplementada (SM) com 4 $g.100g^{-1}$ de da fibra em questão (nome comercial: Beneo TM) (Orafti Active Food Ingredients, Oreye, Bélgica). O conteúdo de sólidos totais da base do leite corresponde ao valor médio relatado por Restle *et al.* (2003).

As bases do leite controle e suplementadas foram homogeneizadas com auxílio de agitador magnético por 15 min e tratadas termicamente a 90°C durante 5 minutos em equipamento de banho-maria (Fisatom, Modelo 550 A, local). O leite tratado foi recolhido e transferido a garrafas estéreis de 1 L, imediatamente resfriado em banho de gelo, distribuído em erlenmeyrs estéreis de 250 mL em câmara de fluxo laminar e, acondicionados em câmara fria a 4°C por 24 h antes da utilização.

Preparação do inóculo

Foi preparada uma pré-cultura com La na qual se adicionou 100 mg de cultura pura em 50 mL de leite autoclavado reconstituído a 10% de sólidos totais. Após a homogeneização, 1 mL da pré-cultura (ativada em banho-maria a 42ºC por 30 minutos) foi inoculado em frascos de 250 mL. O mesmo procedimento foi utilizado para a preparação de pré-culturas de Lb, Lr, Bl e St adicionando 400 mg, 130 mg, 45 mg e 90 mg respectivamente de cultura pura em 50 mL de leite a 10% autoclavado a 121°C durante 20 minutos. As valores das contagens em média nas diferentes pré-culturas variaram de 6,1 a 6,5 logUFC.mL^{-1}.

Fermentação

Após a inoculação, as amostras foram colocadas em banho-maria acoplado ao sistema CINAC, Ysebaert, Frépillon, França até obter a estabilização da temperatura a 42°C. A fermentação foi conduzida até atingir o pH 4,5, selecionado como a condição de parar afermentação. As fermentações foram monitoradas usando o sistema CINAC, o qual permitiu a medição e registro do pH continuamente avaliando a taxa de acidificação.

Pós-acidificação e acidez

A pós-acidificação do leite fermentado foi determinada 1 dia após a fermentação (D1) e após 7 dias de armazenamento a 4ºC (D7) através da medição do pH utilizando um pHmeter modelo Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brasil). A acidez, expressa em g.100 g^{-1} de ácido lático, foi determinada em triplicata por titulação com 0,11 mol equiv.L^{-1} de solução de NaOH, segundo o método No. 907.124 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1995).

Contagens de bactérias probióticas

As contagens bacterianas foram efetuadas após 1 dia da fermentação (D1) e após 7 dias de armazenamento refrigerado (D7) em quadruplicata. Um mL da amostra foi diluída em 9 mL de 1 $g.L^{-1}$ de água peptonada estéril. Posteriormente, oito diluições em série foram realizadas, e cada bactéria foi enumerada nas três diluições mais adequadas, aplicando a técnica semeadura em profundidade (KODAKA *et al.,* 2005). As contagens foram finalmente expressas como valores médios. Todos os meios de cultura foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As colônias de St foram enumeradas em ágar M17 em condições aeróbia de incubação a 37ºC por 48 h. As contagens de Lb, La e Lr foram realizadas em MRS Agar e o seu pH foi ajustado a 5,4 por adição de ácido acético, em anaerobiose a 37ºC por 48, 72 e 72 h, respectivamente. Bl foi enumerado em MRS Agar contendo 50 $g.L^{-1}$ de cisteína sem qualquer ajuste de pH (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1996, 1997, 2003).

Parâmetros cinéticos

A partir dos dados coletados, a taxa de acidificação (V_{max}) foi calculada como a variação do tempo com o pH (dpH/dt) e expressa em 10^{-3} unidades de $pH.min^{-1}$. Durante o período de incubação, os seguintes parâmetros cinéticos também foram calculadas: (i) t_{max} (h), tempo em que foi atingido V_{max}, (ii) $t_{pH5.0}$ (h), tempo para atingir pH 5,0, (iii) $t_{pH4.5}$ (h), tempo para atingir pH 4,5 (ou seja, para completar a fermentação); e (iv) t_g (h), tempo de geração dos microorganismos.

Quando o pH 4,5 foi atingido, a fermentações foram manualmente interrompidas por agitação asséptica do coágulo por meio de uma haste de aço inoxidável com discos perfurados; a haste foi movida suavemente para cima e para baixo por 80 s. O produto fermentado foi colocado em copos de polipropileno de 50 mL, selado termicamente utilizando um equipamento Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil) e rapidamente resfriado em banho de gelo. Os produtos fermentados foram armazenadas a 4ºC.

A cinética de acidificação e de crescimento foi investigada durante toda a fermentação do leite, sem adição de inulina (M) ou em leite suplemantado com 4 g.100 g^{-1} de inulina (SM), por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ou *B. lactis*, ou em culturas puras de todos estes microorganismos. Em particular, a máxima taxa específica de crescimento (μ_{max}) foi calculada para cada microrganismo durante a sua fase de crescimento exponencial segundo a equação:

$$\mu_{\max} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \ln \frac{X_2}{X_1} \qquad (1)$$

em que X_2 e X_1 são as contagens (UFC.mL^{-1}) nos tempos t_2 e t_1.

O tempo de geração (t_g) foi calculado para cada cultura a partir do valor correspondente de μ_{max} através da equação:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \qquad (2)$$

Análises estatísticas

Os dados experimentais de V_{max}, t_{max}, $t_{pH5.0}$, $t_{pH4.5}$, t_g , bem como de pH, contagem bacteriana e de concentração em ácido lático, em D1 e D7, foram apresentados como valores médios. As variações no que diz respeito aos valores médios foram apresentadas com seus respectivos desvios padrão. Os valores médios dos parâmetros acima foram submetidos à análise de variância (ANOVA) através do Software Statistica 6.0 e comparados usando o teste de Tukey, $P < 0,05$. As diferentes letras foram utilizadas para rotular os valores com diferença estatisticamente significativa entre eles.

7.4 Resultados e discussão

Cinética de acidificação e tempo de geração

Co-culturas

A Tabela 08 mostra a cinética de acidificação do leite, quer na presença (SM) ou ausência (M) de 4 g.100 g^{-1} de inulina, fermentado por *Lactobacillus bulgaricus* (St-Lb), *Lactobacillus acidophilus* (St-La), *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) e *Bifidobacterium lactis* (St-Bl), em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*.

V_{max} variou de $15{,}9.10^{-3}$ upH.min^{-1} (St-Lr em M) para $19{,}0.10^{-3}$ upH.min^{-1} (St-Lb em SM). Considerados como valores médios, esse parâmetro foi cerca de 6% mais elevado na presença de inulina, mostrando variações estatisticamente significativas. Além disso, os maiores valores de V_{max} foram obtidos com a co-cultura St-Lb, tanto em M quanto em SM, confirmando as observações feitas por Kristo *et al*., (2003) com respeito ao papel destas duas bactérias termofílicas na cinética de acidificação. t_{max} variou de 2,97 h (St-Lb em SM) a 3,25 h (St-Bl em M), mostrando uma variação estatistica significativa. Como era esperado a inulina mostrou um efeito prebiótico, devido à sua hidrólise parcial e fermentação, apresentando, quando usada, um valor médio de t_{max}, de 3,09 h e 3,16 h na ausência de inulina. Kristo *et al.* (2003) obtiveram valor similar de t_{max} (2,65 h) em co-cultura de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei*, provavelmente devido ao efeito sinérgico entre esses microorganismos. Um comportamento semelhante ao de t_{max} foi observado no tempo necessário para atingir pH 5,0 ($t_{pH5.0}$), que variou de 3,61 h (St-Lb em SM) a 4,67 h (St-La em M) (Tabela 08).

Por outro lado, o tempo para completar a fermentação ($t_{pH4.5}$) dependia fortemente não somente da adição de inulina, mas também da co-cultura e, em todos os casos, as variações foram estatisticamente significativas. Como esperado, o menor tempo fermentação ($t_{pH4.5}$ = 5,4 h) foi obtido na presença dos microrganismos típicos do iogurte (St-Lb em SM), enquanto que as outras co-culturas probióticas durou quase o dobro do do tempo ($t_{pH4.5}$ = 10,1-10,6 h em M).

Além disso, a adição de inulina reduziu o tempo de fermentação em cerca de 10%, em média, confirmando assim o seu efeito prebiótico já evidenciado por outros autores usando bifidobactéria (SHIN *et al.,* 2000; BRUNO *et al.,* 2002; AKALIN *et al*., 2004; DONKOR *et al.*, 2007) e em lactobacilos (SHAH, 2000b, 2001; DONKOR *et al*., 2007).

Conforme sugerido por Bruno *et al.* (2002) e por Liong e Shah (2005), o tempo de geração (t_g) pode ser usado como uma medida de eficácia de um especifico prebiótico para modular a taxa de crescimento bacteriano. Como esperado, *S. thermophilus*, sendo a principal cultura iniciadora iogurte, apresentou em todas as co-culturas o menor tempo de geração (0,22-0,28 h), o qual praticamente coincidiu com o valor relatado por Talon *et al.* (2002) para esta bactéria, em co-cultura com Lb no leite desnatado. Contrariamente, t_g de Lb relatado por esses autores foi cerca de um terço menor à obtida no presente estudo, provavelmente devido à diferente composição do leite. Por outro lado, o longo tempo de geração da cultura Lr (0,76 h em M e 0,55 h em SM) (Tabela 08) poderia ser devido à sua necessidade de co-metabolismo do citrato e induzindo a formação de citrato permease (JYOTI *et al*., 2004). A significativa redução deste parâmetro induzida pela inulina tanto para St (12%) como para os outros microorganismos considerados nesse trabalho (26 %) é mais uma confirmação do seu efeito prebiótico.

Tabela 08. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por co-culturas de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) com *S. thermophilus* (St)*.

Ensaio	Co-cultura	V_{max} (10^{-3} upH/min)	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	$t_{pH4.5}$ (h)	t_g (h)**
Leite						
1	St-Lb	$18,0 \pm 0,4^{bc}$	$3,0 \pm 0,1^{ab}$	$3,7 \pm 0,1^{ab}$	$5,5 \pm 0,1^{a}$	$0,27 \pm 0,01/0,53 \pm 0,02$
2	St-La	$16,3 \pm 0,7^{ab}$	$3,2 \pm 0,0^{b}$	$4,7 \pm 0,1^{c}$	$10,4 \pm 0,7^{d}$	$0,27 \pm 0,01/0,44 \pm 0,01$
3	St-Lr	$15,9 \pm 0,7^{a}$	$3,1 \pm 0,1^{ab}$	$4,4 \pm 0,3^{c}$	$10,6 \pm 0,2^{d}$	$0,28 \pm 0,00/0,76 \pm 0,03$
4	St-Bl	$16,0 \pm 1,1^{abc}$	$3,2 \pm 0,1^{b}$	$4,6 \pm 0,2^{c}$	$10,1 \pm 0,4^{cd}$	$0,26 \pm 0,01/0,57 \pm 0,04$
Leite suplementado com 4 g de inulina.100g^{-1}						
5	St-Lb	$19,0 \pm 0,8^{c}$	$3,0 \pm 0,1^{a}$	$3,6 \pm 0,1^{a}$	$5,2 \pm 0,1^{a}$	$0,23 \pm 0,01/0,42 \pm 0,03$
6	St-La	$17,3 \pm 0,8^{abc}$	$3,2 \pm 0,0^{ab}$	$4,2 \pm 0,1^{bc}$	$9,4 \pm 0,7^{c}$	$0,27 \pm 0,02/0,37 \pm 0,02$
7	St-Lr	$17,1 \pm 1,0^{abc}$	$3,1 \pm 0,1^{ab}$	$4,2 \pm 0,3^{bc}$	$8,3 \pm 0,4^{b}$	$0,23 \pm 0,03/0,55 \pm 0,03$
8	St-Bl	$17,0 \pm 0,9^{ab}$	$3,1 \pm 0,1^{ab}$	$4,5 \pm 0,4^{c}$	$9,2 \pm 0,3^{bc}$	$0,22 \pm 0,01/0,37 \pm 0,02$

* V_{max} = taxa máxima de acidificação; t_{max} = tempo para atingir V_{max}; $t_{pH5.0}$ = tempo para atingir pH 5,0; $t_{pH4.5}$ = tempo para completar a fermentação (pH 4,5). Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa entre os valores do mesmo parâmetro, de acordo com o teste de Tukey (* $P < 0,05$). ** Valores determinados a partir dos gráficos sem o uso da estatística ± Desvio padrão em relação aos valores obtidos em quadriplicata.

Culturas puras

Os parâmetros cinéticos de acidificação do leite pelos referidos microrganismos utilizados em culturas puras estão listados na Tabela 09.

V_{max} variou de $6,70.10^{-3}$ upH.min^{-1} (Lb em M) a $17,8.10^{-3}$ upH.min^{-1} (Lr em M), com variações significativas para todas as culturas. Comparando os valores deste parâmetro, é evidente que, com excepção do Lr, na ausência de inulina, todos as outras mono-culturas apresentaram as piores cinéticas em relação às respectivas co-culturas, confirmando a ação estimulante do St, principalmente quando em co-cultura com Lb favorecendo o metabolismo entre eles (RADKE-MITCHELL; SANDINE,

1986). Esta bactéria foi, de fato, a que apresentou a taxa de acidificação mais lenta, sendo que obteve um melhor comportamento metabólico quando estava em co-cultura.

A cultura Bl foi a que apresentou o maior t_{max} (10,9 h em M), mas mostrou-se ser a única cultura pura no qual a inulina exerceu um efeito prebiótico estatisticamente significativo (9,62 h em SM). O tempo para atingir pH 5,0 variou de 4,86 h (St em SM) para 11,3 h (Lb em M), e para completar a fermentação ($t_{pH4.5}$) de 11,6 h (St em SM) a 16,3 h (Bl em M). Os altos valores de t_{max} e de $t_{pH4.5}$ obtidos pelas culturas puras evidencia o efeito benéfico do *S. thermophilus* no metabolismo das outras bactérias anteriormente ressaltadas pelo V_{max}.

Por outro lado, o efeito da inulina sobre as culturas puras, embora estatisticamente significativa do ponto de vista, não forneceu qualquer informação clara, porque V_{max} e t_{max} variou de uma cultura para a outra sem correlação significativa entre elas (Tabela 09).

Como demonstrado pelos valores de tempo de geração, contrariamente às observações feitas anteriormente para bifidobacteria (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; GÓMEZ, 2007), houve baixa correlação entre a taxa de crescimento e a capacidade de acidificação, provavelmente devido a diferentes durações das fases lag. No entanto, a suplementação com a inulina baixou o t_g significativamente, com especial atenção para o microrganismo St e La (cerca de 30%), o que significa que foi exercido um efeito prebiótico, mesmo nas culturas puras. Além do efeito estimulante da inulina sobre o crescimento, já observada em bifidobactéria (BRUNO *et al.,* 2002; AKALIN *et al.,* 2004) e lactobacilos (DESAI *et al*., 2004), foi recentemente atribuída uma maior produção de iogurtes com adição de nutrientes (MAKRAS *et al.,* 2005), bem como aminoácidos e vitaminas (DESAI *et al.* 2004; DONKOR *et al.,* 2007).

Além disso, os valores de t_g para todos os todos os microorganismos, incluindo St, foram notavelmente mais elevados do que as co-culturas, tanto na presença como na ausência de inulina, demonstrando o sinergismo entre as co-culturas. O valor de t_g = 0,42 h relatado para St na ausência de inulina (O'SULLIVAN; FITZGERALD, 1999; PERRIN *et al.*, 1999) coincidiu com o obtido no presente estudo. Como esperado, devido à difícil metabolização dos dissacáridos

(GOLDIN, 1998), Lr exibiu um tempo de geração muito longo (1,01 h) que diminuiu cerca de 8% na presença de inulina. Lb mostrou em M t_g próximo aquele relatado na literatura em leite em pó desnatado reconstituído (0,67-1,30 h) (RADKE-MITCHELL; SANDINE, 1986). La revelou o maior t_g em M (1,49 h), que correspondeu aos intervalos de valores (0,63-2,9 h) revelados para leite desnatado reconstituído (CHOU; WEIMER, 1999) e leite desnatado (ORDONEZ *et al*., 2000). O tempo de geração de Bl foi menor do que aqueles relatados para diferentes isolados de leite desnatado UHT (t_g = 1,51-1,63 h), o que sugere uma certa tolerância ao oxigênio e ao ácido (MARTÍNEZ-VILLALUENGA; GÓMEZ, 2007). As características interessantes da estirpes Bl fizeram com que ela fosse introduzida na indústria de produtos lácteos fermentados (MEILE *et al*., 1997).

Tabela 09. Parâmetros cinéticos de acidificação do leite fermentado por culturas puras de *L. Bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) e *S. thermophilus* (St)*.

Ensaio	Cultura	V_{max} (10^{-3} upH/min)	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	$t_{pH4.5}$ (h)	t_g (h)**
Leite						
1	St	$16,5 \pm 0,1^{ef}$	$3,2 \pm 0,0^{a}$	$5,1 \pm 0,1^{a}$	$11,6 \pm 0,0^{a}$	$0,45 \pm 0,02$
2	Lb	$6,7 \pm 0,6^{a}$	$3,2 \pm 0,1^{a}$	$11,3 \pm 0,1^{f}$	$15,8 \pm 0,0^{g}$	$0,98 \pm 0,06$
3	La	$15,2 \pm 0,1^{de}$	$5,9 \pm 0,2^{b}$	$7,3 \pm 0,0^{b}$	$12,9 \pm 0,1^{c}$	$1,49 \pm 0,11$
4	Lr	$17,8 \pm 0,1^{f}$	$7,1 \pm 0,1^{c}$	$8,4 \pm 0,0^{c}$	$13,8 \pm 0,1^{d}$	$1,01 \pm 0,10$
5	Bl	$10,7 \pm 0,1^{c}$	$10,9 \pm 0,1^{e}$	$12,5 \pm 0,1^{g}$	$16,3 \pm 0,0^{h}$	$0,85 \pm 0,06$
Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}						
6	St	$15,6 \pm 0,1^{de}$	$3,4 \pm 0,0^{a}$	$4,9 \pm 0,1^{a}$	$11,6 \pm 0,0^{a}$	$0,33 \pm 0,03$
7	Lb	$8,7 \pm 0,5^{b}$	$3,4 \pm 0,1^{a}$	$10,4 \pm 0,1^{e}$	$16,2 \pm 0,0^{h}$	$0,87 \pm 0,08$
8	La	$14,3 \pm 0,2^{d}$	$5,9 \pm 0,2^{b}$	$7,4 \pm 0,0^{b}$	$12,3 \pm 0,1^{b}$	$0,94 \pm 0,01$
9	Lr	$15,7 \pm 0,0^{de}$	$7,3 \pm 0,1^{c}$	$8,8 \pm 0,0^{d}$	$15,0 \pm 0,0^{e}$	$0,93 \pm 0,06$
10	Bl	$15,9 \pm 0,3^{de}$	$9,6 \pm 0,1^{d}$	$10,6 \pm 0,1^{e}$	$15,2 \pm 0,1^{f}$	$0,79 \pm 0,05$

* V_{max} = taxa máxima de acidificação; t_{max} = tempo para atingir V_{max}; $t_{pH5.0}$ = tempo para atingir pH 5,0; $t_{pH4.5}$ = tempo para completar a fermentação (pH 4,5). Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa entre os valores do mesmo parâmetro, de acordo com o teste de Tukey (* $P < 0,05$). ** Valores determinados a partir dos gráficos sem o uso da estatística. ± Desvio padrão em relação aos valores obtidos em quadriplicata.

Pós-acidificação e acidez

De acordo com Souza (1991), a acidez dos iogurtes comerciais é amplamente variável, variando de 700 a 1.250 mg.100 g^{-1} de ácido lático ou pH 3,7-4,6. No entanto, para evitar o excesso de acidez ao paladar, os valores ótimos devem ser entre os intervalos de 70-90 mg.100 g^{-1} e 4,0-4,4, respectivamente.

Os resultados de pós-acidificação (pH) e acidez (teor de ácido lático) do leite fermentado pelas bactérias selecionadas em co-cultura com *S. thermophilus* são listados na Tabela 10 tanto em 1 dia após a fermentação (D1) quanto após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). Esses parâmetros devem ser de fato, considerados como os melhores critérios para expressar a acidez dos iogurtes (SOUZA, 1991), e os selecionados tempos de armazenamento os mais adequados para investigar a dinâmica de crescimento durante a fermentação do leite.

A parte um caso, as variações de pH e a conseqüente produção de ácido lático, com a adição de inulina, passando de D1 para D7 as variações estatísticas não foram significativas. No entanto, os dados foram avaliados fazendo referência aos valores médios para todas as co-culturas.

O armazenamento a frio durante 7 dias levou a uma acidificação com relação a D1 em 0,11-0,13 unidade de pH, enquanto que nenhum efeito significativo foi exercida pela adição de inulina. Estes resultados estão de acordo com a acidez devido ao incremento de ácido lático que aumentou, em média, em 90-100 mg.100 g^{-1} passando de D1 para D7.

Os valores de pH após D1 não estão tão longe daqueles relatados por Moreira *et al.* (2000) (3,76-4,39), os quais analisaram amostras de leite fermentado por diferentes estirpes de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Além disso, Damin *et al.* (2006) detectaram concentração média de ácido lático em iogurtes comerciais (1.010 mg.100 g^{-1}) praticamente coincidente com o valor médio obtido no presente estudo em D7.

Os correspondentes resultados de pós-acidificação e ácido lático produzidos pelas culturas puras dos mesmos microrganismos estão listados na Tabela 11. Deve ser notado que os resultados bastante coincidentes com os das co-culturas foram obtidos tanto em termos de pH quanto de ácido lático. Além

disso, o efeito da adição de inulina foi apenas, em alguns casos, estatisticamente significativa, passando de D1 para D7 conduziu a uma queda de pH de 0,11-0,12 e aumento da acidez de 60-70 mg.100 g^{-1}.

Tabela 10. Pós-acidificação (pH) e acidez do leite fermentado por co-culturas de *S. thermophilus* with *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) e *B. lactis* (St-Bl) em 1 dia após a fermentação (D1) ou após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7) *.

		pH		Acidez (mg ácido lático.100 g^{-1})	
Ensaio	Co-cultura	D1	D7	D1	D7
Leite					
1	St-Lb	$4,39^{abc}$	$4,27^{ab}$	880^{ab}	1010^{ab}
2	St-La	$4,37^{a}$	$4,27^{ab}$	980^{c}	1060^{ab}
3	St-Lr	$4,46^{d}$	$4,35^{b}$	900^{ab}	930^{a}
4	St-Bl	$4,45^{bcd}$	$4,31^{ab}$	840^{a}	960^{ab}
Leite suplementado com 4 g inulina.100 g^{-1}					
5	St-Lb	$4,37^{a}$	$4,21^{a}$	920^{bc}	1010^{ab}
6	St-La	$4,39^{ab}$	$4,25^{ab}$	930^{bc}	1090^{b}
7	St-Lr	$4,42^{abcd}$	$4,33^{b}$	890^{ab}	960^{a}
8	St-Bl	$4,45^{bcd}$	$4,32^{b}$	850^{a}	950^{a}

* Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey (* $P < 0,05$).

Tabela 11. Pós-acidificação (pH) e acidez do leite fermentado por culturas puras de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl), em 1 dia após a fermentação (D1) ou após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7)*.

		pH		Acidez (mg de ácido lático.100 g^{-1})	
Ensaio	Cultura	D1	D7	D1	D7
Leite					
1	St	$4,36^{b}$	$4,26^{b}$	940^{e}	980^{c}
2	Lb	$4,36^{b}$	$4,24^{a}$	930^{e}	980^{c}
3	La	$4,34^{ab}$	$4,24^{a}$	990^{f}	1030^{d}
4	Lr	$4,44^{c}$	$4,32^{d}$	890^{d}	970^{c}
5	Bl	$4,49^{e}$	$4,37^{e}$	850^{bc}	950^{bc}
Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}					
6	St	$4,36^{ab}$	$4,27^{b}$	940^{e}	970^{c}
7	Lb	$4,46^{d}$	$4,30^{c}$	840^{ab}	930^{ab}
8	La	$4,34^{ab}$	$4,24^{a}$	1030^{g}	1080^{e}
9	Lr	$4,46^{d}$	$4,33^{d}$	880^{cd}	970^{c}
10	Bl	$4,50^{e}$	$4,37^{e}$	820^{a}	900^{a}

* Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatisticamente significativa entre os valores, de acordo com o teste de Tukey (* $P < 0,05$).

Análise microbiológica

A Figura 20 mostra as contagens em leites fermentados de bactérias lácticas, em co-cultura com *S. thermophilus*. Após D1, as contagens de *S. thermophilus* foram cerca de 9 logUFC.mL^{-1}, sem efeitos estatisticamente significativos tanto com a presença de inulina quanto em co-cultura. A parte La, a inulina estimulou significativamente o crescimento das outras bactérias lácticas, com especial referência à Bl.

Similar estimulação do crescimento de *B. bifidum* BB-02 foi observada por Özer *et al.* (2005) no leite suplementado com inulina ou lactulose. Após D7, não somente a inulina estimulou o crescimento das bactérias lácticas, mas também as contagens de todas elas não decresceram comparando com D1. Este último

resultado, que confirma certa estabilidade na viabilidade celular como observada por Donkor *et al.* (2007) para *L. casei* e La durante quatro semanas de armazenamento refrigerado, na presença de 5-15 $g.L^{-1}$ de inulina; esta observação é de particular importância, tendo em conta que uma das funções mais importantes dos prebióticos é justamente promover ou melhorar a sobrevivência e atividade dos probióticos durante o armazenamento.

Finalmente, os resultados ilustrados na Figura 21 demonstram que nenhum dos efeitos observados acima em co-culturas foram confirmados quando se empregaram culturas puras, o que significa que a atividade prebiótica da inulina é exercida somente em co-cultura com *S. thermophilus*.

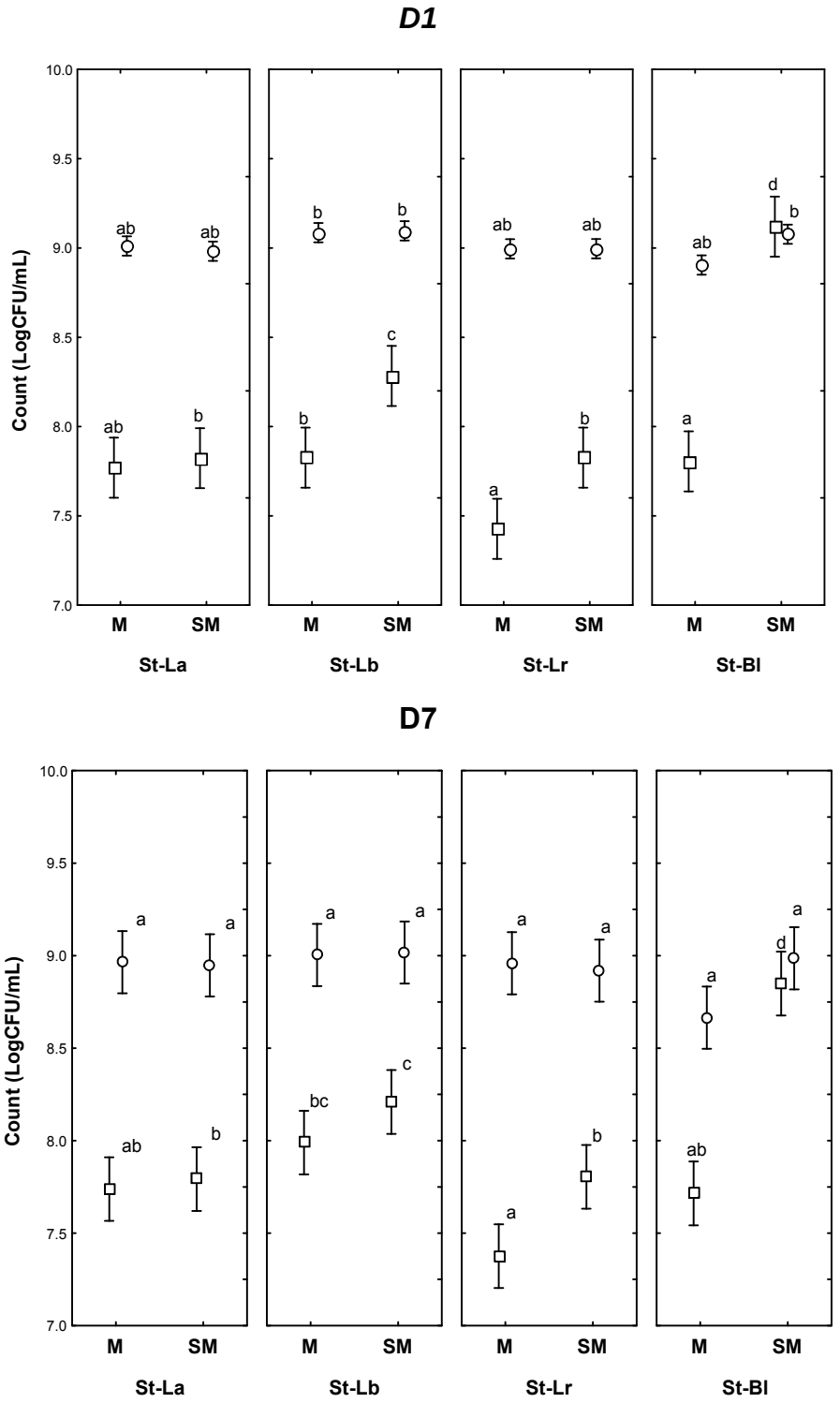


Figura 20. Efeito da adição de inulina ao leite desnatado sobre as contagens de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ou *B. lactis* (□) em co-cultura com *S. thermophilus* (○), tanto 1 dia após a fermentação (D1) como após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). M = Leite controle; SM = Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}. As barras de erro representam os desvios-padrão dos resultados das fermentações em quadruplicata.

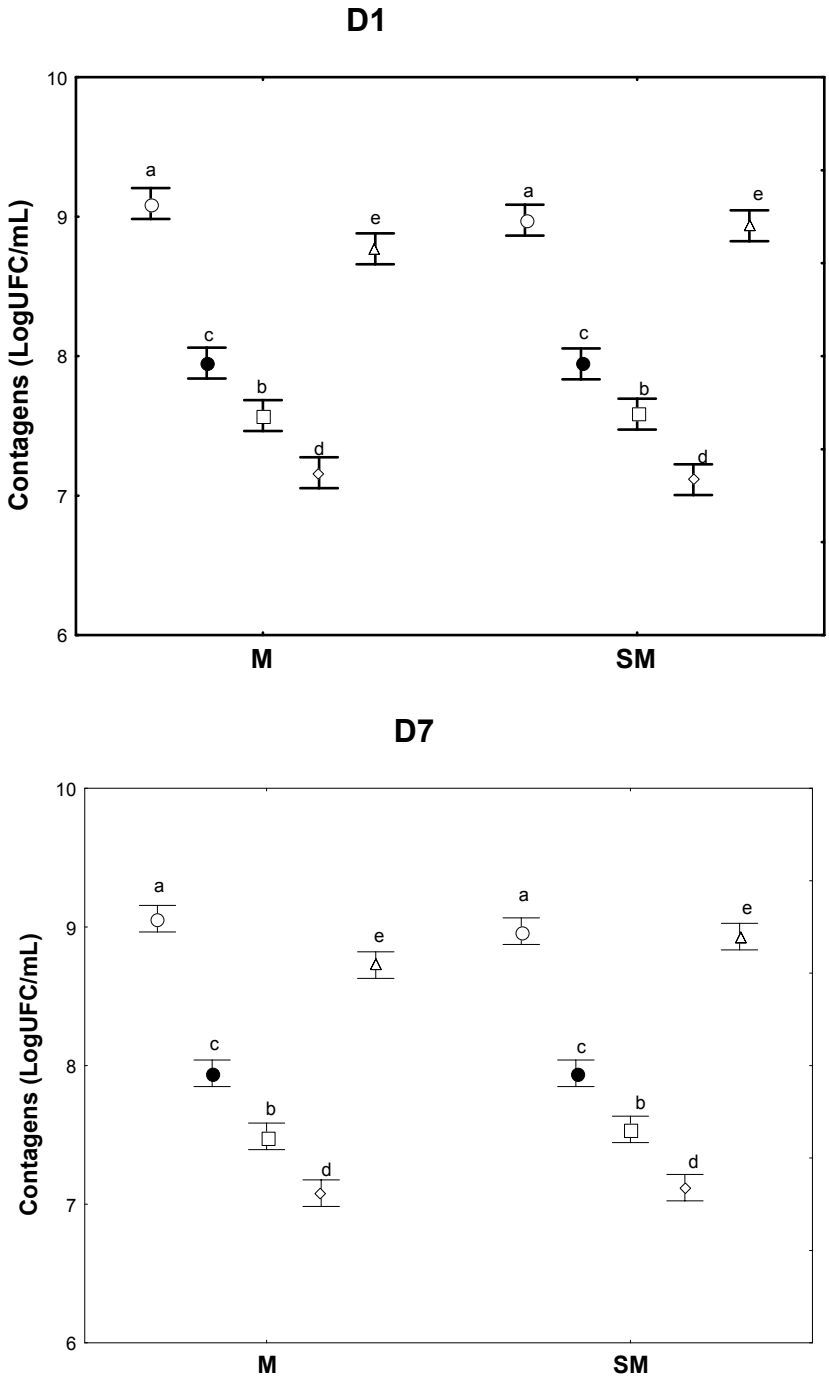


Figura 21. Efeito da adição de inulina ao leite desnatado sobre as contagens das culturas puras de pure *L. bulgaricus* (□), *L. acidophilus* (●), *L. rhamnosus* (◇), *B. lactis* (△) e *S. thermophilus* (○), tanto 1 dia após a fermentação (D1) como após 7 dias de armazenamento a 4°C (D7). M = Leite controle; SM = Leite suplementado com 4 g de inulina.100 g^{-1}. As barras de erro representam os desvios-padrão dos resultados das fermentações em quadruplicata.

7.5 Conclusões

- Em co-cultura, a cinética de acidificação foi reforçada pela adição de inulina ao leite, o qual aumentou a máxima taxa de acidificação diminuindo o tempo de geração, o tempo necessário para atingir V_{max} e aquele para completar a fermentação ($t_{pH4,5}$);
- A adição de inulina também favoreceu a pós-acidificação para todas as co-culturas investigadas e exerceram um evidente efeito bifidogênico;
- Todos os microrganismos apresentaram um maior crescimento e menor tempo de geração em co-cultura, comparando com a cultura pura, o que comprova a ocorrência de um sinergismo entre o metabolismo de *S. thermophilus* e os probióticos. Após 7 dias de armazenamento a 4°C, o efeito estimulante da inulina sobre o crescimento das bactérias, que não seja St, foi quase totalmente mantida, bem como a contagem de todos os probióticos que não diminuiu significativamente. Contrariamente às co-culturas, os efeitos tanto da inulina quanto o armazenamento a frio em culturas puras não foram estatisticamente significativos.

CAPÍTULO VIII

8. CO-METABOLISMO EM LEITE DESNATADO FERMENTADO de *Streptococcus thermophilus* EM CO-CULTURA COM *Lactobacillus bulgaricus* OU *Lactobacillus acidophilus*. O EFEITO DA INULINA COMO PREBIÓTICO[5]

8.1 Resumo

A fim de esclarecer as interações que ocorrem em leites fermentados, quando se utilizam co-culturas de *Streptococcus thermophilus* (St) com *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) e *Lactobacillus acidophilus* (La), foi proposto e verificado um novo modelo co-metabólico, fazendo uso de balanços de matéria do carbono, do grau de redução e do ATP. O St exibiu um rápido crescimento em relação aos dois outros microorganismos. A lactose foi apenas parcialmente fermentada a ácido lático, a galactose foi metabolizada em certa medida, e se formaram diacetil e acetoína em níveis apreciáveis. A acetoína e o diacetil provavelmente foram produzidos pelas atividades da α-acetolactato sintase e descarboxilase de St. Comparando as co-culturas de St-La e St-Lb, foram observados na segunda delas níveis mais elevados de acetoína e uma redução dos níveis de diacetil, provavelmente devido a condições mais reducentes ou a uma limitada desidrogenação da acetoína a diacetil. A adição de inulina em St-La suprimiu o acúmulo de acetoína e reduziu o de diacetil, sugerindo uma repressão catabólica da expressão da α-acetolactato sintase em St. Uma complexa influência do pH na atividade da α-acetolactato sintase e descarboxilase o na sua repressão em St poderia ter sido responsável pelo aumento dos níveis de ambos os produtos por St-Lb. Ambas as co-culturas apresentaram as maiores exigências de ATP para o crescimento e manutenção da biomassa durante a fase lag, por

[5] OLIVEIRA, R.P.S.; RIVAS TORRES, B.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Co-metabolism in skimmed milk of *Streptococcus thermophilus* in co-cultures *with Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. The effect of inulin as prebiotic. ***Journal of Bacteriology*** [Fator de Impacto: 3.636] (Aguardando publicação) .

causa das altas exigências energéticas para a indução de várias enzimas. A inulina diminuiu esses requerimentos tornando a síntese e a manutenção da biomassa menos exigentes em termos de energia. Apenas uma fração da galactose foi solta pela lactose, conforme o fenótipo galactose-positivo de muitas cepas láticas. A fração de galactose metabolizada sem a inulina foi cerca de duas vezes maior que na sua presença, provavelmente devido à inibição do transportador de galactose do St pela frutose liberada durante a hidrólise parcial da inulina.

8.2 Introdução

Os consumidores, em todo o mundo, estão se tornando cada vez mais conscientes da relação entre os alimentos ou componentes alimentares com a saúde. São cada vez mais valorizados produtos funcionais, ou seja, alimentos ou bebidas que oferecem específicos benefícios à saúde, além de nutrição básica (SALMERON *et al*., 2009). Hoje, a maioria das estirpes probióticas é utilizada em iogurtes, leites fermentados, sorvetes e produtos farmacêuticos visando promover efeitos positivos à saúde (MATTILA-SANDHOLM *et al*., 2002). É de extrema importância aumentar o conhecimento com respeito ao papel da microbiota intestinal na manutenção da saúde e na prevenção de doenças. Neste âmbito, o uso de probióticos oferece um meio para melhorar o balanço da flora intestinal, além de estimular o crescimento de determinados microrganismos em detrimento de bactérias potencialmente perigosas, estimulando o sistema imune (HOLZAPFEL *et al.,* 1998).

Os alimentos probióticos são formulados fermentados contendo um número suficiente de microrganismos vivos selecionados para modificar beneficamente a microbiota intestinal do hospedeiro (ARYANA *et al*., 2007). Os principais probióticos - microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem vantagens à saúde do hospedeiro, associados a este balanço intestinal são, sobretudo, lactobacilos e bifidobactérias (FAO/WHO, 2002; REID, 2006). Para produzir os benefícios desejados, as bactérias probióticas devem estar

presentes no produto em contagens viáveis ao serem consumidas. Kurmann e Rasic (1991) recomendaram que a dose mínima para causar efeito terapêutico está entre 10^8-10^9 UFC.mL^{-1}. Embora este nível não esteja bem estabelecido, ele deve variar de acordo com as espécies e as estirpes utilizadas. Outros pesquisadores sugeriram contagens entre 10^7-10^8 UFC.mL^{-1} (RYBKA; KAILASAPATHY, 1995; DAVE; SHAH, 1997; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997), porém este nível pode ser atingido aplicando doses diárias de 100 mL de produtos lácteos contendo 10^7 UFC.mL^{-1} de bactérias probióticas (OLIVEIRA *et al.,* 2002).

Os alimentos funcionais contendo probióticos em associação com prebióticos constituem em um dos setores de crescimento mais rápido no campo alimentar. A definição de "prebióticos" foi atualizada em 2004, e agora eles são definidos como "ingredientes seletivamente fermentados que permitem alterações específicas, tanto na composição e/ou atividade na microbiota gastrointestinal, que conferem bem-estar e promovem a saúde do hospedeiro" (GIBSON *et al.*, 2004).

Há pouca informação publicada relativa à produção tecnológica de produtos lácteos fermentados probióticos e às vias metabólicas seguidas por organismos específicos probióticos durante a fermentação do leite em particular em interação metabólica com outros. A mudança de vias metabólicas em resposta às condições ambientais está bem documentada na literatura no caso de lactobacilos homofermentativos e heterofermentativos (AXELSSON, 1998). Alterações metabólicas são muito importantes para se obterem perspectivas tecnológicas, uma vez que a quantidade de ácidos orgânicos e compostos voláteis é importante no desenvolvimento do sabor e da textura do produto fermentado. No entanto, as alterações metabólicas podem também ser importantes para que os microorganismos possam obter energia além de manter o balanço de NAD^+/ $NADH_2^+$ (AXELSSON, 1998; LOPEZ DE FELIPE; HUGENHOLTZ, 1999).

A lactose, principal açúcar das fermentações láticas, é eficientemente transportado e hidrolisado no interior da célula em *S. thermophilus*, porém muitas estirpes láticas fermentam apenas a glicose proveniente da lactose, enquanto a galactose é excretada no meio, resultando em um fenótipo galactose-negativo (DE VIN *et al*., 2005; SVENSSON *et al*., 2007). No entanto, outras estirpes se revelaram ligeiramente galactose-positivas (HUTKINS *et al*., 1986). Portanto, em

qualquer estudo metabólico, como o que se propõe aqui, é importante, para estimar o ATP produzido pelo metabolismo, levar em conta a percentagem de galactose, procedente da atividade β-galactosidásica, que cada microrganismo é capaz efetivamente de metabolizar.

As bactérias ácido-láticas usadas para fermentar produtos láticos, vegetais e carnes ajudam a preservar e promover propriedades nutricionais e sensoriais dos alimentos. Estas bactérias sintetizam cadeias curtas de ácidos graxos, vitaminas e exopolissacarídeos (KITAZAWA *et al.,* 1998). A fermentação de bactérias láticas em leite utiliza a lactose e o citrato, o qual permite o acúmulo de ácido lático, principal produto, e também de produtos de menor importância, os quais são benéficos para as qualidades organolépticas e a textura do produto (DE VOS; HUGENHOLTZ, 2004). O composto C4 diacetil é parcialmente reduzido a acetoína, responsável por aroma de manteiga. Estes dois componentes acumulados na fermentação dependem da fonte de lactose, glicose e citrato. O ácido lático, o diacetil e a acetoína são derivados do piruvato, o qual é produzido em meio de cultura contendo glicose e citrato. A glicose possui duas unidades de piruvato enquanto o citrato possui somente uma. Então, cada carboidrato e cada citrato estão disponíveis para a biossíntese do ácido lático e produtos aromáticos como diacetil e acetoína (GOUPRY *et al.,* 2000; ØSTLIE *et al.,* 2003). Alguns estudos mostram que o co-metabolismo do citrato com a glicose muda o perfil metabólico produzido durante a fermentação anaeróbica de bactérias láticas: o ácido lático é derivado principalmente da glicose, mas o diacetil e a acetoína são produzidos primariamente pelo citrato (GOUPRY *et al*., 2000; ØSTLIE *et al*., 2003; DE VOS; HUGENHOLTZ, 2004). Estes dois compostos, portanto, ainda que presentes em pequenas concentrações no leite fermentado, não podem ser desprezados tanto em estudos metabólicos de estirpes puras como de co-culturas, assim como se pretende fazer neste estudo.

A bactéria termofílica ácido-lática *Lactobacillus* delbrueckii subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) é usada em associação com *Streptococcus thermophilus* na producão de iogurtes, os quais são menos susceptíveis à sinérese (HESS *et al*., 1997). *L. bulgaricus* fermenta lactose, glicose, frutose e manose (GROBBEN *et al.,* 1998) e geralmente não aumenta a produção de

galactose, sendo somente algumas estirpes que são capazes de fermentar lentamente esta hexose (HUTKINS *et al.,* 1986). Entre os açúcares fermentados por estas bactérias, a lactose é a preferida (CHERVAUX *et al.,* 2000).

Em 1900, Moro foi o primeiro pesquisador a isolar bactérias anaeróbicas facultativas através das fezes de bebês, as quais foram caracterizadas como *Bacillus acidophilus*, um nome genérico para lactobacillus do intestino. Os *Lactobacilli* são, em geral, caracterizados como gram-positivos, não formadores de esporos e não flagelados ou coccobacillos (HAMMES; VOGEL, 1995). Eles podem ser também aerotolerantes ou anaeróbicos e estritamente fermentativos. A glicose é predominantemente fermentada e transformada em ácido lático pela via homofermentativa, ou em quantidades equimolares de ácido lático, CO_2 e etanol (e/ou ácido acético, dependendo do tipo de açúcar) através da via heterofermentativa (GOMES; MALCATA, 1999). Muitas estirpes de *L. acidophilus* podem fermentar amidalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose, trealose e aesculina (NAHAISI, 1986). A lactose é virtualmente o único açúcar presente no leite, mas existem relatos de que *L. acidophilus* utiliza a sacarose mais efetivamente que a lactose (MITAL; GARG, 1992). As estirpes de *L. acidophilus* também são capazes de metabolizar o citrato (HELLAND *et al*., 2004) dando origem a CO_2, acetato, diacetil, acetoína, e 2,3-butanediol. Acetoina e diacetil são produzidos através do citrato e piruvato. Mas, na presença de lactato ou a pH menor que 4,25, o piruvato não é convertido imediatamente a diacetil ou acetoína (DU PLESSIS *et al*., 1996).

S. thermophilus e *L. bulgaricus* mostram no leite uma interação que é mutuamente favorável e não obrigatoriamente caracterizada pelo fato de cada bactéria produzir uma ou mais substâncias que estimulam o crescimento da outra. O fenômeno de simbiose foi estudado por muitos autores, os quais observaram o positivo efeito do “mix” de culturas em comparação com a correspondente cultura pura em termos de crescimento, acidificação, produção de aromas e exopolissacarídeos, e de proteólise (BÉAL *et al*., 1994). Estudos feitos sobre os fatores de estimulação para cada uma das duas bactérias mostraram que *L. bulgaricus* é estimulado pelo ácido fórmico e pelo CO_2 produzido por *Streptococcus*, enquanto *S. thermophilus* é estimulado pelos aminoácidos e

pequenos peptideos produzidos pela atividade metabólica de *L. bulgaricus*. O CO_2 é igualmente um fator estimulador para o *L. bulgaricus* que provém da descarboxilação da ureia através da urease excretada por *S. thermophilus*. Muitos aminoácidos são mencionados na literatura como fatores estimulantes do crescimento de *S. thermophilus*: histidina, glicina, acido glutâmico, metionina, fenilalanina, arginina, cisteína, valina, leucina, triptofano, tirosina, lisina e serina.

No entanto, nenhum estudo metabólico sistemático tem sido desenvolvido com respeito ao co-metabolismo de *S. thermophilus* em associação com estas duas bactérias ácido-láticas no leite, para o qual é necessário um grande avanço neste campo de pesquisa. Portanto, para elucidar este aspecto, um novo modelo co-metabólico tem sido proposto e checado no presente estudo, fazendo uso de balanço de carbono, graus de redução e balanço de ATP com base no atual conhecimento do metabolismo individual de cada uma destas bactérias estudadas.

8.3 Material e métodos

Culturas microbianas

Três culturas comerciais puras e liofilizadas (Danisco, Sassenage, França) foram usadas neste estudo, especificamente *Streptococcus thermophilus* TA040 (St) em co-cultura com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 (Lb) ou *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La).

Preparação do leite

A base do leite foi preparada adicionando 13 g de leite em pó desnatado (Castroni, Reggio Emilia, Italy) em 100 g de água destilada, a qual foi usada como controle (M) ou suplementada (SM) com 40 mg de inulina g^{-1} (Beneo TM) (Orafti Active Food Ingredients, Oreye, Bélgica). Ambos os leites foram termicamente tratados a 90°C por 5 min em banho-maria, modelo Y14 (Grant, Cambridge, Reino Unido). Os leites tratados foram transferidos em frascos estéreis de 1 L, resfriados em banho de gelo, posteriormente distribuídos em frascos Schott estéreis de 250 mL dentro de uma câmara de fluxo laminar e finalmente estocados a 4°C for 24 h antes de sua utilização.

Preparação do inóculo

A pré-cultura liofilizada de La foi preparada dissolvendo 100 mg em 50 mL de leite (10% de sólidos totais; autoclavado a 121ºC por 20 min). Depois de dissolvida e ativada a 42 ºC por 30 min, a pré-cultura (1,0 mL) foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de leite desnatado. As pré-culturas Lb e St foram preparadas do mesmo modo adicionando em 50 mL de leite 400 e 90 mg das respectivas culturas liofilizadas. As contagens destas pré-culturas foram entre 6,0 e 6,6 $logUFC.mL^{-1}$.

Fermentações

Depois da inoculação, o conteúdo do frasco foi transferido em um fermentador de 3 L, modelo Z61103CT04 (Applikon, Schiedam, Holanda) com capacidade de 2 L de volume de trabalho e provido de um sistema eletrônico de controle, modelo ADI1030 (Applikon). A concentração do oxigênio dissolvido (DO) foi determinada por um eletrodo galvânico esterilizado, InPro6000 Series (Mettler-Toledo, Milão, Italia). Para evitar sinérese do produto fermentado, foram conduzidas

fermentações de batelada em quadruplicata sem nenhuma agitação a 42°C, que foram interrompidas quando foi alcançado pH 4,5, de acordo com a comum prática de fabricação de leites fermentados.

Métodos analíticos

A concentração de biomassa foi determinada por densidade ótica a 640 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Lambda 25 (Perkin Elmer, Wellesley, MA), depois da diluição das amostras, quando necessário, e calibrando em peso seco. Para a determinação de peso seco, foram obtidas células por centrifugação em tubos Eppendorf, lavadas duas vezes com água destilada e secas a 70°C até peso constante.

Para analisar lactose, glicose, galactose, ácido orótico, ácido cítrico, ácido acético, diacetil, acetoína e ácido lático, foi usado um cromatógrafo líquido de alto desempenho, modelo 1100 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA), composto de um analisador de amostras inteligente HP-1050, um detector de Índice de Refração HP-1047A, um detector UV HP-1050 e uma bomba HP-1050. A separação foi feita usando uma coluna Supelcogel H59304-U (Sigma Aldrich, Bellefonte, PA) a 50°C com 0,01 M de ácido sulfúrico como eluente a 0,4 $mL.min^{-1}$.

A composição elementar da biomassa, necessária para a formulação dos modelos metabólicos, foi determinada seguindo o método descrito por De Queiroz *et al.* (1993). As células de amostras frescas de ambas as co-culturas retiradas depois de diferentes tempos de fermentação foram lavadas duas vezes com água destilada e secas a 60°C sob vácuo por 24 h. O conteúdo de cinzas de cada amostra foi determinado por peso de matéria seca depois de secagem em estufa a 500°C por 2 h. Então, os teores de C, H, N e O foram determinados por um Analisador Elementar, modelo Flash EA1112 (CE Instruments, Rodano, Itália), cujos desvios em relação aos valores médios foram ±0,2, ±0,1, ±0,1 e ±0,2% para cada elemento, respectivamente.

O progressivo consumo de oxigênio e a produção de CO_2 em função do tempo foram determinados na fase gasosa presente no espaço superior do

fermentador, que foi reciclada, antes de qualquer determinação, passando-a através de um frasco de 250 mL. Para as determinações das concentrações de CO_2 e O_2, amostras de gás (0,1 mL) foram periodicamente retiradas do frasco e injetadas através de uma microsseringa (Hamilton, Bonaduz, Suiça), em um cromatógrafo do tipo Fractovap (Carlo Erba, Milão) equipado com detector de condutividade térmica e uma coluna com Cromosorb 102, utilizando hélio como gás de transporte, a uma vazão de 20 $mL.min^{-1}$.

Estudo metabólico

Teoria

Os balanços de carbono e bioenergético foram realizados conjuntamente para cada par de bactérias láticas que constituem as duas co-culturas tidas em consideração no presente projeto, tanto na presença de inulina como um prebiótico ou não. Eles baseam-se na composição média elementar da biomassa para ambas as co-culturas ($CH_{1,79}O_{0,50}N_{0,26}$), que fora previamente determinada experimentalmente, e se iniciam com os seguintes conhecimentos básicos sobre o metabolismo de bactérias homoláticas (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993). A diferença não significativa na composição das duas co-culturas com certeza foi em grande parte devido à predominância de *S. thermophilus* em ambas.

Hidrólise da lactose

Todas as atividades que foram descritas a seguir implicam em uma preliminar hidrólise da lactose pela β-galactosidase e posterior transporte para a célula. A hidrólise da lactose pode ser descrita de uma forma geral pela equação:

$$y_i \text{ Lactose} + y_i \text{ } H_2O \longrightarrow y_i \text{ Glicose} + y_i \text{ Galactose} \qquad (1)$$

em que o coeficiente estequiométrico y_i representa a fração de lactose consumida por uma determinada atividade metabólica.

Fermentação homolática

Como é bem sabido (AXELSSON, 1993), a maioria dos LABs "termofílicos", entre os quais foram empregados no presente estudo *S. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* e *Lb. acidophilus*, são capazes de metabolizar totalmente a glicose contida na lactose, após o seu transporte e quebra pela β-galactosidase. Por outro lado, a galactose é principalmente excretada no meio (HICKEY *et al.,* 1986; HUTKINS; MORRIS, 1987), provavelmente devido a uma baixa atividade da galactoquinase (THOMAS; CROW, 1984; HICKEY *et al.,* 1986) ou a uma reação energicamente favorável do sistema de transporte da lactose (HUTKINS; PONNE, 1991). No entanto, vários autores relataram a capacidade da maioria das cepas de *Lb. acidophilus* de fermentar a galactose (NAHAISI, 1986; GOMES; MALCATA, 1999), embora seja bem aceita a incapacidade das cepas de *Lb. bulgaricus* de realizar essa atividade (TURNER; MARTLEY, 1983).

Esse pressuposto posteriormente foi verificado fazendo uso de dados experimentais da concentração de galactose no meio fermentado. Assim, as reações envolvidas na hidrólise e metabolização da lactose em ambas as co-culturas com ou sem inulina podem ser resumidas como segue:

a) Fermentação da glicose em ácido lático

$$y_1 \text{ Glicose} \longrightarrow 2\, y_1 \text{ ácido lático} + 2\, y_1 \text{ ATP} \qquad (2)$$

em que ATP se refere como energia química pura.

b) Fermentação da galactose em ácido lático

$$x_1y_1 \text{ Galactose} \longrightarrow 2\, x_1y_1 \text{ ácido lático} + 2\, x_1y_1 \text{ ATP} \qquad (3)$$

em que x_1y_1 é a fração de galactose sujeita à fermentação homolática, enquanto $y_1(1\text{-}x_1)$ é a parte não metabolizada e liberada no meio.

c) Hidrólise e metabolização total da lactose

A soma das atividades acima referidas dá:

$$y_1 \text{ Lactose} + y_1\, H_2O \longrightarrow 2\, y_1\, (1+x_1) \text{ ácido lático} + y_1\, (1\text{-}x_1) \text{ Galactose} + \\ + 2\, y_1\, (1+x_1) \text{ ATP} \qquad (4)$$

Para calcular os coeficientes x_1 e y_1, foi necessário em primeiro lugar conhecer a fração de galactose consumida na produção de todos os produtos metabólicos, especificamente ácido lático (z_1), diacetil (z_2), acetoína quando for o caso (z_3), e biomassa (z_4). Para esta finalidade, supõe-se que todas estas frações com relação a sua soma sejam exatamente proporcionais aos correspondentes valores experimentais das concentrações de cada produto (n_i).

Com base neste pressuposto, o coeficiente x_1 foi calculado a partir da relação:

$$\frac{n_1}{\Delta n_{\text{Gal}} z_1} = \frac{2(1+x_1)}{(1-x_1)} \qquad (5)$$

em que Δn_{Gal} é o valor experimental do consumo de galactose total por unidade de volume, enquanto o coeficiente y_1 pela equação:

$$y_1 = \frac{n_1}{2(1+x_1)} \qquad (6)$$

Formação de diacetil

É razoável supor que o diacetil se forme durante a fermentação homolática como um resultado da metabolização de mais uma fração da glicose, y_2:

$$y_2 \text{ Glicose} \longrightarrow y_2 \text{ Diacetil} + 2\, y_2\, CO_2 + 3\, y_2\, \text{'}H_2\text{'} + 2\, y_2 \text{ ATP} \qquad (7)$$

e da galactose, $x_2\, y_2$:

$$x_2y_2 \text{ Galactose} \longrightarrow x_2y_2 \text{ Diacetil} + 2\, x_2y_2\, CO_2 + 3\, x_2y_2\, \text{'}H_2\text{'} + 2\, x_2y_2 \text{ ATP} \qquad (8)$$

em que 'H_2' indica qualquer cofator reduzido na forma de NADH ou em qualquer outra forma equivalente.

Seguindo o mesmo raciocínio para a produção de ácido lático, a formação de diacetil total pode ser descrita pela equação:

$$y_2 \text{ Lactose} + y_2\, H_2O \longrightarrow y_2(1+x_2) \text{ Diacetil} + 2y_2(1+x_2)\, CO_2 + 3y_2(1+x_2)\, \text{'}H_2\text{'} + \\ + 2y_2(1+x_2) \text{ ATP} + y_2(1-x_2) \text{ Galactose} \qquad (9)$$

Portanto, os coeficientes x_2 e y_2 podem ser estimados através das equações:

$$\frac{n_2}{\Delta n_{\text{Gal}}\, z_2} = \frac{1+x_2}{1-x_2} \qquad (10)$$

$$y_2 = \frac{n_2}{1+x_2} \qquad (11)$$

em que z_2 é a fração de galactose destinada para essa atividade metabólica.

Formação de acetoína

Seguindo o mesmo raciocínio para a formação de diacetil, e tendo em conta que a acetoína é o seu precursor hidrogenado, podem ser propostas, para sua produção, as seguintes equações metabólicas:

$$y_3 \text{ Glicose} \longrightarrow y_3 \text{ Acetoína} + 2\, y_3\, CO_2 + 2\, y_3\, \text{'}H_2\text{'} + 2\, y_3 \text{ ATP} \qquad (12)$$

$$x_3y_3 \text{ Galactose} \longrightarrow x_3y_3 \text{ Acetoína} + 2\, x_3y_3\, CO_2 + 2\, x_3y_3\, \text{'}H_2\text{'} + 2\, x_3y_3 \text{ ATP} \qquad (13)$$

A formação total de acetoína pode, portanto, ser descrita pela equação:

$$y_3 \text{ Lactose} + y_3\, H_2O \longrightarrow y_3(1+x_3) \text{ acetoína} + 2y_3(1+x_3)\, CO_2 + 2y_3(1+x_3)\, \text{'}H_2\text{'} + 2y_3(1+x_3) \text{ ATP} + y_3(1-x_3) \text{ Galactose} \qquad (14)$$

e os coeficientes x_3 e y_3 foram estimados como descrito para x_2 e y_2.

Síntese e manutenção de biomassa

Apesar da presença de outras fontes de carbono no meio em baixos níveis (galactose, diacetil, acetoína, ácido orótico, ácido cítrico e ácido lático), o crescimento dos microorganismos em co-culturas foi atribuído apenas ao teor de lactose, que é a natural fonte de carbono. Após ter determinado experimentalmente a composição elementar de cada co-cultura e negligenciando para todas a pequena diferença na composição da biomassa e precursores (ROELS, 1983), a formação da biomassa, tanto a partir da glicose (y_4) como da fração metabolizada da galactose (y_4x_4), poderá ser descrita, em presença de amônia como fonte de nitrogênio, pelas equações:

$$y_4 \text{ Glicose} + 1{,}424\, y_4\, NH_3 + y_4\, Y_x \text{ ATP} \longrightarrow 5{,}479\, y_4 \text{ Biomassa} + 0{,}521\, y_4\, CO_2 + 1{,}014\, y_4\, \text{'}H_2\text{'} \qquad (15)$$

x_4y_4 Galactose + 1,424 x_4y_4 NH_3 + x_4y_4 Y_x ATP $\longrightarrow$ 5,479 x_4 y_4 Biomassa + 0,521 x_4y_4 CO_2 + 1,014 x_4y_4 'H_2' (16)

em que Y_x representa o consumo total de ATP para o crescimento e a manutenção.

As equações (15) e (16) implicam que todo o ATP produzido pelo metabolismo tem de ser consumido pelas células para o crescimento e a manutenção. Portanto, a formação total de biomassa pode ser escrita como:

y_4 Lactose + 1,424 $y_4(1+x_4)$ NH_3 + $y_4(1+x_4)Y_x$ ATP $\longrightarrow$ 5,479 $y_4(1+x_4)$ Biomassa + 0,521 $y_4(1+x_4)$ CO_2 + 1,014 $y_4(1+x_4)$ 'H_2' + + $y_4(1-x_4)$ Galactose + 2,219 $y_4(1+x_4)$ H_2O (17)

Os coeficientes x_4 e y_4 foram estimados pelas equações:

$$\frac{n_4}{\Delta n_{\mathrm{Gal}} z_4} = \frac{5{,}479(1+x_4)}{1-x_4} \tag{18}$$

$$y_4 = \frac{n_4}{5{,}479(1+x_4)} \tag{19}$$

em que z_4 é a fração de galactose destinada para a síntese de biomassa e n_4 é a produção de biomassa por unidade de volume.

Os balanços de graus de redução referidos aos valores experimentais de todos os produtos (incluindo o CO_2) e substratos (incluindo o O_2) foram utilizados, além dos balanços de carbono, a fim de verificar a validade destes modelos metabólicos após quatro tempos representativos de fases significativas de cada fermentação, ou seja, a fase lag (1,5 h), o início da fase exponencial (3,0 h), o final da fase exponencial (4,5 h) e a fase estacionária (6,0 h).

Bioenergética

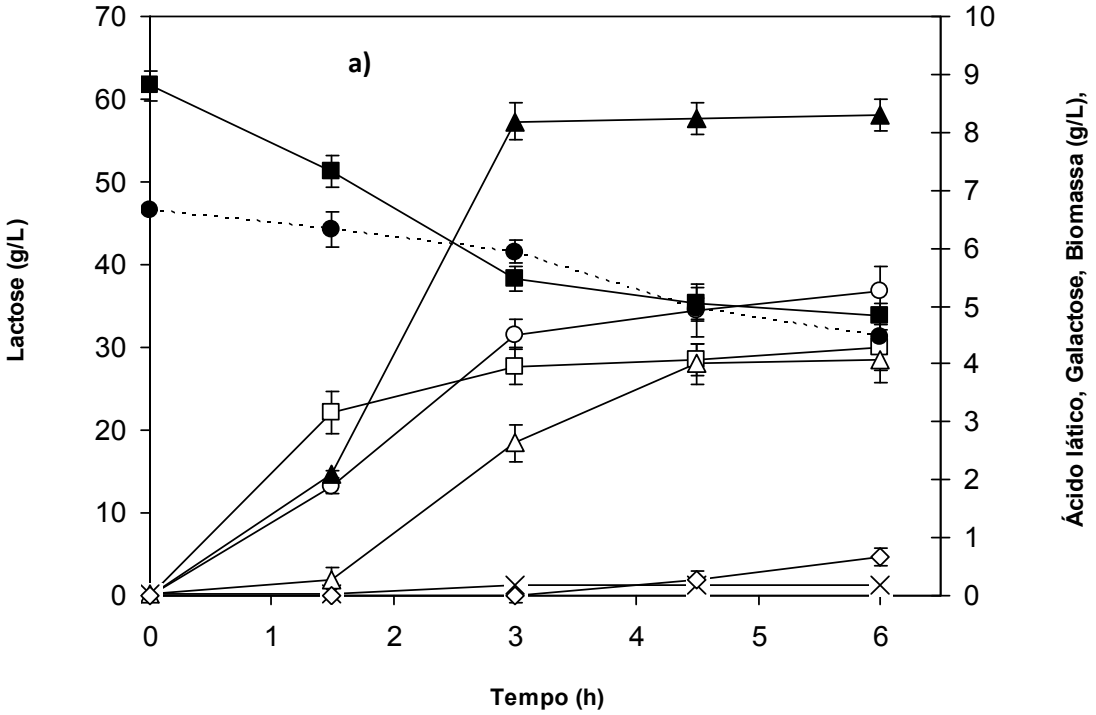
No que se refere à bioenergética de cada co-cultura (ROELS, 1983), foi efetuado, sob condições de estado "pseudo-estacionário", presentes naturalmente no interior da célula, um balanço de ATP representado pela equação:

$$q^{DM}_{ATP} = q^{1}_{ATP} + q^{2}_{ATP} + q^{3}_{ATP} \quad (20)$$

em que q^{DM}_{ATP} é a velocidade específica do consumo de ATP requerido para o crescimento e a manutenção da biomassa, enquanto q^{1}_{ATP}, q^{2}_{ATP} e q^{3}_{ATP} são as velocidades específicas de produção de ATP associadas à formação de ácido lático, diacetil e acetoína, respectivamente.

8.4 Resultados e discussão

As Figuras 22 e 23 mostram o comportamento da fermentação em leite desnatado fermentado por *Streptococcus thermophilus* (St) em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus* (La) e *Lactobacillus bulgaricus* (Lb), respectivamente. Os fenômenos mais importantes evidenciados por essas fermentações são: a) o rápido crescimento de St com respeito a ambos La e Lb, o qual é muito bem observado em produções de leites fermentados, b) o parcial consumo de lactose, c) a formação de acido lático como maior produto metabólico, d) a liberação de galactose como resultado da sua lenta metabolização, e e) formação de níveis apreciáveis de diacetil e acetoína.



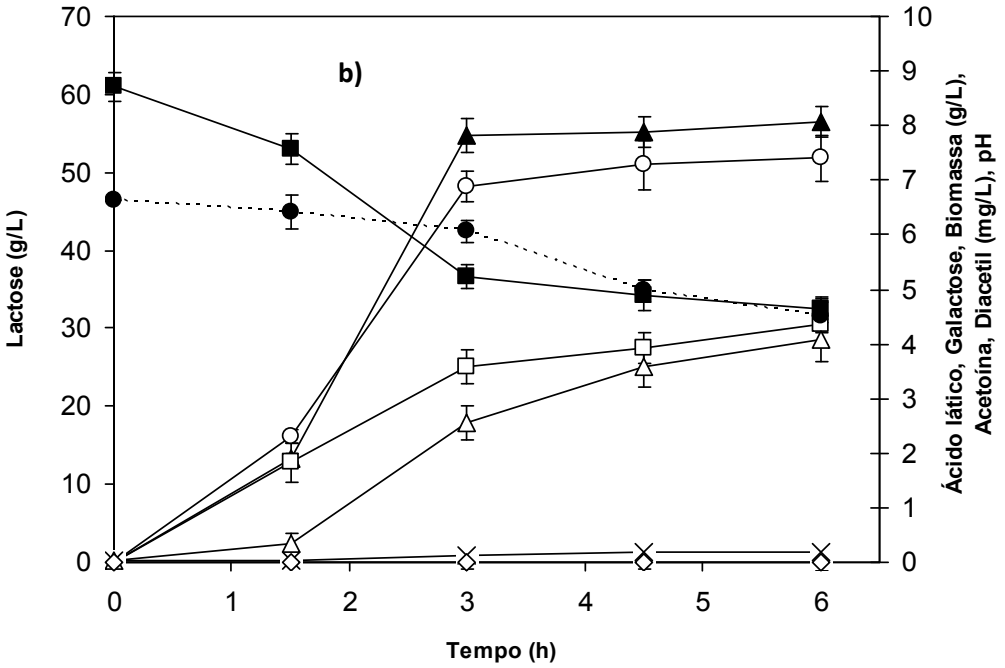


Figura 22. Leite desnatado fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* e *L. acidophilus* a) sem inulina e b) com inulina. (■) Lactose; (○) galactose; (▲) Ácido lático; (□) diacetil; (×) *L. acidophilus*; (△) *S. thermophilus*; (◇) Acetoína; (●) pH.

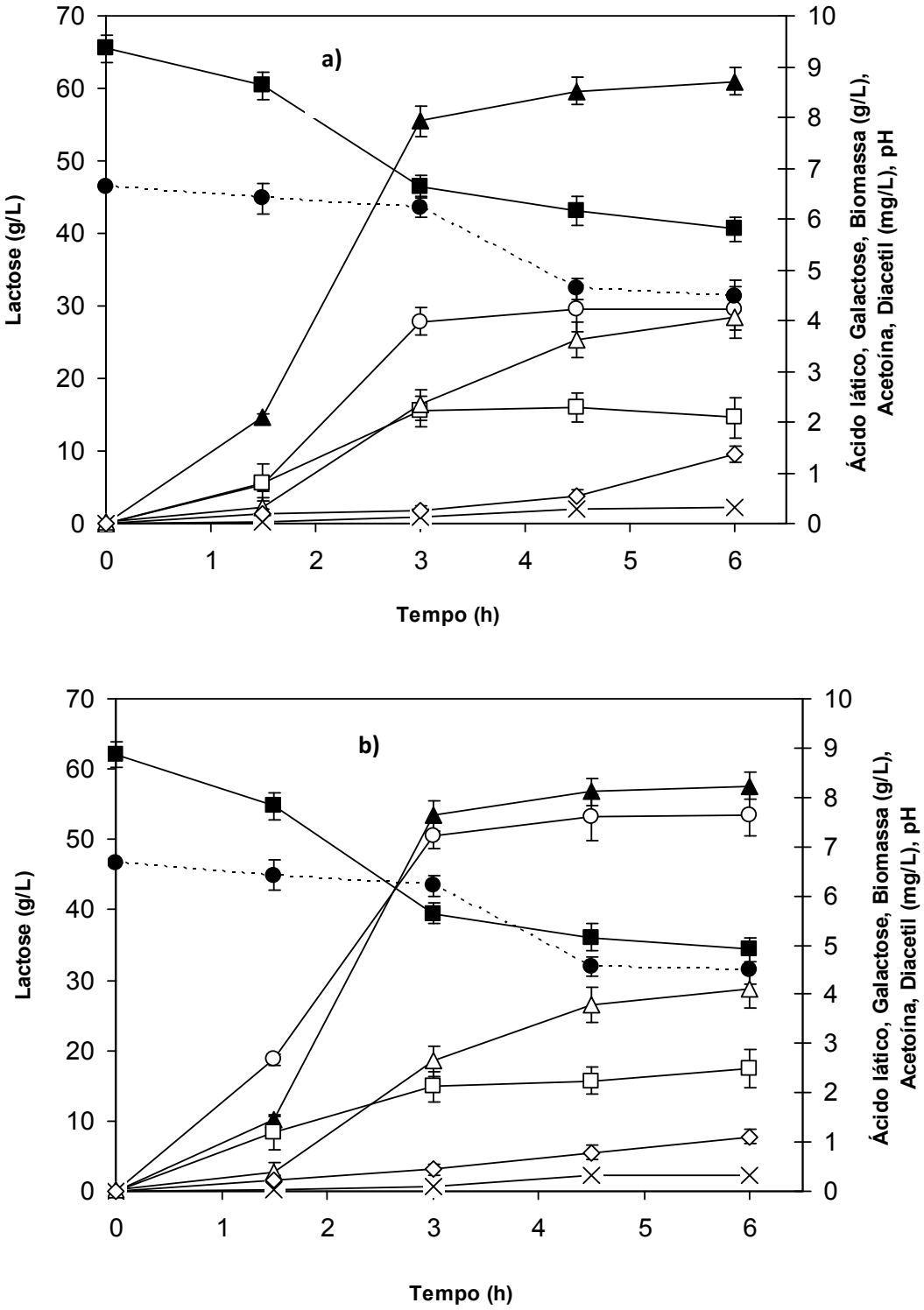


Figura 23. Leite desnatado fermentado por co-cultura de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* a) sem inulina e b) com inulina. (■) Lactose; (○) galactose; (▲) Ácido lático; (□) diacetil; (×) *L. acidophilus*; (△) *S. thermophilus*; (◇) Acetoína; (●) pH.

Para elucidar esses efeitos provavelmente relacionados com a peculiar situação do co-metabolismo, a investigação bioenergética e metabólica foi desenvolvida fazendo uso de balanços de matéria e graus de redução. Isto fez com que pudessem ser checados os modelos apresentados na Seção "Teoria" com os dados experimentais das concentrações de produtos e substratos em função do tempo. A Tabela 12 mostra que os erros percentuais nos balanços de carbono e do grau de redução desenvolvidos usando os valores experimentais das concentrações de substratos e produtos foram -1,4% a +0,35 % e -1,04% a +0,31 %, respectivamente, sendo que os erros percentuais entre os valores teóricos e experimentais da produção de CO_2 e do consumo de O_2 foram -11,9% a +9,1 % e -14,7% a +9,6 %, respectivamente. Estes resultados demonstram uma satisfatória habilidade do modelo proposto a descrever o comportamento de ambos os biossistemas.

Para a co-cultura St-La sem inulina, o não-acúmulo de acetoína se deu na fase lag (1,5 h), e a fração de lactose destinada para esta atividade foi quase desprezível também no final da fermentação (até 0,01%). Este comportamento pode ser imputado a condições cada vez mais anaeróbicas resultando de uma progressiva substituição do ar inicial com o CO_2 principalmente associado com as produções de diacetil e biomassa. Como esperado, a formação de diacetil, como resultado da dehidrogenação da acetoína, progressivamente decresceu da fase lag, onde ela foi responsável por 0,14% da fração de lactose consumida, para somente 0,06% no final. Entretanto, a fração de lactose utilizada para a formação de ácido lático alcançou o valor máximo no início da fermentação, onde, como esperado, foi de longe a principal atividade metabólica (86,3% depois de 1,5 h) (Figura 24). Finalmente, a fração de lactose destinada para a produção de biomassa progressivamente aumentou para quase 40% no final da fermentação, em prejuízo da formação de ácido lático.

Tabela 12. Balanços[a] de Carbono (BC) e Graus de Redução (GR) no final da fermentação do leite desnatado por co-culturas de *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La) e *L. bulgaricus* (St-Lb), na presença de inulina (A) e ausência de inulina (B).

	St-La				**St-Lb**			
	A		**B**		**A**		**B**	
	BC	**GR**	**BC**	**GR**	**BC**	**GR**	**BC**	**GR**
Reagentes								
Lactose	1000	4,000	1000	4,000	1000	4,000	1000	4,000
O_2	0,0	-0,084	0,0	-0,107	0,0	-0,082	0,0	-0,106
O_2[b]	0,0	-0,088	0,0	-0,097	0,0	-0,090	0,0	-0,103
Total de reagentes	1000	3,912	1000	3,903	1000	3,910	1000	3,897
Produtos								
Galactose	353,7	1,415	276,9	1,108	354,0	1,416	228,1	0,912
Ácido lático	385,6	1,542	437,1	1,748	381,2	1,525	468,9	1,876
Diacetil	0,3	0,001	0,3	0,001	0,2	0,001	0,2	0,001
Acetoína	0,0	0,000	0,0	0,000	0,0	0,000	0,1	0,001
Biomassa (St)	228,4	0,916	251,1	1,007	224,2	0,899	256,9	1,030
Biomassa (La ou Lb)	9,3	0,037	9,6	0,038	17,3	0,069	19,4	0,078
CO_2	21,5	0,000	27,2	0,000	22,0	0,000	27,5	0,000
CO_2[b]	22,7	0,000	24,9	0,000	23,1	0,000	26,4	0,000
Produtos totais	1000	3,911	1000	3,902	1000	3,910	1000	3,898
Erro (%)[c]	0,17	0,15	-0,35	-0,42	0,15	0,26	-0,17	-0,14

[a]Dados expressos em mmoles ou C-mmoles, referente ao consumo de C-mol de lactose no final da fermentação e representado como média do ensaio em duplicata.

[b]Valores teóricos calculados por balanços de materia.

[c]Erros porcentuais entre balanços de graus de redução usando os dados experimentais das concentrações de substratos e produtos bem como os valores teóricos de consumo de O_2 e da evolução de CO_2 .

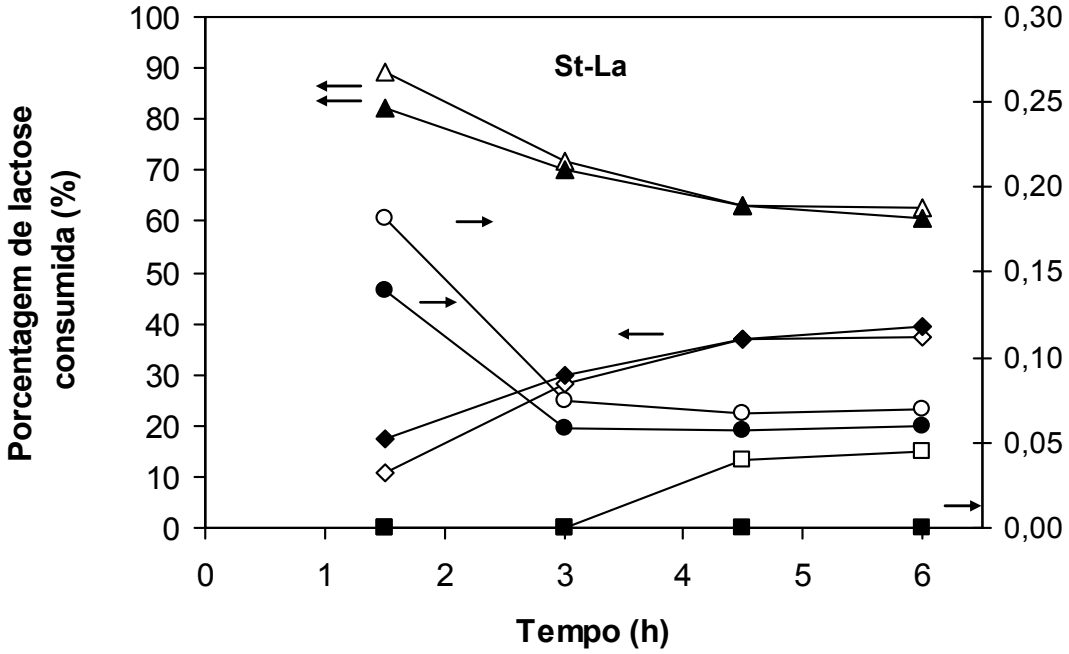


Figura 24. Porcentagem de lactose consumida pela co-cultura St-La para a produção de diferentes produtos metabólicos: (△) Ácido lático; (○) Diacetil; (◇) Biomassa; (□) Acetoína; com inulina (símbolos cheios) ou sem inulina (símbolos vazios).

A formação de acetoína e diacetil foi devida provavelmente ao metabolismo da lactose em St, para o qual as atividades da α-acetolactato sintase e descarboxilase são bem documentadas (MONNET; CORRIEU, 2007). Deve-se notar que a adição de inulina no meio suprimiu completamente o acúmulo de acetoína e desacelerou o de diacetil, o que sugere a ocorrência de algum efeito de repressão catabólica do gene responsável pela expressão da α-acetolactato sintase em St.

Além disso, no que diz respeito à co-cultura St-Lb, podemos assumir todas as considerações metabólicas feitas pela co-cultura St-La; no entanto, algumas relevantes diferenças devem ser colocadas em evidência. Em primeiro lugar, a formação de diacetil foi sempre associada àquela de acetoína em todas as condições e em todas as fases das fermentações. Como nunca foi observado acúmulo de α-acetolactato, o apreciável acúmulo de acetoina especialmente na presença de inulina bem como a produção reduzida de diacetil com respeito as outras co-culturas sugerem condições mais redutoras dentro da célula ou uma menor atividade da desidrogenase responsável pela oxidação da acetoína a diacetil.

Esta hipótese pode ser confirmada na Figura 25 pelo aumento das frações de lactose direcionadas tanto para a formação de ácido lático (61-84% sem inulina e 60-75% de inulina, respectivamente) quanto, principalmente, para a síntese celular (16-39% sem inulina e 25-40% de inulina, respectivamente), a qual é notoriamente associada ao aumento de CO_2 e portanto poderia ter sido a causa principal destas alterações metabólicas. Finalmente, o efeito da inulina sobre as frações de lactose empregadas nas diferentes atividades metabólicas parece ser bastante diferente do observado na co-cultura St-La, em que, a presença deste ingrediente prebiótico no meio levou a um incremento na produção tanto de acetoína como de diacetil.

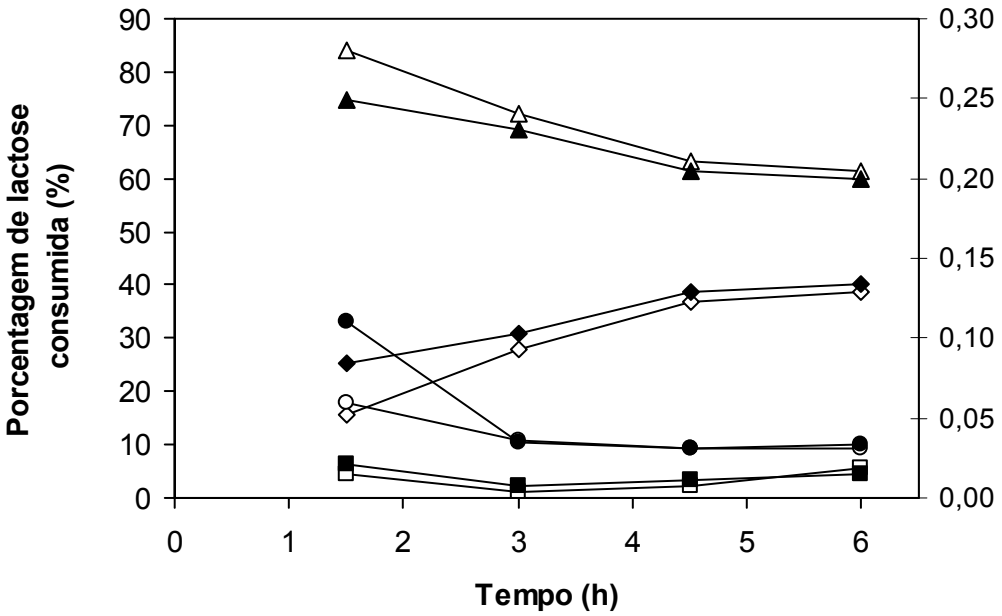


Figura 25. Porcentagens de lactose consumida pela co-cultura St-Lb para a produção de diferentes produtos metabólicos: (△) Ácido lático; (○) Diacetil; (◇) Biomassa; (□) Acetoína; na presença de inulina (símbolos cheios) e ausência de inulina (símbolos vazios).

Este resultado inesperado poderia ter ocorrido devido, principalmente, no início da fermentação, a uma complexa influência do pH nas atividades relativas de α-acetolactato sintase e descarboxilase ou de seus mecanismos de expressão em St.

Outro efeito significativo da inulina foi sua própria estimulação no crescimento ou aumento de biomassa em ambas as co-culturas St-La e St-Lb,

algo que é claramente comprovado na Tabela 13, onde se mostra a utilização do ATP para o crescimento e a manutenção da biomassa em função do tempo. Como pode ser visto, na fase lag esse parâmetro foi notavelmente diminuído pela adição de inulina, o que significa que este prebiótico fez com que diminuissem os requerimentos energéticos da síntese de biomassa e da manutenção celular.

Como esperado, este parâmetro mostrou o seu valor máximo sempre durante a fase lag, por causa das exigências de alta energia requerida para a indução de várias enzimas (principalmente β-galactosidase). Depois disso, diminuiu consideravelmente devido à progressiva adaptação às condições do meio, permitindo, a partir de então, aumentar as quantidades de biomassa.

Finalmente, a Tabela 13 mostra que em ambas as co-culturas, a porcentagem de galactose liberada pela hidrólise de lactose e, posteriormente, metabolizada pela via de Embden-Meyerhof-Parnas aumentou progressivamente ao longo do tempo, com ou sem inulina.

Considerando o fato de que a maioria das cepas de St são galactose-positivas (HUTKINS *et al.,* 1986), esta observação parece confirmar a capacidade da cepa de La de fermentar também a galactose, entre outros açúcares, embora a sua metabolização não pudesse ocorrer de forma muito eficaz (GOMES; MALCATA, 1999). Por outro lado, uma vez que a cepa de Lb é galactose-negativa (TURNER; MARTLEY, 1983), a metabolização deste açúcar pela co-cultura St-Lb só pode ser atribuída ao St.

Tabela 13. ATP requerido (Y_{ATP}) e porcentagem de galactose metabolizada (Y_{Gal}) durante a fermentação do leite desnatado por *S. thermophilus* com *L. acidophilus* (St-La) e *L. bulgaricus* (St-Lb), na ausência (A) ou na presença de inulina (B).

	St-La		**St-Lb**	
	A	**B**	**A**	**B**
	Y_{ATP} (mol_{ATP} C-mol_{DM}^{-1})			
Tempo (h)				
1,5	1,64	2,26	1,04	1,89
3,0	0,84	0,84	0,79	0,92
4,5	0,60	0,56	0,56	0,62
6,0	0,54	0,56	0,53	0,57
	Y_{Gal} (%)			
Time (h)				
1,5	12,2	7,1	35,7	6,3
3,0	43,5	22,9	46,1	20,1
4,5	45,4	25,5	51,2	26,0
6,0	43,2	27,6	53,1	27,5

Outra constatação interessante é que as porcentagens de galactose metabolizadas na ausência de inulina (de cerca de 36 a 53% por St-Lb e de 12 a 43%, por St-La) foram aproximadamente o dobro das estimados na presença de inulina. Comportamento este que pode ser explicado por ambas as co-culturas com a observação de que alguns açúcares são ligados, mas não transportados, pelos sistemas de transporte de açúcar do *S. thermophilus* (HUTKINS *et al.,* 1985). Em particular, o transporte da galactose em St, que ocorre através de uma galactose permease dependente de ATP e envolve um gradiente protônico como força motriz (HUTKINS *et al.,* 1985), poderia ter sido inibido pela frutose liberada da hidrólise parcial da inulina no leite.

CAPÍTULO IX

9. CONCLUSÕES

- A qualidade do leite fermentado foi fortemente influenciada tanto pela composição das co-culturas probióticas quanto por diferentes prebióticos, como oligofrutose, polidextrose, maltodextrina e inulina;
- A cinética de acidificação foi influenciada pela composição das culturas probióticas e pelos ingredientes prebióticos no leite fermentado;
- A suplementação do leite com a inulina reduziu o tempo de fermentação das co-culturas *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus acidophilus* (St-La); *Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) e *Streptococcus thermophilus* + *Bifidobacterium lactis* (St-BL), além de melhorar a firmeza do leite fermentado probiótico;
- Os teores de ácido linoléico conjugado (CLA) aumentaram no leite fermentado pela co-cultura de *S. thermophilus* + *L. acidophilus*, suplementado com maltodextrina;
- No que diz respeito às contagens, a adição de inulina favorece a viabilidade das bactérias probióticas durante o armazenamento a 4°C além de causar um efeito bifidogênico, *in vitro*, estimulando o crescimento de *B. lactis;*
- Em relação ao estudo metabólico entre as co-culturas homofermentativas (St-La e St-Lb), feitas neste presente trabalho, pode-se dizer que a lactose foi apenas parcialmente fermentada a ácido lático, a galactose foi metabolizada em certa medida, e se formaram diacetil e acetoína em níveis apreciáveis. A acetoína e o diacetil provavelmente foram produzidos pelas atividades da α-acetolactato sintase e da descarboxilase de *S. thermophilus;*
- Na co-cultura St-Lb foram observados níveis mais elevados de acetoína e uma redução dos níveis de diacetil, provavelmente devido a condições mais reducentes ou a uma limitada desidrogenação da acetoína a diacetil;

- A adição de inulina em St-La suprimiu o acúmulo de acetoína e reduziu o de diacetil, sugerindo uma repressão catabólica da expressão da α-acetolactato sintase em St;
- As co-culturas St-Lb e St-La apresentaram maiores exigências de ATP para o crescimento e manutenção da biomassa durante a fase lag, por causa das altas exigências energéticas para a indução de várias enzimas, mas a adição de inulina diminuiu esses requerimentos tornando a síntese e a manutenção da biomassa menos exigentes em termos de energia.

CAPÍTULO X

10. PERSPECTIVAS

Além dos 5 artigos usados para a elaboração dos Capítulos IV, V, VI, VII e VIII, foram enviados mais 2 artigos:

- Growth and viability of a probiotics cocktail and fermented milk firmness. ***LWT - Food Science and Technology***, 2010;
- Use of lactulose as prebiotic and it influence on the growth, acidification profile and viability of different probiotics in fermented skim milk. ***Food Chemistry***, 2010.

Os produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e têm prioridade de pesquisa em diversos países. Neste panorama é importante aprofundar o estudo metabólico das bactérias probióticas, já que no leite se revela muito mais complexo do que o previsto e que nos últimos anos surgiram novos conhecimentos na área do metabolismo das bactérias láticas que não podem não ser levados em conta. Além do mais, não existem dados na literatura sobre o metabolismo de bactérias probióticas no leite quando presentes em co-culturas homofermentativas e/ou homo-heterofermentativas.

Nenhum estudo metabólico sistemático tem sido desenvolvido até o momento, no que diz respeito ao co-metabolismo de *S. thermophilus* em associação com outras bactérias ácido-láticas em leite; portanto, é necessário obter um grande avanço neste campo de pesquisa. Contudo, para se obter resultados neste aspecto, dois novos modelos de co-metabolismo serão propostos e checados neste projeto, um para co-culturas exclusivamente homoláticas (St-Lb e St-La) e o outro para co-culturas homo-heterofermentativas (St-Lr e St-Bl), fazendo o uso de balanços de carbono, grau de redução e ATP, com base no atual conhecimento no metabolismo de cada uma dessas bactérias

em questão. Ensaios a diferentes temperaturas serão também executados para fornecer os dados experimentais necessários para seu estudo termodinâmico.

Assim, para a realização deste projeto pioneiro sobre estudo co-metabólico, bioenergético e termodinâmico nas dimensões propostas, torna-se necessário contar com a colaboração do grupo coordenado pelo Professor Attilio Converti do *Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo* da *Facoltà di Ingegneria dell'Università degli Studi di Genova*, Itália, que tem vasta experiência nesta área de pesquisa.

Para isso, os objetivos do projeto pós-doutoral são de estudar: (i) o co-metabolismo em leite desnatado de *Streptococcus thermophilus* em co-culturas homoláticas e heteroláticas com *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis,* (ii) avaliar o efeito da inulina como prebiótico no co-metabolismo.

CAPÍTULO XI

11. REFERÊNCIAS

ACHOUR, L.; FLOURIE, B.; BRIET, F.; PELLIER, P.; MARTEAU, P.; RAMBAUD, J.C. Gastrointestinal effects and energy value of polydextrose in healthy nonobese men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.59, p.1362-1368, 1994.

AKALIN, A.S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteri in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International. **Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.613–621, 2004.

AKALIN, A.S.; TOKUSOGLU, O.; GONC, S.; AYCAN, S. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. **International Dairy Journal**, v.17, p.1089-1095, 2007.

AKIN, M.B.; AKIN, M.S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yoghurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v.104, p.93-99, 2007.

ALLANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDOHOLM, T.; VON WRIGTH, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.351-354, 1999.

ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n.2, p.672-678, 2009.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS**. 5.ed. Champaign: AOCS, 1998. p.24-32 [Official method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography].

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240-251, 2007.

ANDERSON, J.W. Dietary fiber and human health. **HortScience**, v.25, n.12, p.1488-1495, 1990. [2nd International Symposium on Horticulture and Human Health, Alexandria, 1989, American Society for Horticultural Science].

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução n.19, de 30 de Abril de 1999**. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais ou de saúde em sua rotulagem, Agência nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110. Acesso em: 07 nov. 2009.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. **Resolução RDC n.2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Disponível em: http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1567. Acesso em: 07 nov. 2009.

ARYANA, K.J.; PLAUCHE, S.; RAO, R.M.; MCGREW, P.; SHAH, N.P. Fat-free plain yogurt manufactured with inulins of various chain lengths and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, v.72, p.79-84, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. p.30-49.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria; classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A., eds. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.1–72.

BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA BOUDJEMA, B.; HENNI, D.E.; KIHAL, M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. **Food Microbiology**, v.21, p.579–588, 2004.

BÉAL, C.; SPINNLER, H.; CORRIEUX, G. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of Streptococcus salivarus ssp. thermophilus 404 and Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus 398. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.41, p.95–98, 1994.

BIROLLO, G.A.; REINHEIMER, J.A.; VINDEROLA, G.G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, v.33, p.799-805, 2000.

BJORKSTEN, B. Evidence of probiotics in prevention of allergy and asthma. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, v.4, n.5, p.599-604, 2005.

BONGAERTS, G.; SEVERIJNENB, R.; TIMMERMAN, H. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. **Medical Hypotheses**, v.64, p.64-68, 2005.

BRACQUART, P.; LORIENT, D.; ALIAS, C.; 1978. Effects of amino acids and small peptides on the acidification of milk by *Streptococcus thermophilus*. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 20, Paris, 1978. **Proceedings**. Paris, 1978. p.512.

BRIZUELA, M.A.; SERRANO, P.; PÉREZ, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.44, p.95-99, 2001.

BRUNO, A.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v.67, p.2740–2744, 2002.

BURNS, P.; VINDEROLA, G.; BINETTI, A.; QUIBERONI, A.; REYES-GAVILÁN, C.G.; REINHEIMER, J.A. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. **International Dairy Journal**, v.18, p.377-385, 2008.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food Research International**, v.39, p.203–211, 2006.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofrutose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, p.268-282, 1999.

CARPITA, N.C.; KAMABUS, J.; HOUSLEY, Y.T.L. Linkage structure of frutans oligomers from *Triticum astivum* and *Fistuca arundinaceae* leaveas. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.162-168, 1989.

CHERVAUX, C.; EHRLICH, S.D.; MAGUIN, E. Physiological study of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains in a novel chemically defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.p.5306–5311, 2000.

CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L.; PARIZA, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.5, p.185-197, 1992.

CHO, Y.H., LUCEY, J.A.; SINGH, H. Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat globule surface material and heat treatment of milk. **International Dairy Journal**, v.9, p.537-545, 1999.

CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.23-31, 1999.

COAKLEY, M.; ROSS, R.P.; NORDGREN, M.; FITZGERALD, G.; DEVERY, R.; STANTON, C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by humanderived Bifidobacterium species. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.138–145, 2003.

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

COUSSEMENT, P. Powerfull products. **World of Ingredients**, v.17, p.12-17, 1997.

CRAIG, S.A.S.; HOLDEN, J.F.; TROUP, J.P.; AUERBACH, M.H.; FRIER, H.I. Polydextrose as soluble fiber and complex carbohydrate. In: CHO, S.S.; PROSKY, L.; DREHER, M., eds. **Complex carbohydrates in foods**. New York: Marcel Dekker, 1999. cap.18, p.17-31. (Food Science and Technology, 93).

CRITTENDEN, R.G. Prebiotics. In: TANNOCK, G.W., ed. **Probiotics**: a critical review. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1999. p.141-156.

CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T.; ENGLYST, H.N. Prebiotic digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.415S-420S, 2001.

DAMIN, M.R.; ALMEIDA, K.E.; MINOWA, E. Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final da vida de prateleira. **Leite e Derivados**, v.9, p.20-30, 2006.

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.

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, 1997.

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

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophillus, Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1529-1536, 1996.

DELLAGLIO, F.; TORRANI, S.; VLAEMINCK, G. Specific Characteristics of microorganisms used for fermented milks. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.277, p.4-16, 1992.

DE QUEIROZ, J.H.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Estimation of the energetic biomass yield and efficiency of oxidative phosphorylation in cell-recycle cultures of *Schizosaccharomyces pombe*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.609-614, 1993.

DESAI, A.R.; POWELL, I.B.; SHAH, N.P. Survival and activity of probiotic Lactobacilli in skimm ilk containing prebiotics. **Journal of Food Science**, v.69, p.57–60, 2004.

DEVERY, R.; MILLER, A.; STANTON, C. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. **Biochemical Society Transactions**, v.29, pt.2, p.341–344, 2001.

DE VIN, F.P.; RÅDSTRÖM, P.; HERMAN, L.; DE VUYST, L. Molecular and biochemical analysis of the galactose phenotype of dairy Streptococcus thermophilus strains reveals four different fermentation profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.3659–3667, 2005.

DE VOS, W.M.; HUGENHOLTZ, J. Engineering metabolic highways in Lactococci and other lactic acid bacteria. **Trends in Biotechnology**, v.22, p.72–79, 2004.

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

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

ESCULAP. Disponível em: www.esculap.pl/.../activia_dowody_naukowe.html, Acesso em: 20 de mar 2007.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario: FAO/WHO, 2002. [Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002]. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf. Acesso em: 07 nov. 2009.

FERREIRA, C.L.L. Grupo de bactérias láticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L., ed. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: UFV, 2003. p.7-33.

FIGUEIRA, G.M.; PARK, K.J.; BROD, F.P.R.; HONÓRIO, S.L. Evaluation of desorption iso-therms, drying rates and inulin concentration of chicory roots (*Cichorium intybus L.*) with and without enzymatic inactivation. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.273, 2004.

FLOOD, M.T.; AUERBACH, M.H.; CRAIG, S.A.S. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1531–1542, 2004.

FOLIGNE, B.; NUTTEN, S.; GRANGETTE, C.; DENNIN, V.; GOUDERCOURT, D.; POIRET, S.; DEWULF, J.; BRASSART, D.; MERCENIER, A.; POT, B. Correlation between in vitro and in vivo immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, p.236-243, 2007.

FUCKS, R.H.B.; TANAMATI, A.A.C.; ANTONIOLI, C.M.; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção do iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.24, p.83-98, 2006.

GHODDUSI, H.B.; GRANDISON, M.A.; GRANDISON, A.S.; TUOHY, K.M. *In vitro* study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. **Anaerobe**, v.13, n.5/6, p.193–199, 2007.

GIBSON, G.R.; WANG, X. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.118, p.121-128, 1994.

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**, v.17, n.2, p.259–275, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiotica: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2483-2494, 1989.

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

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.39, p.756-761, 1984.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.139-157, 1999.

GONZÁLEZ, B.A.; DOMÍNGUEZ-ESPINOSA, R.; ALCOCER B.R. Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.6, p.152-157, 2008.

GONZALEZ-TOMÁS, L.; COLL-MARQUES, J.; COSTELL, E. Viscoelasticity of inulin–starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.1372–1380, 2008.

GOUPRY, S.; ROCHUT, N.; ROBINS, R.J.; GENTIL, E. Evaluation of solid-phase microextraction for the isotopic analysis of volatile compounds produced during fermentation by lactic acid bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2222–2227, 2000.

GROBBEN, G.J.; CHIN-JOE, I.; KITZEN, V.A.; BOELS, I.C.; BOER, F.; SIKKEMA, J. Enhancement of exopolysaccharide production by *Lactobacillus* delbrueckii subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a simplified defined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.1333–1337, 1998.

GUVEN, M.; YASAR, K.; KARACA, O.B.; HAYALOGLU, A.A. The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type yogurt manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.180-184, 2005.

HAMANAKA, M. Polydextrose as a water-soluble dietary fiber. **Syokuhin Kogyo**, v.9, p.73-80, 1987.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*'. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H.; eds. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic, 1995. p.19-54. (The lactic acid bacteria, v.2).

HELLAND, M.H.; WICKLUND, T.; NARVHUS, J.A. Growth and metabolism of selected strains ofprobiotic bacteria in milk- and water-based cereal puddings. **International Dairy Journal**, v.14, p.957–965, 2004.

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

HICKEY, R.W.; HILLIER, A.J.; JAGO, G.R. Transport and metabolism of lactose, glucose and galactose in homofermentative lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.825-831, 1986.

HOKKAIDO UNIVERSITY. Disponível em: http://www.agr.hokudai.ac.jp. Acesso em 21 abr 2007.

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

HOUSEKNECHT, K.L.; VANDEN HEUVEL, J.P.; MOYA-CAMARENA, S.Y.; PORTOCARRERO, C.P.; PECK, L.W.; NICKEL, K.P.; BELURY, M.A. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.244, p.678–682, 1998.

HUTKINS, R.; HALAMBECK, S.M.; MORRIS, H.A. Use of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Swiss, Mozzarella, and short-method Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.1-8, 1986.

HUTKINS, R.; MORRIS, H.A.; MCKAY, L.L. Galactose Transport in *Streptococcus thermophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.772-776, 1985.

HUTKINS, R.W.; MORRIS, H.A. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Food Protection**, v.50, p.876-884, 1987.

HUTKINS, R.W.; PONNE, C. Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilis*: evidence for a galactose-lactose antiporter. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, p.941-944, 1991.

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, 533p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard n.122C**: Preparation of samples and dilutions for microbiological examination. Brussels: IDF, 1996. p.151-158.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard n.149A**: dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB): standard of identity. Brussels: IDF, 1997. p.123-127.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Standard n.117**: Yoghurt / enumeration of characteristic microorganisms – colony count technique at 37°C. Brussels: IDF, 2003. p.102-109.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Standard 14156**: milk and milk products: extraction methods for lipids and liposoluble compounds. Geneva: ISO, 2001. p.71-79.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Standard 15884**: milk fat: preparation of fatty acid methyl esters. Geneva: ISO, 2002. p.55-61.

ITSARANMUWAT, P.; SHAL-HADDAD, K.; ROBINSON, R.K. The potential therapeutic benefits of consuming “health promoting” fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v.56, n.4, p.203-210, 2003.

JAYA, S.; DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.125–134, 2004.

JIE, Z.; BANG-YAO, L.; MING-JIE, X.; HAI-WEI, L.; ZU-KANG, Z.; TING-SONG, W. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, p.1503–1509, 2000.

JORDANO, R.; SERRANO, E.C.; TORRES, M.; SALMERON, J. Comparison of three M17 media for the enumeration of *Streptococcus thermophilus* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v.55, p.999-1000, 1992.

JYOTI, B.D.; SURESH, A.K.; VENKATESH, K.V. Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. **Microbiological Research**, v.159, p.35–42, 2004.

JYOTI, B.D.; SURESH, A.K.; VENKATESH, K.V. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.509-514, 2003.

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.

KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: An *in vitro* comparison with commercial oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Protection**, v.65, p.214–218, 2002.

KARPPINEN, S.; GIBSON, G.R.; FULLER, R. *In vitro* fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1469-1476, 2000.

KAUR, N.; GUPTA, A.K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal of Bioscience**, v.27, p.703-714, 2002.

KIM, Y.J.; LIU, R.H. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, v.67, p.1731–1737, 2002.

KIMMEL, S.A.; ROBERTS, R.F. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.87–92, 1998.

KITAZAWA, H.; HARATA, T.; UEMURA, J.; SAITO, T.; KANEKO, T.; ITOH, T. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.169–75, 1998.

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

KODAKA, H.; MIZUOCHI, S.; TERAMURA, H.; NIRAZUKA, T. Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples: performance-tested methodSM. **Journal of AOAC International**, v.88, p.1702-1713, 2005.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v.13, p.517-528, 2003.

KULKARNI, N.; REDDY, B.S. Inhibitory effect of Bifidobacterium longum cultures on the azoxymethane induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial b-glucuronidase. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.207, p.278-283, 1994.

KURIEN, A.; PUNIYA, A.K.; SINGH, K. Selection of prebiotic and *Lactobacillus acidophilus* for synbiotic yoghurt preparation. **Indian Journal of Microbiology**, v.45, p.45-50, 2005.

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.117-158. (Elsevier applied food science series).

LAMMERS, K.M.; BRIGIDI, P.; VITALI, B.;GIONCHETTI, P.; RIZELLO, F.; CARAMELLI, E.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, p.165-172, 2003.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with L*. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Milchwissenschaft**, v.51, p.446-451. 1996.

LEE, K.N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, v.108, p.19-25, 1994.

LIN, T.Y.; LIN, C.-W.; WANG, Y.-J. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. **Food Chemistry**, v.83, p.27–31, 2003.

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach. **Journal of Applied Microbiology**, v.98, p.1115–1126, 2005.

LOPEZ DE FELIPE, F.; HUGENHOLZ, J. Pyruvate flux distribution in NADH-oxidase-overproducing *Lactococcus lactis* strain as a function of culture conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v.179, p.461–466, 1999.

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

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. 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.

MAGMA. Disponível em: http:// www. www.magma.ca/~scimat/acidophilus.htm Acesso em 15 abr 2007.

MAKRAS, L.; VAN ACKER, G.; DE VUYST, L. *Lactobacillus casei* subsp. *Casei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.6531–6537, 2005.

MARTEAU, P.; BOURTRON-RUALT, M.C. Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v.87, suppl.2, p.153-157, 2002.

MARTIN, N.C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; BÉAL, C.; CORRIEU, G. Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yoghurts. **Journal of Sensory Studies**, v.47, p.151-164, 1999.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; GÓMEZ, R. Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. **International Dairy Journal**, v.17, p.116-122, 2007.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTO, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims-interations and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v.9, p.25-35, 1992.

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

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C.; KAUFMANN, P.; DASEN, G.; WENGER, S.; TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology**, v.20, p.57–64, 1997.

MENNE, E.; MANSON, J.E.; NILSSON, U. Prebiotic effect of the fructosylfructose: a type inulin hydrolysate in humans. In: NDO SYMPOSIUM, Wageningen, 1997. **Book of abstracts**. Wageningen, 1997. p.164.

MILLER, C.C.; PARK, Y.; PARIZA, M.W.; COOK, M.E. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.198, p.1107-1112, 1994.

MITAL, B.K.; GARG, S.K. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews International**, v.8, n.3, p.347-389, 1992.
MONNET C.; CORRIEU, G. Selection and properties of α-acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. **Food Microbiology**, v.24, p.601–606. 2007.

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

NAHAISI, M.H. Therapeutic properties, products and enumeration. In: ROBINSON, R.K., ed. **Developments in food microbiology**. London: Elsevier Applied Science, 1986. cap.6, p.153-178. (Development series).

NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S., ed. **Natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.341-462.

NICOLOSI, R.J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J.A.; HUTH, P.J. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. **Artery**, v.22, p.266-277, 1997.

NINESS, K.R. Inulin and oligofructose: what are they? **Journal of Nutrition**, v.129, p.1402-1406, 1999.

OH, D.K.; HONG, G.H.; LEE, Y.; MIN, S.; SIN, H.S.; CHO, S.K. Production of conjugated linoleic acid by isolated Bifidobacterium strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.19, p.907–912, 2003.

OHTA, A. Dietary fructooligosaccharides present osteopenia after gastrectomy in rats. **Journal of Nutrition**, v.128, p.106-110, 1998.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.1-21, 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, R.P.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M.N. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the effect of inulin. **LWT – Food Science and Technology**, v,42, n.5, p.1015-1021, 2009.

ORDONEZ, G.A.; FUNG, D.Y.C.; JEON, I.J. Effect of oxyrase (TM) on the metabolic processes of lactic acid bacteria in frozen yogurt mix. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v.8, p.71-81, 2000.

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

O'SULLIVAN, T.F.; FITZGERALD, G.F. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p.275-283, 1999.

OUWEHAND, A.C.; SALVADORI, B.B.; FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; SELLARS, R. Health effects of probiotics and cultures-containing dairy products in humans. **IDF Bulletin**, v.380, p.4-19, 2003.

OZER, D.; AKIN, M.S.; OZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food Science and Technology International**, v.11, p.19-24, 2005.

PENNA, A.L.B.; BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. Optimization of yoghurt production using demineralized whey. **Journal of Food Science**, v.62, p.846-850, 1997.

PERRIN, C.; GUIMONT, C.; BRACQUART, P.; GAILLARD, J.L. Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. **Current Microbiology**, v.39, p.342-347, 1999.

PIAD, R.; SAMANIEGO, L.M.; PÉREZ, M.; BOUCOURT, R.; MEDINA, E.; LAURENCIO, M.; MILIÁN, G. Prebiotic activity of an enzymatic yeast cream hydrolyzate on egg-laying hens productive indicator. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.5, p.226-230, 2006.

PROBERT, H.M.; APAJALAHTI, J.H.A.; RAUTONEN, N.; STOWELL, J.; GIBSON, G.R. Polydextrose, lactotol & fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in three-stage continuous culture system. **Applied Environment Microbiology**, v.70, p.4505–4511, 2004.

PROTONUTRIZIONE. Disponível em: http:// www.protonutrizione.blogosfere.it/2006/07/2.html Acesso em 20 abr 2007

RADKE-MITCHELL, L.C.; SANDINE, W.E. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.2558-2568, 1986.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, doi:10.1016/ j.foodres.2009.09.009

RAO, A.V. Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1442-1445, 1999.

REID, G. Scientific evidence for and against the safe use of probiotics. **Trends in Microbiology**, v.14, p.348–352, 2006.

RESTLE, J.; PACHECO, P.S.; MOLETTA, J.L. Grupo genético e nível nutricional pós-parto na produção e composição do leite de vacas de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.585-597, 2003.

RHEE, S.K.; PACK, M.Y. Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v.144, p.217-221, 1980.

ROBERFROID, M.B. Prebiotics: preferencial substrates for specific germs? **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, suppl., p.406-409, 2001.

ROBERFROID, M.B. Funcional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, suppl.2, p.105-110, 2002.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, p.11-19, 1998.

ROBERFROID, M.B. Defining functional foods. In: GIBSON, G.R.; WILLIANS, C.M., eds. **Functional foods**: concept to product. Boca Raton, Cambridge: CRC Press, 2000. cap.1, p.9-27. (Woodhead publishing in foods science and technology).

ROELS, J.A. **Energetics and kinetics in biotechnology**. Amsterdam, New York: Elsevier Biomedical Press, 1983. 330p.

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

SALMERON, I.; FUCIÑOS, P.; CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S.S. Volatile compounds produced by the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in cereal-based substrates. **Food Chemistry**, v.117, n.2, p.265-271, 2009.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.563-572, 1998.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A., eds. **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, n.5/6, p.341-347, 1998. [Symposium on Functional Foods – Designer Foods for the Future, Cork, Ireland, 1997].

SCIENTIFIC PSYCHIC. Disponível em: http:// www.scientificpsychic.com/fitness/inulin.gif. Acesso em 20 mar 2007

SCHMIDT-HEBBEL, H. **Quimica y tecnologia de los alimentos**. Santiago: Editorial Salesiana, 1956. 313p.

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

SHAH, N.P. Some beneficial effects of probiotic bacteria. **Bioscience and Microflora**, v.19, p.99–106, 2000b.

SHAH, N.P. Functional foods, probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v.55, p.46–53, 2001.

SHAH, N.P. Probiotics and prebiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.15, p.13–16, 2004.

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

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

SHIN, H.S.; LEE, J.H.; PESTKA, J.J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v.65, p.885–887, 2000.

SIEBER, R.; COLLOMB, M.; AESCHLIMANN, A.; JELEN, P.; EYER, H. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v.14, p.1–15, 2004.

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.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.U. **Biometría**: principios y métodos estadísticos de la investigación biológica. Madrid: H. Blume, 1979. 832p.

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

SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. **Journal of Dairy Research**, v.56, p.755-764, 1989.

SVENSSON, M.; LOHMEIER-VOGEL, E.; WAAK, E.; SVENSSON, U.; RÅDSTRÖM, P. Altered nucleotide sugar metabolism in *Streptococcus thermophilus* interferes with nitrogen metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.195–200, 2007.

TAGUCHI, A.; OHTA, A.; ABE, M.; BABA, S.; OHTSUKI, M.; TAKIZAWA, T.; YUDA, Y.; ADACHI, T. Effects of fructooligosaccharides on the bone and mineral absorption in the rat model with ovariectomized osteoporosis. **Meiji Seika Kaisha Nenpo**, v.33, p.37-44, 1994.

TALON, R.; WALTER, D.; VIALLON, C.; BERDAGUÉ, J.L. Prediction of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* populations in yoghurt by Curie point pyrolysis-mass spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v.48, p.271-279, 2002.

TAMIME, A.Y., ed. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. 216p.

TANNOCK, G.W.; MUNRO, K.; HARMSEN, H.J.M.; WELLING, G.W.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR 20. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2578–2588, 2000.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2288–2296, 2003.

THOMAS, T.D.; CROW, V.L. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.48, n.1, p.186-191, 1984.

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

TURNER, K.W.; MARTLEY, F.G. Galactose fermentation and classification of thermophilic lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.1932-1934, 1983.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BASILICATA. Disponível em: http://www.unibas.it/utenti/parente/starter/gruppi.html. Acesso em:22 mar 2007

VAN LOO, J.; CLUNE, Y.; BOSSCHER, D.; FRANCK, A. Prebiotic oligofructose-enriched chicory inulin combination with probiotics: in the prevention of colon cancer in experimental models and human volunteers. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.16, n.4, p.6-8, 2005.

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

VORAGEN, A.G.I. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, p.328-335, 1998.

WANG, X.; GIBSON, G.R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofrutose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.273-380, 1993.

ZHAO, R.; SUN, J.; MO, H.; ZHU, Y. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.23, p.195-200, 2007.

CAPÍTULO XII

12. ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM REVISTA INDEXADA

Pág.

The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk 142

Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk 151

Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus* 157

Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin (aguardando publicação) ... 164

doi: 10.1111/j.1471-0307.2009.00471.x

ORIGINAL RESEARCH

The effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk

RICARDO PINHEIRO DE SOUZA OLIVEIRA,[1] PATRIZIA PEREGO,[2] ATTILIO CONVERTI[2] and MARICÊ NOGUEIRA DE OLIVEIRA[1]*

[1]*Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil,* [2]*Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo, Università degli Studi di Genova, Via Opera Pia 15, I-16145 Genova, Italy*

We investigated the effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk. The kinetics of acidification of inulin-supplemented milk (0, 0.01, 0.02 and 0.04 g/g), as well as probiotic survival, pH and firmness of fermented milk stored at 4°C for 24 h and 7 days after preparation were examined. Probiotic fibre-enriched fermented milk quality was influenced both by the amount of inulin and by the co-culture composition. Depending on the co-culture, inulin addition to milk influenced acidification kinetic parameters, probiotic counts, pH and the firmness of the product.

Keywords Inulin, Probiotics, Prebiotics, Yogurt, Milk Processing.

INTRODUCTION

Nowadays, consumers are increasingly demanding foods with special properties, such as pleasant flavour, low-calorie value or low fat content, and beneficial health effects. Within this context, the food industry has been developing products with improved flavour and appearance. Functional dairy products meet various nutritional requirements, along with health benefits that are strengthened by the addition of probiotics as well as by certain types of soluble fibres known as prebiotics.

Prebiotics are non-digestible food components that are beneficial for the host because they selectively stimulate proliferation or activity of desirable bacterial populations in the colon. Moreover, prebiotics can inhibit pathogen multiplication, ensuring additional benefits to host health. Such components mostly act in the large intestine, even though they can also impact on micro-organisms in the small intestine (Roberfroid 2000; Mattila-Sandholm *et al.* 2002).

Among prebiotics, inulin and oligofructoses are soluble and fermentable fibres. They are named fructans and are not digested by α-amylase or hydrolytic enzymes in the upper part of the intestinal tract (Carabin and Flamm 1999). The inulin and oligofructose sources that are most widely used by the food industry are chicory (*Cichorium intybus*) and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) (Kaur and Gupta 2002). Inulin is mostly used to obtain products with a low-fat content, while oligofructoses are employed in low-calorie fruit preparations, such as yogurts, and to balance the sweetness and mask the high-intensity sweetener's residual flavour in food preparations (Niness 1999; Guven *et al.* 2005). Established amounts for food fibres are at least 0.03–0.06 g of fibres per gram in solid foods and 0.015–0.03 g of fibres per gram in liquid foods (Anvisa 2002).

These functional food ingredients influence both physiological and biochemical processes in the organism, resulting in both health improvement and reduced risk of many diseases. Several experimental *in vivo* studies have shown the effects of both inulin and oligofructoses in stimulating the host's immunological system and promoting bifidobacterial predominance in the colon, reducing the pathogenic bacteria level in the intestine, alleviating constipation and decreasing the risk of osteoporosis that can result from reduced absorption of minerals, such as calcium. They also reduce the risk of arteriosclerosis through a decrease in the synthesis and the blood levels of triglycerides and fatty acids (Kaur and Gupta 2002; Fucks *et al.* 2006). Inulin influences intestinal function, increasing the frequency of evacuations, especially in constipated patients. The increase in faeces weight in evacuations and faecal pH reduction caused by fermentation are consequences of the suppression of putrefactive substance production in the colon (Menne *et al.* 1997; Roberfroid and Gibson 1998).

*Author for correspondence: monolive@usp.br

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

As inulin is digestion resistant in the upper intestinal tract, it reaches the large intestine practically intact, where it is fermented by bacteria; thus it can be classified as a soluble alimentary fibre (Anderson 1995; Roberfroid and Gibson 1998).

Most of the lactic-acid bacteria (LAB) isolated from human and animal gastrointestinal tracts are known as probiotics. These organisms, when used in large amounts in the preparation of foods and dairy products, should survive passage through the upper digestive tract. Probiotic micro-organisms should also be able to adhere to intestinal cells, with beneficial effects for the intestinal tract (Gilliland 1989). When such organisms are consumed in large quantities, they help in the intestinal balance (Ferreira 2003). Probiotic micro-organisms used in functional dairy products belong to the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Saccharomyces* (Goldin and Gorbach 1984).

Several researchers have described the main therapeutic benefits of the ingestion of probiotic micro-organisms for humans. Such benefits can be summarized as follows: increased immune modulation and prevention of certain diseases and/or changes in humans, such as, for instance, diarrhoeas, lactose intolerance, intestinal inflammatory diseases, irritated bowel syndrome, constipation, disordered growth of intestinal bacteria, bladder and cervix cancers, allergies, high cholesterol, high blood pressure, coronary diseases and infection of the urinary tract, as well as upper breathing tract and related infections (Mattila-Sandholm *et al.* 1992; Goldin 1998; Holzapfel *et al.* 1998; Salminen *et al.* 1998; Ouwehand *et al.* 2003; Akin *et al.* 2007).

In order to produce the desired benefits, probiotic bacteria should be present in the products at high viable counts during their entire shelf life. Kurmann and Rasic (1991) recommended that the minimum dose for therapeutic effect be from 10^8 and 10^9 colony-forming units (cfu)/mL. This optimum desirable concentration is not well established, although it could vary according to species and strains. Other researchers suggested counts in the range 10^7–10^8 cfu/mL (Rybka and Kailasapathy 1995; Dave and Shah 1997; Kailasapathy and Rybka 1997); this level can be reached with daily doses of 100 mL of dairy products containing 10^7 cfu/mL of probiotic bacteria (Oliveira *et al.* 2002). Usually, probiotic micro-organisms have low viability in commercial preparations; several factors that may affect their viability have been identified in fermented milk, including low pH, other micro-organisms, incubation temperature and presence of oxygen (Shah *et al.* 1995; Kailasapathy and Rybka 1997; Shah 2000; Damin *et al.* 2008). Furthermore, lack of proteolytic activity of probiotics limits their growth in milks other than human milk (Klaver *et al.* 1993; Oliveira *et al.* 2001; Lucas *et al.* 2004).

The focus on disease prevention by means of functional foods is currently very strong. Inulin and probiotics appear as important food ingredients that could widely be explored in research and by the food industry for the production of functional foods (Niness 1999; Guven *et al.* 2005). We evaluated the effect of inulin as a prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milks, by investigating the kinetics of acidification of inulin-supplemented milk (0.01, 0.02 and 0.04 g/g) fermented by *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. We also looked at survival, pH, acidity and firmness of the fermented fibre-enriched milk product, stored at 4°C after 24 h and 7 days.

MATERIALS AND METHODS

Microbial cultures

Five strains of pure commercial freeze-dried starter cultures (Danisco, Sassenage, France) were used: *Streptococcus thermophilus* TA040 (St) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340 (Lb) (yogurt micro-organisms) and *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr), and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BL 04 (Bl) (probiotic micro-organisms).

Experimental procedure

Milk preparation

Milk was prepared by adding 13 g of skim milk powder (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brazil) to 100 g of distilled water (M), supplemented with inulin (Beneo TM, ORAFTI Active Food Ingredients, Oreye, Belgium), specifically 0.01 (SM1), 0.02 (SM2) and 0.04 (SM4) g/g, and then thermally treated at 90°C for 5 min in a water bath (550 THE, Fisatom, São Paulo, Brazil). The heat-treated milk was collected in 1.0 L sterile flasks, cooled in an ice bath, distributed into 250 mL sterile Schott flasks in a laminar flow chamber, and then stored at 4°C for 24 h, before use.

Inoculum preparation

A pre-culture of La was prepared by dissolving 100 mg of freeze-dried culture in 50 mL of milk (10% of total solids; autoclaved at 121°C for 20 min). After blending and activation at 42°C for 30 min, 1 mL of the pre-culture was inoculated into 250 mL of milk or supplemented milk. The same procedure was used for the preparation of Lb, Lr, Bl, and St pre-cultures adding to 50 mL of milk, 400, 130, 45 and 90 mg of the freeze-dried pure cultures, respectively. Average bacteria counts in the different pre-cultures ranged from 6.1 to 6.5 log cfu/mL.

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

Fermentations
The inoculated samples were transferred to a water bath connected to CINAC (*Cynetique d'acidification*, Ysebaert, Frépillon, France) (Spinnler and Corrieu 1989). This system allows continuous monitoring of lactic acid ferment forming activity, through the simultaneous observation of the evolution of the pH and temperature of one or several samples. Batch fermentations were made at 42°C up to pH 4.5, corresponding to the end of fermentation. Fermentations were carried out in duplicate and monitored using the CINAC system.

Kinetic parameters
The acidification rate (dpH/dt) was calculated as the time variation of pH, and its maximum value (V_{max}) expressed as pH units/minute. At the end of the incubation period, the following kinetic parameters were also calculated: (i) t_{max} (h): time after which the maximum (V_{max}) acidification rate was reached; (ii) $t_{pH5.0}$ (h): time to reach pH 5.0; (iii) pH V_{max}: pH corresponding to V_{max}; and (iv) $t_{pH4.5}$ (h): time to reach pH 4.5. When pH 4.5 was reached, the fermentation was manually interrupted by agitating the clot with a stainless steel rod attached to a perforated disk; the disk was moved upwards and downwards for 80 s. The fermented product was put into a 50-mL polypropylene plastic cup, thermally sealed using Selopar equipment (BrasHolanda, Pinhais, Brazil), and quickly cooled in an ice bath. The fermented product was then stored at 4°C for 7 days.

We investigated the kinetics of acidification throughout the fermentation of milk supplemented with 0.01, 0.02 or 0.04 g of inulin/g by *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus* or *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and/or *B. lactis*. We also examined probiotic survival, pH and firmness of these fermented fibre-enriched milk samples, stored at 4°C for 24 h or 7 days after production. Milk not supplemented with inulin was used as a control.

Physicochemical analyses
Physicochemical analysis was carried out for inulin-supplemented milk samples in triplicate, and the results were expressed in g/g. Fat was determined by Gerber's method, according to Schmidt-Hebbel (1956). Protein levels were calculated as a function of the total nitrogen content, through the micro-Kjeldahl method, using 6.38 as a conversion factor (Aoac 1995). Lactose content was determined by titration using Fehling's solution (Instituto Adolfo Lutz 1985). The total solids content was determined by dry weight at 100–105°C, following the method recommended by AOAC (1995).

pH and acidity
Fermented milk post-acidification was determined by pH measurement using a pH meter model Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brazil). Acidity, expressed as lactic acid content, was evaluated by titration with a 0.11-N NaOH solution, according to the AOAC (1995).

Counts of probiotic bacteria
Bacterial counts were carried out in triplicate after 24 h or 7 days storage of the fermented milk at 4°C. One mL of each sample was diluted with 9 mL of 1% sterile peptonated water. Serial dilutions were made, and the bacteria were counted with the pour plate technique (Kodaka *et al.* 2005). All media were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). St colonies were counted in M17 agar by aerobic incubation at 37°C for 48 h. Lb counts were made in MRS agar medium with pH adjusted to 5.4 by addition of acetic acid, after aerobic incubation at 37°C for 48 h. La and Lr were counted in this same medium, with pH adjusted to 5.4 by addition of acetic acid, after anaerobic incubation at 37°C for 72 h. Bl was counted as for La and Lr (Almeida *et al.* 2008), but without any pH adjustment (IDF 1996, 1997, 2003).

Firmness
Fermented milk firmness was measured in quadruplicate at 8°C using a TA-XT2 texture analyser (Stable Micro Systems, Godalming, UK). The operating conditions were: P/25P acrylic probe (2.5 cm diameter), 10 mm penetration, and 10 mm/s speed. Firmness was defined as the maximum force required to penetrate the gel and expressed as N.

Statistical analyses
The data were examined by analysis of variance (ANOVA) using the STATISTICA Software 6.0 (StatSoft, Tulsa, EUA). Mean values were compared using the Tukey test at $\alpha = 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Milk chemical composition
Milk and supplemented milk compositions are presented in Table 1. Fat, protein and solid contents ranged from 0.3 to 0.6 mg/g, 40 to 41 mg/g, and 0.132 to 0.156 g/g, respectively. No significant differences were observed in fat and protein contents; however, total solids values varied significantly. Lactose content ranged from 0.044 to 0.046 g/g; this was significantly affected by the addition of 0.04 g of inulin per g of milk.

Kinetics of acidification
Acidification curves of the supplemented milks are shown in Figure 1. Fermentation time was shorter for all co-cultures (St-La, St-Lb, St-Lr and St-Bl) when 0.04 g inulin was added per gram of milk. The stimulating effect of inulin on the metabolism of bifidobacteria (Bruno *et al.* 2002; Akalın *et al.*

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

Table 1 General composition of the milk*

Milk Base	Inulin (g/g)	Fat (mg/g)	Protein (mg/g)	Lactose (g/g)	Total solids (g/g)
M	0	0.6[a]	40.7[a]	0.044[a]	0.132[a]
SM1	0.01	0.3[a]	40.0[a]	0.045[ab]	0.140[b]
SM2	0.02	0.6[a]	40.3[a]	0.046[ab]	0.148[c]
SM4	0.04	0.3[a]	41.0[a]	0.046[b]	0.156[d]

*Means of triplicate measures, mean standard deviation ≥ 0.03.
Means in the same column with different letters are significantly different; $\alpha < 0.05$.
M, non-supplemented milk; SM1, milk supplemented with 0.01 g of inulin/g; SM2, milk supplemented with 0.02 g of inulin/g; SM4, milk supplemented with 0.04 g of inulin/g.

Table 2 Acidification kinetics parameters of milk fermented by *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) and *Bifidobacterium lactis* (Bl) in co-culture with *Streptococcus thermophilus* (St)

Milk	Co-culture	V_{max} (10^{-3} pH units/min)	t_{max} (h)	pHV_{max}	$t_{pH5.0}$ (h)
M	St-Lb	17.9[cd]	3.03[abc]	5.53[a]	3.68[ab]
M	St-La	16.4[abc]	3.23[cde]	5.71[a]	4.70[de]
M	St-Lr	15.3[ab]	3.03[abc]	5.71[a]	4.26[bcd]
M	St-Bl	16.0[abc]	3.35[ef]	5.68[a]	4.83[de]
SM1	St-Lb	17.8[cd]	2.91[a]	6.11[a]	3.75[abc]
SM1	St-La	16.6[abcd]	3.20[cde]	5.73[a]	4.85[def]
SM1	St-Lr	16.0[abc]	3.05[abc]	5.74[a]	4.63[de]
SM1	St-Bl	14.6[a]	3.53[f]	5.76[a]	5.43[f]
SM2	St-Lb	17.2[cd]	3.03[abc]	5.59[a]	3.73[abc]
SM2	St-La	16.7[abcd]	3.18[cde]	5.73[a]	4.76[de]
SM2	St-Lr	16.3[abc]	3.16[bcde]	5.76[a]	4.95[ef]
SM2	St-Bl	15.5[ab]	3.31[def]	5.88[a]	5.01[ef]
SM4	St-Lb	18.8[d]	2.93[ab]	5.51[a]	3.55[a]
SM4	St-La	17.1[bcd]	3.16[bcde]	5.64[a]	4.31[cd]
SM4	St-Lr	16.3[abc]	3.10[abcd]	5.58[a]	4.45[de]
SM4	St-Bl	16.3[abc]	3.23[cde]	5.62[a]	4.80[de]

M, non-supplemented milk; SM1, milk supplemented with 0.01 g of inulin/g; SM2, milk supplemented with 0.02 g of inulin/g; SM4, milk supplemented with 0.04 g of inulin/g.
V_{max}, maximum acidification rate; t_{max}, time to reach the maximum acidification rate; pHV_{max}, milk pH at which the maximum acidification rate was reached; tpH5.0, time to reach pH 5.0.
Values with different letters in the same column are significantly different ($\alpha < 0.05$).

2004) and lactobacilli (Desai *et al.* 2004) has recently been ascribed to greater release in yogurt of additional nutrients (Makras *et al.* 2005) like amino acids (Donkor *et al.* 2007) or reduction of a negative environmental impact (Desai *et al.* 2004).

Kinetic acidification parameters of milk fermented by *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *B. lactis* in co-culture with *S. thermophilus* are presented in Table 2. Maximum acidification rates (V_{max}) ranged from 14.6×10^{-3} pH units/min (St-Bl/SM1) to 18.8×10^{-3} upH/min (St-Lb/SM4), with significant differences between the trials. V_{max} values were significantly higher when inulin was used. Values of t_{max} varied significantly, ranging from 02.91 hours (St-Lb/SM1) to 03.53 hours (St-Bl/SM1). In all cultures, t_{max} decreased with increasing inulin supplementation; however, it was only slightly influenced when the St-Lr co-culture was used. The St-Bl co-culture in SM1 yielded the highest t_{max} value; however, t_{max} was significantly lower in SM2 and SM4.

Although pHV_{max} ranged from 5.51 (St-Lb/SM4) to 6.11 (St-Lb/SM1), the differences were not significant, whereas significant differences were observed for $t_{pH}5.0$ values, which ranged from 3.55 (St-Lb/SM4) to 5.43 (St-Bl/SM1).

The fermentation time ($t_{pH}4.5$) ranged from 5.2 to 11.2 h; there are significant differences among these values, and they decreased in milk supplemented with inulin, especially at 0.04 g/g; St-Lr cultures were strongly affected at this inulin level. However, the fermentation time for St-Lb (SM1), St-Lr (SM1 and SM2) and St-Bl (SM1) co-cultures was close to those obtained at the other concentrations (Figure 2).

Ozer *et al.* (2005) found that the fermentation time of St-Lb was 3.5 h, while more than 8 h were needed by the St-Lb-La-Bb co-culture. The addition of inulin and/or lactulose to these co-cultures reduced this parameter to 7.0 and 7.3 h, respectively. After 14 days of storage, the pH ranged from 4.03 to 4.42 for St-Lb-La-Bb in milk supplemented with inulin and lactulose, respectively. Oliveira *et al.* (2002) and Sodini *et al.* (2002) reported that the fermentation time was shorter for the St-La co-culture when compared to St-Lr, which can be explained by the higher acidification rate of La.

pH and acidity

Table 3 presents the pH and acidity results for milk fermented by *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *B. lactis* in co-culture with *S. thermophilus*. pH values ranged from 4.32 (St-La/M) to 4.48 (St-Lr/M) after 24 h of fermentation (D1), and from 4.15 (St-La/SM4) to 4.37 (St-La/M) after 7 days (D7). Using the St-Lb and St-La co-cultures, acidification was stronger in milk supplemented with 0.04 g of inulin/g, while milk supplemented with 0.01 g of inulin/g with St-Lr and St-Bl co-cultures exhibited lower pH. Birollo *et al.* (2000) observed that the pH of fermented milk was initially 4.7, decreasing to 4.25 after 45 days.

After 24 h of fermentation, the acidity ranged from 8.1 (St-Bl/M) to 10.3 mg of lactic acid per gram (St-La/SM2). When we used the St-Lb co-culture, the amount of lactic acid increased with increased inulin concentration in the formulation, but only the highest inulin addition (0.04 g/g) produced a significant difference. With the St-La

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

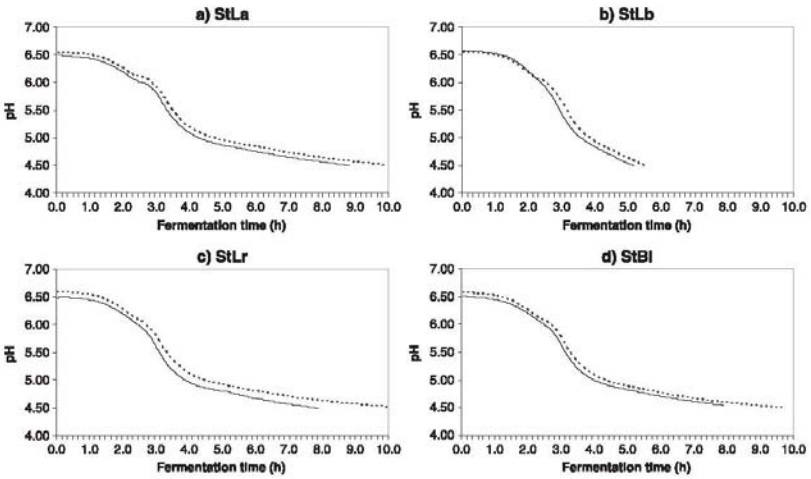


Figure 1 Acidification curves of milk (dotted lines) and milk supplemented with 0.04 g of inulin/g (continuous lines) at 42°C until pH 4.5.

co-culture, the addition of 0.02 g of inulin/g yielded the highest production of lactic acid compared to all of the other co-cultures. With the St-Lr co-culture, the highest production of lactic acid (9.4 mg/g) was obtained with 0.01 g of inulin/g. The lowest values of lactic acid were found when the St-Bl co-culture was used, ranging from 8.1 mg of lactic acid per gram in M to 8.6 mg/g in SM1; this difference was significant. Lactic acid production was always higher after D7 than D1, ranging from 9.0 mg/g (St-Lr/M) to 12.0 mg of lactic acid per gram (St-La/SM2). Ozer *et al.* 2005 observed a production of lactic acid ranging from 9.9 to 11.8 mg/g after 1 day of fermentation, and from 13.3 to 15.8 mg/g after 14 days of storage, which is similar to what we found.

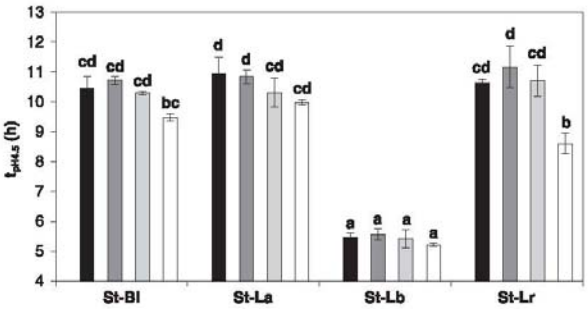


Figure 2 Effect of inulin addition to milk on the duration of fermentation ($t_{pH4.5}$) by *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*. Inulin addition (g/g): 0 (■); 0.01 (■); 0.02 (■); 0.04 (□).

Probiotic bacteria counts

Figures 3 and 4 illustrate the probiotic (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *B. lactis*) bacteria counts and the *S. thermophilus* (St) counts in fermented milk supplemented or not with inulin after 24 h and 7 days storage at 4°C of fermentation, respectively.

The counts for *S. thermophilus* after 24 h of fermentation ranged from 8.67 (St-Bl) to 9.45 log cfu/mL (St-Lr) in SM1, with no significant differences between the cultures (Figure 3b). After 7 days of fermentation, the counts ranged from 8.18 (St-Bl) to 9.42 log cfu/mL (St-Lr) in this same medium, with significant differences between them (Figure 4b). On average, the addition of 0.04 g of inulin/g resulted in a 0.40 log cfu/mL decrease for La and 0.69 log cfu/mL for Lr.

Birollo *et al.* (2000) observed that *S. thermophilus* remained viable (~109 cfu/mL) after up to 40 days of storage at 6°C. *Lactobacillus bulgaricus* counts reached 108 cfu/mL within the first 10 days, under the same storage conditions, and after 15 to 45 days the counts continued to be ~107 cfu/mL.

After D1, the probiotic counts ranged from 7.37 (St-Lr/M) to 9.13 log cfu/mL (St-Bl/SM4). There was significantly greater growth of St-Lb in milk supplemented with inulin. Compared to the control, the growth of La in milk supplemented

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

Table 3 Post-acidification and acidity of milk fermented by *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) and *Bifidobacterium lactis* (Bl) in co-culture with *Streptococcus thermophilus* (St)

		pH		*Acidity (mg of lactic acid/g)*	
Milk	*Co-culture*	*D1*	*D7*	*D1*	*D7*
M	St-Lb	4.41^{fg}	4.25^{fg}	8.3^{ab}	10.1^{ef}
M	St-La	4.32^{a}	4.22^{cde}	10.2^{hi}	11.6^{g}
M	St-Lr	4.48^{k}	4.37^{j}	8.9^{cd}	9.0^{a}
M	St-Bl	4.44^{ij}	4.25^{efg}	8.1^{a}	10.0^{cdef}
SM1	St-Lb	4.37^{de}	4.22^{cde}	8.4^{ab}	10.1^{def}
SM1	St-La	4.35^{bc}	4.24^{ef}	9.9^{gh}	11.7^{g}
SM1	St-Lr	4.39^{ef}	4.32^{h}	9.4^{ef}	9.7^{bc}
SM1	St-Bl	4.40^{fg}	4.23^{def}	8.6^{bc}	10.2^{f}
SM2	St-Lb	4.41^{fg}	4.21^{bcd}	8.4^{ab}	9.6^{b}
SM2	St-La	4.34^{abc}	4.20^{bc}	10.3^{i}	12.0^{h}
SM2	St-Lr	4.46^{jk}	4.36^{ij}	9.1^{de}	9.0^{a}
SM2	St-Bl	4.42^{gh}	4.25^{fg}	8.4^{ab}	10.2^{ef}
SM4	St-Lb	4.33^{ab}	4.18^{b}	9.1^{de}	9.8^{bcde}
SM4	St-La	4.35^{cd}	4.15^{a}	9.7^{fg}	12.4^{i}
SM4	St-Lr	4.41^{g}	4.34^{hi}	9.1^{de}	9.7^{b}
SM4	St-Bl	4.44^{hi}	4.27^{g}	8.3^{ab}	9.8^{bcd}

M, non-supplemented milk; SM1, milk supplemented with 0.01 g of inulin/g; SM2, milk supplemented with 0.02 g of inulin/g; SM4, milk supplemented with 0.04 g of inulin/g.
D1, after 24 h of fermentation of the product at 4°C.
D7, after 7 days of storage of the product at 4°C.
Values with different letters in the same column are significantly different ($\alpha < 0.05$).

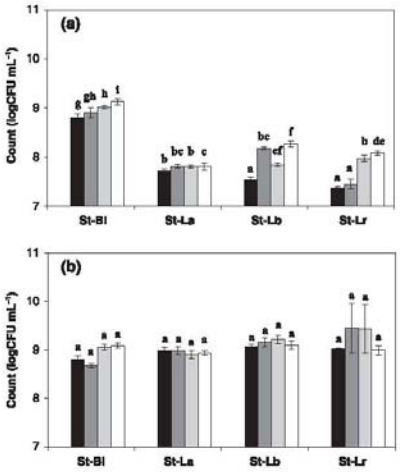


Figure 3 Effect of inulin addition on bacterial counts of *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* after 24 h of storage of the product at 4°C. Inulin addition (g/g): 0 (■); 0.01 (■); 0.02 (■); 0.04 (□). (a) Counts of probiotic bacteria. (b) Counts of *S. thermophilus*.

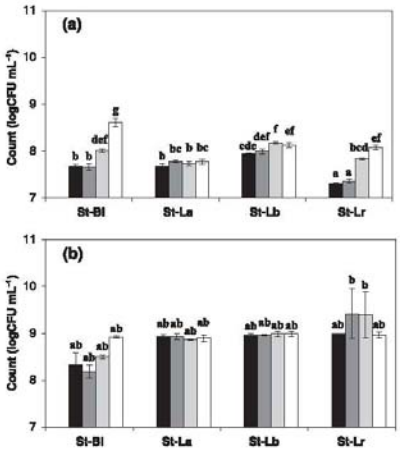


Figure 4 Effect of inulin addition on bacterial counts of *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus* after 7 days of storage of the product at 4°C. Inulin addition (g/g): 0 (■); 0.01 (■); 0.02 (■); 0.04 (□). (a) Counts of probiotic bacteria. (b) Counts of *S. thermophilus*.

with inulin was significantly greater. However, no significant increase in counts of Lr in milk supplemented with 0.01 g of inulin/g was observed; however, the changes were significant when 0.02 and 0.04 g of inulin per gram were added. Indeed, inulin significantly increased Bl count (Figure 3a).

Ozer *et al.* (2005) compared the effect of 0.005 to 0.01 g of inulin per gram and 0.0025 to 0.025 g of lactulose per gram on *L. acidophilus* and *B. bifidum* growth. Neither inulin nor lactose influenced St-Lb growth, while they stimulated that of *B. bifidum*. Lactulose enhanced the growth of probiotic bacteria more than inulin, whereas this latter compound did not stimulate La growth at all.

After 7 days of fermentation, the viability of the probiotic bacteria *L. acidophilus* and *B. lactis* decreased by only ~0.04 and ~0.15 log cfu/mL, respectively. However, the counts remained stable for *L. rhamnosus* and *L. bulgaricus* cultures. These results, which confirm the stable viability observed by Donkor *et al.* (2007) for *L. casei* and La during 4 weeks' cold storage in the presence of 5–15 g inulin/L, is of particular significance, taking into account that one of the most important functions of prebiotics is just improving probiotic survival and activity during storage. Finally, inulin supplementation of milk had a significant influence on the survival of these probiotic bacteria (Figure 4a),

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

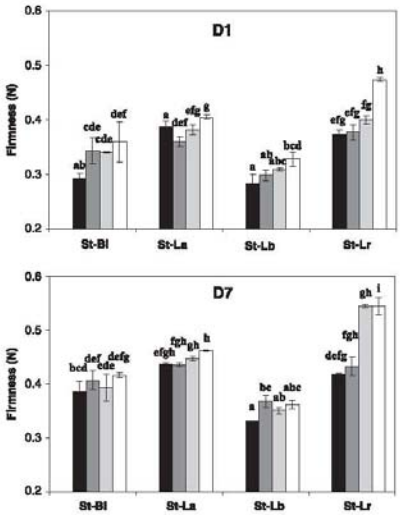


Figure 5 Effect of inulin addition on firmness of milk fermented by *Lactobacillus bulgaricus* (St-Lb), *Lactobacillus acidophilus* (St-La), *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) and *Bifidobacterium lactis* (St-Bl) in co-culture with *Streptococcus thermophilus* after 1 day of fermentation and after 7 days (D7) of storage at 4°C. Inulin addition (g/g): 0 (■); 0.01 (■); 0.02 (■); 0.04 (□).

thus confirming the results of Akin *et al.* (2007), who observed that the addition of inulin had no effect on St and Lb counts, while La and Bl counts increased.

Firmness

Yogurt and fermented milk firmness is directly associated with the total solids content (Penna *et al.* 1997; Dave and Shah 1998; Trachoo and Mistry 1998; Tamime 2005), and with the type of protein (Cho *et al.* 1999; Tamime 2005). In our study, total milk solid contents varied from 0.132 to 0.156 g/g, and the amount of protein in the milk was on average, 40.5 mg/g.

After D1, firmness ranged from 0.28 (St-Lb/M) to 0.47 N (St-Lr/SM4), while after D7, it increased on average by ~0.06 N when compared to D1, varying from 0.33 (St-Lb/M) to 0.54 N (St-Lr/SM4). This means that supplementation of milk with inulin increased firmness of all products (Figure 5), as was also reported by Martin *et al.* (1999) and Oliveira *et al.* (2001). According to Damin *et al.* (2006), firmness in commercial brands of yogurts in Brazil ranges from 0.32 to 0.79 N at 5°C. According to Oliveira *et al.* (2001), supplementation of milk (with casein hydrolysate, whey and milk proteins) and culture composition directly affects product firmness.

CONCLUSIONS

Inulin significantly influenced the acidification kinetics of probiotic cultures in milk. Maximum acidification rate increased with inulin content. Milk supplementation with 0.04 g of inulin/g reduced the fermentation time of *S. thermophilus* and *L. rhamnosus* in co-culture. The addition of inulin resulted in greater acidification in all of our co-cultures. Probiotic counts were higher than 7.37 log cfu/mL. The inulin had a stimulating effect on the growth of all probiotics; this effect was more pronounced with *B. lactis* than with the other probiotic cultures. Counts remained almost stable after 7 days of storage at 4°C. Milk supplementation with inulin resulted in a firmer probiotic fermented milk.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPESP (Research Foundation of the State of São Paulo) for research funds and DANISCO and ORAFTI Active Food Ingredients for furnishing the cultures and the inulin, respectively.

REFERENCES

Akalın A S, Fenderya S and Akbulut N (2004) Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology* **39** 613–621.

Akin M B, Akin M S and Kirmaci Z (2007) Effects of inulin and sugar levels on the viability of yoghurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. *Food Chemistry* **104** 93–99.

Almeida K E, Tamime A Y and Oliveira M N (2008) Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT- Food Science and Technology*. doi. 10.1016/j.lwt.2008.03.013.

Anderson J W (1995) Dietary fiber and human health. *The American Society for Horticultural Science* **25** 1488–1495.

Anvisa (2002) *Resolução n°2*, January 7th. Brasilia, Brazil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1995) *Official Methods of Analysis*, 16th edn Washington: AOAC.

Birollo G A, Reinheimer J A and Vinderola G G (2000) Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. *Food Research International* **33** 799–805.

Bruno A, Lankaputhra W E V and Shah N P (2002) Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science* **67** 2740–2744.

Carabin I G and Flamm W G (1999) Evaluation of safety of inulin and oligofrutose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **30** 268–282.

Cho Y H, Lucey J A and Singh H (1999) Rheological properties of acid milk gels as affected by the nature of the fat

© 2009 Society of Dairy Technology

globule surface material and heat treatment of milk. *International Dairy Journal* **9** 537–545.

Damin M R, Almeida K E and Minowa E (2006) Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final da vida de prateleira. *Revista Leite E Derivados* **9** 20–30.

Damin M R, Minowa E, Alcântara M R and Oliveira M N (2008) Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies* **39** 40–55.

Dave R I and Shah N P (1997) Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starters cultures. *International Dairy Journal* **7** 31–41.

Dave R I and Shah N P (1998) Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *Journal of Dairy Science* **81** 2804–2816.

Desai A R, Powell I B and Shah N P (2004) Survival and activity of probiotic Lactobacilli in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science* **69** 57–60.

Donkor O N, Nilmini S L I, Stolic P, Vasiljevic T and Shah N P (2007) Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal* **17** 657–665.

Ferreira C L L (2003) Grupo de bactérias láticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In *Prebióticos E Probióticos: Atualização E Prospecção*, pp 7–33. Ferreira CLL, eds. Viçosa-MG: UFV.

Fucks R H B, Tanamati A A C, Antonioli C M and Doneda I (2006) Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção do iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. *Boletim Ceppa* **24** 83–98.

Gilliland S E (1989) Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *Journal of Dairy Science* **72** 2483–2494.

Goldin B R (1998) Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition* **80** S203–S207.

Goldin B R and Gorbach S L (1984) The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American Journal of Clinical Nutrition* **39** 756–761.

Guven M, Yasar K, Karaca O B and Hayaloglu A A (2005) The effect of inulin as a fat replacer on the quality of set-type yogurt manufacture. *International Journal of Dairy Technology* **58** 180–184.

Holzapfel W H, Haberer P, Snel J, Schillinger U and Huis in't Veld J h J (1998) Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* **41** 85–101.

International Dairy Federation (IDF) (1996) *Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological Examination*, Standard No. 122C. Brussels, Belgium: IDF.

International Dairy Federation (IDF) (1997) *Dairy Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria (LAB)—Standard of Identity*, Standard No. 149A. Brussels, Belgium: IDF.

International Dairy Federation (IDF) (2003) *Yoghurt/ Enumeration of Characteristic Microorganisms—Colony Count Technique at 37°C*. Standard No. 117. Brussels, Belgium: IDF.

Instituto Adolfo Lutz (1985) *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos E Físicos Para Análise de Alimentos*, 3rd edn. **1**. 533. São Paulo, Brazil: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo,

Kailasapathy K and Rybka S (1997) *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology* **52** 28–35.

Kaur N and Gupta A K (2002) Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience* **27** 703–714.

Klaver F A M, Kingman F and Weerkamp A H (1993) Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **47** 151–164.

Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H and Nirazuka T (2005) Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples: performance-tested method[SM]. *Journal of AOAC International* **88** 1702–1713.

Kurmann J A and Rasic J L (1991) The health potential of products containing bifidobacteria. In *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, pp 117–158. Robinson RK, eds. London: Elsevier Applied Science.

Lucas A, Sodini I, Monnet C, Jolivet P and Corrieu G (2004) Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science* **85** 2479–2488.

Makras L, Van Acker G and De Vuyst L (2005) *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 8700: 2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology* **71** 6531–6537.

Martin N C, Skokanova J, Latrille E, Béal C and Corrieu G (1999) Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yoghurts. *Journal of Sensory Studies* **47** 151–164.

Mattila-Sandholm T, Matto J and Saarela M (1992) Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal* **9** 25–35.

Mattila-Sandholm T, Myllärinen P, Crittenden R, Mogensen G, Fondén R and Saarela M (2002) Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* **12** 173–182.

Menne E, Manson J E and Nilsson U (1997) Prebiotic effect of the fructosyl-fructose: a type inulin hydrolysate in humans. In *NDO Symposium, Book of Abstracts, the Netherlands*, pp 164.

Niness K R (1999) Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition* **129** 1402–1406.

Oliveira M N, Sivieri K, Alegro J H A and Saad S M I (2002) Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **38** 1–21.

Oliveira M N, Sodini I, Remeuf F and Corrieu G (2001) Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal* **11** 935–942.

Ouwehand A C, Salvadori B B, Fondén R, Mogensen G, Salminen S and Sellars R (2003) Health effects of probiotics and cultures-containing dairy products in humans. *IDF Bulletin* **380** 4–19.

Ozer D, Akin M S and Ozer B (2005) Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in *acidophilus-bifidus* yoghurt. *Food Science and Technology International* **11** 19–24.

© 2009 Society of Dairy Technology

Vol 62, No 2 May 2009

Penna A L B, Baruffaldi R and Oliveira M N (1997) Optimization of yoghurt production using demineralized whey. *Journal of Food Science* **62** 846–850.

Roberfroid M B (2000) Defining functional foods. In *Functional foods-concept to product*, pp 9–27. Gibson G R and Willians C M eds. Boca Raton, FL: CRC Press.

Roberfroid M and Gibson G (1998) The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* **128** 11–19.

Rybka S and Kailasapathy K (1995) The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yogurts. *Australian Journal of Dairy Technology* **50** 51–57.

Salminen S, Ouwehand A C and Isolauri E (1998) Clinical applications of probiotic bacteria. *International Dairy Journal* **8** 563–572.

Schmidt-Hebbel H (1956) *Quimica Y Tecnologia de Los Alimentos*, pp 313. Santiago, Chile: Editorial Salesiana.

Shah N P (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* **83** 894–907.

Shah N P, Lankaputhra E V, Britz M L and Kyle W S A (1995) Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal* **5** 515–521.

Sodini I, Lucas A, Oliveira M N, Remeuf F and Corrieu G (2002) Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. *Journal of Dairy Science* **85** 2479–2488.

Spinnler H E and Corrieu G (1989) Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. *Journal of Dairy Research* **56** 755–764.

Tamime A Y (2005) Probiotic dairy products. *Dairy Science and Technology*. Consultant Ayr, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Trachoo N and Mistry V V (1998) Application of ultrafiltered sweet buttermilk and sweet buttermilk powder in the manufacture of non fat and low fat yoghurts. *Journal of Dairy Science* **81** 3163–3171.

© 2009 Society of Dairy Technology

International Journal of Food Microbiology 128 (2009) 467–472

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk

Ricardo P.S. Oliveira [a,b], Ana C.R. Florence [a], Roberta C. Silva [a], Patrizia Perego [b], Attilio Converti [b,*], Luiz A. Gioielli [a], Maricê N. Oliveira [a]

[a] Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo, Av. Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil
[b] Department of Chemical and Process Engineering, via Opera Pia 15, 16145 Genova, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 July 2008
Received in revised form 3 October 2008
Accepted 6 October 2008

Keywords:
Probiotic
Prebiotic
Milk
Yogurt
Conjugated linoleic acid

ABSTRACT

The simultaneous effects of different binary co-cultures of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* with *Streptococcus thermophilus* and of different prebiotics on the production of fermented milk were investigated in this paper. In particular, we determined and compared the kinetics of acidification of milk either as such or supplemented with 4% (w/w) maltodextrin, oligofructose and polydextrose, as well as the probiotic survival, chemical composition (pH, lactose, lactic acid and protein contents), fatty acids profile and conjugate linoleic acid (CLA) content of fermented milk after storage at 4 °C for 24 h. Fermented milk quality was strongly influenced both by the co-culture composition and the selected prebiotic. Depending on the co-culture, prebiotic addition to milk influenced to different extent kinetic acidification parameters. All probiotic counts were stimulated by oligofructose and polydextrose, and among these *B. lactis* always exhibited the highest counts in all supplemented milk samples. Polydextrose addition led to the highest post-acidification. Although the contents of the main fatty acids were only barely influenced, the highest amounts of conjugated linoleic acid (38% higher than in the control) were found in milk fermented by *S. thermophilus–L. acidophilus* co-culture and supplemented with maltodextrin.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, consumers are demanding for foods with increasingly properties, such as pleasant flavor, low-calorie value or low fat content, and benefic health effects. Within this context, food industry has been trying to offer products with improved flavor and appearance. In addition, functional dairy products offer requirements, benefits to health that are strengthened by the addition of probiotics as well as by certain types of soluble fibers known as prebiotics. Established amounts for food fibers are at least 3–6% (w/w) in solid foods and 1.5–3% (w/w) in liquid foods (ANVISA, 2002).

Probiotics have been defined in several ways, depending on our understanding of their effects on the health and well-being of humans. These microorganisms are live microbial feed supplements that improve the intestinal microbial population of the host. In recent years, there has been a growing interest in using probiotic microorganisms as dietary adjuncts in the dairy industry. Products have been developed and are on the market worldwide (Anal and Singh, 2007). To produce the desired benefits, probiotic bacteria should be present in the product in viable counts during their whole shelf-life. Kurmann and Rasic (1991) recommended that the minimum dose able to assure therapeutic effect should range between 8 and 9 log CFU/mL. Although this level is not well established, it should vary according to species and strains used. Other researchers suggested counts in the range 7–8 log CFU/mL (Dave and Shah, 1997), which can be reached applying daily doses of 100 mL of dairy products containing 7 log CFU/mL of probiotic bacteria (Oliveira et al., 2002).

Prebiotics are non-digestible food components that beneficially act on the host, because they selectively stimulate either the proliferation or the activity of bacterial populations that are desirable in the colon (Mattila-Sandholm et al., 2002).

The most important prebiotics are inulin and oligofructoses, which are soluble and fermentable fibers (Gibson et al., 2004). They are named fructans and cannot be digested by α-amylase or other hydrolases in the upper section of the intestinal tract (Carabin and Flamm, 1999). Inulin and other fructo-oligosaccharides are frequently employed in studies as they resist digestion by gastric acid and pancreatic enzymes *in vivo* (Cummings et al., 2001). Oligosaccharides in general may serve as prebiotic agents and also suppress potentially deleterious bacteria among the gastrointestinal microbiota (Kajiwara et al., 2002). In most instances, the increase in the number of beneficial *Bifidobacterium* spp. in the intestinal microbiota has been

* Corresponding author. Tel.: +39 0 10 3532586.
E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

0168-1605/$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.012

the main focus of prebiotic addition (Akalın et al., 2004; Gibson et al., 2004), although also lactobacilli would deserve attention due to their well-known health-promoting effects. Inulin is mostly applied to obtain products with low fat-content, while oligofructoses are employed in low-calorie fruit preparations, such as yoghurts, as well as to balance the sweetness and mask the high-intensity sweetener's residual flavor used in food preparations (Niness, 1999).

Polydextrose is a low molecular weight randomly-bonded polysaccharide of glucose with calorie content of 1 kcal/g (Achour et al., 1994). All possible glycosidic bonds with the anomeric carbon of glucose are present: α and β 1–2, 1–3, 1–4 and 1–6, among which the 1–6 bonds predominate. It has an average degree of polymerization (DP) of 12 and an average molecular weight of 2000 g/mol (Flood et al., 2004). The low calorie content of polydextrose is a result of its poor digestibility in the small intestine and incomplete fermentation in the large intestine. This property has led to acceptance of polydextrose as a dietary fiber in many countries (Craig et al., 1999).

Maltodextrins have well defined physical properties, and, unlike natural starches, are soluble in water, which popularized their use as additive in the food industry. They are applied, for example, as spray-drying aids for flavors and seasonings, carriers for synthetic sweeteners, flavors enhancers, fat replacers, and bulking agents. In addition, maltodextrins were also used as food model since they present a wide distribution of molecular mass between oligosaccharides and polysaccharides (Jaya and Das, 2004).

A symbiotic has been defined as a mixture of probiotics and prebiotics that has beneficial effect on the host by improving the survival and implantation of live microbial dietary supplements in the gastrointestinal tract, by selectively stimulating the growth and/or activating the metabolism of one or a limited number of health-promoting bacteria (Gibson and Roberfroid, 1995).

Conjugated linoleic acid (CLA), a mixture of positional and geometric isomers of octadecadienoic acids (C18:2) with conjugated double bonds, has gained considerable attention because of its potentially beneficial biological effects. Studies with animal models have demonstrated that CLA consumption inhibits the initiation of carcinogenesis (Devery et al., 2001), reduces body fat content and increases muscle mass (Chin et al., 1992), decreases atherosclerosis (Nicolosi et al., 1997), improves hyperinsulinemia (Houseknecht et al., 1998), enhances the immune system (Miller et al., 1994) and alters the low-density lipoprotein/high-density lipoprotein cholesterol ratio (Lee et al., 1994). There are many studies on CLA production by lactic cultures (Kim and Liu, 2002; Sieber et al., 2004), but only few efforts have been made on the effects of prebiotics addiction on the CLA content of dairy foods (Akalin et al., 2007).

On the basis of this background, oligofructoses, polydextrose and maltodextrin appear as important food ingredient that should be additionally explored for the production of functional foods. However, a number of microbiological questions have to be solved to get advance in the field. By comparison of the behaviors of different probiotics (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*) in binary co-culture with *Streptococcus thermophilus*, the present work aims at contributing to the knowledge of the: a) synergistic effects between these probiotics; b) prebiotic effect of maltodextrin, polydextrose and oligofructose on probiotics; c) characteristics of symbiotic fermented milk; d) kinetics of acidification of milk supplemented with 4% (w/w) of prebiotics; e) probiotic survival and chemical composition of the product (pH, lactose, lactic acid and protein contents), f) fatty acids profile and CLA contents of fermented milk after storage at 4 °C for 24 h.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of cultures

Five commercial starter freeze-dried cultures (Danisco, Sassenage, France) were used in this study, specifically the yoghurt microorganisms *S. thermophilus* TA040 (St) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 from here onwards called *L. bulgaricus* (Lb); and the probiotics *L. acidophilus* LAC4 (La), *L. rhamnosus* LBA (Lr), and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL04 from here onwards called *B. lactis* (Bl). Table 1 lists the main characteristics of the selected strains.

Pure spray-dried strains were weighted in sufficient amounts to get initial counts of 10^6 CFU/mL. Pre-cultures were prepared by dissolving individually each culture in 50 mL of sterilized skim milk (121 °C for 15 min), and activating them at 42 °C for 15 min before use.

2.2. Milk preparation

Commercial skim milk powder (Molico, Nestlé, Brazil) was diluted in distilled water to obtain 13% (w/w) total solids and supplemented with 4% (w/w) of maltodextrin (Fibersol®, Matsutani Chemical

Table 1
Characteristics of selected strains employed on the production of nonfat symbiotic fermented milk (Lammers et al., 2003; Foligne et al., 2007; Burns et al., 2008)

Characteristics	*Lactobacillus acidophilus* LAC4	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340	*Lactobacillus rhamnosus* LBA	*Bifidobacterium lactis* BL04	*Streptococcus thermophilus* TA040
Lactose fermentation	+	+	–	+	+
Lactic acid isomers	DL	D	L	L	L
Growth 15–45 (°C)	–/+	–/+	+/+	–/+	–/+
Bile salt tolerance	****	–	***	****	****
Acid tolerance	****	–	****	****	*
Pepsin resistance	***	–	***	–	–
Pancreatin resistance	***	–	***	–	–
Exopolysaccharides production	–	–	–	–	*
Adhesion to intestinal mucosa	HT-29: **** Caco-2: ***	HT-29: * Caco-2: *	HT-29: **** Caco-2: ****	HT-29: *** Caco-2: ***	HT-29: *** Caco-2: ****
Health effects	Inhibits common pathogens; improve specific immune response (human clinical study); influences the induction of IL-2 and moderates induction of tumor necrosis factors (*in vitro*).	Colonizes and adheres to the colon and reinforces the barrier function of the intestinal mucosa, helping in the management of intestinal infection and food allergies.	Increases the induction of IL-10 (*in vitro*); anti-inflammatory properties as protection against TNBS-induced colitis (animal model).	Maintains and restores microbiota after antibiotic treatment; improves specific immune response (human clinical study); induces IL-10 (*in vitro*); protects against inflammation (animal model).	Increases induction of IL-10 (*in vitro*).

****Excellent.
***Very good.
*Fair.

Industry, Hyogo, Japan), or oligofructose (Beneo™, Clariant, São Paulo, Brazil) or polydextrose (Litesse®, Danisco, São Paulo, Brazil). Non-supplemented milk was always used as a control. Milk was submitted to thermal treatment in water until reaching 85 °C, then was kept at this temperature for 15 min, and finally cooled in an ice bath to 10 °C.

2.3. Fermentations

After inoculations, milks were incubated for fermentation at 42 °C in a thermostatically controlled water bath until pH 4.5 was reached. Each fermentation was performed in quadruplicate and monitored by using the Cinac (*Cinétique d'acidification*) system (Ysebaert, Frépillon, France). After achievement of pH 4.5, the fermentations were manually interrupted agitating the clot by means of a stainless steel perforated disk-rod that was moved upwards and downwards for 80 s. The fermented product was put into 50 mL polypropylene cups, thermally sealed using a Selopar equipment (BrasHolanda, Pinhais, Brazil), quickly cooled in ice bath and stored at 4 °C.

2.4. Kinetic parameters

The acidification rate (V_{max}) was calculated as the time variation of pH (dpH/dt) and expressed as pH units/min. At the end of the incubation, the following kinetic parameters were also calculated: (i) t_{max} (h), time at which V_{max} was reached; (ii) $t_{pH5.0}$ (h), time to reach pH 5.0; and (iii) t_f (h), time to complete the fermentation.

2.5. Chemical composition

Fermented milk post-acidification was determined after 1 day of storage at 4 °C by pH measurement using a pH meter model Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brazil). Acidity, expressed as mg of lactic acid per g, was evaluated by titration using a 0.11 N NaOH solution according to the methodology n. 907.124 of the AOAC (1995).

Protein and total solids contents of the fermented milk were determined by an ultrasonic Ekomilk analyzer (Eon Trading, Bulgaria). Lactose was determined by titration using the Fehling solution. All the analyses of milk composition were performed in duplicate.

2.6. Counts of viable bacteria

The cell counts of starter cultures and probiotics were made in triplicate after fermentation. Samples (1.0 mL) were added to 9.0 mL of 0.1% sterile peptonated water; then, appropriate dilutions were made. Subsequently, St and Lb were plated into M17 Agar and MRS Agar (Oxoid, Basingstoke, UK), previously acidified to pH 5.4 with acetic acid, respectively, and incubated at 37 °C for 48 h (Dave and Shah, 1996). La, Lr and Bl were enumerated in MRS plus 10 μL/mL clindamycin (pH 6.2), RCA plus 1 μL/mL dicloxacillin (pH 7.1) and MRS plus 0.5 μL/mL vancomycin (pH 6.2), respectively, after anaerobic incubation at 37 °C for 72 h.

M17 and MRS media (pH 5.4) were prepared according to Dave and Shah (1996), and the MRS plus clindamycin and MRS plus vancomycin ones by Lankaputhra and Shah (1996) and Tharmaraj and Shah (2003), respectively.

Anaerobic conditions were ensured by the use of AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, UK). Colony forming units (CFU) were enumerated in plates containing 30 to 300 colonies, and cell concentration was expressed as log CFU/mL of fermented milk. The selectivity of culture media was confirmed by microscopic examination of cells in the colonies.

2.7. Lipid extraction and conjugated linoleic acid analysis

Lipids were extracted according to the method 14156 ISO (2001). The fatty acids methyl esters (FAMEs), among which those of conjugated linoleic acid (CLA), were prepared from the extracted lipids of yoghurt by esterification according to the method n. 15884 ISO (2002).

Analyses of FAMEs were carried out in a gas chromatograph, model 3400CX (Varian, São Paulo, Brazil), equipped with a split-injection port, a flame-ionization detector and a software package for system control and data acquisition (model Star Chromatography Workstation version 5.5). Injections were performed in a 30-m long fused silica capillary column with 0.25 mm internal diameter, coated with 0.25 μm of Chrompack CP-Wax 52CB (ChromTech, Apple Valley, MN, USA), using helium as carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min and a split ratio of 1:50. The injector temperature was set at 250 °C and the detector at 280 °C. The oven temperature was initially set at 75 °C for 3 min, then programmed to increase to 150 °C at a rate of 37.5 °C/min and then to 215 °C at 3 °C/min. Samples (1 μL) were injected manually after a dwell-time of ca. 2 s. Qualitative fatty acid composition of the samples was determined by comparing the retention times of the peaks produced after injecting the methylated samples with those of the respective standards of fatty acids. The quantitative composition was obtained by area normalization and expressed as mass percentage, according to the Official Method Ce 1-62 (AOCS, 1997). All samples were analyzed in duplicate, and the results reported as mean values.

2.8. Statistical analysis

Results were submitted to analyses of variance (ANOVA) using the Statistica Software 6.0. Mean values were compared using the Tukey test (Sokal and Rohlf, 1979) at $\alpha<0.05$, and different letters were used to label values with statically significant differences among them.

3. Results and discussion

3.1. Fermentation kinetics

The kinetic results of fermentations performed with the selected co-cultures supplemented with three different prebiotics, specifically maltodextrin, oligofructose and polydextrose, are compared in Table 2

Table 2
Acidification kinetic parameters of fermentations of skim milk supplemented with 4% (w/w) maltodextrin, oligofructose or polydextrose, by *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus* (St–Lb), *L. acidophilus* (St–La), *L. rhamnosus* (St–Lr) or *B. lactis* (St–Bl)

Prebiotic	Co-culture	V_{max} (10^{-3} pH units/min)^{A}	t_{max} (h)^{B}	$t_{pH5.0}$ (h)^{C}	t_f (h)^{D}
Control^{E}	St–La	16.11 ± 0.15^{b}	3.25 ± 0.03^{fgh}	4.65 ± 0.11^{f}	9.92 ± 0.21^{h}
Control	St–Lb	17.87 ± 0.01^{d}	3.03 ± 0.05^{bc}	3.68 ± 0.07^{abc}	5.47 ± 0.14^{b}
Control	St–Lr	16.51 ± 0.01^{c}	3.18 ± 0.07^{def}	4.60 ± 0.24^{f}	10.59 ± 0.30^{i}
Control	St–Bl	15.49 ± 0.24^{a}	3.24 ± 0.09^{efgh}	4.73 ± 0.19^{f}	10.02 ± 0.21^{h}
Maltodextrin	St–La	18.27 ± 0.01^{e}	3.36 ± 0.00^{h}	4.03 ± 0.01^{de}	7.61 ± 0.01^{f}
Maltodextrin	St–Lb	15.84 ± 0.01^{b}	2.63 ± 0.01^{a}	3.74 ± 0.05^{bcd}	5.11 ± 0.01^{b}
Maltodextrin	St–Lr	18.20 ± 0.01^{e}	3.30 ± 0.01^{fgh}	4.26 ± 0.01^{e}	8.81 ± 0.01^{g}
Maltodextrin	St–Bl	18.63 ± 0.01^{f}	3.32 ± 0.01^{gh}	4.26 ± 0.04^{e}	9.16 ± 0.00^{g}
Oligofructose	St–La	24.09 ± 0.01^{i}	3.01 ± 0.01^{bc}	3.83 ± 0.01^{cd}	7.06 ± 0.00^{de}
Oligofructose	St–Lb	23.18 ± 0.01^{k}	2.91 ± 0.01^{b}	3.41 ± 0.01^{ab}	4.61 ± 0.01^{a}
Oligofructose	St–Lr	23.30 ± 0.01^{k}	3.01 ± 0.01^{bc}	3.76 ± 0.00^{cd}	6.91 ± 0.01^{cde}
Oligofructose	St–Bl	21.08 ± 0.01^{j}	3.06 ± 0.00^{cd}	3.81 ± 0.01^{cd}	6.73 ± 0.01^{cde}
Polydextrose	St–La	19.21 ± 0.01^{g}	3.24 ± 0.00^{fgh}	3.81 ± 0.01^{cd}	6.53 ± 0.01^{c}
Polydextrose	St–Lb	20.55 ± 0.01^{i}	3.06 ± 0.00^{cd}	3.36 ± 0.00^{a}	4.61 ± 0.01^{a}
Polydextrose	St–Lr	19.93 ± 0.01^{h}	3.21 ± 0.01^{efg}	3.86 ± 0.00^{cd}	7.16 ± 0.00^{ef}
Polydextrose	St–Bl	19.31 ± 0.01^{g}	3.11 ± 0.01^{cde}	3.73 ± 0.01^{bcd}	6.71 ± 0.01^{cd}

Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($\alpha<0.05$).
± Standard deviations with respect to the mean values of quadruplicate runs.
[A] Maximum rate of acidification.
[B] Time to reach V_{max}.
[C] Time to reach pH 5.0.
[D] Time to complete the fermentation (pH 4.5).
[E] Not supplemented skim milk was used for control tests.

with those of the control runs without any prebiotic. It should be noticed that, for each prebiotic as well as for the control, 87 and 75% of the variations from one co-culture to the others were statistically significant for V_{max} and t_f, respectively, but only 42% for both t_{max} and $t_{pH5.0}$. Because of such a lack of significance of the variations in the last two parameters, average values of them, obtained gathering all the co-cultures, were used for comparison.

As far as the runs performed in the absence of prebiotics (controls) are concerned, the V_{max} values observed in this study with all the binary co-cultures are practically coincident with those obtained by Almeida et al. (in press) with St–La at pH 4.5 (16.3×10^{-3} pH units/min) and little higher than those obtained with St–Lr at pH 5.5 (12.3×10^{-3} pH units/min) when 12% (w/w) milk whey was used. The fermentation time of the binary St–Lr co-culture (t_f= 10.59 h) was about 1 h shorter than that reported by those authors in milk whey, which can be justified by the variations in the LAB acidification activity related to their specific aptitude to assimilate the nutritive compounds of the medium (Badis et al., 2004).

The two prebiotics whose supplementation most accelerated the acidification were oligofructose and to some extent also polydextrose, showing V_{max} increases by 39 and 20%, respectively, while only the former prebiotic ensured a significant decrease in t_{max} (5.5%). Meanwhile, these two prebiotics were able to almost equally accelerate the fermentations and the achievement of pH 5.0, both showing reductions of t_f by about 30% and of $t_{pH5.0}$ by about 16%, compared to the control. On the other hand, maltodextrin showed the lowest variations, hence behaving as the worst prebiotic in this respect.

Another interesting comparison can be done using the opposite reasoning, i.e., gathering the variations induced by all the prebiotics, so as to put into evidence possible significant influence of the different co-cultures on the kinetic parameters. On this basis, St–Bl was the slowest co-culture in terms of acidification power and St–Lb the quickest one in terms of fermentation. The former did in fact show a V_{max} value about 4.5% less than the others taken as an average, and the latter t_{max}, t_f and $t_{pH5.0}$ values 8.7, 39 and 14% lower the others.

Oliveira et al. (in press) have recently reported a similar accelerating effect of inulin, which reduced by about 10% the fermentation time of different binary co-cultures taken as an average, thus confirming its prebiotic effect already evidenced by other authors for both bifidobacteria (Akalın et al., 2004; Donkor et al., 2007) and lactobacilli (Donkor et al., 2007).

These results as a whole not only confirm that St–Lb is the best co-culture for yoghurt preparation, but also that the alternative probiotics employed in this study (La, Lr, and Bl) would be able to ensure satisfactory results in terms of acidification and fermentation time. This result is of particular significance for Lr, which is a poorly-investigated alternative probiotic in fermented skim milk preparations (Tannock et al., 2000; Tharmaraj and Shah, 2003; Capela et al., 2006). Moreover, oligofructose and to some extent also polydextrose were shown to significantly accelerate either the acidification or the fermentation, thus proving interesting prebiotics to improve the production of yoghurts. These results appear to confirm the prebiotic effect of polydextrose highlighted by Jie et al. (2000) and Probert et al. (2004), whereas they disagree with the observations of Ghoddusi et al. (2007), who claimed that polydextrose seemed to show hardly any selectivity towards bifidobacteria and lactobacilli/enterococci when used alone or mixed with other carbohydrates.

3.2. Milk post-acidification

Table 3 lists the results of post-acidification, lactic acidity and residual levels of lactose and proteins after 1 day-storage at 4 °C since the end of fermentation by the selected co-cultures. Analyzing their variations from the statistical point of view, it is noteworthy that only the values of final pH were statistically significant by almost 80% of the experiments, whereas none of those related to lactose, lactic acid and protein were so. Comparing the average values of pH and lactic acid concentration according to the same criteria as for the parameters of Table 2, it can be observed that the highest lactic acid levels were associated to the lowest final pH and *vice versa*, thus suggesting that these parameters are strongly related to each other. Oligofructose and mainly polydextrose led to lower post-acidification and lactic acid release with respect to maltodextrin, whose effects, on the contrary, were almost negligible when compared with the control. Such result suggests that the addition of both these prebiotics to the milk could improve its stability during cold storage, decelerating the post-acidification. Extending the comparison to the different co-cultures, it can be seen that although the variations were quite low, La induced the highest post-acidification and lactic acid release, whereas the opposite took place with Bl, the other two microorganisms showing an intermediate behavior. This finding once more confirms that, besides the well-known La and Lb species, also Lr and Bl could be successfully used in co-culture with *S. thermophilus* as alternative probiotics for industrial probiotic fermented milk preparation.

Table 3
Results in terms of post-acidification (pH), lactic acidity and residual lactose and protein contents after 24 h since the end of fermentations of skim milk, supplemented with 4% (w/w) maltodextrin, oligofructose or polydextrose, by *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus* (St–Lb), *L. acidophilus* (St–La), *L. rhamnosus* (St–Lr) or *B. lactis* (St–Bl)

Prebiotic	Co-culture	pH	Lactic acid (mg/g)	Lactose (mg/g)	Protein (mg/g)
Control	St–La	4.33 ± 0.02^{ab}	9.2 ± 0.3^{ab}	38.2 ± 0.1^{abc}	37.1 ± 0.3^{ab}
Control	St–Lb	4.32 ± 0.01^{ab}	9.7 ± 0.2^{defgh}	38.0 ± 0.2^{abc}	36.7 ± 0.5^{a}
Control	St–Lr	4.34 ± 0.01^{bc}	9.9 ± 0.4^{gh}	38.7 ± 0.5^{abcd}	37.0 ± 0.4^{ab}
Control	St–Bl	4.37 ± 0.01^{d}	9.8 ± 0.1^{fgh}	39.7 ± 0.1^{bcde}	37.8 ± 0.4^{abc}
Maltodextrin	St–La	4.31 ± 0.01^{a}	9.9 ± 0.2^{gh}	38.2 ± 0.1^{abc}	38.8 ± 0.4^{abcde}
Maltodextrin	St–Lb	4.40 ± 0.02^{e}	9.5 ± 0.3^{abcdef}	36.8 ± 0.2^{a}	41.6 ± 0.1^{fg}
Maltodextrin	St–Lr	4.36 ± 0.03^{cd}	9.6 ± 0.1^{cdefg}	37.6 ± 0.4^{ab}	43.4 ± 0.1^{g}
Maltodextrin	St–Bl	4.37 ± 0.01^{d}	9.5 ± 0.4^{bcdef}	38.2 ± 0.5^{abc}	40.5 ± 0.5^{def}
Oligofructose	St–La	4.31 ± 0.02^{a}	9.8 ± 0.2^{efgh}	41.6 ± 0.1^{ef}	39.5 ± 0.5^{bcdef}
Oligofructose	St–Lb	4.37 ± 0.04^{d}	9.4 ± 0.2^{abcde}	39.7 ± 0.1^{bcdef}	36.5 ± 0.1^{a}
Oligofructose	St–Lr	4.42 ± 0.01^{e}	9.3 ± 0.1^{abc}	41.8 ± 0.4^{ef}	36.8 ± 0.1^{a}
Oligofructose	St–Bl	4.45 ± 0.01^{f}	9.1 ± 0.2^{a}	41.8 ± 0.1^{ef}	40.9 ± 0.1^{efg}
Polydextrose	St–La	4.32 ± 0.03^{ab}	10.0 ± 0.2^{h}	41.0 ± 0.4^{def}	38.0 ± 0.7^{abcd}
Polydextrose	St–Lb	4.46 ± 0.03^{f}	9.4 ± 0.1^{abcd}	42.3 ± 0.6^{f}	40.3 ± 0.2^{cdef}
Polydextrose	St–Lr	4.46 ± 0.01^{f}	9.3 ± 0.4^{abcd}	42.1 ± 0.1^{ef}	37.4 ± 0.4^{ab}
Polydextrose	St–Bl	4.49 ± 0.01^{g}	9.2 ± 0.1^{ab}	40.2 ± 0.6^{cdef}	40.6 ± 0.4^{ef}

Not supplemented skim milk was used for control tests.
Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($\alpha<0.05$).
± Standard deviations with respect to the mean values of quadruplicate runs.

As expected, the microorganisms (Lr and Bl) as well as the prebiotics (oligofructose and polydextrose) that, taken as a whole, led to the less amounts of lactic acid were those that exhibited the highest residual lactose levels (3.68–4.23% of the initial content). The protein content of the milk decreased by 3.65–4.34% compared with the starting raw material, due to its uptake as a nitrogen source by the microorganisms. However, notwithstanding some significance of its variations (37%), no interesting information arises from its consumption.

3.3. Bacterial counts

Figs. 1 and 2 show the counts after 1 day-storage at 4 °C since the end of fermentations by binary mixtures of *S. thermophilus* and the selected probiotics, respectively, both the presence and in the absence of the different prebiotics. In particular, St counts (Fig. 1) were not significantly influenced by the type of prebiotic or probiotic used, varying between 8.7 and 9.2 log CFU/mL and being al least one order of magnitude higher than those of the others. On the other hand, significant differences were observed for counts of the other microorganisms, which were strongly influenced also by the nature

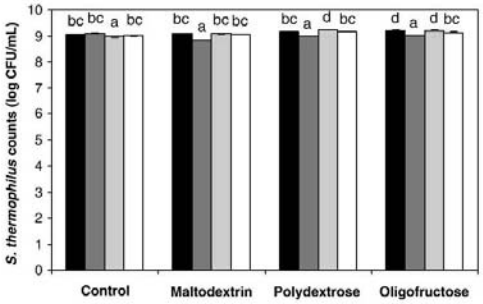


Fig. 1. Cell counts of *S. thermophilus* in skim milk fermented by its binary co-cultures with different probiotics, namely *L. acidophilus* (St–La, ■), *L. bulgaricus* (St–Lb, ■), *L. rhamnosus* (St–Lr, ■) and *B. lactis* (St–Bl, □), either in the presence of different prebiotics (maltodextrin, polydextrose and oligofructose) or not (control). Different letters mean statistically significant difference according to the test of Tukey ($\alpha<0.05$).

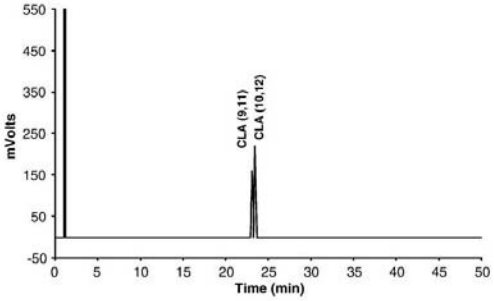


Fig. 3. Typical gas-chromatogram for the conjugated linoleic acid isomer standards.

of the prebiotic (Fig. 2). As expected by the above considerations, on average, polydextrose and oligofructose behaved as the best prebiotics, ensuring the highest counts (7.89 and 7.97 log CFU/mL, respectively), whereas the count in the presence of maltodextrin (7.45 log CFU/mL) was only a little higher than in the control (7.31 log CFU/mL). Such an effect of oligofructose is consistent with the observations of several authors, who observed a clear beneficial action of this prebiotic on the viability of *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt and other food products (Capela et al., 2006).

Finally, Bl was the probiotic whose growth was the most stimulated by the presence of the above prebiotics; it did in fact show average count (8.06 log CFU/mL) even higher than Lb (7.63 log CFU/mL), i.e. the microorganism responsible for the well-known metabolic synergism with St. On the other hand, Lr exhibited in co-culture with St, satisfactory counts only in the presence of oligofructose and polydextrose (7.65 log CFU/mL on average).

3.4. Fatty acids profile and CLA content

Fig. 3 shows that the retention time observed in the gas-chromatogram of fatty acid methyl esters in the culture medium was 23.10 min. Since the area of the peak of t10, c12-CLA, appearing after 23.47 min, was very small, it was not considered to be significant.

Whereas, no significant difference was found in the concentration of c9t11-CLA isomer between the control milks fermented by the different co-cultures, the effects of addition of 4% (w/w) of the different prebiotics in the skim milk on c9t11-CLA level at the end of fermentation appeared to depend on the co-culture (Fig. 4). Although the addition of all of them appreciably increased the level of c9t11-CLA, the strongest effect was observed with maltodextrin. This prebiotic did in fact induce a rise in the concentration of this compound by 21% using St–Lb and no less than 38% using St–La with respect to the control. On the other hand, supplementation of oligofructose and polydextrose led to higher increase in the c9t11-CLA level using St–Lr (24%) and St–Bl (30%), respectively.

To explain the observed variations in CLA levels, it should be taken into account that the different enzyme activities of starter cultures have been identified as factors that may contribute to influence the CLA content of cultured dairy products (Sieber et al., 2004). In particular, Lin et al. (2003) demonstrated that a higher level of linoleic acid isomerase in *L. acidophilus* crude extract increased the CLA content of fermented milks. The production of CLA by the St–Bl co-culture is in agreement with the release of this acid previously observed with Bifidobacteria by other authors (Coakley et al., 2003; Oh et al., 2003). In conclusion, the results of this part of work suggest that CLA levels in fermented milk could be enhanced by addition of probiotic bacteria with high CLA-producing potential in combination of suited prebiotics during processing of fermented milk.

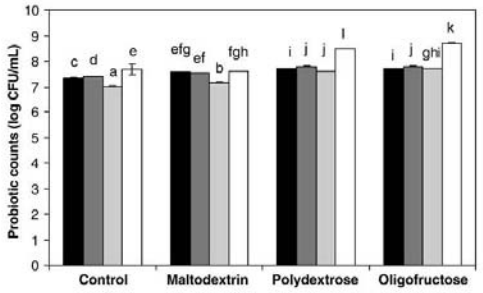


Fig. 2. Cell counts of probiotic microorganisms in skim milk fermented by binary co-cultures of *S. thermophilus* with *L. acidophilus* (St–La, ■), *L. bulgaricus* (St–Lb, ■), *L. rhamnosus* (St–Lr, ■) and *B. lactis* (St–Bl, □), either in the presence of different prebiotics (maltodextrin, polydextrose and oligofructose) or not (control). Different letters mean statistically significant difference according to the test of Tukey ($\alpha<0.05$).

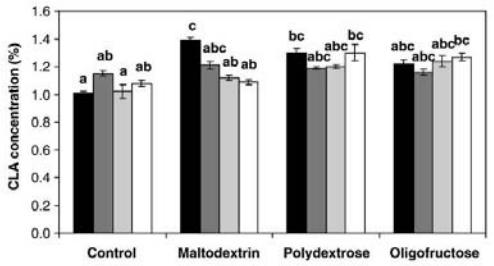


Fig. 4. Mean conjugated linoleic acid concentrations (% w/w) in skim milk fermented by binary co-cultures of *S. thermophilus* with *L. acidophilus* (St–La, ■), *L. bulgaricus* (St–Lb, ■), *L. rhamnosus* (St–Lr, ■) and *B. lactis* (St–Bl, □), either in the presence of different prebiotics or not (control). Different letters mean statistically significant difference according to the test of Tukey ($\alpha<0.05$).

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, for the PhD fellowships of R.P.S. Oliveira.

References

Achour, L., Flourie, B., Briet, F., Pellier, P., Marteau, P., Rambaud, J.C., 1994. Gastrointestinal effects and energy value of polydextrose in healthy nonobese men. American Journal of Clinical Nutrition 59, 1362–1368.
Akalin, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International Journal of Food Science and Technology 39, 613–621.
Akalin, A.S., Tokusoglu, O., Gonc, S., Aycan, S., 2007. Occurrence of conjugated linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. International Dairy Journal 17, 1089–1095.
Almeida, K.E., Tamime, A.Y., Oliveira, M.N., in press. Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. LWT — Food Science and Technology (11 April 2008, Electronic publication ahead of print). doi:10.1016/j.lwt.2008.03.013.
Anal, A.K., Singh, H., 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science and Technology 18, 240–251.
ANVISA, 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, Resolução RDC n° 2, January 7, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasilia, Brazil. Retrieved August 22, 2007, from http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1567.
AOAC, 1995. Official Methods of Analysis, 13.edn., vol. 2. Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, VA, USA.
AOCS, 1997. Official method Ce 1-62: fatty acid composition by gas chromatography. Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA.
Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology 21, 579–588.
Burns, P., Vinderola, G., Binetti, A., Quiberoni, A., Reyes-Gavilán, C.G., Reinheimer, J.A., 2008. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. International Dairy Journal 18, 377–385.
Capela, P., Hay, T.K.C., Shah, N.P., 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International 39, 203–211.
Carabin, I.G., Flamm, W.G., 1999. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. Regulatory Toxicology and Pharmacology 30, 268–282.
Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., Pariza, M.W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. Journal of Food Composition and Analysis 5, 185–197.
Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R., Stanton, C., 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. Journal of Applied Microbiology 94, 138–145.
Craig, S.A.S., Holden, J.F., Troup, J.P., Auerbach, M.H., Frier, H.I., 1999. Polydextrose as soluble fiber and complex carbohydrate. In: Cho, S.S., Prosky, L., Dreher, M. (Eds.), Complex Carbohydrate in Foods. Marcel Dekker, New York. chap. 18.
Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., Englyst, H.N., 2001. Prebiotic digestion and fermentation. American Journal of Clinical Nutrition 73, 415S–420S.
Dave, R.I., Shah, N.P., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. Journal of Dairy Science 79, 1529–1536.
Dave, R.I., Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starters cultures. International Dairy Journal 7, 31–41.
Devery, R., Miller, A., Stanton, C., 2001. Conjugated linoleic acid and oxidative behaviour in cancer cells. Biochemical Society Transactions 29 (Part 2), 341–344.
Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal 17, 657–665.
Flood, M.T., Auerbach, M.H., Craig, S.A.S., 2004. A review of the clinical toleration studies of polydextrose in food. Food and Chemical Toxicology 42, 1531–1542.
Foligne, B., Nutten, S., Grangette, C., Dennin, V., Goudercourt, D., Poiret, S., Dewulf, J., Brassart, D., Mercenier, A., Pot, B., 2007. Correlation between *in vitro* and *in vivo* immunomodulatory properties of lactic acid bacteria. World Journal of Gastroenterology 13, 236–243.
Ghoddusi, H.B., Grandison, M.A., Grandison, A.S., Tuohy, K.M., 2007. *In vitro* study on gas generation and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures. Ecology/Environmental Microbiology 13, 193–199.
Gibson, G.R., Roberfroid, M.B., 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiotica: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition 125, 1401–1412.
Gibson, G.R., Probert, H.M., Van Loo, J., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Review 17, 259–275.
Houseknecht, K.L., Vanden Heuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P., Peck, L.W., Nickel, K.P., Belury, M.A., 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. Biochemical and Biophysical Research Communications 244, 678–682.
ISO, 2001. Standard 14156. Milk and milk products. Extraction Methods for Lipids and Liposoluble Compounds. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
ISO, 2002. Standard 15884. Milk fat. Preparation of fatty acid methyl esters. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
Jaya, S., Das, H., 2004. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. Journal of Food Engineering 63, 125–134.
Jie, Z., Bang-Yao, L., Ming-Jie, X., Hai-Wei, L., Zu-Kang, Z., Ting-Song, W., 2000. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. American Journal of Clinical Nutrition 72, 1503–1509.
Kajiwara, S., Gandhi, H., Ustunol, Z., 2002. Effect of honey on the growth of and acid production by human intestinal *Bifidobacterium* spp.: an *in vitro* comparison with commercial oligosaccharides and inulin. Journal of Food Protection 65, 214–218.
Kim, Y.J., Liu, R.H., 2002. Increase of conjugated linoleic acid content in milk by fermentation with lactic acid bacteria. Journal of Food Science 67, 1731–1737.
Kurmann, J.A., Rasic, J.L., 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson, R.K. (Ed.), Therapeutic Properties of Fermented Milks. Elsevier Applied Science, London, pp. 117–158.
Lammers, K.M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizello, F., Caramelli, E., Matteuzzi, D., Campieri, M., 2003. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. FEMS Immunology and Medical Microbiology 38, 165–172.
Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., 1996. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Milchwissenschaft 51, 446–451.
Lee, K.N., Kritchevsky, D., Pariza, M.W., 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. Atherosclerosis 108, 19–25.
Lin, T.Y., Lin, C.-W., Wang, Y.-J., 2003. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. Food Chemistry 83, 27–31.
Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal 12, 173–182.
Miller, C.C., Park, Y., Pariza, M.W., Cook, M.E., 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. Biochemical and Biophysical Research Communications 198, 1107–1112.
Nicolosi, R.J., Rogers, E.J., Kritchevsky, D., Scimeca, J.A., Huth, P.J., 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. Artery 22, 266–277.
Niness, K.R., 1999. Inulin and oligofructose: what are they? Journal of Nutrition 129 (suppl. 7), 1402–1406.
Oh, D.K., Hong, G.H., Lee, Y., Min, S., Sin, H.S., Cho, S.K., 2003. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 907–912.
Oliveira, M.N., Sivieri, K., Alegro, J.H.A., Saad, S.M.I., 2002. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 38 (1), 1–21.
Oliveira, R.P.S., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M.N., in press. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the effect of inulin. LWT — Food Science and Technology.
Probert, H.M., Apajalahti, J.H.A., Rautonen, N., Stowell, J., Gibson, G.R., 2004. Polydextrose, lactotol & fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in three-stage continuous culture system. Applied Environment Microbiology 70, 4505–4511.
Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P., Eyer, H., 2004. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products — a review. International Dairy Journal 14, 1–15.
Sokal, R.R., Rohlf, F.J.U., 1979. Biometría: principios y métodos estadísticos de la investigación biológica. Editorial H. Blume, Madrid, Spain.
Tannock, G.W., Munro, K., Harmsen, H.J.M., Welling, G.W., Smart, J., Gopal, P.K., 2000. Analysis of the faecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR 20. Applied and Environmental Microbiology 66, 2578–2588.
Tharmaraj, N., Shah, N.P., 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionibacteria. Journal of Dairy Science 86, 2288–2296.

Journal of Food Engineering 91 (2009) 133–139

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfoodeng

Effect of inulin on growth and acidification performance of different probiotic bacteria in co-cultures and mixed culture with *Streptococcus thermophilus*

Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira [a], Patrizia Perego [b], Attilio Converti [b], Maricê Nogueira De Oliveira [a,*]

[a] Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900, São Paulo, Brazil
[b] Department of Chemical and Process Engineering, Genoa University, Via Opera Pia 15, I-16145 Genova, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 24 June 2008
Received in revised form 4 August 2008
Accepted 9 August 2008
Available online 22 August 2008

Keywords:
Probiotic
Prebiotic
Milk
Yoghurt
Inulin
Co-cultures
Mixed cultures

ABSTRACT

Inulin was used as a prebiotic to improve the quality and consistency of skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr), *Lactobacillus bulgaricus* (Lb) and *Bifidobacterium lactis* (Bl) with *Streptococcus thermophilus* (St), either in binary co-cultures or in cocktail containing all microorganisms. We compared, either in the presence of 40 mg inulin g^{-1} or not, the results of the maximum acidification rate (V_{max}) and the times to reach it (t_{max}), to reach pH 5.0 ($t_{pH5.0}$) and to complete the fermentation (t_f). Post-acidification, lactic acid formation and cell counts were also compared after either 1 day (D1) or 7 days of storage at 4 °C (D7). In co-culture, inulin addition to the milk increased V_{max}, decreased t_{max} and t_f, favored post-acidification and exerted a bifidogenic effect. *S. thermophilus* proved to stimulate the metabolism of the other lactic bacteria and enhanced the product features. After D7, a significant prebiotic effect of inulin was observed in all co-cultures. Either after D1 or D7, the enumerations of Lr and Bl in mixed culture markedly decreased compared to their respective co-cultures because of greater competition for the same substrates.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Functional foods have shown a high potential of growth in the recent years. Consumers are demanding for foods with increasingly properties, such as pleasant flavor, low-calorie value or low-fat content and benefic health effects (Gonzalez-Tomás et al., 2008). In the attempt to obtain products with improved flavor and appearance and to offer benefits to the consumer health, microbial probiotics as well as a certain number of prebiotics such as soluble fibers are supplemented to functional dairy products.

Prebiotics are non-digestible food components that inhibit pathogen multiplication and selectively stimulate the proliferation and activity of useful bacterial populations of the colon, of the large and even the small intestines (Mattila-Sandholm et al., 2002; Roberfroid, 2000). To exert their prebiotic effects, fibers have to be present in solid and liquid foods in amounts of 30–60 and 15–30 mg g^{-1}, respectively (ANVISA, 2002). Inulin is a natural component of several fruits and vegetables with beneficial effects on health and interesting technological properties, which depend also on its average chain length. This food ingredient is a soluble and fermentable fiber named fructan, which cannot be digested by α-amylase or other hydrolytic enzymes in the upper section of the intestinal tract (Carabin and Flamm, 1999) and is mostly applied to obtain low-fat content products (Niness, 1999).

Probiotics are microorganisms that, when used in large amounts in the preparation of foods and dairy products, are able to survive the passage through the upper digestive tract as well as to adhere to intestinal cells, providing beneficial effects to the intestine (Gilliland, 1989). Most common probiotics used in functional dairy products belong to the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Saccharomyces* (Goldin and Gorbach, 1984). Among these, lactic acid bacteria (LAB) isolated from human and animal gastrointestinal tract, when largely consumed, are well known to help in the intestinal balance (Ferreira, 2003).

Several investigations have focused on the use of prebiotics to improve growth and activities of probiotics. Inulin and starch were successfully employed to stimulate *Bifidobacterium* spp. metabolism (Akalin et al., 2004; Bruno et al., 2002; Shin et al., 2000); however, reports are lacking regarding the effects of these prebiotics on *Lactobacillus* spp.

In order to produce the desired benefits, probiotic bacteria should be present in the product in viable counts (7–9 Log CFU mL^{-1}) during their whole shelf-life (Kurmann and Rasic, 1991). Although this level is not well established, it seems that it depends on the species and strains used.

Owing to the rapid decline of *Bifidobacterium* spp. after yoghurt manufacture (Dave and Shah, 1997), inulin was frequently employed in studies mainly devoted to improve its viability during long-term cold storage (Akalin et al., 2004; Bruno et al., 2002; Shin et al., 2000). It was demonstrated that supplementation of yoghurt with inulin at low concentration significantly improves also the

* Corresponding author. Tel.: +55 10 3091 3690; fax: +55 10 3815 6386.
E-mail address: monolive@usp.br (M.N. De Oliveira).

0260-8774/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.08.013

growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotics in yoghurt during cold storage (Donkor et al., 2007; Kurien et al., 2005). Nevertheless, other lactobacilli would deserve attention due to their health-promoting effects (Shah, 2000, 2001).

Therefore, inulin appears as an important food ingredient that might be additionally explored for the production of functional foods (Niness, 1999). However, the synergistic or antagonistic effects of different probiotics (*Lactobacillus bulgaricus, L. acidophilus, Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*) with *Streptococcus thermophilus* were poorly explored (Oliveira et al., submitted for publication). Therefore, the present study reports the effect of inulin in both binary and mixed cultures, synergistic effects among microorganisms, yoghurt production with binary and mixed cultures and capability of *L. bulgaricus, L. rhamnosus, L. acidophilus* and *B. lactis* to survive in yoghurt production.

2. Materials and methods

2.1. Microbial cultures

Five commercial starter freeze-dried cultures (Danisco, Sassenage, France) were used in this study, specifically the yoghurt microorganisms *S. thermophilus* TA040 (St) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 (Lb); and the probiotics *L. acidophilus* LAC4 (La), *L. rhamnosus* LBA (Lr) and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL 04 (Bl).

2.2. Milk preparation

Culture media prepared adding 100 g of distilled water to 13 g of skim milk powder (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brazil) were either used as such (M) or supplemented (SM) with 40 mg of inulin g^{-1} (commercial name: Beneo TM; degree of polymerization: DP = 10) (Orafti Active Food Ingredients, Oreye, Belgium). Both media were thermally treated at 90 °C for 5 min in water bath, model 550 THE (Fisatom, São Paulo, Brazil), and then transferred to sterile flasks (1.0 L), cooled in ice bath, distributed into sterile Shott flasks (250 mL) inside laminar air flow chamber, and stored at 4 °C for 24 h.

2.3. Inoculum preparation

In order to obtain almost the same mean initial counts of each bacterium in the different co-cultures as well as in the mixed culture (6.1–6.5 Log CFU mL^{-1}), bacterial pre-cultures (Bl, St, La, Lr and Lb) were prepared by dissolving 45, 90, 100, 130 and 400 mg of their respective freeze-dried cultures in 50 mL of milk (10% of total solids; autoclaved at 121 °C for 20 min). After blending and activation at 42 °C for 30 min, 1.0 mL of each pre-culture was inoculated into milk or milk supplemented with inulin up to a final volume of 250 mL, giving a volumetric proportion of 1/250 for all them.

2.4. Fermentations

After inoculation, flask samples were transferred to water bath equipment assembled to a CINAC (Cynetique dacidification, Ysebaert, Frépillon, France) system, and batch fermentations were performed at 42 °C up to pH 4.5, selected as the condition to stop the fermentation. Fermentations were carried out in quadruplicate and monitored using the CINAC system that allows continuously measuring and recording the pH as well as evaluating the acidification rate throughout the run (Spinnler and Corrieu, 1989).

2.5. Kinetic parameters

The acidification rate (V_{max}) was calculated as the time variation of pH (dpH/dt) and expressed as 10^{-3} pH units min^{-1}. At the end of the incubation, the following kinetic parameters were also calculated: (i) t_{max} (h), time at which V_{max} was reached; (ii) $t_{pH5.0}$ (h), time to reach pH 5.0; and (iii) t_f (h), time to complete the fermentation. After achievement of pH 4.5 the fermentations were manually interrupted agitating the clot by means of a perforated disk-stainless steel rod that was moved upwards and downwards for 80 s. The fermented product was put into 50 mL polypropylene cups, thermally sealed using a Selopar equipment (BrasHolanda, Pinhais, Brazil), quickly cooled in ice bath and stored at 4 °C (Damin et al., 2006; Oliveira et al., 2001).

The kinetics of acidification were investigated throughout the fermentation of milk, either as such (M) or supplemented with 40 mg inulin g^{-1} (SM), by *S. thermophilus* either in binary co-cultures with *L. bulgaricus, L. acidophilus, L. rhamnosus* or *B. lactis*, or in multiple mixed culture containing all them. At the end of fermentations we determined the post-acidification parameters and the probiotic survival of fermented milks, after storage at 4 °C either for 1 day (D1) or for 7 days (D7) since the end of fermentations. Non-supplemented milk (M) was used as a control.

2.6. Post-acidification and acidity

Fermented milk post-acidification was determined after D1 or D7 by pH measurement using a pHmeter model Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brazil). Acidity, expressed as mg of lactic acid g^{-1}, was evaluated by titration using a 0.11 N NaOH solution (AOAC, 1995).

2.7. Counts of probiotic bacteria

Bacterial enumerations were carried out either after D1 or after D7. One milliliter of sample was diluted with 9 mL of 0.1% sterile peptonated water. Afterwards, serial dilutions were done, and bacteria were counted applying the pour plate technique (Kodaka et al., 2005). All media were obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

In co-cultures St colonies were enumerated in M17 agar by aerobic incubation at 37 °C for 48 h, while Lb, La and Lr enumerations were carried out in MRS agar medium, after pH adjustment at 5.4 by acetic acid addition, and aerobic incubation at 37 °C for 48, 72 and 72 h, respectively. Bl was enumerated in MRS agar medium containing 5% cystein without any pH adjustment (IDF, 1996, 1997, 2003).

In multiple mixed cultures, St and Lb were enumerated in M17 and MRS at pH 5.4, respectively, after aerobic incubation at 37 °C for 48 h. After incubation at 37 °C for 72 h in anaerobic jar, La, Bl and Lr were enumerated in the selective media MRS plus 10 μL mL^{-1} clindamycin (pH 6.2), Reinforced Clostridial Agar plus 1 μL mL^{-1} dicloxacillin (pH 7.1) and MRS plus 0.5 μL mL^{-1} vancomycin (pH 6.2), respectively. M17 and MRS media (pH 5.4) were prepared according to Jordano et al. (1992) and Dave and Shah (1996), and the MRS plus clindamycin and MRS plus vancomycin ones according to Lankaputhra and Shah (1996) and Tharmaraj and Shah (2003), respectively.

Anaerobic conditions were ensured by the use of AnaeroGen (Oxoid, Basingstoke, UK). Colony forming units (CFU) were enumerated in plates containing 30–300 colonies, and cell concentration was expressed as CFU g^{-1} of fermented milk. The selectivity of culture media was confirmed by microscopic examination of cells in the colonies.

2.8. Statistical analyses

Results were submitted to two factors-analysis of variance (ANOVA) using the Statistica Software 6.0. Mean values were

compared using the Tukey test (Sokal and Rohlf, 1979) at $P < 0.05$, and different letters were used to label values with statistically significant differences among them.

3. Results and discussion

3.1. Acidification kinetics

The highest value of V_{max} was obtained with the binary St–Lb co-culture in the presence of inulin (19.0×10^{-3} upH min^{-1}) (Table 1), confirming the observation made by Kristo et al. (2003) on the significant role exerted by St and Lb on the acidification kinetics in yoghurts. As a matter of fact, the combined use of all bacteria gave about the same results of such a co-culture, either in the presence or the absence of inulin. On the other hand, the lowest V_{max} value was observed with the St–Lr co-culture (15.9×10^{-3} upH min^{-1}) in the absence of inulin, demonstrating the poor acidification ability of Lr, proposed in this study as a new probiotic, with respect to the traditional bacteria. It is also evident the prebiotic effect of inulin, which increased the mean acidification rate (16.5×10^{-3} upH min^{-1}) of binary co-cultures by about 6% and that of the mixed culture (17.8×10^{-3} upH min^{-1}) by about 4%, both these variations being statistically significant. Oliveira et al. (2001) observed for St–Lr and St–La in milk supplemented with casein hydrolyzate significantly higher values of V_{max} ($20–21 \times 10^{-3}$ upH min^{-1}), which means that the prebiotic effect of inulin is weaker than that of casein hydrolyzate.

The time to reach V_{max} (t_{max}) ranged from 2.97 h (St–Lb in SM) to 3.25 h (St–Bl in M), showing statistically significant effects either of inulin or type of binary co-culture. As expected, the prebiotic effect of inulin, that reduced the mean t_{max} of binary co-cultures by only 2%, was weaker than that observed by Oliveira et al. (2001) for casein hydrolyzate. Apparently, there was no direct relationship between V_{max} and t_{max}, either in the presence or the absence of inulin; nevertheless, the use of the mixed culture reduced t_{max} significantly with respect not only to the binary co-cultures taken as a whole (11–12%), but even to the quickest of them, i.e. St–Lb (7–9%). Because Kristo et al. (2003) obtained in ternary co-culture of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. paracasei* in similar milk a value of t_{max} (2.65 h) comparable to that observed in mixed culture (2.77 h), it is possible that the simultaneous presence of various microorganisms could have led to synergistic effects among them, associated to the release of metabolic products stimulating the metabolism of the others (Bracquart et al., 1978; Radke-Mitchell and Sandine, 1986). In the mixed culture, a synergistic effect took place among the microorganisms. The fermentation was in fact completed more quickly (t_f = 4.06–4.23 h) even than with the St–Lb co-culture. This effect may have stimulated the growth of microorganisms to such an extent so as to render that exerted by inulin negligible.

A behavior qualitatively similar to that of t_{max} was observed for the times needed either to reach pH 5.0 ($t_{pH5.0}$) or to complete the fermentation (t_f) (Table 1). As expected, the lowest values of both t_f (5.47 h in M and 5.25 h in SM) and $t_{pH5.0}$ (3.72 h in M and 3.61 in SM) were obtained in the presence of the typical yoghurt bacteria (St–Lb), whereas the other probiotic co-cultures lasted an almost double time. When using the mixed culture, both parameters were significantly reduced with respect to St–Lb (by 15% and 23%, respectively), either in the absence or in the presence of inulin. As far as the prebiotic effect of inulin is concerned, its supplementation to skim milk reduced $t_{pH5.0}$ of binary co-cultures by 5.3% and that of the mixed culture by 3.5%. Even larger reductions (4.0% and 12%, respectively) were induced by such a prebiotic on t_f (Table 1). Although the effect of the different binary co-cultures was often not statistically significant, those of both inulin and use of all microorganisms in mixture were so.

Table 1
Kinetic parameters of acidification of milk fermented by co-cultures and mixed culture of *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) with *S. thermophilus* (St)

Run	Culture	V_{max} (10^{-3} upH min^{-1})	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	t_f (h)
Milk without inulin (M)					
1	St–Lb	18.0 ± 0.4^{d}	3.04 ± 0.06^{c}	3.72 ± 0.09^{d}	5.47 ± 0.09^{b}
2	St–La	16.3 ± 0.7^{b}	3.24 ± 0.03^{g}	4.67 ± 0.09^{g}	10.4 ± 0.68^{f}
3	St–Lr	15.9 ± 0.7^{a}	3.10 ± 0.11^{de}	4.43 ± 0.27^{f}	10.6 ± 0.19^{f}
4	St–Bl	16.0 ± 1.1^{ab}	3.25 ± 0.12^{g}	4.64 ± 0.24^{g}	10.1 ± 0.44^{ef}
5	Mixed culture	17.8 ± 1.1^{d}	2.77 ± 1.1^{a}	3.16 ± 1.1^{b}	4.23 ± 1.1^{a}
Milk supplemented with 40 mg of inulin g^{-1} (SM)					
6	St–Lb	19.0 ± 0.8^{f}	2.97 ± 0.09^{b}	3.61 ± 0.09^{c}	5.25 ± 0.07^{b}
7	St–La	17.3 ± 0.8^{c}	3.16 ± 0.03^{f}	4.25 ± 0.12^{e}	9.42 ± 0.66^{de}
8	St–Lr	17.1 ± 1.0^{c}	3.10 ± 0.08^{cd}	4.21 ± 0.29^{e}	8.35 ± 0.39^{c}
9	St–Bl	17.0 ± 0.9^{c}	3.15 ± 0.11^{ef}	4.46 ± 0.40^{f}	9.24 ± 0.33^{cd}
10	Mixed culture	18.5 ± 1.1^{e}	2.75 ± 1.1^{a}	3.05 ± 1.1^{a}	4.06 ± 1.1^{a}

V_{max}, maximum rate of acidification; t_{max}, time to reach V_{max}; $t_{pH5.0}$, time to reach pH 5.0; t_f, time to complete the fermentation (pH 4.5). Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($P < 0.05$). ±Mean standard deviations with respect to the mean values of quadruplicate runs.

3.2. Post-acidification and acidity

Souza (1991) suggested using the post-acidification (pH) and lactic acidity (lactic acid content) of fermented milk either after 1-day (D1) or after 7-day storage at 4 °C since the end of fermentation (D7) as the best criteria to express the acidity of yoghurts. According to this suggestion, Figs. 1 and 2 show the results of these parameters collected using both binary co-cultures and mixed bacterial culture either in the presence of inulin or not.

In co-cultures, the values of pH after D1 varied from 4.36 (St–La in M and St–Lb in SM) to 4.46 (St–Lr and St–Lb in M) and those after D7 from 4.21 (St–Lb in SM) to 4.35 (St–Lr in M) (Fig. 1). The most statistically significant variations were those between the co-cultures St–La and St–Lb from the one hand, showing higher post-acidification power (pH 4.36–4.39 after D1 and 4.21–4.26 after D7), and the co-cultures St–Lr and St–Bl from the other hand (pH 4.42–4.45 after D1 and 4.30–4.34 after D7). This result suggests that the alternative probiotics proposed in this study (Lr and Bl) could ensure the production of less acid yoghurts with respect to the traditional ones, and then could be of a certain industrial concern. Another statistically significant effect was related to cold storage for 7 days, which led to additional acidification with respect to D1 by 0.11–0.13 pH units, whereas no significant effect was exerted by inulin, apart from one case. As regards the mixed bacterial culture, it showed a behavior practically coincident to the promising one of St–Lr and St–Bl co-cultures as well as the same mean pH decrease after cold storage.

These results as a whole are in accordance with the acidity due to only lactic acid that varied after D1 from 8.4 mg g^{-1} (St–Bl in M) to 9.8 mg g^{-1} (St–La in M) and after D7 from 9.3 mg g^{-1} (St–Lr in M) and 10.9 mg g^{-1} (St–La in SM) (Fig. 2). As an average there was a significant increase (by 0.9–1.0 mg g^{-1}) passing from D1 to D7. Although the effect of inulin was only in a few cases significant, its presence in the milk implied in general a little less acidification. Of particular concern was, on the contrary, the use of the mixed culture with respect to binary co-cultures, in that it ensured practically the same low lactic acidity as St–Bl either after D1 (8.3–8.5 mg g^{-1}) or D7 (9.5–9.6 mg g^{-1}).

These results as well as those of post-acidification can be interpreted on the basis of the metabolic behavior of each

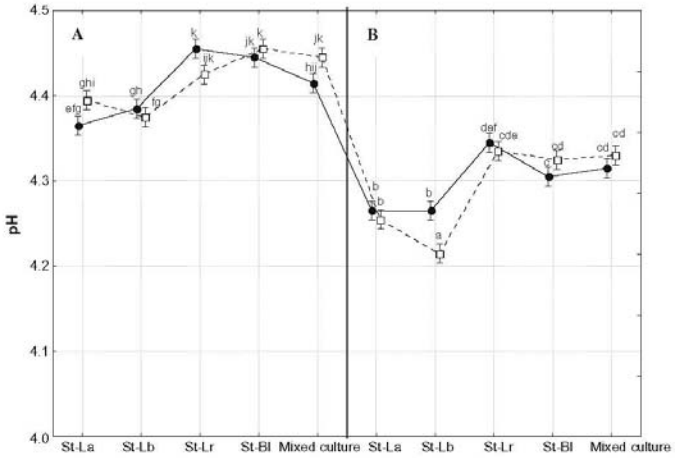


Fig. 1. Post-acidification of skim milk fermented either by binary co-cultures of St–La, St–Lb, St–Lr and St–Bl or mixed bacterial culture after 1 day (A) or after 7 days (B) of storage at 4 °C. (□) Milk supplemented with 40 mg of inulin g^{-1}; (●) Non-supplemented milk.

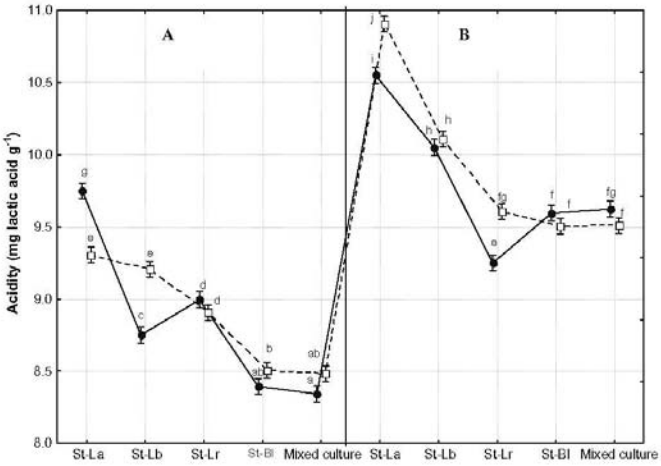


Fig. 2. Lactic acidity of skim milk fermented either by binary co-cultures of St–La, St–Lb, St–Lr and St–Bl or mixed bacterial culture after 1 day (A) or after 7 days (B) of storage at 4 °C. (□) Milk supplemented with 40 mg of inulin g^{-1}; (●) Non-supplemented milk.

microorganism. The highest production of lactic acid either after D1 or D7 by St–La with respect to the other co-cultures was the likely result of the homolactic metabolism of *L. acidophilus* (Zhao et al., 2007). The lower lactic acidity associated to St–Lb could have been due to the shift from homolactic to heterolactic behavior of Lb consequent to the change of environmental pH (Rhee and Pack, 1980), while the post-acidification comparable to that of St–La the result of acetic acid release. Finally, the highest values of pH and less lactic acidity obtained with St–Lr and St–Bl with respect to the other two co-cultures are consistent with the heterolactic nature of both Lr (Jyoti et al., 2003) and Bl (Bongaerts et al., 2005), and the lower pH after D7 with St–Lb compared with St–Lr to the formation of acetic acid instead of ethanol (Bongaerts et al., 2005).

The values of pH after D1 are not so far from those reported by Moreira et al. (2000) (3.76–4.39), who analyzed samples of milk fermented by different strains of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, and by Martin et al. (1999) after 30-day storage at 5 °C (4.18–4.36). Besides, Damin et al. (2006) detected an average lactic acidity in commercial yoghurts (10.1 mg g^{-1}) practically coincident to the average value of this work after D7. According to Souza (1991), the lactic acidity of commercial yoghurts is largely variable,

ranging from 7.0 to 12.5 mg g^{-1} or pH 3.7–4.6. Nevertheless, to avoid insipidity or excess acidity to the taste, optimal values should be in the ranges 7.0–9.0 mg g^{-1} and 4.0–4.4, respectively.

3.3. Microbiological analysis

Figs. 3 and 4 show the enumeration in fermented milks of the above lactic acid bacteria in fermented milks either in co-cultures with *S. thermophilus* or in the mixed microbial culture after 1 and 7 days of cold storage, respectively. The enumerations of *S. thermophilus* in co-cultures varied within a very narrow range, and practically did not vary significantly with the type of co-culture (8.98–9.05 Log CFU mL^{-1}), the presence of inulin (9.05–9.14 Log CFU mL^{-1}) and the cold storage (8.95–9.05 Log CFU mL^{-1}).

As far as the enumerations of the other lactic bacteria are concerned, after D1 they varied from 7.3 Log CFU mL^{-1} (St–Lr in M) to 9.1 Log CFU mL^{-1} (St–Bl in SM), with a statistically significant stimulating effect of inulin on the growth of almost all of them. For instance, the enumeration of Bl in the St–Bl co-culture increased in the presence of inulin by no less than 1.4 Log CFU mL^{-1}, thus proving the bifidogenic effect exerted by the selected prebiotic. Compared to our results, Ozer et al. (2005) found considerably higher

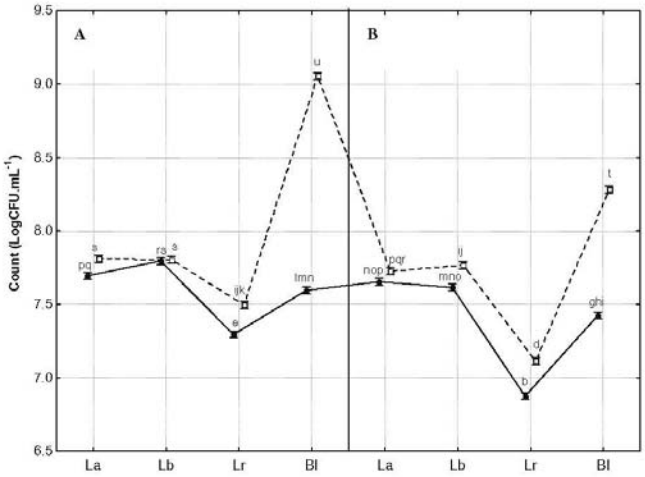


Fig. 3. Cell enumerations in skim milk fermented either by binary co-cultures of St–La, St–Lb, St–Lr and St–Bl (A) or mixed bacterial culture (B) after 1 day of storage at 4 °C. (□) Milk supplemented with 40 mg of inulin g^{-1}; (●) Non-supplemented milk.

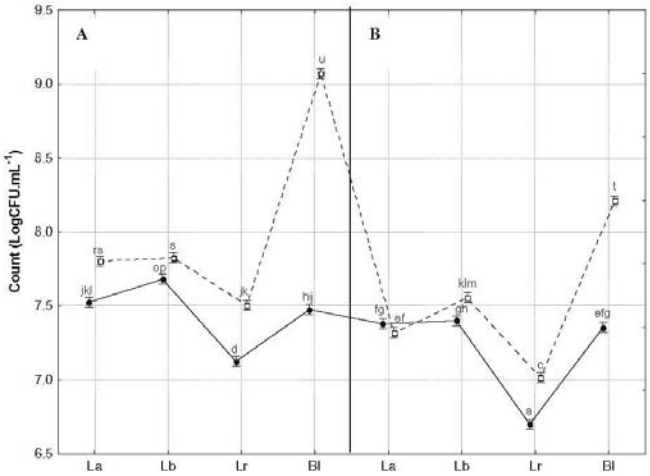


Fig. 4. Cell enumerations in skim milk fermented either by binary co-cultures of St–La, St–Lb, St–Lr and St–Bl (A) or mixed bacterial culture (B) after 7 days of storage at 4 °C. (□) Milk supplemented with 40 mg of inulin g^{-1}; (●) Non-supplemented milk.

enumerations for Lb and La (9.6 and 8.3–8.8 Log CFU mL^{-1}, respectively), which are comparable to those reported by Dave and Shah (1997), likely due not only to the larger inoculum, but also to the higher total solid content and nutrient availability in their milk (Kristo et al., 2003).

After D7, the enumeration of bacteria other than St decreased only a little compared to D1, although only 62.5% of these variations were statistically significant. On the other hand, the prebiotic effect of inulin was significant in all cases (Figs. 3 and 4). Damin et al. (2006) detected La enumerations in St–La even below the legislation limit (4.8–5.4 Log CFU mL^{-1}). Nevertheless, St and Lb enumerations >7.0 Log CFU mL^{-1} as well as the very high St/Lb ratio (5–6) in their product after D7 made its suitable for commercialization, because it ensured a reduced post-acidification.

Either after D1 or D7, the use of microorganisms in mixture led to marked decreases in the enumerations of Lr and Bl compared to their respective co-cultures, whereas the same effect on La and Lb, although statistically significant, was barely perceptible. These results taken together suggest that, in spite of the above-described advantages in terms of product quality, the use of more microorganisms in complex mixture leads to marked reduction in the growth of all them, as the logical consequence of greater competition for the same substrates. Nevertheless, the only bacterium whose counts in the mixed culture kept below the recommended limit of 7.0 Log CFU mL^{-1} was Lr in the medium without inulin; therefore, the supplementation of skim milk with inulin appears to be a fundamental requisite to achieve all the desired microbiological characteristics of the product.

4. Conclusions

The present work deals with the effect of inulin as a prebiotic to improve the quality of fermented skim milk by binary co-cultures of *L. acidophilus, L. rhamnosus, L. bulgaricus* and *B. lactis* with *S. thermophilus* or by a mixed culture containing all of them.

- In co-culture, the highest acidification rate was obtained with St–Lb in the presence of inulin, confirming the role exerted by St and Lb on the yoghurt acidification.
- Consistently with the prebiotic effect of inulin, it increased appreciably the mean acidification rate either of binary co-cultures or of mixed culture and reduced the mean time to reach V_{max} in the mixed culture.
- Both the times needed to reach pH 5.0 or to complete the fermentation were significantly reduced in the mixed culture with respect to co-cultures, either in the absence or in the presence of inulin. The synergistic effect among the selected microorganisms observed in the mixed culture was so strong as to mask that of inulin.
- Inulin reduced a little the lactic acidity, especially in the case of the mixed culture.
- After D1, the prebiotic effect of inulin was remarkable only for the St–Bl co-culture, whereas, after D7, it was so for all co-cultures. Either after D1 or D7, the enumerations of Lr and Bl in the mixed culture markedly decreased compared to their respective co-cultures as the consequence of greater competition for the same substrates.

References

Akalın, A.S., Fenderya, S., Akbulut, N., 2004. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. International Journal of Food Science and Technology 39, 613–621.
ANVISA, 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde, Resolução RDC no. 2, January 7, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, Brasilia, Brazil. <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=1567> (retrieved 22.08.2007).
AOAC, 1995, 13th ed. Official Methods of Analysis, vol. 2 Association of Official Analytical Chemistry, Arlington.
Bongaerts, G., Severijnenb, R., Timmerman, H., 2005. Effect of antibiotics, prebiotics and probiotics in treatment for hepatic encephalopathy. Medical Hypotheses 64, 64–68.
Bracquart, P., Lorient, D., Alias, C., 1978. Effects of amino acids and small peptides on the acidification of milk by *Streptococcus thermophilus*. In: Proceedings of the 20th International Dairy Congress, vol. E, June 26–30, Paris, p. 512.
Bruno, A., Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., 2002. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. Journal of Food Science 67, 2740–2744.
Carabin, I.G., Flamm, W.G., 1999. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. Regulatory Toxicology and Pharmacology 30, 268–282.
Damin, M.R., Almeida, K.E., Minowa, E., Oliveira, M.N., 2006. Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final da vida de prateleira. Revista Leite e Derivados 94 (September–October), 20–30.
Dave, R.I., Shah, N.P., 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. Journal of Dairy Science 79, 1529–1536.
Dave, R.I., Shah, N.P., 1997. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starters cultures. International Dairy Journal 7, 31–41.
Donkor, O.N., Nilmini, S.L.I., Stolic, P., Vasiljevic, T., Shah, N.P., 2007. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal 17, 657–665.
Ferreira, C.L.L., 2003. Grupo de bactérias láticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: Ferreira, C.L.L. (Ed.), Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção. Universidade Federal Viçosa, Viçosa-MG, Brazil, pp. 7–33.
Gilliland, S.E., 1989. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. Journal of Dairy Science 72, 2483–2494.
Goldin, B.R., Gorbach, S.L., 1984. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. American Journal of Clinical Nutrition 39, 756–761.
Gonzalez-Tomás, L., Coll-Marqués, J., Costell, E., 2008. Viscoelasticity of inulin–starch-based dairy systems. Influence of inulin average chain length. Food Hydrocolloids 22, 1372–1380.
IDF, 1996. Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological examination, Standard No. 122C. International Dairy Federation, Brussels.
IDF, 1997. Dairy Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria (LAB), Standard of Identity, Standard No. 149A. International Dairy Federation, Brussels.
IDF, 2003. Yoghurt/enumeration of Characteristic Microorganisms, Colony Count Technique at 37 °C, Standard No. 117. International Dairy Federation, Brussels.
Jordano, R., Serrano, E.C., Torres, M., Salmeron, J., 1992. Comparison of three M17 media for the enumeration of *Streptococcus thermophilus* in fermented dairy products. Journal of Food Protection 55, 999–1000.
Jyoti, B.D., Suresh, A.K., Venkatesh, K.V., 2003. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19, 509–514.
Kodaka, H., Mizuochi, S., Teramura, H., Nirazuka, T., 2005. Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples: performance-tested method[SM]. Journal of AOAC International 88, 1702–1713.
Kristo, E., Biliaderis, C.G., Tzanetakis, N., 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. International Dairy Journal 13, 517–528.
Kurien, A., Puniya, A.K., Singh, K., 2005. Selection of prebiotic and *Lactobacillus acidophilus* for synbiotic yoghurt preparation. Indian Journal of Microbiology 45, 45–50.
Kurmann, J.A., Rasic, J.L., 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: Robinson, R.K. (Ed.), Therapeutic Properties of Fermented Milks. Elsevier Applied Science, London, pp. 117–158.
Lankaputhra, W.E.V., Shah, N.P., 1996. A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Milchwissenschaft 51, 446–451.
Martin, N.C., Skokanova, J., Latrille, E., Béal, C., Corrieu, G., 1999. Influence of fermentation and storage conditions on the sensory properties of plain low fat stirred yoghurts. Journal of Sensory Studies 47, 151–164.
Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal 12, 173–182.
Moreira, M., Abraham, A., Antoni, G., 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. Journal of Dairy Science 83, 395–400.
Niness, K.R., 1999. Inulin and oligofructose: what are they? Journal of Nutrition 129 (Suppl. 7), 1402–1406.
Oliveira, R.P.S., Perego, P., Converti, A., Oliveira, M.N., submitted for publication. Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the effect of inulin. LWT-Food Science and Technology.
Oliveira, M.N., Sodini, I., Remeuf, F., Corrieu, G., 2001. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties

and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. International Dairy Journal 11, 935–942.

Ozer, D., Akın, M.S., Ozer, B., 2005. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. Food Science and Technology International 11, 19–24.

Radke-Mitchell, L.C., Sandine, W.E., 1986. Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Dairy Science 69, 2558–2568.

Rhee, S.K., Pack, M.Y., 1980. Effect of environmental pH on fermentation balance of *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Bacteriology 144, 217–221.

Roberfroid, M.B., 2000. Defining functional foods. In: Gibson, G.R., Williams, C.M. (Eds.), Functional Foods: Concept to Product. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 9–27 (Chapter 1).

Shah, N.P., 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science 83, 894–907.

Shah, N.P., 2001. Functional foods, probiotics and prebiotics. Food Technology 55, 46–53.

Shin, H.S., Lee, J.H., Pestka, J.J., Ustunol, Z., 2000. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. Journal of Food Science 65, 885–887.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1979. Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica. H. Blume, Madrid.

Souza, G., 1991. Fatores de Qualidade do Iogurte, vol. 21. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, Brazil, pp. 20–27.

Spinnler, H.E., Corrieu, G., 1989. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. Journal of Dairy Research 56, 755–764.

Tharmaraj, N., Shah, N.P., 2003. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophillus*, *Lactococcus acidophillus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and Propionicbacteria. Journal of Dairy Science 86, 2288–2296.

Zhao, R., Sun, J., Mo, H., Zhu, Y., 2007. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23, 195–200.

ARTICLE IN PRESS

LWT - Food Science and Technology xxx (2009) 1–7

Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin

Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira [a], Patrizia Perego [b], Attilio Converti [b], Maricê Nogueira De Oliveira [a,*]

[a] Biochemical and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Av Prof Lineu Prestes, 580, Bl 16, 05508-900 São Paulo, Brazil
[b] Department of Chemical and Process Engineering, Genoa University, Via Opera Pia 15, I-16145 Genova, Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Received 21 August 2008
Received in revised form
3 January 2009
Accepted 5 January 2009

Keywords:
Probiotic
Prebiotic
Milk
Inulin
Co-culture
Generation time

ABSTRACT

Inulin was used as a prebiotic to improve the quality and consistency of skim milk fermented by co-cultures and pure cultures of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Bifidobacterium lactis* with *Streptococcus thermophilus*. We compared, either in the presence or absence of 4 g inulin/100 g, the results of the main kinetic parameters, specifically the generation time (t_g), the maximum acidification rate (V_{max}), and the times to reach V_{max} (t_{max}), to attain pH 5.0 ($t_{pH5.0}$) and to complete the fermentation ($t_{pH4.5}$). Post-acidification, lactic acid formation and cell counts were also determined and compared, either 1 day after the fermentation was complete or after 7 day storage at 4 °C. In general, inulin addition to the milk increased in co-cultures V_{max}, decreased t_{max}, t_g and $t_{pH4.5}$, favored post-acidification, exerted a bifidogenic effect, and preserved almost intact cell viability during storage. In addition, *S. thermophilus* was shown to stimulate the metabolism of the other lactic bacteria. Contrary to co-cultures, most of the effects in pure cultures were not statistically significant. The most important aspect of this paper is the use of the generation time as a tool to investigate the microbial response to inulin addition.

© 2009 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prebiotics are non-digestible components of functional foods that stimulate the proliferation and activity of bacterial populations desirable in the colon and inhibit pathogen multiplication, hence beneficially acting on the host (Mattila-Sandholm, Myllärinen, Crittenden et al., 2002; Roberfroid, 2000). The most important prebiotics are glucans, fructans and mannans, often contained in agroindustrial residues (Piad, Samaniego, Pérez et al., 2006). Among fructans, inulin and oligofructoses, which are soluble and fermentable fibers, are the most known. They reach the large intestine practically intact, are then hydrolyzed in the upper section of the intestine (Carabin & Flamm, 1999) and fermented by bacteria (Roberfroid, Van Loo, & Gibson, 1998). Moreover, they may exert a protective effect towards selected probiotics in improving their survival and activity during product storage (Donkor, Nilmini, Stolic, Vasiljevic, & Shah, 2007).

Lactic acid bacteria isolated from human and animal gastrointestinal tract are well-known probiotics. When used in large amounts in the preparation of foods, they are able to survive the passage through the upper digestive tract and adhere to intestinal cells, helping in the intestinal balance. Probiotics used in functional dairy products belong to the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Saccharomyces*. To produce the desired benefits, probiotics should be present in the product in viable counts during their whole shelf-life. It has been recommended that the minimum dose able to assure therapeutic effects should be in the range 7–9 LogCFU/ml (Dave & Shah, 1997; Kailasapathy & Rybka, 1997). However, the viability of probiotics in commercial preparations is affected by several factors such as temperature, acidity and presence of other microorganisms and oxygen (Kailasapathy & Rybka, 1997; Shah, 2000a; Tamime, 2005).

Inulin or oligofructoses were frequently employed in studies mainly devoted to improve bacterial viability during long-term cold storage, where *Bifidobacterium* spp. was the main focus of research (Akalın, Fenderya, & Akbulut, 2004; Bruno, Lankaputhra, & Shah, 2002; Shin, Lee, Pestka, & Ustunol, 2000), owing to its rapid decline after yoghurt manufacture (Dave & Shah, 1997). Donkor et al. (2007) have recently demonstrated that supplementation of yoghurt with inulin at low concentration significantly improves the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotics in yoghurt during cold storage. Nevertheless, other lactobacilli would deserve attention because of their health-promoting effects (Shah, 2000b, 2001).

* Corresponding author. Tel.: +55 10 3091 3690; fax: +55 10 3815 6386.
E-mail address: monolive@usp.br (M.N. De Oliveira).

0023-6438/$34.00 © 2009 Swiss Society of Food Science and Technology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

Although some authors have proposed using the generation time as a tool to investigate the microbial dynamics either in pure or mixed cultures (Bruno et al., 2002; Liong & Shah, 2005), there is lack in the literature about this issue. The first authors used this parameter to confirm the stimulating effect of inulin on bifidobacteria growth, already evidenced by other authors (Gibson & Wang, 1994; Roberfroid, et al., 1998). Contrarily, a very poor prebiotic effect was reported for inulin by Shin et al. (2000), likely due to the use of a particular *Bifidobacterium* strain. Also in this respect, reference to lactobacilli is very poor, and only a few attempts were made in pure cultures of *L. acidophilus* (Brizuela, Serrano, & Pérez, 2001; Chou & Weimer, 1999; Du Plessis, Dicks, Vescovo, Torriani, & Dellaglio, 1996; Ordonez, Fung, & Jeon, 2000), *Lactobacillus rhamnosus* (Goldin, 1998; Jyoti, Suresh, & Venkatesh, 2004), *Lactobacillus bulgaricus* (Kimmel & Roberts, 1998; Radke-Mitchell & Sandine, 1986), *Lactobacillus plantarum* and *L. casei* (Gonzâlez, Domínguez-Espinosa, & Alcocero, 2008).

On the basis of this background, inulin appears as an important food ingredient that might be additionally explored for the production of functional foods (Niness, 1999); however, a number of questions have to be solved to get advance in the field. To this purpose, the behaviors of different probiotics (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *B. lactis*) have been compared in pure culture or in co-culture with *Streptococcus thermophilus*, using the generation time as the main kinetic parameter.

The main objectives of this work are: (a) to investigate the synergistic effects between these microorganisms in co-culture with *S. thermophilus*; (b) to evaluate the capability of *L. rhamnosus* to be used as potential probiotic in yoghurt preparation; (c) to highlight the prebiotic effect of inulin on fermented milk production either by mono- or co-cultures; (d) to produce yoghurt with higher and more time-stable bacterial charge with respect to the present commercial products; (e) to increase the industrial productivity of fermented milk.

2. Materials and methods

2.1. Microbial cultures

Five strains of pure commercial *starter* freeze-dried cultures (Danisco, Sassenage, France) were used: *Streptococcus thermophilus* TA040 (St) and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340 from here onwards called *L. bulgaricus* (Lb) (yoghurt microorganisms); *Lactobacillus acidophilus* LAC4 (La), *Lactobacillus rhamnosus* LBA (Lr), and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BL 04 from here onwards called *B. lactis* (Bl) (probiotic microorganisms).

2.2. Milk preparation

Milk prepared adding 13 g of skim powder milk (Molico, Nestlé, Araçatuba, Brazil) in 100 g of distilled water was either used as such (M) or supplemented (SM) with 4 g inulin/100 g (trade name: Beneo™) (Orafti Active Food Ingredients, Oreye, Belgium). This solid content of milk corresponds to the average value reported by Restle, Pacheco, and Moletta (2003) for integral cow milk. Both milks then were thermally treated at 90 °C for 5 min in water bath, model 550 THE (Fisatom, São Paulo, Brazil). The heat treated milks were transferred to 1.0 l sterile flasks, cooled in ice bath, distributed, inside laminar flow chamber, into 250 ml sterile glass flasks (Schott, Mainz, Germany), sealed with screw-caps and complete with protected seal, and stored at 4 °C for 24 h before using.

2.3. Inoculum preparation

The La pre-culture was prepared by dissolving 100 mg of freeze-dried culture in 50 ml of milk (10 g/100 g of total solids; autoclaved at 121 °C for 20 min). After blending and activation at 42 °C for 30 min, 1.0 ml of the pre-culture was inoculated into 250 ml of milk. The same procedure was used for Lb, Lr, Bl, and St adding to 50 ml of milk 400, 130, 45 and 90 mg of their respective freeze-dried cultures. Bacterial counts in these pre-cultures ranged from 6.1 to 6.5 LogCFU/ml.

2.4. Fermentations

After inoculation, flask samples were transferred to a water bath assembled to a CINAC (*Cynetique âacidification*, Ysebaert, Frépillon, France) system, and batch fermentations were performed in quadruplicate at 42 °C up to pH 4.5, selected as the condition to stop the fermentation. Fermentations were monitored using the CINAC system that allowed continuously measuring and recording the pH and evaluating the acidification rate along the run.

2.5. Post-acidification and acidity

Fermented milk post-acidification was determined 1 day after the fermentation was complete (D1) and after 7 day-storage at 4 °C (D7) by pH measurement using a pHmeter model Q-400M1 (Quimis, São Paulo, Brazil). Acidity, expressed as grams of lactic acid per 100 grams, was determined in triplicate for each trial by titration with a 0.11 mol equiv/l NaOH solution according to method No. 907.124 (AOAC, 1995).

2.6. Counts of probiotic bacteria

Bacterial counts were carried out either after D1 or after D7 of every quadruplicate runs. One ml of sample was diluted with 9 ml of 1 g/l sterile peptonated water. Afterwards, eight serial dilutions were done, and each bacterium was counted in the three most appropriate dilutions, applying the pour plate technique (Kodaka, Mizuochi, Teramura, & Nirazuka, 2005). Counts were finally presented as mean values. All media were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). St colonies were counted in M17 agar by aerobic incubation at 37 °C for 48 h. Counts were carried out after 48 h (Lb) or 72 h (La and Lr) in MRS Agar medium after pH adjustment to 5.4 by acetic acid addition, and aerobic incubation at 37 °C. Bl was counted in MRS Agar medium containing 50 g/l cysteine without any pH adjustment (IDF, 1996, 1997, 2003).

2.7. Kinetic parameters

From the collected data, the acidification rate (V_{max}) was calculated as the time variation of pH (dpH/dt) and expressed as 10^{-3} pH units/min. During the incubation period, the following kinetic parameters were also calculated: (i) t_{max} (h), time at which V_{max} was reached; (ii) $t_{pH5.0}$ (h), time to reach pH 5.0; (iii) $t_{pH4.5}$ (h), time to reach pH 4.5 (i.e., to complete the fermentation); and (iv) t_g (h), generation time of microorganisms.

Once pH 4.5 had been reached, the fermentations were manually interrupted by aseptically agitating the clot by means of a stainless steel rod with perforated disks; the rod was gently moved upwards and downwards for 80 s. The fermented product was put into 50 ml polypropylene cups, thermally sealed using a Selopar equipment (BrasHolanda, Pinhais, Brazil) and quickly cooled in an ice bath. The fermented products were stored at 4 °C.

The kinetics of acidification and growth were investigated throughout the fermentation of milk, either as such (M) or

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

ARTICLE IN PRESS

R.P. De Souza Oliveira et al. / LWT - Food Science and Technology xxx (2009) 1–7 3

supplemented with 4 g inulin/100 g (SM), by *S. thermophilus* in co-culture with *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* or *B. lactis*, or by pure cultures of all these microorganisms. In particular, the maximum specific growth rate (μ_{max}) was calculated for each microorganism during its exponential growth phase by the equation:

$$\mu_{max} = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (1)$$

where X_2 and X_1 are counts (CFU/ml) at time t_2 and t_1.

The generation time (t_g) was calculated for each culture from the corresponding value of μ_{max} by the equation:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (2)$$

2.8. Statistical analyses

The experimental data of V_{max}, t_{max}, $t_{pH5.0}$, $t_{pH4.5}$, t_g, as well as of pH, bacterial counts and lactic acid concentration either after D1 or D7, were presented as mean values. Variations with respect to the mean values were presented as standard deviations. Mean values of the above parameters but t_g and t' were submitted to analysis of variance (ANOVA) by the Statistica Software 6.0. They were compared using the Tukey test at $P < 0.05$, and different letters were used to label values with statistically significant differences among them.

3. Results and discussion

3.1. Acidification kinetics and generation time

3.1.1. Co-cultures

Table 1 lists the acidification kinetics of milk, either in the presence (SM) or absence (M) of 4 g inulin/100 g, fermented by *Lactobacillus bulgaricus* (St-Lb), *Lactobacillus acidophilus* (St-La), *Lactobacillus rhamnosus* (St-Lr) and *Bifidobacterium lactis* (St-Bl) in co-culture with *Streptococcus thermophilus*.

V_{max} ranged from 15.9×10^{-3} pH units/min (St-Lr in M) to $19.0.10^{-3}$ pH units/min (St-Lb in SM). Taken as an average, this parameter was about 6% higher in the presence of inulin, showing statistically significant variations. In addition, the highest V_{max} values were obtained with the St-Lb co-culture either in M or in SM, confirming the observations made by Kristo, Biliaderis, and Tzanetakis (2003) on the role of these two thermophilic bacteria in the acidification kinetics.

t_{max} ranged from 3.0 h (St-Lb in SM) to 3.2 h (St-Bl in M), showing statistically significant variations. As expected from the well-known prebiotic effect of inulin, ascribable to its partial hydrolysis and fermentation, the average value of t_{max} was lower in the presence (3.1 h) than in the absence (3.2 h) of inulin. Kristo et al. (2003) obtained in similar milk a t_{max} of only 2.65 h in co-culture of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. paracasei*, likely due to a three-way synergistic effect among these microorganisms. A behavior similar to that of t_{max} was observed for the time needed to reach pH 5.0 ($t_{pH5.0}$), which ranged from 3.6 h (St-Lb in SM) to 4.7 h (St-La in M) (Table 1). On the other hand, the time to complete the fermentations ($t_{pH4.5}$) depended not only on the addition of inulin but also on the co-culture, although the variations were statistically significant only at 50% and 58% levels, respectively. As expected, the shortest fermentation time ($t_{pH4.5} = 5.4$ h) was obtained in the presence of the typical yoghurt bacteria (St-Lb in SM), whereas the other probiotic co-cultures lasted an almost double time ($t_{pH4.5} = 10.1–10.6$ h in M). Besides, the addition of inulin reduced the fermentation time by about 10% as an average, thus confirming its prebiotic effect already evidenced by other authors for both bifidobacteria (Akalin, Fenderya, & Akbulut et al., 2004; Bruno et al., 2002; Donkor et al., 2007; Shin et al., 2000) and lactobacilli (Donkor et al., 2007; Shah, 2000b, 2001).

As suggested by Bruno et al. (2002) and by Liong and Shah (2005), the generation time (t_g) can be used as a measure of the effectiveness of a specific prebiotic in modulating the bacterial growth rate. As expected, *S. thermophilus*, being the main yoghurt starter, exhibited in all the co-cultures the shortest generation time (0.22–0.28 h), which almost coincided with the value reported by Talon, Walter, Viallon, and Berdagué (2002) for this bacterium in co-culture with Lb in half skimmed milk. Contrarily, t_g of Lb reported by these authors was about one third the one obtained in this work, likely because of the different milk composition. On the other hand, the very long generation time of Lr (0.76 h in M and 0.55 h in SM) (Table 1) could be due to its need of co-metabolizing citrate and the inducible feature of its citrate permease (Jyoti et al., 2004). The significant reduction in this parameter induced by inulin either for St (12%) or for the other microorganisms taken as a whole (26%) is a further confirmation of its prebiotic effect.

3.1.2. Pure cultures

The kinetic parameters of milk acidification by the above microorganisms used in pure cultures are listed in Table 2.

Table 1
Kinetic parameters of acidification of milk fermented by co-cultures of *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) with *S. thermophilus* (St).

Run	Co-culture	V_{max} (10^{-3} pH units/min)	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	$t_{pH4.5}$ (h)	t_g (h)*
Milk						
1	St-Lb	18.0 ± 0.4^{bc}	3.0 ± 0.1^{ab}	3.7 ± 0.1^{ab}	5.5 ± 0.1^{a}	$0.27 \pm 0.01/0.53 \pm 0.02$
2	St-La	16.3 ± 0.7^{ab}	3.2 ± 0.0^{b}	4.7 ± 0.1^{c}	10.4 ± 0.7^{d}	$0.27 \pm 0.01/0.44 \pm 0.01$
3	St-Lr	15.9 ± 0.7^{a}	3.1 ± 0.1^{ab}	4.4 ± 0.3^{c}	10.6 ± 0.2^{d}	$0.28 \pm 0.00/0.76 \pm 0.03$
4	St-Bl	16.0 ± 1.1^{abc}	3.2 ± 0.1^{b}	4.6 ± 0.2^{c}	10.1 ± 0.4^{cd}	$0.26 \pm 0.01/0.57 \pm 0.04$
Milk supplemented with 4 g inulin/100 g						
5	St-Lb	19.0 ± 0.8^{c}	3.0 ± 0.1^{a}	3.6 ± 0.1^{a}	5.2 ± 0.1^{a}	$0.23 \pm 0.01/0.42 \pm 0.03$
6	St-La	17.3 ± 0.8^{abc}	3.2 ± 0.0^{ab}	4.2 ± 0.1^{bc}	9.4 ± 0.7^{c}	$0.27 \pm 0.02/0.37 \pm 0.02$
7	St-Lr	17.1 ± 1.0^{abc}	3.1 ± 0.1^{ab}	4.2 ± 0.3^{bc}	8.3 ± 0.4^{b}	$0.23 \pm 0.03/0.55 \pm 0.03$
8	St-Bl	17.0 ± 0.9^{ab}	3.1 ± 0.1^{ab}	4.5 ± 0.4^{c}	9.2 ± 0.3^{bc}	$0.22 \pm 0.01/0.37 \pm 0.02$

V_{max}, maximum rate of acidification; t_{max}, time to reach V_{max}; $t_{pH5.0}$, time to reach pH 5.0; $t_{pH4.5}$, time to complete the fermentation (pH 4.5). Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($P < 0.05$). ± indicates standard deviations with respect to the mean values of quadruplicate runs.

* Values determined from the count graphs with no statistical program. Values on the left refer to St; values on the right refer to the other microorganism present in the co-culture.

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

ARTICLE IN PRESS

Table 2
Kinetic parameters of acidification of milk fermented by pure cultures of *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr), *B. lactis* (Bl) and *S. thermophilus* (St)*.

Run	Culture	V_{max} (10^{-3} pH units/min)	t_{max} (h)	$t_{pH5.0}$ (h)	$t_{pH4.5}$ (h)	t_g (h)*
Milk						
1	St	16.5 ± 0.1^{ef}	3.2 ± 0.0^{a}	5.1 ± 0.1^{a}	11.6 ± 0.0^{a}	0.45 ± 0.02
2	Lb	6.7 ± 0.6^{a}	3.2 ± 0.1^{a}	11.3 ± 0.1^{f}	15.8 ± 0.0^{g}	0.98 ± 0.06
3	La	15.2 ± 0.1^{de}	5.9 ± 0.2^{b}	7.3 ± 0.0^{b}	12.9 ± 0.1^{c}	1.49 ± 0.11
4	Lr	17.8 ± 0.1^{f}	7.1 ± 0.1^{c}	8.4 ± 0.0^{c}	13.8 ± 0.1^{d}	1.01 ± 0.10
5	Bl	10.7 ± 0.1^{c}	10.9 ± 0.1^{e}	12.5 ± 0.1^{g}	16.3 ± 0.0^{h}	0.85 ± 0.06
Milk supplemented with 4 g inulin/100 g						
6	St	15.6 ± 0.1^{de}	3.4 ± 0.0^{a}	4.9 ± 0.1^{a}	11.6 ± 0.0^{a}	0.33 ± 0.03
7	Lb	8.7 ± 0.5^{b}	3.4 ± 0.1^{a}	10.4 ± 0.1^{e}	16.2 ± 0.0^{h}	0.87 ± 0.08
8	La	14.3 ± 0.2^{d}	5.9 ± 0.2^{b}	7.4 ± 0.0^{b}	12.3 ± 0.1^{b}	0.94 ± 0.01
9	Lr	15.7 ± 0.0^{de}	7.3 ± 0.1^{c}	8.8 ± 0.0^{d}	15.0 ± 0.0^{e}	0.93 ± 0.06
10	Bl	15.9 ± 0.3^{de}	9.6 ± 0.1^{d}	10.6 ± 0.1^{e}	15.2 ± 0.1^{f}	0.79 ± 0.05

V_{max}, maximum rate of acidification; t_{max}, time to reach V_{max}; $t_{pH5.0}$, time to reach pH 5.0; $t_{pH4.5}$, time to complete the fermentation (pH 4.5). Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($P < 0.05$). ± indicates standard deviations with respect to the mean values of quadruplicate runs.
*Values determined from the count graphs with no statistical program.

Table 3
Post-acidification (pH) and acidity of milk fermented by co-cultures of *S. thermophilus* with *L. bulgaricus* (St-Lb), *L. acidophilus* (St-La), *L. rhamnosus* (St-Lr) and *B. lactis* (St-Bl) either 1 day after the fermentation was complete (D1) or after 7-day storage at 4 °C (D7).

Run	Co-culture	pH		Acidity (mg lactic acid/100 g)	
		D1	D7	D1	D7
Milk					
1	St-Lb	4.39^{abc}	4.27^{ab}	880^{ab}	1010^{ab}
2	St-La	4.37^{a}	4.27^{ab}	980^{c}	1060^{ab}
3	St-Lr	4.46^{d}	4.35^{b}	900^{ab}	930^{a}
4	St-Bl	4.45^{bcd}	4.31^{ab}	840^{a}	960^{ab}
Milk supplemented with 4 g inulin/100 g					
5	St-Lb	4.37^{a}	4.21^{a}	920^{bc}	1010^{ab}
6	St-La	4.39^{ab}	4.25^{ab}	930^{bc}	1090^{b}
7	St-Lr	4.42^{abcd}	4.33^{b}	890^{ab}	960^{a}
8	St-Bl	4.45^{bcd}	4.32^{b}	850^{a}	950^{a}

Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

V_{max} varied from 6.7×10^{-3} pH units/min (Lb in M) to 17.8×10^{-3} pH units/min (Lr in M), with significant variations for all cultures. Comparing the values of this parameter, it is evident that, with the exception of Lr in the absence of inulin, all the other monocultures showed worst kinetics with respect to their respective co-cultures, confirming the stimulating action of St, with particular concern to the metabolism of Lb (Radke-Mitchell & Sandine, 1986). This bacterium did in fact show the slowest acidification rate alone, whereas it behaved as the best one in co-culture.

Bl lasted the longest t_{max} (10.9 h in M), but it was shown to be the only pure culture on which inulin exerted a statistically significant prebiotic effect (9.6 h in SM). The time to reach pH 5.0 varied from 4.9 h (St in SM) to 11.3 h (Lb in M), and that to complete the fermentation ($t_{pH4.5}$) from 11.6 h (St in SM) to 16.3 h (Bl in M). The higher values of both t_{max} and $t_{pH4.5}$ of pure cultures with respect to co-cultures are consistent with the beneficial effect of *S. thermophilus* on the metabolism of the other bacteria earlier evidenced by V_{max}.

On the other hand, the inulin effect on pure cultures, although significant from the statistical viewpoint, did not provide any clear information, because V_{max} and t_{max} varied from one culture to the other with no significant correlation among them (Table 2).

As shown by the values of the generation time, contrary to observations previously made for bifidobacteria (Martínez-Villaluenga & Gómez, 2007), there was poor correlation between the growth rate and the acidification capacity, likely due to different durations of the lag phases. Nevertheless, inulin supplementation lowered t_g significantly, with particular concern to St and La (by about 30%), which means it exerted a prebiotic effect even in pure cultures. Such a stimulatory effect of inulin on the growth, already observed on bifidobacteria (Akalın et al., 2004; Bruno et al., 2002) and lactobacilli (Desai, Powell, & Shah, 2004), has recently been ascribed to greater release in yoghurt of additional nutrients (Makras, Van Acker, & De Vuyst, 2005) such as amino acids (Donkor et al., 2007) or reduction of a negative environmental impact (Desai et al., 2004). Moreover, the t_g values of all the microorganisms, including St, were appreciably lower in co-cultures and in the presence of inulin, demonstrating the general feature of the above synergism. A value of $t_g = 0.42$ h almost coincident with that obtained in this work in the absence of inulin was reported for St (O'Sullivan & Fitzgerald, 1999; Perrin, Guimont, Bracquart, & Gaillard, 1999). As expected by its hard metabolization of disaccharides (Goldin, 1998), Lr exhibited a very long generation time (1.01 h) that decreased by about 8% in the presence of inulin. Lb showed in M a t_g value close to those reported in the literature in reconstituted nonfat dry milk (0.67–1.30 h) (Radke-Mitchell & Sandine, 1986). As expected from its complex nutritional needs (Du Plessis et al., 1996), La showed the longest t_g in M (1.49 h), which matched the range of values (0.63–2.9 h) reported for reconstituted nonfat dry milk (Chou & Weimer, 1999) and skim milk ultrafiltration rententate (Ordonez et al., 2000). The generation time of Bl was shorter than those reported for different isolates in UHT skim milk ($t_g = 1.51$–1.63 h), which suggests a certain oxygen and acid tolerance (Martínez-Villaluenga & Gómez, 2007). These interesting characteristics render the Bl strain selected for this study suitable for industrial utilization in fermented milk products compared with other bifidobacteria species (Meile et al., 1997).

3.2. Post-acidification and acidity

According to Souza (1991), the acidity of commercial yoghurts is largely variable, ranging from 700 to 1250 mg/100 g of lactic acid or pH 3.7–4.6. Nevertheless, to avoid insipidity or excess acidity to the taste, optimal values should be in the ranges 70–90 mg/100 g and 4.0–4.4, respectively.

Table 4
Post-acidification (pH) and acidity of milk fermented by pure cultures of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) and *B. lactis* (Bl) 1 day after the fermentation was complete (D1) or after 7-day storage at 4 °C (D7).

Run	Culture	pH		Acidity (mg lactic acid/100 g)	
		D1	D7	D1	D7
Milk					
1	St	4.36^{b}	4.26^{b}	940^{e}	980^{c}
2	Lb	4.36^{b}	4.24^{a}	930^{e}	980^{c}
3	La	4.34^{ab}	4.24^{a}	990^{f}	1030^{d}
4	Lr	4.44^{c}	4.32^{d}	890^{d}	970^{c}
5	Bl	4.49^{e}	4.37^{e}	850^{bc}	950^{bc}
Milk supplemented with 4 g inulin/100 g					
6	St	4.36^{ab}	4.27^{b}	940^{e}	970^{c}
7	Lb	4.46^{d}	4.30^{c}	840^{ab}	930^{ab}
8	La	4.34^{ab}	4.24^{a}	1030^{g}	1080^{e}
9	Lr	4.46^{d}	4.33^{d}	880^{cd}	970^{c}
10	Bl	4.50^{e}	4.37^{e}	820^{a}	900^{a}

Different letters in the same column mean statistically significant difference among the values of the same parameter, according to the test of Tukey ($P < 0.05$).

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

ARTICLE IN PRESS

R.P. De Souza Oliveira et al. / LWT - Food Science and Technology xxx (2009) 1–7 5

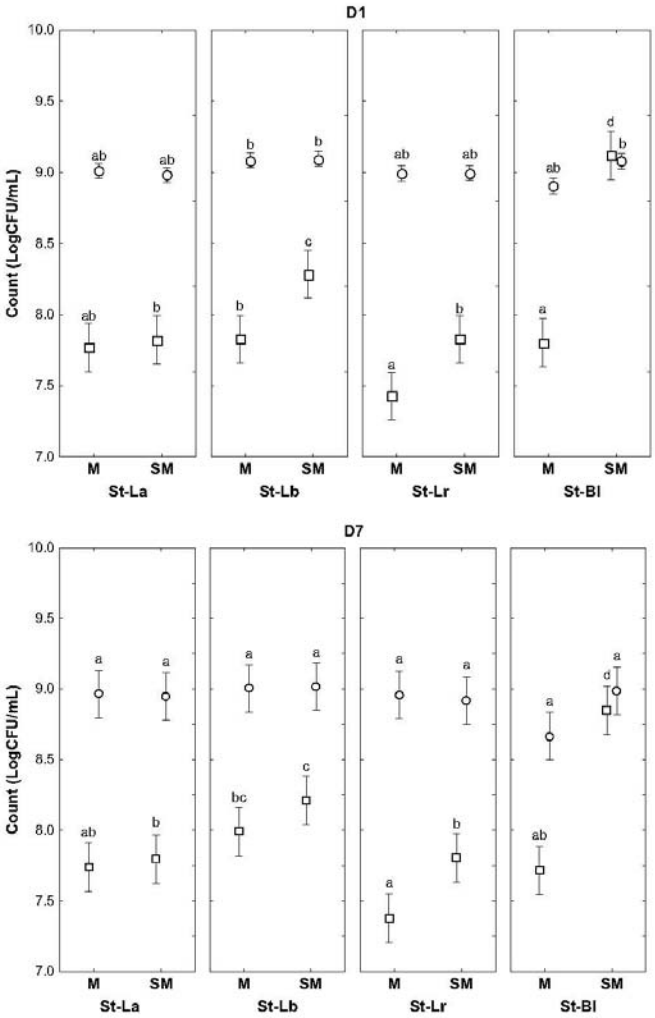


Fig. 1. Effect of inulin addition to skim milk on the counts of *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* or *B. lactis* (□) in co-culture with *S. thermophilus* (○), either 1 day after the fermentation was complete (D1) or after 7-day storage at 4 °C (D7). M, milk; SM, milk supplemented with 4 g inulin/100 g. Error bars represent standard deviations with respect to the mean values of three different dilutions of quadruplicate fermentations.

The results of post-acidification (pH) and acidity (lactic acid content) of milk fermented by the selected bacteria in co-culture with *S. thermophilus* are listed in Table 3 either 1 day after the fermentation was complete (D1) or after 7-day storage at 4 °C (D7). These parameters should be in fact considered as the best criteria to express the acidity of yoghurts (Souza, 1991), and the selected storage times the most suitable ones to investigate the growth dynamics during milk fermentation.

Apart from one case, the variations of pH and lactic acid production consequent to inulin addition or passing from D1 to D7 were not statistically significant. Nevertheless, the overall effects were evaluated making reference to average values gathering all the co-cultures. Cold storage for 7 days led to additional acidification with respect to D1 by 0.11–0.13 pH units, whereas no significant effect was exerted by inulin. These results are in accordance with the acidity due to lactic acid that increased, as an average, by 90–100 mg/100 g passing from D1 to D7.

The values of pH after D1 are not so far from those reported by Moreira, Abraham and Antoni (2000) (3.76–4.39), who analyzed samples of milk fermented by different strains of *L. bulgaricus* and *S.*

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

ARTICLE IN PRESS

thermophilus. Besides, Damin, Almeida, Minowa, and Oliveira (2006) detected average lactic acid concentration in commercial yoghurts (1010 mg/100 g) practically coincident to the average value of this work at D7.

The corresponding results of post-acidification and lactic acid produced by pure cultures of the same microorganisms are listed in Table 4. It should be noticed that results quite coincident to those of the co-cultures were obtained either in terms of pH or of lactic acid. Moreover, the effect of inulin addition was only in a few cases statistically significant, while passing from D1 to D7 led to an average decrease in pH of 0.11–0.12 and increase in acidity of 60–70 mg/100 g.

3.3. Microbiological analysis

Fig. 1 shows the counts in fermented milks of the above lactic bacteria in co-culture with *S. thermophilus*. After D1, the counts of *S. thermophilus* were about 9 LogCFU/ml with no statistically significant effect either of inulin or the co-culture, whereas, apart from La, inulin stimulated significantly the growth of the other lactic bacteria, with particular reference to Bl. Similar stimulation of the growth of *B. bifidum* BB-02 was observed by Ozer, Akın, and Ozer (2005) in milk supplemented with inulin or lactulose. After D7, not only the stimulating effect of inulin on the growth of bacteria other than St was almost completely kept, but, interestingly, the counts of all of them did not decrease significantly compared to D1. This last result, which confirms the stable viability observed by Donkor et al. (2007) for *L. casei* and La during 4 weeks' cold storage in the presence of 5–15 g/l inulin, is of particular significance, taking into account that one of the most important functions of prebiotics is just improving probiotic survival and activity during storage.

Finally, the results illustrated in Fig. 2 demonstrate that none of the above effects observed in co-cultures were confirmed in pure cultures, which means that the prebiotic activity of inulin is exerted only in co-culture with *S. thermophilus*.

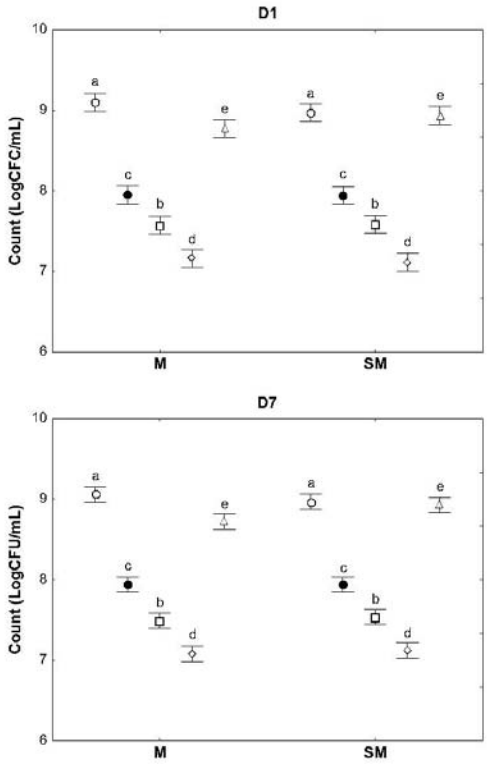


Fig. 2. Effect of inulin addition to skim milk on the counts of pure cultures of *S. thermophilus* (○), *L. acidophilus* (●), *L. bulgaricus* (□), *L. rhamnosus* (◇) and *B. lactis* (△), either 1 day after the fermentation was complete (D1) or after 7-day storage at 4 °C (D7). M, milk; SM, milk supplemented with 4 g inulin/100 g. Error bars represent standard deviations with respect to the mean values of three different dilutions of quadruplicate fermentations.

4. Conclusions

This work dealt with the effects of inulin as a prebiotic to improve the quality of fermented milk by co-cultures of *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus* and *B. lactis* with *S. thermophilus*. The following main conclusions may be drawn from these results. In co-culture, the acidification kinetics was enhanced by inulin addition to the milk, in that it increased the maximum acidification rate and decreased the generation time, the time needed to reach V_{max} and that to complete the fermentation. The addition of inulin also exerted a clear bifidogenic effect. All the microorganisms exhibited better growth and shorter generation time in co-culture rather than in mono-culture, which proves the occurrence of a synergism between the metabolism of *S. thermophilus* and the probiotics. After 7 day storage at 4 °C, the stimulating effect of inulin on the growth of bacteria other than St was almost completely kept, and the counts of all probiotics did not decrease significantly. Contrary to co-cultures, the effects of both inulin and cold storage in pure cultures were not statistically significant.

Acknowledgments

The authors wish to thank FAPESP (Fudação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior, Brazil) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa, Brazil) for financial support.

References[1]

Akalın, A. S., Fenderya, S., & Akbulut, N. (2004). Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International journal of Food Science and Technology, 39*, 613–621.
AOAC. (1995) (13th ed.).*Official methods of analysis, Vol. 2.)* Arlington: Association of Official Analytical Chemistry.
Brizuela, M. A., Serrano, P., & Pérez, Y. (2001). Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 44*, 95–99.
Bruno, A., Lankaputhra, W. E. V., & Shah, N. P. (2002). Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. *Journal of Food Science, 67*, 2740–2744.
Carabin, I. G., & Flamm, W. G. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 30*, 268–282.
Chou, L.-S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus. *Journal of Dairy Science, 82*, 23–31.
Damin, M. R., Almeida, K. E., Minowa, E., & Oliveira, M. N. (2006). Propriedades físico-químicas e viabilidade de *Streptococcus salivarius* subsp. *termophillus* e *Lactobacillus bulgaricus* em diferentes marcas de iogurtes comerciais no período final da vida-de-prateleira. *Revista Leite e Derivados, 94*(Sept.-Oct.), 20–30.
Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starters cultures. *International Dairy journal, 7*, 31–41.

[1] The references preceded by an asterisk are the key references of this work, because they refer to similar milk or conditions, to the same bacteria or to the use of inulin as a prebiotic.

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002

Desai, A. R., Powell, I. B., & Shah, N. P. (2004). Survival and activity of probiotic Lactobacilli in skim m ilk containing prebiotics. *Journal of Food Science, 69*, 57–60.

Donkor, O. N., Nilmini, S. L. I., Stolic, P., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2007). Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal, 17*, 657–665.

Du Plessis, E. M., Dicks, L. M. T., Vescovo, M., Torriani, S., & Dellaglio, F. (1996). *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia, 46*, 319–340.

Gibson, G. R., & Wang, X. (1994). Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters, 118*, 121–128.

Goldin, B. R. (1998). Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition, 80*, S203–S207.

González, B. A., Domínguez-Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). Aloe vera como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, 6*, 152–157.

IDF. (1996). *Preparation of samples and dilutions for microbiological examination, Standard No. 122C*. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (1997). *Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB), Standard of Identity, Standard No. 149A*. Brussels: International Dairy Federation.

IDF. (2003). *Yoghurt/Enumeration of Characteristic Microorganisms, Colony Count Technique at 37°C, Standard No. 117*. Brussels: International Dairy Federation.

Jyoti, B. D., Suresh, A. K., & Venkatesh, K. V. (2004). Effect of preculturing conditions on growth of *Lactobacillus rhamnosus* on medium containing glucose and citrate. *Microbiological Research, 159*, 35–42.

Kailasapathy, K., & Rybka, S. (1997). *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology, 52*, 28–35.

Kimmel, S. A., & Roberts, R. F. (1998). Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology, 40*, 87–92.

Kodaka, H., Mizuochi, S., Teramura, H., & Nirazuka, T. (2005). Comparison of the compact dry TC method with the standard pour plate method (AOAC Official Method 966.23) for determining aerobic colony counts in food samples: performance-tested method[SM]. *Journal of AOAC International, 88*, 1702–1713.

Kristo, E., Biliaderis, C. G., & Tzanetakis, N. (2003). Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of Lactobacillus paracasei. *International Dairy Journal, 13*, 517–528.

Liong, M. T., & Shah, N. P. (2005). Optimization of cholesterol removal, growth and fermentation patterns of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962 in the presence of mannitol, fructo-oligosaccharide and inulin: a response surface methodology approach. *Journal of Applied Microbiology, 98*, 1115–1126.

Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology, 71*, 6531–6537.

Martínez-Villaluenga, C., & Gómez, R. (2007). Characterization of bifidobacteria as starters in fermented milk containing raffinose family of oligosaccharides from lupin as prebiotic. *International Dairy Journal, 17*, 116–122.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy journal, 12*, 173–182.

Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S., & Teuber, M. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Systematic and Applied Microbiology, 20*, 57–64.

Moreira, M., Abraham, A., & Antoni, G. (2000). Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science, 83*, 395–400.

Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: what are they? *Journal of Nutrition, 129*(suppl.7), 1402–1406.

Ordonez, G. A., Fung, D. Y. C., & Jeon, I. J. (2000). Effect of oxyrase (TM) on the metabolic processes of lactic acid bacteria in frozen yogurt mix. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 8*, 71–81.

O'Sullivan, T. F., & Fitzgerald, G. F. (1999). Electrotransformation of industrial strains of Streptococcus thermophilus. *Journal of Applied Microbiology, 86*, 275–283.

Ozer, D., Akın, M. S., & Ozer, B. (2005). Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International, 11*, 19–24.

Perrin, C., Guimont, C., Bracquart, P., & Gaillard, J. L. (1999). Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Current Microbiology, 39*, 342–347.

Piad, R., Samaniego, L. M., Pérez, M., Boucourt, R., Medina, E., Laurencio, M., & Milián, G. (2006). Prebiotic activity of an enzymatic yeast cream hydrolyzate on egg-laying hens productive indicator. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5*, 226–230.

Radke-Mitchell, L. C., & Sandine, W. E. (1986). Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and Lactobacillus bulgaricus. *Journal of Dairy Science, 69*, 2558–2568.

Restle, J., Pacheco, P. S., & Moletta, J. L. (2003). Grupo genético e nível nutricional pós-parto na produção e composição do leite de vacas de corte. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 32*, 585–597.

Roberfroid, M. B. (2000). Defining functional foods. In G. R. Gibson, & C. M. Williams (Eds.), *Functional foods: concept to product. Chap. 1* (pp. 9–27). Boca Raton: CRC.

Roberfroid, M., Van Loo, J. A. E., & Gibson, G. (1998). The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition, 128*, 11–19.

Shah, N. P. (2000a). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science, 83*, 894–907.

Shah, N. P. (2000b). Some beneficial effects of probiotic bacteria. *Bioscience Microflora, 19*, 99–106.

Shah, N. P. (2001). Functional foods, probiotics and prebiotics. *Food Technology, 55*, 46–53.

Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing oligosaccharides and inulin. *Journal of Food Science, 65*, 885–887.

Souza, G. (1991). Fatores de Qualidade do Iogurte. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos (Campinas, Brazil), 21*, 20–27.

Talon, R., Walter, D., Viallon, C., & Berdagué, J. L. (2002). Prediction of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* populations in yoghurt by Curie point pyrolysis-mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods, 48*, 271–279.

Tamime, A. Y. (2005). *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing.

Please cite this article in press as: Ricardo Pinheiro De Souza Oliveira et al., Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with <ce..., LWT - Food Science and Technology (2009), doi:10.1016/j.lwt.2009.01.002