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

Avaliação do perfil de acidificação e viabilidade de bactérias
probióticas em misturas leite-soro para elaboração de bebidas
lácteas utilizando soro de queijo Minas frescal

Keila Emílio de Almeida

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2007

Keila Emílio de Almeida

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira
orientador/presidente

Profa. Dra. Maria Isabel Franchi Vasconcelos Gomes

Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto

Profa. Dra. Deborah Helena Marcowikcs Bastos

Profa. Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes

São Paulo, 20 de dezembro de 2007.

AGRADECIMENTOS

À professora Maricê Nogueira de Oliveira, pelos ensinamentos, apoio e orientação na elaboração deste trabalho.

Aos professores e colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica.

Aos técnicos de laboratório Alexandre Mariani, Ivani e Nilton.

À professora Carmem Tadini e técnicos do laboratório de Engenharia de Alimentos da Poli-Usp.

À professora Maria Isabel Franchi Vasconcelos Gomes e aos técnicos do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Unesp – Botucatu.

Ao Jorge de Lima, pela correção do texto.

A Leila Bonadio pela correção das referências.

À Danisco, pelo fornecimento das culturas lácteas utilizadas neste trabalho.

À Gemacon, pelo fornecimento do preparado de morango utilizado neste trabalho.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e ao CnPq pelo auxílio à pesquisa concedidos.

Agradeço especialmente aos meus pais, pelo incentivo ao estudo, e ao meu marido, pelo amor e companheirismo.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE FIGURAS	V
NOTAÇÃO E NOMENCLATURA	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. O soro de leite	3
2.2. As bebidas lácteas	9
2.2.1. Mercado	9
2.2.2. Definição e legislação	10
2.2.3. Tecnologia de fabricação de bebidas lácteas	11
2.2.3.1. Bebidas lácteas não fermentadas	11
2.2.3.2. Bebidas lácteas fermentadas	16
2.3. Culturas lácteas	20
2.3.1. Culturas de iogurte	20
2.3.2. Culturas probióticas	22
2.3.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	26
2.3.2.2. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	27
2.3.2.3. <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	28
2.4. Crescimento de probióticos no leite	29
2.5. Atividade acidificante de bactérias lácticas	30

3. OBJETIVOS	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. Material	33
4.1.1. Leite	33
4.1.2. Soro	33
4.1.3. Culturas lácticas	34
4.2. Procedimento experimental	34
4.2.1. Planejamento	34
4.2.2. Preparação das misturas leite-soro	37
4.2.3. Preparação do inóculo	37
4.2.4. Fermentação	38
4.2.5. Preparação das bebidas lácteas	39
4.3. Métodos	40
4.3.1. Determinações físico-químicas	40
4.3.1.1. Sólidos totais	41
4.3.1.2. Lactose	41
4.3.1.3. Gordura	41
4.3.1.4. Proteína	41
4.3.1.5. Pós-acidificação	41
4.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos	42
4.3.3. Análises microbiológicas	42
4.3.4. Análise estatística	43
4.3.5. Determinação da vida-de-prateleira das bebidas lácteas probióticas	44
4.3.5.1. Pós-acidificação (pH e acidez total titulável)	44
4.3.5.2. Determinação instrumental da cor	44
4.3.5.3. Reologia	44

4.3.5.4. Viabilidade das bactérias probióticas	45
4.3.5.5. Avaliação sensorial	45
4.3.5.6. Análise estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Composição química da matéria-prima	47
5.2. Efeito da composição da cultura e do pH final da fermentação sobre a cinética de acidificação, a pós-acidificação e a contagem de bactérias probióticas em soro de queijo Minas frescal	49
5.3. Efeito de diferentes combinações de <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> no desenvolvimento de ácido em leite e em misturas leite-soro	59
5.4. Efeito de diferentes níveis de sólidos totais das diferentes bases leite-soro na pós-acidificação e na contagem de microrganismos probióticos	67
5.5. Bebida láctea probiótica elaborada a partir das misturas leite-soro 10% ST e 8% ST (base láctea)	72
6. CONCLUSÕES	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
ANEXO I - Ficha de análise sensorial	
ANEXO II - Termo de Consentimento Livre Esclarecido	

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1. Planejamento experimental para a modelagem da atividade acidificante de bactérias probióticas em soro.	35
Tabela 2. Planejamento experimental para a modelagem da atividade acidificante de bactérias probióticas em misturas leite-soro.	36
Tabela 3. Formulação básica de bebidas lácteas probióticas preparada a partir de misturas leite-soro.	40
Tabela 4. Composição química média das misturas leite-soro.	48
Tabela 5. Parâmetros cinéticos, pós-acidificação (d1) de <i>L. bulgaricus</i> (StLb), <i>Lactobacillus acidophilus</i> (StLa), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (StLr) e <i>B. lactis</i> (StBl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> em soro de queijo Minas frescal.	51
Tabela 6. Parâmetros cinéticos de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr), e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em leite (12%) e misturas a 10% e 8% de sólidos totais.	61
Tabela 7. Parâmetros cinéticos de bebidas lácteas elaboradas com base leite-soro a 10 e 8% adicionadas de açúcar e estabilizante	74
Tabela 8. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas (a^* , b^*) e croma (c^*) nas matérias-primas das bebidas lácteas.	86
Tabela 9. Valores da luminosidade (L^*), das coordenadas de cor (a^* , b^*) e croma (c^*) de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) durante o período de armazenamento refrigerado.	90

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Sistema Cinac (<i>Cinétique d'acidification</i>).	43
Figura 2. Tempo (horas) no qual a velocidade máxima é atingida (t_{vmax}) de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em soro de Minas frescal.	54
Figura 3. Tempo de fermentação (horas) de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em soro de Minas frescal.	55
Figura 4. Efeito do pH de parada da fermentação sobre as contagens de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em soro de Minas frescal.	58
Figura 5. Tempo de fermentação (horas) de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST.	66
Figura 6. Pós-acidificação de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST.	68
Figura 7. Contagens de células viáveis de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST após 24 horas de armazenamento refrigerado.	71
Figura 8. Tempo de fermentação (tpH) de <i>L. bulgaricus</i> (Lb), <i>L. acidophilus</i> (La), <i>L. rhamnosus</i> (Lr) e <i>B. lactis</i> (Bl) em co-cultura com <i>S. thermophilus</i> (St) bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos. Médias ($n = 6$); letras diferentes são significativamente diferentes; $P < 0,05$.	76
Figura 9. Contagens de células viáveis de <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. lactis</i> e <i>L. rhamnosus</i> em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos durante 28 dias de armazenamento.	81
Figura 10. Contagens de células viáveis de <i>S. thermophilus</i> em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos durante 28 dias de armazenamento	82

- Figura 11.** Pós-acidificação em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. 84
- Figura 12.** Variação na acidez Dornic em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 durante o período de armazenamento. Médias (n = 6); $P \leq 0,05$. 85
- Figura 13.** Fotografia das matérias-primas (leite, soro, misturas leite-soro 10% e 8% e preparado de morango) utilizadas para elaboração das bebidas lácteas (BL10 e BL8). 87
- Figura 14.** Variação da coordenada a^* em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 durante o período de armazenamento. Médias (n = 6); $P \leq 0,05$. 91
- Figura 15.** Variação do croma (c^*) em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 e BL8 durante o período de armazenamento refrigerado. Médias (n = 6); $P \leq 0,05$. 92
- Figura 16.** Reograma das bebidas lácteas contendo 8% (BL8) após 21 dias de armazenamento refrigerado. 94
- Figura 17.** Índice de comportamento de escoamento (n) de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Modelo Oswald-de-Waele, ciclo descendente. 95
- Figura 18.** Índice de consistência (k) de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Modelo Oswald-de-Waele, ciclo descendente. 97
- Figura 19.** Viscosidade aparente de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bi) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Dados obtidos antes do cisalhamento. 98

- Figura 20.** Viscosidade aparente de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Dados obtidos após o cisalhamento e a 60 rpm. 99
- Figura 21.** Variação da aparência segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. 102
- Figura 22.** Variação do sabor segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. 103
- Figura 23.** Variação da consistência segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. 104

NOTAÇÃO E NOMENCLATURA

°C	Graus Celsius
°D	Graus Dornic
a*	Parâmetro CIELAB (vermelho)
b*	Parâmetro CIELAB (amarelo)
BI	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
BL10	Bebida láctea contendo 10% de sólidos lácteos
BL8	Bebida láctea contendo 8% de sólidos lácteos
c*	Croma
Cinac	<i>Cinetique d' Acidification</i>
d1, d7, d14, d21, d28	dias de armazenamento
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
k	Índice de consistência
L*	Luminosidade
La	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Lb	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Lr	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
Mistura leite-soro 10%	Mistura contendo 10% de sólidos totais
Mistura leite-soro 8%	Mistura contendo 8% de sólidos totais
mPa	mili Pascal
n	Índice de comportamento de escoamento
pH_{Vmax}	pH no qual V _{max} é atingida
ppm	parte por milhão
rpm	Rotação por minuto
St	<i>Streptococcus thermophilus</i>
ST	Sólidos totais

t_{pH 5,0}	tempo para atingir pH 5,0
t_{pH 5,5}	tempo para atingir pH 5,5
ton	Tonelada
t_{pH 4,5}	tempo para atingir pH 4,5
t_{Vmax}	tempo para atingir a velocidade máxima de acidificação
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
upH	Unidades de pH
upH/min	Unidades de pH por minuto
V_{max}	Velocidade máxima de acidificação

RESUMO

A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas envolve a mistura de leite e soro, podendo ser fermentada por bactérias do iogurte ou probióticas e adicionada de polpa de fruta e outros aditivos permitidos. O produto final deve conter bactérias lácticas viáveis em número adequado. Os objetivos deste trabalho foram desenvolver bebidas lácteas probióticas a partir das misturas leite-soro e estudar sua vida-de-prateleira. O efeito da composição da cultura probiótica (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) e o efeito do pH final da fermentação na cinética de acidificação, pós-acidificação e contagem de bactérias probióticas foram estudados em soro de queijo Minas frescal e em diferentes misturas leite-soro. Bebidas lácteas probióticas foram desenvolvidas a partir das diferentes misturas leite-soro e a vida-de-prateleira foi determinada ao longo de 28 dias de armazenamento do produto a 4°C. As características dos produtos foram seguidas pelas determinações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. O soro apresentou efeito positivo sobre a velocidade máxima das co-culturas estudadas, bem como as diferentes composições das co-culturas influenciaram o parâmetro estudado. Todas as culturas apresentaram contagens maiores em pH final de fermentação 4,5, quando comparadas às obtidas em pH 5,5. A co-cultura StLb foi a mais rápida a fermentar os diferentes meios estudados e, a StLr, a mais lenta. Com a adição de açúcar e de estabilizante, os parâmetros cinéticos mostraram comportamento diferenciado daqueles obtidos em misturas leite-soro. Nas bebidas lácteas, as contagens de *B. lactis* mantiveram-se acima do limite exigido pela legislação até 28 dias de armazenamento do produto refrigerado. A pós-acidificação, cor e reologia variaram durante o período de armazenamento, influenciando a análise sensorial, cujos atributos obtiveram maior aceitação em bebidas elaboradas com 10% de sólidos lácteos. Os resultados indicaram que a bebida láctea elaborada com a co-cultura StBl foi a melhor alternativa para desenvolvimento de uma bebida funcional com boas características sensoriais.

Palavras-chave: soro, bebida láctea, probióticos, acidificação, vida-de-prateleira

ABSTRACT

The technology of production of lactic beverages involves the mixture of milk fermented by yoghurt or probiotic bacteria and whey in appropriate proportions, and the addition of fruit pulp and other allowed additives. The final product should contain viable lactic bacteria in appropriate counts. The objective of this work was to develop a probiotic lactic beverage from milk-whey mixtures and to study its shelf-life. The effect of the composition of the probiotic culture (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in co-culture with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) and the effect of the pH of the end of fermentation in the acidification kinetics, post-acidification and counts of probiotic bacteria were studied in Minas frescal cheese whey and in different mixtures milk-whey. Probiotic lactic beverages were developed from different milk-whey mixtures and the shelf-life was determined along 28 days of storage of the product at 4°C. The characteristics of the products were followed by determination of post-acidification, total acidity, color, rheology, probiotic viability and sensorial analysis. Whey presented positive effect on maximum acidification rates of the studied co-cultures, as well as the different compositions of the co-cultures influenced the studied parameter. All cultures presented higher counts when fermentation was stopped at pH 4.5, when compared to pH 5.5. The co-culture StLb presented the fast acidification performance while StLr, the slowest. The addition of sucrose and stabilizer affected the acidification kinetic parameters. In probiotic lactic beverages, counts of *B. lactis* were higher than the limit required by the legislation until 28 days of cool storage of the product. The post-acidification, color and rheological parameters varied during shelf-life, influencing the sensorial analysis, whose attributes obtained higher acceptance in the elaborated beverage with 10% of total solids. The results indicated that the lactic beverage elaborated with the co-culture StBl was the best alternative for development of a functional lactic beverage with good sensorial characteristics

Key-words: whey, lactic beverage, probiotics, acidification, shelf-life

1. INTRODUÇÃO

Bebidas lácteas fermentadas correspondem a uma série de produtos, incluindo aqueles preparados com leite fermentado e soro. A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas envolve a mistura de leite fermentado por bactérias do iogurte e soro líquido, em proporções adequadas, e a adição de polpa de fruta e outros aditivos permitidos. O produto final deve conter bactérias lácticas em número adequado e viáveis.

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando são consumidos, agem no trato gastrointestinal do organismo hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal. Considerando, como é admitido comumente, que a fermentação pode melhorar a digestibilidade de alimentos e produzir vitaminas e co-fatores nos produtos alimentícios, existem atualmente trabalhos científicos que permitem afirmar que as bactérias probióticas têm efeito benéfico na saúde humana.

Diversos estudos publicados descrevem a acidificação de bactérias probióticas em leite. Porém, existem poucos dados na literatura, até o presente, sobre o perfil de acidificação de bactérias probióticas em soro e na mistura leite-soro. Portanto, a modelagem do efeito do teor de sólidos totais e do valor de pH de término da fermentação sobre a cinética de acidificação, pós-acidificação e contagem de bactérias probióticas é indispensável. A utilização do soro como matéria-prima, além de seu valor nutricional, é importante na redução do impacto ambiental que este pode causar. Adicionalmente, a fermentação da mistura leite-soro por bactérias do iogurte e pelas probióticas pode facilitar a tecnologia de fabricação de bebidas lácteas.

A preparação de bebidas lácteas funcionais de baixo custo, com boas características físico-químicas e sensoriais e com a adição de bactérias probióticas viáveis, é passível de ser obtida. O desenvolvimento deste produto tem importantes alcances nutricionais e econômicos. Enfim, o conhecimento da vida-de-prateleira de bebidas lácteas contendo probióticos e dos efeitos que a afetam é relevante, pois existem indicativos que vários fatores, dentre os quais o teor de sólidos e o valor de pH do produto, afetam a viabilidade das bactérias probióticas em bebidas lácteas (OLIVEIRA et al., 2002b).

Face ao exposto, este trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Inicialmente, estudou-se o efeito da composição da cultura de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e o efeito do pH final da fermentação sobre a cinética de acidificação, pós-acidificação e contagem de bactérias probióticas em soro de queijo fresco e em diferentes misturas leite-soro. A seguir, as bebidas lácteas probióticas foram desenvolvidas a partir das misturas leite-soro. Finalmente, a vida-de-prateleira das bebidas desenvolvidas foi determinada, estudando-se suas características físico-químicas (pós-acidificação, acidez total titulável, cor e reologia), viabilidade dos microrganismos probióticos e análise sensorial ao longo de 28 dias de armazenamento do produto a 4°C.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O soro de leite

A indústria queijeira produz, a partir do leite, diversos tipos de queijos. No entanto, estes não contêm todos os componentes do leite, pois uma parte é perdida num produto de segunda transformação denominado soro de leite ou lactosoro. O soro constitui-se, assim, um subproduto da indústria de queijo e de caseína. O Brasil não dispõe, atualmente, de dados oficiais sobre a produção de queijos, dada a configuração do mercado produtor, onde proliferam centenas de microlaticínios que atuam regionalmente e, muitas vezes, fora do âmbito do Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assim, os dados aqui apresentados referem-se tão somente à produção dos estabelecimentos registrados no SIF, o que representa, conforme projeções feitas por especialistas, apenas 60% do mercado total. Estima-se que para cada dez litros de leite coagulado na fabricação de queijo se produza cerca de seis a nove litros de soro, dependendo do tipo de queijo. Levando-se em consideração que a produção de queijos em 2006, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2006), atingiu a cifra de 572 mil ton/ano, isto corresponde a 4.576 mil ton de soro de queijo. Esta quantidade equivale a aproximadamente 27,47 mil ton de sais minerais, 41,18 mil ton de proteínas, 13,73 mil ton de gordura e 228,80 mil ton de lactose (informação pessoal¹).

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Mercado brasileiro de queijos**. 2006. n.p.

Em 1993, considerava-se que apenas 6% do total de soro líquido produzido era transformado, pelas indústrias registradas no SIF, visando a produção de soro em pó. Isto representa cerca de 70.000 toneladas de soro fluido, sendo o restante, portanto, descartado (NEVES, 1993). Num estudo em indústrias de laticínios do Paraná, constatou-se que 50% das empresas fazem doação do soro para alimentação animal, 25% comercializam este derivado lácteo e 6,3% utilizam processos de evaporação e secagem. Entretanto, 12,5% ainda consideram o soro como resíduo (GIROTO; PAWLOWSKY, 2002). Segundo Silva et al. (2006), as linhas de produção de queijo mussarela, queijo frescal e requeijão geram a maior carga específica (kg de DQO/m³ de leite processado) dentro de um laticínio em razão do descarte direto do soro no efluente.

Em muitos laticínios, o soro é descartado junto aos efluentes líquidos, sendo considerado um forte agravante, em razão de seu elevado poder poluente. Esta descarga constitui perda significativa de alimento potencial e também de energia. Por outro lado, por possuir significativa quantidade de matéria orgânica em sua composição, apresenta altos valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), representando um sério poluente, pois a DBO de um litro de soro se situa entre 30 e 50.000 ppm e necessita, portanto, de 4.500 litros de água não poluída para sua completa assimilação (MUKHOPADHYAY et al., 2003). O custo do tratamento do soro antes de ser enviado aos mananciais é muito grande. Uma planta com produção de 300 mil litros de soro/dia polui o equivalente a uma cidade de 150 mil habitantes. Atualmente, constitui prática ilegal descartar o soro, direta e indiretamente, nos cursos de água (MACHADO et al., 2002).

Ponsano et al. (1992) salientam que vários são os fatores que levam atualmente a indústria queijeira a considerar as possibilidades de aproveitamento do

soro de leite. O aumento da produção de queijos traz como consequência o aumento na produção de soro de leite. A crescente falta de alimentos que ameaça o mundo é uma realidade em populações pobres de diversos países, incluindo o Brasil, tornando-se inadmissível considerar o soro de leite como dejetos industriais. O valor nutricional do soro de leite e a despesa necessária para seu tratamento – caso seja considerado efluente – faz com que as técnicas que permitem sua transformação em um produto com valor comercial tornem-se cada vez mais atraentes.

Segundo Mello (1989), existe no mundo grande deficiência calórico-protéica, especialmente nos países do Terceiro Mundo, onde proteínas de origem animal são particularmente caras e seu suprimento para a população é um problema.

A utilização do soro “*in natura*” para alimentação animal (suínos e bovinos) é muito restrita, devido ao custo de transporte, à facilidade do soro fermentar e ao limite que cada animal pode consumir (NEVES, 1993).

A relação custo/benefício favorável é uma das principais razões para o uso desses produtos em muitos alimentos, uma vez que os atributos qualitativos, tais como o realce de sabor e a funcionalidade, justificam a aplicação em quantidades ótimas em qualquer tipo de fórmula.

Muitas estratégias de utilização do soro envolvem fracionamento e recuperação dos componentes, como proteína e lactose, para posterior processamento ou secagem, porém o problema é seu baixo teor de sólidos, que dificulta e reduz a eficiência de processamentos (GALLARDO-ESCAMILA; KELLY; DELAHUNTY, 2005).

A importância do soro utilizado como matéria-prima ou ingrediente, na produção de bebidas lácteas, tem sido, por diferentes motivos, estudada por pesquisadores. Segundo Hoffman et al. (1997), bebidas lácteas são produtos

formulados contendo iogurte, soro de leite, polpa de frutas e outras matérias-primas e aditivos.

Para os laticínios, a conversão do soro líquido em bebidas (fermentadas ou não) é uma das mais atrativas opções. Isto se deve à simplicidade do processo e à utilização de equipamentos de beneficiamento do leite, além das excelentes propriedades funcionais das proteínas do soro (GANDHI; PATEL, 1994), pois, segundo Doral, Akila e Sivakumar (2007), o soro retém 55% dos nutrientes do leite, metade das cinzas e $\frac{1}{4}$ do teor de proteína.

Segundo Chiappini et al. (1995), com o emprego cada vez maior do soro como ingrediente em produtos alimentícios é necessário o controle higiênico e sanitário do mesmo para que não se torne, além de carreador de nutrientes, um veiculador de microrganismos nocivos à saúde do consumidor.

Ottogalli (1986) descreveu a dinâmica da microbiota durante a fabricação do queijo, desde o momento da pasteurização do leite até a fase de separação da coalhada e do soro. Uma série de condições pode influenciar na quantidade de microrganismos do soro, principalmente na fase final, quando parte da microbiota permanece no mesmo.

A composição do lactosoro varia segundo a origem. A faixa de variação da matéria seca total é de 50 a 60 g/l, sendo representada por 39 a 48 g/l de lactose, 1 a 8 g/l de ácido láctico, 0,5 a 3 g/l de matéria graxa, 3 a 6 g/l de sais minerais e 6 a 8 g/l de matéria nitrogenada (BOUDIER et al., s.d.).

A lactose é o componente presente em maior porcentagem na porção sólida do soro de leite, sendo responsável pelo sabor adocicado do soro fresco. É um dissacarídeo encontrado exclusivamente no leite, constituído de quantidades equimolares de galactose e glicose.

As proteínas constituintes do soro de leite são predominantemente a β -lactoglobulina, a α -lactoalbumina, as lactoglobulinas (imunoglobulinas) e a soro albumina bovina. Além destas, existem, ainda, várias outras proteínas coletivamente denominadas “proteose-peptona”, muitas das quais são resultantes da proteólise da caseína (MULVIHILL, 1987). Deve-se observar que as frações β -lactoglobulina e α -lactoalbumina são bem ricas em aminoácidos importantes do ponto de vista nutricional (ADRIAN, 1973).

A β -lactoglobulina representa 50% das proteínas do soro de leite bovino. Esta proteína liga cálcio e zinco e sua cadeia possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lipídios que podem ser usados para incorporar tocoferol (vitamina A) em produtos com baixo teor de gordura.

A α -lactoalbumina representa 25% do teor protéico do soro de leite bovino e 28% do teor de proteína do leite humano. A adição de α -lactoalbumina tem sido defendida como forma de tornar formulações infantis similares ao leite humano e criar produtos para pessoas que podem ingerir uma quantidade limitada de proteínas.

Ferreira et al. (1996) consideram que as lactoalbuminas e lactoglobulinas são comparáveis às proteínas da gema do ovo, apresentando Índice de Eficiência Protéica (IEP) de 3,2, comparado ao valor 2,5 da caseína. Proteínas com IEP acima de 2,5 são consideradas proteínas de alta qualidade. A proteína do soro é considerada excelente do ponto de vista nutricional, pois quase todos os tipos de aminoácidos presentes no soro doce superam as doses diárias mínimas de nutrientes recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO), tanto para crianças entre dois a cinco anos de idade, quanto para adultos. No caso de

adultos, as proteínas do soro oferecem mais que o dobro dos padrões recomendados como dose diária (USDEC, 2001). Essas proteínas são também indicadas em dietas para atletas que desejam aumentar o ganho de massa muscular, sendo empregadas em diversas formulações já existentes no mercado (SANTOS; FERREIRA, 2001).

Segundo Boire et al. (1997), as proteínas do soro não sofrem alterações conformacionais pelos ácidos estomacais. Ao atingirem o intestino delgado são rapidamente digeridas e seus aminoácidos absorvidos, elevando a concentração aminoacídica do plasma e estimulando a síntese de proteínas nos tecidos.

A albumina sérica e as imunoglobulinas são consideradas proteínas menores ou secundárias por estarem presentes em quantidades muito pequenas. A albumina sérica liga ácidos graxos e outras moléculas pequenas. As imunoglobulinas incluem IgG1, IgG2, IgA e IgM, as quais reforçam a imunidade de crianças e outros consumidores. As imunoglobulinas são encontradas no colostro em concentrações maiores que em leite comum.

Em 100g de matéria seca do soro pode-se encontrar diferentes elementos minerais, cujos teores médios são os seguintes: cálcio (500 a 725 mg), sódio (650 a 950 mg), potássio (2.400 a 2.900 mg), magnésio (80 a 160 mg), fósforo (700 a 800 mg) e cloro (1.500 a 1.800 mg).

As vitaminas do soro são, em sua maioria, hidrossolúveis, uma vez que a matéria graxa é quase totalmente eliminada, arrastando consigo as vitaminas lipossolúveis. Entre as vitaminas presentes notam-se quantidades importantes de riboflavina (B₂), ácido pantotênico, tiamina (B₁) e piridoxina (B₆).

Certa quantidade de lipídeos do leite é arrastada no lactosoro bruto. Entretanto estas quantidades normalmente são pequenas, pois em muitos laticínios

o soro é desnatado para recuperação da matéria graxa para elaboração de manteiga.

2.2. As bebidas lácteas

2.2.1. Mercado

A produção de leites fermentados no Brasil, especialmente de bebidas lácteas, vem crescendo significativamente e o futuro aponta para o desenvolvimento das bebidas funcionais, com a incorporação de microrganismos probióticos. Segundo Dahm e Fuhrman (2006), a inclusão de culturas probióticas em bebidas lácteas está sendo bem-sucedida, uma vez que os consumidores estão prontos pra aceitar o conceito probiótico. Leites fermentados e outras bebidas lácteas probióticas são alimentos tradicionais no mercado europeu e asiático e os consumidores estão familiarizados com os benefícios relacionados ao consumo de probióticos.

Em outros países, o mercado está mais desenvolvido. A União Européia, por exemplo, tem investido mais de US\$19 milhões em pesquisas em alimentos contendo probióticos (ABBOTT, 2004). Segundo Gallardo-Escamilla et al. (2007), pesquisas demonstram que houve aumento significativo no consumo de bebidas lácteas, leites fermentados e iogurte líquido. O crescimento no mercado de bebidas de iogurte em 2000 chegou a 270% (JELEN; GALLMANN; COOLBEAR, 2003). Segundo ACNielsen (2002), bebidas lácteas e iogurtes líquidos compõem uma das categorias com crescimento mais rápido no mundo, devido ao lançamento de diversos novos produtos, sabores e embalagens inovadoras. Com mais alternativas de bebidas lácteas e de soja entrando no mercado, esta categoria combinada apresentou significativa atividade de novos produtos. Ainda nesta pesquisa de

mercado, foi constatado que os consumidores estão procurando produtos mais saudáveis e inovadores, que sejam seguros e de fácil utilização.

As principais regiões consumidoras de bebidas lácteas no Brasil são as regiões Sul e Nordeste e o estado de São Paulo. Desde 1994 as bebidas lácteas têm tido lugar destacado no mercado brasileiro. Tamime (1997) considerou um incremento notável do consumo de bebidas lácteas fermentadas que se caracterizam por apresentar baixa viscosidade e são consumidas como bebidas suaves e refrescantes.

Em 1996 ocuparam 33% da categoria de lácteos fermentados. As classes que mais consomem esse tipo de produto no Brasil são a D e E, representando 36,4% do mercado consumidor, seguidas pela classe C (32,5%). A faixa etária que aceita bem o produto é de 3 a 12 anos. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ, 2003), a produção de bebidas lácteas em 2002 foi de 57.561 ton (informação pessoal ²). O consumo de iogurte e afins aumentou 702% no período de 1974 a 2003 (CONSUMO..., 2007). Na Europa, em países como França, Suécia e Holanda, o consumo é duas vezes maior que no Reino Unido, sendo que as mulheres consomem mais iogurtes que os homens (MCKINLEY, 2005).

2.2.2. Definição e legislação

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea, bebida láctea é o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*,

² ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Mercado brasileiro de queijos**. 2003. n.p.

pasteurizado, esterilizado, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% da massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (BRASIL, 2005).

Bebida láctea fermentada é o produto conforme descrito acima, fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos e/ou adicionado de leite(s) fermentado(s) e que não pode ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. Nesta categoria, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

2.2.3. Tecnologia de fabricação de bebidas lácteas

2.2.3.1. Bebidas lácteas não fermentadas

Quando se refere às bebidas lácteas, Brandão (1994) considera que a mais simples é aquela que é obtida após a adição de sabores (base de frutas e aromas, por exemplo) e outros ingredientes, incluindo ácidos, açúcar, corantes e estabilizantes. Esta bebida pode ser pasteurizada ou esterilizada.

Porém, há hoje no mercado a mistura simples de leite e soro, vendida como substituta do leite.

Bebidas esportivas ou energéticas são opções promissoras para utilização do soro (DRYER, 2006). Segundo o autor, inovações de bebidas com soro surgem com

as seguintes características: com suco, isotônico esportivo contendo soro, mistura de soro e chá, adoçada com lactose e aquela para controle de peso.

A mistura de soro de queijo com suco de frutas também é muito utilizada. Sahu, Patel e Choudhary (2005) testaram a combinação de 12% de polpa de manga, 8% de açúcar, 48% de água, 32% de soro e 1,50% de erva cidreira. Essa combinação foi a mais aceitável sensorialmente e apresentou vida-de-prateleira alta, provavelmente em função da erva cidreira, a qual tem propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

Pifarre et al. (2006) testaram a aceitação e a qualidade nutricional de uma bebida elaborada à base de suco de laranja e soro de leite. Bebidas à base de soro são de grande valor dietético, fácil digestão, leves e agradáveis para serem consumidas (PIEN, 1970). Neste sentido, Mohebbi e Najafi (2004) fizeram análise sensorial de 27 formulações de bebidas usando três tipos de concentrados de frutas (laranja, *grape* e *sour cherry*) e três quantidades diferentes de açúcar. Numa segunda fase, a bebida selecionada como a mais aceitável foi produzida por aquecimento dos ingredientes a 90 °C por 10 minutos e estocada em embalagens flexíveis à temperatura ambiente e sob refrigeração. Os resultados mostraram que houve diferença significativa do valor de pH final das amostras conservadas em temperatura ambiente e sob refrigeração.

Shukla e Sing (2004) testaram misturas de suco e de polpa de maçã, goiaba, banana, lichia e manga a quatro diferentes níveis (10, 20, 30 e 40%) com soro de queijo e leite. A bebida melhor avaliada contendo 20% de suco de maçã em soro foi liofilizada. A liofilização não alterou a qualidade e parâmetros de composição.

Uma bebida de soro de queijo *Paneer* foi desenvolvida por Sing, Kapoor e Srivasta (1999) utilizando extrato de goiaba de diferentes variedades e adicionado

de corantes diversos. A melhor nota foi obtida com a bebida elaborada com a variedade de goiaba Banarsi, com 8% de açúcar e corante verde.

Soro ácido de queijo Chhana foi utilizado para elaboração de bebidas com preparação de frutas. A bebida preparada com manga foi aquela de melhor aceitação, enquanto a de abacaxi obteve o menor resultado. Foi observada separação de gordura nas bebidas elaboradas com soro não centrifugado. A centrifugação não apenas eliminou esse problema como também aumentou a aceitabilidade da bebida (YALCIN; WADE; HASSAN, 1994).

Uma cooperativa na Suíça desenvolveu uma bebida de soro chamada Freshi. O produto foi feito com 50% de soro, além de açúcar, água e aromas naturais de laranja, limão e pomelo. A bebida foi pasteurizada a 90 °C e, por causa da baixa acidez do produto, uma esterilização de baixa temperatura foi empregada. A vida-de-prateleira da bebida, sem refrigeração, foi de seis meses (DODDS, 1989).

Miglioranza et al. (2003) utilizaram bebidas de soro para veicular ferro e estudar os efeitos sobre a anemia em uma determinada população. Bebidas com polpa de morango e ainda fortificadas com glicinato de ferro foram elaboradas e administradas a crianças e adolescentes, os quais tiveram a taxa de hemoglobina medida por um ano. Concluiu-se que houve acentuada redução de anemia na população depois da administração por tempo prolongado.

Uma bebida funcional contendo soro e óleo de linhaça foi desenvolvida por Liutkevicius, Tamulionyte e Sekmokiene (2007). Os impactos dos fatores tecnológicos sobre a qualidade funcional do produto foram avaliados. As bebidas apresentaram ácido láctico L(+), o qual possui impacto favorável na saúde humana.

Bebidas achocolatadas elaboradas com soro são muito comuns na literatura e no mercado. Até hoje, no Brasil, quando se fala em bebida láctea não fermentada,

se refere, praticamente, aos achocolatados. O mercado experimentou crescimento significativo (85,8 %) na década passada. São produtos consumidos principalmente no café-da-manhã, no lanche ou como integrante da merenda escolar (BRANDÃO, 1994).

Os achocolatados líquidos pasteurizados ou esterilizados com vida-útil variável em embalagens cartonadas, garrafas plásticas e saquinhos plásticos têm sido introduzidos lentamente no mercado brasileiro. O produto “Candi Nectar”, registrado no Ministério da Agricultura e produzido pela EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) é um exemplo desse tipo de bebida (Neves, 1993). Trata-se de um produto preparado com a mistura de soro, leite, açúcar, cacau e estabilizante. Sua composição média é 2,1% de proteínas, 1% de gordura e 13,1% de extrato seco total. Após a separação do soro, este é filtrado e resfriado, antes de ser misturado aos outros ingredientes. A mistura então é pasteurizada a 75 °C por 15 segundos, resfriada a 5 °C e embalada em sacos plásticos para ser distribuída em creches, escolas, orfanatos e asilos em Juiz de Fora, MG.

Uma bebida achocolatada foi preparada usando 55% de soro e 45% de leite, adoçada a 6% (JOKAR; GOLMAKANY; KARBASI, 2007). Esse *blend* foi misturado a cacau em pó, baunilha, leite em pó e creme de leite. A mistura foi pasteurizada, resfriada e analisada, tendo boa aceitabilidade.

Magalhães et al. (1996) desenvolveram uma bebida láctea achocolatada (mistura de soro e leite integral em pó). Os melhores resultados foram obtidos pela mistura de 500 gramas de leite em pó, 650 gramas de soro em pó, 16 gramas de estabilizante, 750 gramas de açúcar, 180 gramas de cacau alcalinizado em pó e 2,0 gramas de cloreto de sódio, dissolvidos em 9,5 kg de água.

Alvarez, Ji e Balakrishnan (2003) substituíram leite desnatado por soro ácido em uma formulação de leite achocolatado. O soro foi neutralizado com hidróxido de cálcio até pH 5,8, misturado com açúcar, estabilizante, cacau em pó, leite desnatado e creme. A mistura foi pasteurizada a 74 °C por 30 segundos e homogeneizada a 70,31 kgf/cm². Amostras com 30 e 40% de soro apresentaram baixa sinerese, enquanto as amostras com 10 e 20% obtiveram aceitação igual ao leite achocolatado controle.

Outra bebida achocolatada à base de soro e pasta de soja foi desenvolvida por Paz-Frassino et al. (1998), diluindo pasta de soja em soro doce, ajustando o pH para 5,5, 6,0 e 6,5. Em seguida, açúcar, chocolate, sal e estabilizantes foram adicionados e a mistura foi homogeneizada.

Bebidas com alto teor de proteínas podem ser produzidas a partir de soro concentrado por ultrafiltração ou soro em pó.

Uma bebida desenvolvida pela EPAMIG – CEPE/ILCT foi produzida a partir de concentrado de proteínas de soro, empregando a técnica de ultrafiltração em membranas semipermeáveis. O concentrado foi obtido com um teor de aproximadamente 35% de proteínas no extrato seco total. O concentrado por ultrafiltração foi acidificado biologicamente e adicionado de cacau ou sucos de frutas. As bebidas foram submetidas à avaliação sensorial e a bebida achocolatada foi a que teve maior aceitação (NEVES, 1993).

Sensidoni et al. (1995) estudaram a formulação de uma bebida à base de suco de kiwi e soro em pó. Verificaram que, após um mês de conservação a 4 °C, o teor de vitamina C continuava relativamente elevado.

O permeado de soro (PS) é um subproduto da produção de proteína de soro que contém, primariamente, água, lactose, minerais e um mínimo de gordura e de

proteína. Para utilizar o permeado de soro de queijo Cheddar, Suresh e Jayaprakasha (2004) hidrolisaram a lactose presente no permeado, adicionaram 8% de açúcar e 0,1% de ácido cítrico. A carbonatação aumentou as propriedades sensoriais da bebida hidrolisada. Os resultados indicaram que a utilização do permeado de soro para preparação de bebidas lácteas pode ser uma das melhores maneiras de aproveitar os sólidos do permeado para alimentação humana.

Beucler, Drake e Foegeding (2005) avaliaram organolepticamente a substituição de teores de água por permeado de soro em formulações comerciais de bebidas. Formulações elaboradas com baixos níveis de PS obtiveram nota similar às comerciais em itens como propriedades visuais e aromáticas.

2.2.3.2. Bebidas lácteas fermentadas

O consumo de leites fermentados remonta quase que desde a origem da civilização humana. No entanto, somente após a II Guerra Mundial é que os leites fermentados, principalmente o iogurte, passaram a ser produzidos em escala industrial, conquistando grande parte da população mundial. No princípio do século XX, o microbiologista russo Elif Metchnikoff propôs uma teoria sobre o prolongamento da vida a partir da ingestão destes tipos de produto baseada nos povos dos Bálcãs – que têm grande consumo diário de leites fermentados. Desde então, muitos pesquisadores têm estudado os microrganismos usados na produção de leites fermentados tradicionais e de novos produtos e seus efeitos sobre o metabolismo humano e animal (FERREIRA, 1997).

Muitos produtos alimentícios devem sua produção e características à atividade de microrganismos. Alguns destes, como iogurtes e bebidas lácteas, têm vida-de-prateleira consideravelmente mais prolongada que as matérias-primas com

as quais foram elaborados. Todos os alimentos fermentados têm um aroma e sabor característicos, que provêm direta ou indiretamente dos microrganismos fermentadores (GAVA, 1979).

O ácido láctico formado pelo processo de fermentação produz, nos alimentos, transformações que são consideradas como benéficas. Como exemplos de transformações favoráveis estão as que se verificam no leite, possibilitando a produção de derivados com excelentes qualidades organolépticas (GRANDI, 1983).

A fermentação do soro, dependendo dos microrganismos, pode produzir diferentes compostos. Dentre as substâncias possíveis de serem produzidas encontram-se proteínas unicelulares, ácido láctico, álcool etílico, riboflavina, vitamina B₂, metano, antibióticos, enzimas e bebidas lácteas fermentadas, entre outros (BRANDÃO, 1994).

Paraskevopoulou et al. (2003) avaliaram polissacarídeos como estabilizante em uma bebida elaborada utilizando soro de queijo, frutose, extrato de uvas e grãos de *kefir*. Foram adicionados 20% de leite à mistura para aumentar as propriedades sensoriais e reológicas. Para evitar a coagulação e sedimentação da caseína presente, goma xantana, goma guar e pectina com alto grau de metoxilação foram avaliadas como estabilizante. Os resultados de reologia revelaram que o melhor estabilizante para essa tecnologia foi a goma xantana.

Outra pesquisa desenvolvida por Ismail et al. (1992), apresentou uma bebida de soro com *kefir*, feita a partir de soro tratado a 90 °C por 30 minutos sendo incubada à temperatura ambiente com 1 a 5 grãos de *kefir* r por 100 ml sob agitação contínua.

Os microrganismos mais usados para a fabricação de bebidas lácteas são o *Streptococcus salivarius thermophilus* e o *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Uma

bebida foi desenvolvida na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) utilizando-se soro adicionado de 10% de açúcar. Após pasteurização a 80 °C/20 min, cerca de 2% de cultura foram adicionados e o material foi incubado a 45 °C durante 3,5 horas aproximadamente. Completada a fermentação, procedeu-se o resfriamento em água gelada. Testes de aceitabilidade demonstraram a possibilidade desse produto vir a ser industrializado.

Kar e Misra (1999) prepararam uma bebida a partir de soro de queijo e cultura de iogurte. O produto, armazenado até cinco dias em refrigeração, apresentou características organolépticas aceitáveis e microrganismos em quantidade adequada.

Na preparação de uma mistura, utilizando 82% de soro líquido e leite em pó, submetida à fermentação de forma semelhante à do iogurte, obteve-se um produto de sabor, aroma, consistência, textura e aceitabilidade excelentes (KRISHNA; RAO; RAO, 1984).

Salminen et al. (1991) citaram dois produtos feitos com o *Lactobacillus* GG como ingrediente. Elaborada a partir de soro de queijo com lactose hidrolisada, a bebida láctea foi adicionada de frutose e aromas de frutas e fermentada com o *Lactobacillus* GG (*Lactobacillus casei* spp *rhannosus strain* GG). O leite fermentado Gefilus é outro produto do tipo iogurte com consistência firme, feito a partir de leite com baixo teor de gordura.

Ferreira et al. (1996) utilizaram soro de queijos tipo mussarela, provolone, *Minas Padrão* e *Frescal* na preparação de bebida fermentada com bactérias lácticas utilizando culturas termofílicas. Concluíram que uma bebida agradável e estável pode ser produzida. O período de incubação variou de 6 a 7 horas, até que o pH atingisse o valor 3,9 a 4,0.

Soro de queijo com lactose hidrolisada e leite desnatado foram utilizados para preparação de uma bebida láctea fermentada com *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. Os produtos já fermentados foram adicionados de diferentes óleos de ervas (anis, hortelã e carawi), estocados por quinze dias sob refrigeração e analisados periodicamente em relação a pH, acidez titulável, acetaldeído, contagem total e contagem de bifidobactérias e organolepticamente. Concluiu-se que a adição de óleos melhorou o crescimento de *Bifidobacterium* spp no leite desnatado e no soro (EL-NERM; AWAD e ALI, 2004).

Vishal e Jha (2004) desenvolveram um processo de bebidas lácteas à base de soro e leite desnatado em duas proporções diferentes: 100:0 e 50:50. As bebidas foram fermentadas por diferentes cepas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*. Após a fermentação, as bebidas foram adoçadas e aromatizadas. *L. acidophilus* NCDC-15 em combinação com *L. casei* NCDC-12 produziram uma bebida de alta aceitação organoléptica, com propriedades antagonísticas contra microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhi* e *Staphylococcus aureus*, além de maior produção de ácido, acetaldeído e porcentagem de nitrogênio solúvel.

Thammer e Penna (2005) formularam 12 bebidas lácteas com diferentes teores de soro, açúcar e frutooligossacarídeos (FOS) e verificaram o efeito dessas variáveis sobre a contagem de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*. Não foi verificado efeito do teor de FOS sobre as bactérias probióticas, porém, com o decréscimo do pH, ocorreu diminuição nas contagens dos mesmos.

Hernandez-Mendoza et al. (2007) prepararam uma bebida à base de soro de queijo, sacarose e pectina e fermentada com *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium bifidum*. O tratamento com contagens mais altas e melhor

aceitação sensorial foi selecionado e estocado a 4° C por 30 dias. Ao final do período, pequena taxa de pós-acidificação foi detectada e a bebida estava boa para consumo.

2.3. Culturas lácteas

2.3.1. Culturas de iogurte

As bactérias lácticas se caracterizam por serem Gram-positivas, esporogênicas e por acumularem ácido láctico no meio como produto do metabolismo primário (FERREIRA, 2003).

A cultura de iogurte é composta por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. São bactérias termofílicas com crescimento ótimo a 42°C, devendo estar em número dominante no produto final, comparadas com as bactérias termofílicas (SPREER; MIXA, 1998).

O *Streptococcus thermophilus* tem a morfologia de cocos unidos, geralmente em cadeias curtas, e seu melhor crescimento se dá em temperaturas entre 37 e 45°C, podendo tolerar até 50°C. Apresenta elevada sensibilidade a NaCl (<2%) e importante função bioajustadora em processos fermentativos na presença de bactérias probióticas (FERREIRA, 2003). Algumas cepas são produtoras de exopolissacarídeos, que são bastante úteis na produção de iogurtes mais firmes, mantendo a textura e a viscosidade durante a manipulação posterior à fermentação (COLLET, 2005).

O *Lactobacillus bulgaricus* apresenta-se como bastonetes, unidos em cadeias longas, com crescimento ótimo em temperaturas entre 45 e 50° C, embora cresçam em temperaturas de até -15°C (ROBINSON; TAMIME, 1975; DELLAGLIO, 1992; SABOYA, 1997).

Tanto *L. bulgaricus* quanto *S. thermophilus* são homo fermentativos.

Estes microrganismos desenvolvem simbiose quando presentes no leite. Nessa simbiose, *S. thermophilus* inicia o desenvolvimento do ácido láctico através da fermentação da lactose, crescendo rapidamente até pH 5,5. Boas condições são geradas através da depleção do oxigênio, formação de ácido e excreção de compostos voláteis para o desenvolvimento do *L. bulgaricus* (SPREER; MIXA, 1998).

Os lactobacilos estimulam o crescimento dos estreptococos por sua ação proteolítica sobre as proteínas do leite e concomitante peptização, formando aminoácidos como treonina, metionina e valina. No final, um *flavor* de acetaldeído dominante é desenvolvido no iogurte. Ao mesmo tempo, *L. bulgaricus* apresenta atividade lipolítica, liberando ácidos graxos que contribuem para o desenvolvimento do *flavor*.

Outro aspecto referente à cultura de iogurte é que, durante a fermentação, os estreptococos produzem exclusivamente ácido láctico L(+) (também formado no metabolismo humano e animal), enquanto os lactobacilos produzem ácido láctico D(-) ou uma mistura dos dois isômeros. Ao final desse processo, observa-se produção maior de ácido, maior número de células, maior consumo de carboidratos e melhores sabor e textura no produto final (TAMIME; DEETH, 1989).

Laye, Karleskind e Morr (1993) sugeriram que as concentrações e as proporções de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp. afetam o sabor e a textura do iogurte. Mudanças químicas durante o armazenamento incluem diminuição da quantidade de lactose, formação de ácido láctico, diminuição de acetaldeído e pequena, mas potencialmente importante, mudança nas concentrações de outros voláteis. Acetaldeído (2,0 a 41,0 ppm), diacetil (0,2 a 2,3

ppm), acetoína (2,2 a 28,2 ppm), etanol (0,2 a 9,0 ppm), acetona (1,8 a 3,4 ppm) e butanona (0,1 a 0,6 ppm) são os mais importantes compostos aromáticos produzidos durante a fermentação (RASIC; KURMAN, 1978; KNEIFEL et al., 1992; XANTHOPOULUS et al., 1994).

2.3.2. Culturas probióticas

Segundo Goldin (1998), a palavra probiótico foi introduzida por Lilley e Stillwell em 1965 para descrever microrganismos que desempenham atividades benéficas.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando são consumidos, agem no trato gastrintestinal do organismo hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal (KURMANN, 1988; FULLER, 1994). A fermentação melhora a digestibilidade de alimentos e produz vitaminas e co-fatores nos produtos alimentícios. Neste sentido, existem alguns trabalhos científicos que permitem afirmar que as bactérias probióticas têm efeito benéfico na saúde humana (GILLILAND, 1989).

Atualmente, a definição mais aceita é a de que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem uma série de benefícios à saúde do hospedeiro (WHO/FAO, 2002).

A terminologia da palavra probiótico se origina de estudos iniciais que determinaram os efeitos de bactérias do iogurte sobre a composição do intestino humano (ISOLAURI et al., 2004). Holzapfel *et al.* (1998) optaram pela definição de probióticos proposta por Havenaar *et al.* (1992), os quais definem probióticos como culturas puras ou mistas de microrganismos vivos que, quando aplicadas aos animais ou ao ser humano, têm efeitos benéficos ao hospedeiro, fornecendo

propriedades à microflora endógena. Os autores defendem que esta definição é mais ampla e vantajosa, pois não restringe os efeitos probióticos à flora intestinal, mas também às comunidades microbianas de outras partes do corpo; os probióticos podem consistir de uma ou mais espécies; podem ser aplicados aos animais e ao ser humano. Uma revisão mais detalhada sobre o assunto pode ser encontrada em Oliveira et al. (2002a).

Aspectos de segurança revistos em 2002 por Mattila-Sandhom et al. incluem especificações como origem (trato gastrointestinal de humanos saudáveis), não patogenicidade e resistência a antibióticos.

Numa ampla revisão sobre os efeitos potenciais da ingestão de produtos lácteos contendo *Lactobacillus acidophilus*, Gilliland (1989) descreveu os seguintes benefícios: controle de patógenos intestinais; ação anticarcinogênica; promoção da absorção da lactose em pessoas com deficiência na digestão da mesma; controle do colesterol sérico. Redução da pressão arterial, produção de metabólitos antimicrobianos e nutracêuticos, imunomodulação, prevenção e alívio de enfermidades alérgicas também são descritos por Ahmed (2003) e Mercenier (2003). Alguns efeitos adversos são também descritos. Entretanto, existe considerável falta de dados científicos em humanos para substanciar alguns destes efeitos. Estudos clínicos que suportam a teoria sobre os efeitos probióticos e de benefícios à saúde das bactérias lácticas são também descritos por Gilliland (1989) e Dunne et al. (1999). Segundo Farneworth et al. (2007), microrganismos probióticos têm sido usados em tratamentos de vários tipos de diarreia, infecções urogenitais e doenças gastrintestinais, mas não há consenso sobre a efetividade dos mesmos.

Os probióticos agem por exclusão competitiva, aderindo aos sítios específicos localizados no epitélio intestinal, diminuindo, dessa maneira, a colonização por

microrganismos patogênicos. O mecanismo de exclusão competitiva não está completamente esclarecido, entretanto várias pesquisas realizadas permitem sugerir algumas formas de atuação dos probióticos (FERREIRA e KUSSAKAWA, 1999). Para que o efeito probiótico ocorra as células viáveis devem sobreviver em condições ácidas no estômago humano e concentrações de bile no intestino, de forma a poderem colonizar o intestino (BUTTRISS, 1997; FOSCHINO et al., 1997). Variáveis, como bile e baixos valores de pH, são fatores importantes na seleção de cepas probióticas a serem usadas em produtos lácteos.

As propriedades funcionais e a tecnologia de aplicação dos probióticos são estirpe específicas, sendo a seleção a chave para a racionalização de novos candidatos a probióticos (OUWEHAND et al., 2002a). A sobrevivência desses microrganismos no trato gastrointestinal depende da matriz na qual as células estão incorporadas para o consumo (SAXELIN; KORPELA; MAYARA-MAKINEN, 2003). Então, além da seleção da cepa, também a formulação do produto tem influência sobre a funcionalidade do microrganismo probiótico.

Segundo Foschino et al. (1997), para que um produto possa ser considerado um vetor eficaz de microflora em grau de explicar um efeito probiótico é necessário estabelecer um número mínimo de 10^6 UFC/g para cada bactéria presente no produto. Há controvérsias sobre este número: alguns grupos de pesquisa consideram o valor de 10^6 UFC/ g suficiente para a obtenção dos efeitos probióticos (VINDEROLA et al., 2000; OSTLIE et al., 2003), porém o nível recomendado pelo padrão francês ,norma AFNOR NFV04-600, é de 10^8 UFC/g. Desta forma, não existe consenso quanto à frequência e à quantidade de ingestão de produtos probióticos para que os mesmos possam propiciar os benefícios a eles atribuídos (ANTUNES et al., 2007).

Embora não haja concordância sobre a quantidade ideal, as embalagens de leites fermentados comercializados no Brasil apresentam geralmente 80 mL de produto e, segundo Saxelin, Korpela e Mayara-Makinen (2003), essas garrafas pequenas fazem parte do conceito de “dose diária” de diversas companhias multinacionais (ANTUNES et al., 2007).

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

Microrganismos comumente usados como probióticos incluem *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* (GOLDIN e GORBACH, 1992). As espécies de maior interesse são *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. brevis* e *B. animalis*. (BARRETO et al., 2003). Alguns dos critérios usados na seleção de uma boa cepa de probiótico podem ser encontrados nas publicações de Collins, Thornton e Sullivan (1998) e Klaenhammer e Kullen (1999). Alguns microrganismos usados como probióticos são bem documentados com relação as suas propriedades benéficas. Espécies de *Lactobacillus* e de *Bifidobacterium* ganharam popularidade na fabricação de produtos probióticos graças aos benefícios para a saúde humana e ao seu *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*). Geralmente se aceita que, com exceção de

alguns estreptococos e enterococos, as bactérias lácticas são raramente patogênicas ao ser humano e aos animais (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998).

De acordo com Maragkoudakis et al. (2006), bactérias probióticas são os microrganismos mais pesquisados no campo das bactérias lácticas nos últimos vinte anos. Os probióticos são particularmente influenciados por outras bactérias durante longos períodos de fermentação, porém, durante curtos períodos de fermentação, a taxa de crescimento da maioria das bactérias probióticas é negligenciável (TAMIME et al., 2005).

2.3.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus (LA) foi primeiramente isolado de fezes de crianças lactentes por Moro (em 1900) e, apesar de identificado como não esporulante, foi nomeado *Bacillus acidophilus*. Posteriormente, foi designado como *Lactobacillus* e, anos depois, as possíveis vantagens da ingestão de *L. acidophilus* encorajaram a indústria de lácteos a produzir leites fermentados com altas contagens deste microrganismo (ITSARANUWAT; HAL HADDAD; ROBINSON, 2003).

LA pertence ao grupo geneticamente distante, isto é, dos lactobacilos homofermentativos restritos. São encontrados em diferentes habitats que os transformaram, ao longo dos tempos, do ponto de vista fenotípico e genotípico. Dentro deste grupo, encontram-se as espécies mais acidificantes (2,7% de ácido láctico) e as mais termofílicas (temperatura máxima de crescimento 40 a 52°C).

LA é descrito como bacilo circular, Gram-positivo, não móvel, não esporulante, geralmente de 0,6-0,9 µm, ocorrendo só, em par ou formando

pequenas cadeias. As colônias são geralmente brancas. Apresenta necessidades nutricionais complexas. Aminoácidos e fatores de crescimento, como pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina são essenciais. O crescimento a 16°C é raro ou muito lento; em temperaturas superiores, o crescimento depende da cepa, sendo que algumas crescem a 45°C e outras a 48°C (DU PLESSIS et al., 1996).

LA fermenta hexoses exclusivamente pela via do lactato de Embden-Meyerhof-Parnas; pentoses e gluconato não são metabolizados. Acetoína e diacetil são produzidos a partir de citrato e de piruvato. Na presença de lactato, ou em pH inferior a 4,25, piruvato não é imediatamente convertido a diacetil ou acetoína (DU PLESSIS et al., 1996). LA pode também produzir uma bacteriocina designada como acidofilina 801, quando em condições favoráveis (ZAMFIR et al., 2000).

2.3.2.2. *Lactobacillus rhamnosus*

O *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pertence ao grupo dos lactobacilos heterofermentativos facultativos, isto é, fermentam as hexoses, produzindo ácido láctico, mas, também, outras pentoses após indução de fosfocetolase com produção de ácido láctico e acético. A frutose é sempre fermentada. Este grupo, formado por bactérias muito difundidas na natureza, compreende três complexos de espécies semelhantes por suas homologias DNA-DNA e diversas espécies não apresentam nenhuma relação filogenética conhecida (DELLAGLIO et al., 1994; BÉAL et al., 1994).

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

Uma cepa específica da espécie, *L. rhamnosus* GG, tornou-se primeiramente disponível para avaliação em 1990 e desde então vem sendo proposta como alternativa para o alívio da diarreia induzida por antibiótico (e outros tipos de diarreia) e como meio de reduzir a incidência de cáries. Estudos mostraram que outras cepas da mesma espécie apresentaram boa aderência às células intestinais humanas (ITSARANUWAT et al., 2003).

L. rhamnosus ou GG usado como probiótico foi estudado em modelos experimentais em animais e humanos, em estudos clínicos em humanos, em cultura de tecidos e *in vitro* (ALLANDER et al., 1999). É considerado como o mais estudado probiótico nos últimos 10 anos. GG foi isolado de cultura fecal humana em 1985, e identificado taxonomicamente pelos métodos genéticos e por eletroforese como *L. rhamnosus*. Entretanto, é um rhamnosum atípico porque não fermenta lactose, maltose ou sacarose, embora fermente a ramnose muito lentamente (GOLDIN, 1998).

2.3.2.3. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

As bifidobactérias foram primeiramente isoladas e descritas em 1899-1900 por Tissier. *Bifidobacterium* spp. são microrganismos Gram-positivos, anaeróbicos, não esporulantes, sem motilidade. Produzem ácido láctico e ácido acético, sem geração de gás carbônico, na proporção de 2 para 3, exceto durante degradação de gliconato. As bifidobactérias de origem humana fermentam glicose, galactose, lactose e frutose como fontes de carbono (GOMES; MALCATA, 1999).

O grupo *Bifidobacterium* forma a maior parte da microbiota que coloniza o trato intestinal de humanos e de animais (SANZ, 2007). Segundo Itsaranuwat et al. (2003), apresentam morfologias distintas, que variam desde o formato do “Y” e do

osso até a forma de cocos, dependendo das condições de crescimento e/ou espécie. *B. lactis* é encontrado no intestino grosso de humanos.

Sanz (2007) afirma que, das condições de estresse às quais as bifidobactérias são submetidas num processo de fermentação, o ambiente ácido é um dos mais importantes fatores limitantes da viabilidade. Apenas estirpes de *B. animalis* têm mostrado habilidade de sobreviver sob condições ácidas. Porém, mesmo os probióticos mais estáveis têm desvantagens tecnológicas e limitações (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; MATTO et al., 2006).

2.4. Crescimento de probióticos no leite

Bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido à falta de atividade proteolítica (KLAVER et al., 1993). A prática atual é adicionar as bactérias do iogurte, como *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, na produção de iogurte contendo probióticos (SAMONA; ROBINSON, 1994; SHAH; LANKAPUTHRA, 1997; DAVE; SHAH, 1998). Entretanto, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* produz também ácido láctico durante armazenamento refrigerado, através um mecanismo denominado pós-acidificação que afeta a viabilidade das bactérias probióticas (DAVE; SHAH, 1997), fato também observado por Almeida (1999).

A fim de superar o problema da pós-acidificação e da perda de viabilidade, a tendência atual é usar culturas *starter* isentas de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (DAVE; SHAH, 1998). Ainda, a incorporação de micronutrientes como peptídeos e aminoácidos ao leite pode ser necessária para reduzir o tempo de fermentação e assegurar viabilidade às bactérias probióticas.

2.5. Atividade acidificante de bactérias lácticas

Importantes informações sobre a fisiologia de cepas industriais podem ser obtidas pelo estudo da influência das condições da cultura através da cinética – crescimento, acidificação, rendimento em biomassa ou ácido láctico. Quantificar a atividade acidificante das bactérias lácticas permite obter conhecimentos relacionados à fermentação, comparar o desempenho de diferentes estirpes, ou diferentes combinações de *starters* e a determinação do melhor tempo para recuperá-las, medir a perda da atividade acidificante durante processos de liofilização e congelamento (LAMPRESH; FOSTER, 1963), e avaliar o perfil de acidificação em diferentes substratos, a fim de definir o melhor experimento.

O crescimento ou acidificação das bactérias lácticas pode ser monitorado pela quantidade de ácido láctico produzido ou pelo pH, uma vez que a principal propriedade das LAB é a produção de ácido (WALSTRA et al., 2006). Essa atividade acidificante durante o período de fermentação poderia ser descrita pela curva de pH, medindo a queda do mesmo em intervalos regulares. A velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$) poderia ser calculada como dpH/dt . O tempo para atingir a $V_{\max}$ e o pH correspondente a esse momento também podem ser mensurados. De acordo com Picque et al. (1992), os parâmetros acima são os que descrevem melhor a cinética de acidificação.

Alguns parâmetros cinéticos de acidificação, como velocidade máxima de acidificação ($V_{\max}$), tempo de fermentação (t_{pH}) de LAB ou bactérias probióticas em leite têm sido extensivamente documentado (BEAL; LOUVET; CORRIEU, 1989; OLIVEIRA et al., 2001; CACHON et al., 2002; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003; CHAMMAS et al., 2006; LUCAS et al., 2004).

Embora a temperatura e o pH tenham sido os fatores mais estudados, variáveis como substrato e concentração no produto são as que mais afetam a fase exponencial de crescimento das bactérias lácticas (BÉAL et al., 1994). A mesma cultura que possui um perfil acidificante alto em um substrato pode apresentar atividade diversa em meio diferenciado.

Todavia, pouca ou nenhuma atenção tem sido dada ao perfil de acidificação em misturas leite-soro ou em bebidas lácteas à base de soro.

3. OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram desenvolver bebidas lácteas probióticas a partir das misturas leite-soro e estudar sua vida-de-prateleira.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar o efeito da composição da cultura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* e do pH final da fermentação sobre a cinética de acidificação, pós-acidificação e contagem de bactérias probióticas em soro de queijo Minas frescal;
- Estudar os efeitos de diferentes combinações de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* no desenvolvimento de ácido em leite e em misturas leite-soro;
- Estudar o efeito de diferentes níveis de sólidos totais das diferentes bases leite-soro na pós-acidificação e na contagem de microrganismos probióticos;
- Elaborar bebidas lácteas a partir de misturas leite-soro e estudar sua vida-de-prateleira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Leite

O leite utilizado em todos os experimentos para fabricação dos leites fermentados e do queijo foi o pasteurizado integral Tipo B, marca Top Paulista, da Cooperativa Central de Laticínios de São Paulo (CCL), obtido no comércio local na cidade de São Paulo.

4.1.2. Soro

O soro de queijo foi obtido da elaboração do queijo tipo Minas frescal, conforme a metodologia especificada por Furtado e Neto (1994).

O leite foi aquecido a 35 °C e sofreu adição de solução de cloreto de cálcio a 50% (0,5 ml/litro de leite). O coalho de marca Estrela foi então adicionado ao leite em quantidade suficiente para que a coagulação ocorresse em 40 minutos. Depois desse tempo, a coalhada foi cortada em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta e deixada em repouso por 5 minutos. Foi feita uma agitação cuidadosa durante 20 minutos, alternando-se mexedura com repouso. O soro foi então retirado e pasteurizado a 72°C por 15 segundos em trocador a placas de bancada marca Armfield, modelo FT-43, do Laboratório de Engenharia de Alimentos do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, resfriado a 4°C em banho de gelo, acondicionado em garrafas plásticas e congelado para uso posterior.

O leite e o soro foram submetidos às seguintes determinações químicas: sólidos totais, lactose, gordura e proteína.

4.1.3. Culturas Lácticas

As seguintes culturas liofilizadas para inoculação direta foram empregadas:

- TA040, *Streptococcus thermophilus*, Danisco, Sassenage, França;
- LAC4, *Lactobacillus acidophilus*, Danisco, Sassenage, França;
- LBA, *Lactobacillus rhamnosus*, Danisco, Sassenage, França;
- LB340, *Lactobacillus bulgaricus*, Danisco, Sassenage, França
- BLO4, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Danisco, Madison, Estados Unidos.

4.2. Procedimento Experimental

4.2.1. Planejamento

O planejamento experimental foi dividido em três etapas:

- a. Execução de 12 experimentos com soro de queijo Minas frescal nos quais as variáveis estudadas foram: a composição das culturas *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* e o valor de pH de término da fermentação (4,5, 5,0 e 5,5). O planejamento experimental está apresentado na Tabela 1.
- b. Preparação de 36 misturas leite-soro nas quais as variáveis estudadas foram: o teor de sólidos das misturas leite-soro (8%, 10% e 12%), as culturas *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*.

e o valor de pH de término da fermentação (4,5, 5,0 e 5,5). O planejamento experimental está apresentado na Tabela 2.

- c. Preparação da bebida láctea e estudo da vida-de-prateleira durante 28 dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 1. Planejamento experimental para a caracterização da atividade acidificante de bactérias probióticas em soro.

Ensaio	Co-culturas ¹				pH ²		
	StLb	StLa	StLr	StBl	4,5	5,0	5,5
1	+				+		
2	+					+	
3	+						+
4		+			+		
5		+				+	
6		+					+
7			+		+		
8			+			+	
9			+				+
10				+	+		
11				+		+	
12				+			+

¹StLb: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus bulgaricus*;

StLa: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus acidophilus*;

StLr: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus rhamnosus*;

StBl: *Streptococcus thermophilus*-*Bifidobacterium lactis*.

² pH de parada da fermentação.

Tabela 2. Planejamento experimental para a caracterização da atividade acidificante de bactérias probióticas em misturas leite-soro.

Ensaio	Teor de sólidos (%)				Co-culturas ¹				pH ²		
	12	10	8	6	StLb	StLa	StLr	StBl	4,5	5,0	5,5
1	+				+				+		
2	+				+					+	
3	+				+						+
4	+					+			+		
5	+					+				+	
6	+					+					+
7	+						+		+		
8	+						+			+	
9	+						+				+
10	+							+	+		
11	+							+		+	
12	+							+			+
13		+			+				+		
14		+			+					+	
15		+			+						+
16		+				+			+		
17		+				+				+	
18		+				+					+
19		+					+		+		
20		+					+			+	
21		+					+				+
22		+						+	+		
23		+						+		+	
24		+						+			+
25			+		+				+		
26			+		+					+	
27			+		+						+
28			+			+			+		
29			+			+				+	
30			+			+					+
31			+				+		+		
32			+				+			+	
33			+				+				+
34			+					+	+		
35			+					+		+	
36			+					+			+

¹StLb: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus bulgaricus*;

StLa: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus acidophilus*;

StLr: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus rhamnosus*;

StBl: *Streptococcus thermophilus*-*Bifidobacterium lactis*.

² pH de parada da fermentação.

4.2.2. Preparação das misturas leite-soro

A mistura leite-soro foi padronizada em três valores de sólidos totais (8%, 10% e 12%) misturando-se leite integral e soro de leite pasteurizado. O teor de sólidos totais das misturas foi calculado por balanceamento de massa, considerando-se o teor de sólidos totais do leite e do soro. Após a padronização, leite e soro foram misturados com auxílio de agitador magnético por 15 min. A seguir, a mesma foi distribuída em frascos estéreis de 250 mL em câmara de fluxo laminar.

As misturas foram submetidas às seguintes determinações químicas: sólidos totais, lactose, gordura e proteína.

4.2.3. Preparação do inóculo

O inóculo foi elaborado de modo a obter-se contagem inicial de 10^8 UFC/mL de cada microrganismo.

Foi preparada inicialmente uma pré-cultura com *L. bulgaricus*, na qual se adicionou 0,4 g de cultura pura em 50 ml de leite autoclavado. Após a homogeneização, 1 mL da pré-cultura foi inoculado em frascos de 250 ml de soro ou da mistura leite-soro. O mesmo método foi utilizado para preparação de pré-culturas de *L. rhamnosus* e *B. lactis*, adicionando-se 0,8 g e 0,05 g, respectivamente, de cultura pura em 50 ml de leite autoclavado a 121°C/20 minutos.

Para a elaboração de inóculos de *S. thermophilus* e de *L. acidophilus*, cada cultura (envelope contendo aproximadamente 10 gramas) foi diluída em um litro de leite autoclavado, homogeneizada e estocada em frascos estéreis com volumes

conhecidos. Os frascos foram congelados para uso posterior. Análises microbiológicas foram realizadas para averiguar e igualar a contagem inicial de cada cultura. Após padronização do número de bactérias viáveis, inoculou-se, na razão de 1,25 ml e 2,00 ml, *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, respectivamente. A contagem de bactérias nos diferentes inóculos foi de $2,4 \times 10^8$ UFC/mL para *S. thermophilus*; $1,28 \times 10^8$ UFC/mL para *L. bulgaricus*; $9,0 \times 10^8$ UFC/mL para *L. acidophilus*, $1,4 \times 10^8$ UFC/mL para *L. rhamnosus* e $6,5 \times 10^8$ UFC/mL para *B. lactis*.

4.2.4. Fermentação

Os frascos contendo soro e as misturas leite-soro foram colocados em banho-maria acoplado ao sistema Cinac (Ysebaert, Frépillon, França) até estabilização da temperatura, a 42°C. Após a inoculação, misturas e bebidas adicionadas de cultura láctica foram homogeneizadas e a cinética de acidificação foi seguida pelo Sistema Cinac (*Cinetique d' Acidification*) até valores de pH de parada de fermentação constantes nas Tabelas 1 e 2. Quando o soro e as misturas atingiram os valores de pH estabelecidos, a fermentação foi interrompida e os frascos foram imediatamente resfriados em banho de água-gelo até 8°C. A seguir foi realizada a quebra do coágulo, movimentando-se o produto durante 30 segundos com um agitador de aço inox. Os produtos fermentados foram então acondicionados em potes plásticos de 50 mL. Os potes foram selados em seladora térmica Selopar (BrasHolanda, Pinhais, Brasil), resfriados em banho de gelo e estocados a 4°C. Os experimentos referentes ao soro e às misturas foram feitos em duplicata.

Nos produtos fermentados (soro e misturas leite-soro) analisou-se a pós-acidificação e determinou-se a contagem das bactérias probióticas após 24 horas do término da fermentação (d1).

4.2.5. Preparação das bebidas lácteas

Com base nos resultados obtidos nos ensaios apresentados na Tabela 2, duas misturas leite-soro foram selecionadas para preparação da bebida láctea (8 e 10% de sólidos totais).

As misturas leite-soro 8% e 10% foram adicionadas de 6% de açúcar e 0,35% de estabilizante Dairy mix BL (Germinal, Diadema, Brasil), pasteurizadas a 90°C por 5 minutos sob agitação constante e resfriadas até 42°C. Procedeu-se então à inoculação das culturas *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em co-cultura com *S. thermophilus*, conforme descrito em 4.2.3. A seguir, estas foram fermentadas, conforme descrito em 4.2.3, até pH 4,5. Após a parada da fermentação os produtos foram resfriados em banho de gelo até 20°C e adicionados de 5% de preparado de morango (Gemacom, Juiz de Fora, Brasil). Após a distribuição completa do preparado nas misturas, as seis diferentes bebidas lácteas (Tabela 3) foram envasadas em potes plásticos de 50 mL e armazenadas durante 28 dias a 4°C. Os ensaios referentes às bebidas lácteas foram repetidos seis vezes.

A cinética de acidificação das misturas leite-soro adicionadas de açúcar e estabilizante foi seguida com a determinação dos parâmetros cinéticos. As bebidas lácteas probióticas foram submetidas às determinações químicas (sólidos totais, lactose, gordura e proteína), pós-acidificação (pH e acidez total titulável), instrumental da cor (parâmetros L^* , a^* , b^*) e reologia, bem como a determinação da

viabilidade dos microrganismos probióticos ao longo de 28 dias de armazenamento do produto a 4°C. A análise sensorial das bebidas lácteas probióticas foi realizada quatro dias após sua fabricação e aos 21 dias de armazenamento do produto a 4°C

Tabela 3. Formulação básica de bebidas lácteas probióticas preparadas a partir de misturas leite-soro.

Sólidos Totais (%)	Leite (%)	Soro (%)	Açúcar (%)	Estabilizante ¹ (%)	Co-cultura	Morango ² (%)	Bebida Láctea
10	63,0	37,0	6	0,35	StLb	5,0	BL10
10	63,0	37,0	6	0,35	StLr	5,0	BL10
10	63,0	37,0	6	0,35	StBl	5,0	BL10
8	27,0	73,0	6	0,35	StLb	5,0	BL8
8	27,0	73,0	6	0,35	StLr	5,0	BL8
8	27,0	73,0	6	0,35	StBl	5,0	BL8

¹Estabilizante: Dairy mix BL (Germinal, Diadema, Brasil);

²Fruta: Preparado de Morango (Gemacom, Juiz de Fora, Brasil)

StLb: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus bulgaricus*;

StLr: *Streptococcus thermophilus*-*Lactobacillus rhamnosus*;

StBl: *Streptococcus thermophilus*-*Bifidobacterium lactis*

4.3. Métodos

4.3.1. Determinações físico-químicas

As seguintes análises físico-químicas foram realizadas em triplicata:

4.3.1.1. Sólidos totais

A determinação da matéria seca do soro e do leite foi realizada em estufa com circulação forçada de ar a 100-105°C, até peso constante, seguindo-se o método recomendado pela AOAC (1995). Os resultados foram expressos em % de sólidos totais

4.3.1.2. Lactose

O teor de lactose do soro e do leite foi determinado pelo método de titulação utilizando-se solução de Fehling (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.3.1.3. Gordura

A matéria graxa do soro e do leite foi determinada pelo método de Gerber, segundo Schmidt-Hebbel (1956).

4.3.1.4. Proteína

A proteína total do soro e do leite foi calculada em função dos teores de nitrogênio total determinado pelo método de microKjeldahl, multiplicado pelo fator 6,38 (AOAC, 1995).

4.3.1.5. Pós-acidificação

As medidas dos valores de pH dos produtos fermentados foram realizadas em potenciômetro digital Quimis (Diadema, São Paulo.)

4.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

A modelagem da atividade acidificante de misturas de culturas lácticas em soro e nas misturas leite-soro foi feita através do Sistema CINAC (Figura 1), isto é, mediante um método automático para a quantificação da atividade de uma cultura *starter* com base em medidas de valores de pH (CORRIEU et al., 1988; SPINNLER; CORRIEU, 1989).

A partir dos dados obtidos, 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:

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

4.3.3. Análises microbiológicas

Amostras do leite fermentado (1mL) foram homogeneizadas com 9 mL de água triptonada 0,1% p/v durante 2 min em um agitador de tubos e, em seguida, foram feitas diluições utilizando-se o mesmo diluente e inoculações em meios seletivos. *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. rhamnosus* foram enumerados em MRS acidificado (Difco, Detroit, Estados Unidos) ao valor de pH 5,4, após incubação a

37°C por 72 h em jarra de anaerobiose. *S. thermophilus* foi enumerado em M17 após incubação aeróbica a 37°C durante 72 h. *B. lactis* foi enumerado em meio MRS, após incubação anaeróbica a 37°C durante 72 h. A seletividade dos meios de cultura foi confirmada por observação microscópica da aparência das células obtidas das colônias.

Figura 1. Sistema Cinac (*Cinétique d'acidification*).

4.3.4 Análise estatística

A partir dos resultados obtidos foi feita Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias mediante programa Statistica (versão 6). Em todas as análises foi considerado nível de significância $p \leq 0,05$.

4.3.5. Determinação da vida-de-prateleira das bebidas lácteas probióticas

4.3.5.1. Pós-acidificação (pH e acidez total titulável)

A pós-acidificação foi determinada pela medida do valor de pH conforme descrito em 4.3.1.5. Para determinação do teor de acidez total titulável foi utilizado o método descrito por (FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE, 1991) com solução azul de timol. Os resultados foram expressos em graus Dornic.

4.3.5.2. Determinação instrumental da cor

As análises de cor foram realizadas em colorímetro Hunter Lab, modelo Color Quest XE (Reston, Virginia, Estados Unidos) com acessório e programa de análise de cor. Foram determinados atributos de luminosidade (L^*), vermelho (a^*) e amarelo (b^*), usando escala CIELAB (ROSSO; MERCADANTE, 2007).

4.3.5.3. Reologia

Os parâmetros reológicos das formulações aos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento foram obtidos, em duplicata, a 5 e 25°C, ciclos ascendentes e descendentes, usando-se um reômetro de cone e placa, modelo RVDV III, marca Brookfield (Stoughton, USA). O aumento da tensão de cisalhamento foi obtido pelo aumento da rotação, a partir da variação contínua da velocidade angular do cone. A taxa de deformação foi determinada usando-se O programa computacional

Brookfield Reocalc for Windows (Stoughton, USA), que utiliza as seguintes equações:

$$\gamma = \omega / \text{sen} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\tau = \frac{\text{torque}}{2/3\pi r^3} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que :

γ : Taxa de Deformação (1/s)

τ : Tensão de Cisalhamento (Pa)

ω : Velocidade angular do spindle (rpm)

Torque = N.m

Foram utilizadas rotações de 10 a 250 rpm, com acréscimos de 10 rpm a cada 10 segundos, 0,5 ml de amostra e cone CP-40. As amostras foram agitadas delicadamente com bastão de vidro. A descrição do comportamento reológico foi realizada utilizando-se o modelo reológico de Ostwald-de-Waele ($\tau = k \dot{\gamma}^n$), através do programa computacional Excell, conforme estudado por Benezech e Maingonnat (1994) e Basak e Ramaswamy (1994). Para a medida da viscosidade aparente foi adotado o valor da rotação a 60 rpm, conforme descrito por Shaker et al. (2000). Os resultados foram expressos em mPas.

4.3.5.4 Viabilidade das bactérias probióticas

As análises foram realizadas conforme descrito em 4.3.3.

4.3.5.5 Avaliação Sensorial

Foram realizados testes de aceitação sensorial, avaliando-se os atributos aparência, sabor e consistência das bebidas lácteas após 24 h e aos 21 dias de armazenamento do produto a 4°C. As análises foram realizadas por 60 voluntários, adultos de ambos os sexos, com idades entre 18 e 60 anos, habituados ao consumo freqüente de produtos lácteos como leite fermentado, iogurte e queijos. Pessoas com histórico de alergia a algum componente do leite ou que estariam sob tratamento médico, tomando algum medicamento ou gripadas, foram excluídas do ensaio. Foi utilizada escala não estruturada de 9 cm com os termos “desgostei muitíssimo” e “gostei muitíssimo” ancorados em seus extremos (STONE; SIDEL, 1993). Todas as amostras foram submetidas ao controle microbiológico de contagem total, coliformes totais e fecais e bolores e leveduras utilizando Petri Film^R (3M do Brasil).

Para as avaliações sensoriais, cerca de 50 ml da bebida láctea foram servidos em copos de plástico branco, codificados com números aleatórios de três dígitos, de acordo com um delineamento experimental de blocos completos casualizados. Foram servidas seis amostras em cada sessão de análise. As análises foram realizadas sempre duas horas antes ou depois das refeições, os quais são períodos mais adequados para realizações dessas avaliações (MORAES, 1985; DETHERMERS, 1981). Entre uma amostra e outra os provadores tomaram um gole de água antes de iniciar a análise novamente (MUNÕS et al., 1992). As fichas de avaliações sensoriais utilizadas podem ser encontradas no Anexo I. As sessões foram repetidas uma vez para cada tempo de armazenamento do produto, isto é, uma sessão com as bebidas lácteas recém-preparadas (quatro dias após sua fabricação) e outra sessão com aquelas que foram armazenados durante 21 dias.

Antes do início de cada sessão, o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), apresentado no Anexo II, foi assinado pelos voluntários. O projeto recebeu autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (processo número P-413).

4.3.5.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas conforme descrito em 4.3.4.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química da matéria-prima

As composições químicas do leite, do soro e das misturas leite-soro nos diferentes tratamentos estão apresentadas na Tabela 4.

Os teores de gordura, proteína e extrato seco variaram de 0,5 a 3,6%, 0,8 a 2,9%, 6,2 a 12%, respectivamente. Esses valores diferiram significativamente em todas as misturas em função da adição de soro. O teor de lactose foi em média 4,6%, não variando significativamente nas diferentes misturas. Spadoti (1998) registrou valores semelhantes para a composição química do leite *in natura*.

Os valores encontrados neste trabalho para extrato seco, proteína e gordura de soro de queijo foram ligeiramente diferentes dos citados por Ponsano et al. (1992), que registraram valores de 6,3 a 6,7% para extrato seco, de 0,61 a 0,67% para proteína e de 4,4 a 5,2% para lactose. Os valores de 0,13% de gordura, 0,57% de proteína e 6,11% de extrato seco, citados por Cabrera et al. (1995), foram inferiores aos encontrados no presente trabalho.

Os dados da composição química média das misturas leite-soro estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001).

Tabela 4. Composição química média* e desvio padrão das misturas leite-soro.

Mistura leite-soro	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Extrato seco (%)
12%	3,6 ^d ± 0,153	2,9 ^d ± 0,017	4,5 ^a ± 0,061	12,0 ^d ± 0,347
10%	2,4 ^c ± 0,058	2,1 ^c ± 0,022	4,5 ^a ± 0,012	9,8 ^c ± 0,100
8%	1,2 ^b ± 0,058	1,4 ^b ± 0,026	4,6 ^a ± 0,075	7,8 ^b ± 0,038
6%	0,5 ^a ± 0,000	0,8 ^a ± 0,015	4,7 ^a ± 0,104	6,2 ^a ± 0,026

n= 6

* Valores médios de análises feitas em triplicata.

12, 10, 8, 6: teor de sólidos da mistura.

Letras iguais nas colunas indicam que não há diferença significativa com respeito ao parâmetro analisado, de acordo com teste de Tukey ($P=0,05$).

5.2. Efeito da composição da cultura e do pH final da fermentação sobre a cinética de acidificação, a pós-acidificação e a contagem de bactérias probióticas em soro de queijo Minas frescal

Os parâmetros cinéticos, a pós-acidificação e a contagem dos microrganismos após um dia de fermentação em soro podem ser vistos na Tabela 5.

Cinética de acidificação

Os valores de $V_{\max}$ das co-culturas StLb, StLa, StLr e StBl variaram significativamente em função da composição da co-cultura (Tabela 5). StBl apresentou valores altos de $V_{\max}$ ($21,4 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ em média), seguido de StLr ($20,0 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$). Em compensação, StLb exibiu $V_{\max}$ abaixo de $16,80 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$. A co-cultura StLa apresentou valores intermediários, $18,45 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$, $17,95 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ e $18,30 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ nos pH de parada 5,5, 5,0 e 4,5, respectivamente. Os valores, encontrados em soro de queijo, foram mais altos que aqueles reportados por Oliveira e Damin (2003), que investigaram os parâmetros cinéticos de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *L. rhamnosus* em co-cultura com *S. thermophilus* em leite integral e leite suplementado com sacarose até pH 4,5. Os autores encontraram $V_{\max}$ de $14,5 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$, $7,7 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ e $12,8 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ para as co-culturas StLb, StLa e StLr, respectivamente. Oliveira et al. (2001) estudaram os efeitos da suplementação do leite sobre a taxa de acidificação de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* em co-cultura com *S. thermophilus* e reportaram que as co-culturas alcançaram $7,2 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ em leite sem suplementação, $20,3$ e $20,7 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ em leite suplementado com hidrolisado de caseína e

11,9 e 11,7 $\times 10^{-3}$ upH.min⁻¹ em leite suplementado com proteína de leite. Pode-se sugerir então que o soro, tendo composição físico-química diferenciada, apresentou efeito positivo sobre a velocidade máxima das co-culturas aqui estudadas, bem como as diferentes composições das co-culturas influenciaram o parâmetro estudado.

O pH correspondente a $V_{\max}$ variou de 5,40 a 5,78 (Tabela 5). As co-culturas StLb e StLa atingiram $V_{\max}$ em pH 5,47, em média, valores significativamente mais baixos que StLr (5,75) e StBl (5,67). Porém, analisando pH 4,5 separadamente, observa-se que StLb, StLa e StBl (5,43, 5,48 e 5,56, respectivamente) apresentaram valores sem diferença significativa entre si – e diferentes daquele observado para StLr, 5,74.

O tempo para atingir $V_{\max}$ - $t_{V_{\max}}$ variou de 2,87 horas (StLa em pH 4,5) a 4.38 h (StBl em pH 4,5) (Figura 2). A co-cultura StLa alcançou $V_{\max}$ em tempos mais baixos, seguida por StLb. Observando-se a Figura 2, percebe-se nitidamente que este parâmetro apresentou duas tendências bem definidas para as co-culturas estudadas, dividindo-as em mais lentas ou mais rápidas. StLa e StLb apresentaram tempos inferiores a StLr e StBl, independentemente do pH de parada, embora as últimas tenham apresentado taxas de acidificação diferentes. Os diferentes $t_{V_{\max}}$ em pH 4,5 observados em soro foram mais baixos que aqueles reportados por Oliveira e Damin (2003), cujos tempos para atingir $V_{\max}$ foram 5,2 e 6,4 horas para co-culturas StLb e StLa, respectivamente, em leite; porém os mesmos foram superiores àqueles apontados por Oliveira et al. (2001). Não foram encontrados estudos sobre o perfil de acidificação de *B. lactis* para comparação.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos, pós-acidificação (d1) de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (StLb), *Lactobacillus acidophilus* (StLa), *Lactobacillus rhamnosus* (StLr) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (StBl) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em soro de queijo Minas frescal.

Co-cultura	pH de parada da fermentação	$V_{\max}$ ($\times 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)	pH correspondente a $V_{\max}$	Pós-acidificação ²
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i> (StLb)	5,5	15,90 $\pm$ 1,13 ^{ab}	5,51 $\pm$ 0,03 ^{abc}	0,29 $\pm$ 0,01 ^c
	5,0	15,05 $\pm$ 0,64 ^a	5,40 $\pm$ 0,04 ^a	0,10 $\pm$ 0,07 ^{ab}
	4,5	16,80 $\pm$ 0,00 ^{abc}	5,43 $\pm$ 0,01 ^a	0,43 $\pm$ 0,04 ^d
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. acidophilus</i> (StLa)	5,5	18,45 $\pm$ 0,21 ^{abcd}	5,51 $\pm$ 0,03 ^{abc}	0,19 $\pm$ 0,01 ^{bc}
	5,0	17,95 $\pm$ 1,06 ^{abcd}	5,47 $\pm$ 0,02 ^{ab}	0,19 $\pm$ 0,01 ^{bc}
	4,5	18,30 $\pm$ 0,14 ^{abcd}	5,48 $\pm$ 0,04 ^{abc}	0,16 $\pm$ 0,01 ^b
<i>S. thermophilus</i> + <i>L. rhamnosus</i> (StLr)	5,5	21,20 $\pm$ 0,14 ^{de}	5,78 $\pm$ 0,08 ^d	0,44 $\pm$ 0,00 ^d
	5,0	19,50 $\pm$ 0,99 ^{cde}	5,73 $\pm$ 0,13 ^{bcd}	0,13 $\pm$ 0,00 ^{ab}
	4,5	19,30 $\pm$ 0,28 ^{cde}	5,74 $\pm$ 0,12 ^{cd}	0,15 $\pm$ 0,00 ^b
<i>S. thermophilus</i> + <i>B. longum</i> (StBl)	5,5	22,60 $\pm$ 0,28 ^e	5,73 $\pm$ 0,11 ^{bcd}	0,14 $\pm$ 0,00 ^b
	5,0	21,35 $\pm$ 0,78 ^{de}	5,72 $\pm$ 0,01 ^{bcd}	0,15 $\pm$ 0,01 ^b
	4,5	20,25 $\pm$ 2,05 ^{de}	5,56 $\pm$ 0,00 ^{abcd}	0,01 $\pm$ 0,01 ^a

¹ Valores dados como médias com desvio padrão;

²Diferença entre o pH do produto depois de 24 horas de estocagem e o pH do produto imediatamente após a fermentação;

^{abcd} Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; P < 0,05.

A variação no tempo de fermentação foi de 3,06h a 12,40 h. De maneira geral, as diferentes co-culturas apresentaram comportamento similar referente aos pH de parada 5,0 e 5,5, como observado na Figura 3, uma diferença de aproximadamente 0,6 horas entre os mesmos. Como nos parâmetros já exibidos neste estudo, StLb e StLa apresentaram $t_{pH5,0}$ e $t_{pH5,5}$ significativamente menores que StLr e StBl. A co-cultura StLb foi a mais rápida, pois o *L. bulgaricus* é um microrganismo conhecidamente com alta atividade acidificante. Embora tenha apresentado V_{max} mais baixa, exibiu t_{Vmax} e pH_{Vmax} baixos também e $t_{pH4,5}$ igual a 5,26 horas. A co-cultura StBl mostrou comportamento inesperado, apresentando $t_{pH4,5}$ de 6 horas, sem diferença significativa de StLa (6,78 h). StLr atingiu pH 4,5 em 12,40 horas, ressaltando perfil de acidificação lento. StLr apresentou altos valores de V_{max} , porém t_{Vmax} e pH_{Vmax} altos.

Oliveira e Damin (2003) reportaram tempos de fermentação diferentes para StLb, StLa e StLr (7,9 h, 12,5 h e 7,3 h, respectivamente) em leite, enquanto que Lucas et al. (2004) observaram $t_{pH4,5}$ de 8,8 horas para StLa e 13,2 horas para StLr em leite suplementado com proteína láctea.

As discrepâncias referentes ao comportamento acidificante das mesmas co-culturas observadas por diferentes pesquisadores podem ser atribuídas às diferenças entre a composição química dos leites utilizados e o soro. Segundo a Tabela 4, o leite apresenta o dobro de sólidos totais que o soro e teor elevado de proteína. Além disso, o perfil e a disponibilidade das proteínas do soro são diferentes, como discutido em 2.1.

Os presentes resultados sugerem que o alto poder acidificante observado para *L. acidophilus* em soro foi similar àqueles descritos para este probiótico em leite e melhores que o perfil de acidificação de *L. rhamnosus*.

Pós-acidificação

A pós-acidificação (diferença entre o pH do produto imediatamente após o término da fermentação e o pH depois de 24 horas de armazenamento) no soro fermentado apresentou diferença estatística entre as diferentes co-culturas (Tabela 5). StLr produziu mais ácido em pH 5,5 e StLb em pH 4,5 (0,44 unidades de pH). *L. bulgaricus* possui a característica de pós-acidificação, como descrito em Dave e Shah (1997), atributo que pode ser considerado problemático, dependendo do produto final e das cepas utilizadas. StBl apresentou os menores valores de pós-acidificação, em média, devido à sua limitada capacidade de produzir ácido a baixas temperaturas (MATTILA-SANDHOM et al., 2002), enquanto StLa exibiu *performance* intermediária.

Figura 2. Tempo (horas) no qual a velocidade máxima é atingida (t_{vmax}) de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em soro de Minas frescal (○ pH 4,5, □ pH 5,0, ◇ pH 5,5). Médias ($n = 2$) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; $P < 0,05$.

Figura 3. Tempo de fermentação (horas) de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em soro de Minas frescal (○ pH 4,5, □ pH 5,0, ◇ pH 5,5). Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; $P < 0.05$.

Contagem de células viáveis

As contagens de células viáveis variaram significativamente em soro (Figura 4). Embora os inóculos apresentassem contagens iniciais similares, os resultados sugerem que os microrganismos se diferenciaram em três grupos distintos. *L. rhamnosus* apresentou contagens baixas, independente do pH de parada da fermentação, em média $5,59 \log_{10}$ UFC/mL. *L. acidophilus* e *L. bulgaricus* exibiram valores significativamente mais altos, $6,72$ e $7,26 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente. As contagens de *B. lactis* foram as mais altas observadas neste estudo, acima de $8,00 \log_{10}$ UFC/mL, independentemente do pH de parada. É importante notar que todas as culturas apresentaram contagens maiores em pH 4,5, quando comparadas às obtidas em pH 5,5, embora sem diferença significativa para alguns. Essa observação demonstra o efeito do pH de parada sobre a contagem de células viáveis dos probióticos, pois, à medida que a fermentação avançou e atingiu pH mais baixo, os microrganismos provavelmente estavam mais adaptados ao meio e mais ativos.

Drgalic, Tratnik e Božanić (2005) estudaram o crescimento de culturas de *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium bifidum* por 24 h em soro de queijos reconstituído com e sem adição de inulina. Os autores reportaram que *L. acidophilus* começou a crescer imediatamente após o estágio de inoculação, enquanto *L. casei* teve ligeira queda nas contagens. Todavia, as taxas de crescimento de *L. acidophilus* e *L. casei* foram similares entre 6 e 12 horas de incubação, nas quais um significativo acréscimo nas contagens foi observado ($\sim 8,5$

log UFC/mL), enquanto *B. bifidum* teve pequena variação nas contagens durante o período de fermentação. Tal padrão não foi observado no presente estudo.

As contagens de *S. thermophilus* variaram de 8,31 log UFC/mL (St-Lb/pH 4.5) a 8,85 log UFC/mL (StLr/pH 5,0), apresentando tendência inversa às contagens dos lactobacilos, sendo 8,12 log ufc/mL para StLb/pH4,5 e 8,52 log UFC/mL para StLr/pH5,0, respectivamente (Figura 4). Os diferentes valores de pH de parada e a composição das co-culturas não influenciaram as contagens de *S. thermophilus*.

Figura 4. Efeito do pH de parada da fermentação sobre as contagens de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em soro de Minas fresco (○ Lb, La, Lr ou Bl, ■ St). Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; P < 0.05.

5.3. Efeito de diferentes combinações de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* no desenvolvimento de ácido em leite e em misturas leite-soro

Os resultados dos parâmetros cinéticos estudados para leite (12% ST) e misturas 10% e 8% fermentados por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. animalis* subsp. *lactis* em co-cultura com *S. thermophilus* a 42°C estão apresentados na Tabela 6 e na Figura 5.

Cinética de acidificação

Os valores de $V_{\max}$ variaram de $12,30 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ (StLr a pH5,5) a $16,35 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ (StLa a pH4,5) quando leite (12% ST) foi utilizado como base (Tabela 6). A co-cultura StLa apresentou $V_{\max}$ altas ($16,08 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ em média) significativamente diferentes das outras co-culturas empregadas, independentemente do pH de parada. A menor velocidade foi observada utilizando-se a co-cultura StLr em pH 5,5 ($12,30 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$), enquanto que StLb e StBl apresentaram valores intermediários. Esses resultados podem ser comparados com aqueles reportados por Oliveira e Damin (2003), que investigaram os parâmetros cinéticos de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. rhamnosus* em co-cultura com *S. thermophilus* em leite suplementado com sacarose e fermentado até pH 4,5. Os autores encontraram as seguintes velocidades: $14,5 \times 10^{-3}$, $7,7 \times 10^{-3}$ e $12,8 \times 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ para as co-culturas StLb, StLa e StLr, respectivamente. Não há dados disponíveis sobre o perfil de acidificação de StBl na literatura consultada.

Nas misturas contendo 10% ST, a co-cultura StLr exibiu baixos valores de $V_{\max}$, independentemente do pH de parada da fermentação ($13,00 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$, $12,65 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$, e $12,60 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$) (Tabela 6), enquanto StBl apresentou tendência oposta. StLb e StBl atingiram $V_{\max}$ mais altos quando comparados aos encontrados em leite (Tabela 6), mas StLr e StLa não tiveram o mesmo comportamento.

De acordo com os valores de $V_{\max}$ em mistura leite-soro 8% de ST, as co-culturas podem ser classificadas em três grupos distintos (Tabela 6). Primeiramente, StLr, com os valores mais baixos independentemente do pH de parada da fermentação ($12,40 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$ em média), seguido por StLa, com $V_{\max}$ intermediárias ($15,63 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$ em média) e, finalmente, as co-culturas StLb e StBl, com $V_{\max}$ acima de $16,20 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$.

À medida que o teor de sólidos diminuiu, de 12 para 8%, observou-se aumento nas velocidades das co-culturas StLb e StBl. Analisando esse fato, pode-se inferir que o teor de sólidos influenciou a velocidade de acidificação das co-culturas StLb e StBl, enquanto que StLa e StLr não foram induzidos a comportamento diferente em relação a este parâmetro.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb), *Lactobacillus acidophilus* (La), *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BI) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (St) em leite (12%) e misturas a 10% e 8% de sólidos totais^a.

Co-cultura	pH de parada da fermentação	$V_{\max}$ ($\times 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)			$t_{V\max}$ (h)			pH correspondente a $V_{\max}$		
		12 ^a	10 ^a	8 ^a	12 ^a	10 ^a	8 ^a	12 ^a	10 ^a	8 ^a
StLb	5,5	13,25 ^{ab}	15,20 ^{ab}	16,20 ^{ab}	4,08 ^{cd}	4,23 ^{bcd}	4,06 ^{bc}	5,58 ^{abc}	5,96 ^{bc}	5,56 ^{ab}
StLb	5,0	14,65 ^{bc}	15,40 ^{ab}	19,55 ^b	4,37 ^{bc}	4,63 ^{de}	4,23 ^c	5,38 ^{ab}	5,52 ^{ab}	5,27 ^a
StLb	4,5	13,75 ^{ab}	14,60 ^{ab}	18,55 ^b	4,60 ^{de}	4,98 ^e	4,18 ^c	5,32 ^a	5,30 ^a	5,30 ^a
StLa	5,5	15,90 ^c	15,75 ^{ab}	16,15 ^{ab}	3,96 ^{bcd}	3,82 ^{ab}	3,06 ^{ab}	5,57 ^{abc}	5,53 ^{ab}	5,90 ^{ab}
StLa	5,0	16,00 ^c	15,20 ^{ab}	15,55 ^{ab}	3,76 ^{abc}	3,70 ^a	3,67 ^{abc}	5,59 ^{abc}	5,57 ^{ab}	5,87 ^{ab}
StLa	4,5	16,35 ^c	14,70 ^{ab}	15,20 ^{ab}	3,66 ^{abc}	3,88 ^{ab}	3,67 ^{abc}	5,56 ^{abc}	5,54 ^{ab}	5,53 ^{ab}
StLr	5,5	12,30 ^a	13,00 ^{ab}	12,40 ^a	3,21 ^{ab}	4,36 ^{cd}	3,73 ^{abc}	6,07 ^d	6,05 ^c	5,82 ^{ab}
StLr	5,0	13,10 ^{ab}	12,65 ^a	12,45 ^a	3,51 ^{abc}	4,63 ^{de}	3,73 ^{abc}	5,84 ^{cd}	5,80 ^{bc}	5,86 ^{ab}
StLr	4,5	13,00 ^{ab}	12,60 ^a	12,40 ^a	2,86 ^a	4,61 ^{de}	2,90 ^a	5,69 ^{bc}	5,88 ^{bc}	6,20 ^b
StBI	5,5	13,20 ^{ab}	16,55 ^{ab}	16,90 ^b	5,23 ^e	3,90 ^{abc}	4,03 ^{bc}	5,84 ^{cd}	5,96 ^{bc}	5,93 ^{ab}
StBI	5,0	13,45 ^{ab}	18,25 ^b	17,60 ^b	4,67 ^{de}	4,00 ^{abc}	4,20 ^c	6,12 ^d	5,91 ^{bc}	5,73 ^{ab}
StBI	4,5	14,45 ^{bc}	17,55 ^{ab}	19,00 ^b	4,73 ^{de}	3,85 ^{ab}	4,31 ^c	6,09 ^d	6,07 ^c	5,63 ^{ab}

^a 12, 10 e 8% sólidos totais no leite e nas misturas leite-soro, ^b $V_{\max}$ = velocidade máxima de acidificação, $t_{V\max}$ = tempo para atingir $V_{\max}$

^c Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; P < 0.05.

Os valores encontrados neste trabalho foram superiores àqueles descritos por Chamas et al. (2006), que estudaram culturas puras de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* isolados de leite fermentado “laban”. De acordo com os autores, as velocidades máximas de acidificação foram $8,4 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹ e $10,5 \times 10^{-3}$ upH.min⁻¹, respectivamente para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Os valores de $t_{V_{\max}}$ apresentados na Tabela 6 variaram de 2,86 h a 5,23 h em leite (12%ST). Pode ser observado que a co-cultura StLr alcançou $V_{\max}$ em tempos menores, 3,21 h, 3,51 h e 2,86 h, em pH 5,5, 5,0 e 4,5, respectivamente, seguida por StLa e StLb. A co-cultura StBl precisou de tempos maiores para atingir $V_{\max}$, como pode ser observado na Tabela 6. Os valores para as co-culturas StLb (4,60) e StLa (3,66 h) foram mais baixos do que aqueles observados por Oliveira e Damin (2003) em leite, mas similares aos valores obtidos em leite suplementado com sacarose (4,7 h e 3,8 h, respectivamente).

Na mistura leite-soro 10%ST, $t_{V_{\max}}$ variou de 3,70 h a 4,98 h (Tabela 6), tendo as co-culturas StLa e StBl apresentado valores similares (3,80 h e 3,91 h em média, respectivamente). StLb e StLr, de forma inversa, mostraram altos tempos para atingir $V_{\max}$ (4,61 h e 4,53 h, respectivamente). Esses resultados mostraram padrão diferente daqueles observados em leite (12%ST), no qual StBl apresentou os maiores tempos e StLr, os mais baixos.

Quando a mistura leite-soro contendo 8%ST foi fermentada, as co-culturas apresentaram comportamento similar para $t_{V_{\max}}$ ao observado em leite (Tabela 6), embora os tempos em mistura leite-soro 8%ST tenham sido

menores. $t_{V_{\max}}$ para StLb e StBl foram (em média) 4,17 horas, enquanto as co-culturas StLa e StLr atingiram $V_{\max}$ em aproximadamente 3,46 horas.

O valor de pH quando $V_{\max}$ é atingida pode dar importantes informações sobre o conhecimento das bactérias lácticas. Pode ser observado que a co-cultura StLb alcançou $V_{\max}$ em pH mais baixos (pHs 5,58, 5,38 e 5,32), seguida por StLa. Esses valores foram ainda mais baixos que aqueles reportados por Spinnler e Corrieu (1989) utilizando *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em culturas puras. As co-culturas StLr e StBl atingiram $V_{\max}$ em pH mais alto (~5,87 e 6,01, respectivamente) (Tabela 6), sendo a mesma tendência para as diferentes co-culturas observada em mistura leite-soro 10%ST.

Em mistura leite-soro 8% ST, StLb apresentou comportamento como já descrito, enquanto que StLa e StBl alcançaram $V_{\max}$ em pH semelhantes (5,77 em média), indicando a possibilidade da diferença no teor de sólidos totais ter influenciado este parâmetro.

Os tempos de fermentação (t_{pH}) variaram significativamente ($P \leq 0,05$) e foram influenciados pela composição do leite e das misturas. Em geral, a co-cultura StLb foi a mais rápida a fermentar os diferentes meios estudados (Figura 5).

Em leite, os tempos de acidificação até pH 4,5 para StLb, StLa, StBl e StLr foram 6,50, 7,50, 11,30 e 11,68 h, respectivamente (Figura 5). As diferenças entre os tempos de fermentação até pH 5,0 e 4,5 foram de 1,75, 2,77, 4,52, e 5,22 h, para StLb, StLa, StBl e StLr, respectivamente, indicando

que StBl e StLr precisaram de quase a metade do tempo total para conseguir acidificar o meio de pH 5,0 até pH 4,5.

O padrão de acidificação de StLb em mistura leite-soro 10%ST foi semelhante àquele observado em leite e o $t_{pH4,5}$ foi de 6,3 h. Os tempos de fermentação de StLa foram estatisticamente iguais aos de StBl (Figura 5). StLr acidificou a mistura em 12,07 h, apresentando o mesmo comportamento que em leite (12%ST). Os $t_{pH4,5}$ em mistura 10%ST foram mais altos que em leite quando as co-culturas StLb, StLa, StLr foram utilizadas, porém StBl conseguiu atingir o mesmo pH em tempo duas vezes menor.

Em mistura leite-soro 8%ST, o desempenho das co-culturas StLb, StLa e StBl foi mais rápido que nas outras misturas (Figura 5). Porém, a co-cultura StLr apresentou o maior tempo de fermentação observado neste estudo, 14,02 h. Esse desempenho baixo da co-cultura StLr também foi observado em 5.2, quando a co-cultura necessitou de 12,4 h para atingir pH 4,5. Essas observações sugerem que a co-cultura StLr, mais precisamente o microrganismo *L. rhamnosus* aqui utilizado, tem sua força de acidificação ainda mais reduzida quando em meio com baixo teor de sólidos.

As co-culturas exibiram diferentes perfis de acidificação nas misturas testadas, StLb e StBl apresentaram V_{max} crescente e t_{vmax} , $t_{pH4,5}$ e $t_{pH5,5}$ decrescentes com a diminuição do teor de sólidos. Baixos valores de t_{vmax} e $t_{pH 5,5}$ significam alta atividade acidificante para as co-culturas estudadas. Foi observado que as co-culturas tiveram sua atividade incrementada com teores de sólidos mais baixos.

StBI apresentou $V_{\max}$ altas em todas as misturas, fato que o caracterizaria como microrganismo de rápida acidificação, como reportado por Xanthopoulos, Petridis e Tzanetakis (2001), porém, em leite, a co-cultura apresentou $t_{\text{pH}4,5}$ acima do esperado (Figura 5). De acordo com Kristo et al. (2003), meios com baixo teor de sólidos possuem baixa capacidade tamponante, significando que grande decréscimo nos valores de pH pode ocorrer para a mesma quantidade de ácido produzida e vice-versa.

StLa manteve uma média de valores de $V_{\max}$, t_{vmax} e $t_{\text{pH } 4,5}$ nas bases estudadas, mas apresentou baixos $t_{\text{pH } 5,5}$ quando comparada às outras co-culturas. A co-cultura StLr exibiu baixa habilidade de acidificação em todas as bases estudadas, caracterizada por baixas $V_{\max}$ e tempos de fermentação até pH 4,5 acima de 11 h.

Apesar disso, as diferentes co-culturas conseguiram atingir pH 5,5 em menos de 6 h nas diferentes misturas. Segundo Coogan et al. (1997), microrganismos com essa característica teriam boas propriedades acidificantes. Badis et al. (2004) relatam ainda que as variações na atividade acidificante de diferentes cepas estão diretamente relacionadas à aptidão específica de cada uma em assimilar os componentes nutritivos do meio, observação que poderia explicar o comportamento de StLr nas bases estudadas.

Figura 5. Tempo de fermentação (horas) de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST (○ pH 4,5, □ pH 5,0, ◇ pH 5,5). Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; P < 0,05.

5.4. Efeito de diferentes níveis de sólidos totais das diferentes bases leite-soro na pós-acidificação e na contagem de microrganismos probióticos

A pós-acidificação e a contagem de células viáveis das bactérias probióticas após um dia (d1) de armazenamento dos produtos a 4°C podem ser vistas nas Figuras 6 e 7.

Pós-acidificação

Todos os tratamentos apresentaram produção de ácido após 24 h de armazenamento, variando significativamente ($P \geq 0.05$) (Figura 6). A co-cultura StLb exibiu maior pós-acidificação em leite e nas misturas leite-soro, como sugerido na literatura (DAVE; SHAH, 1997). A co-cultura StLa apresentou valores intermediários nos diferentes meios, porém em pH 5,0, esses valores foram mais altos. Em leite (12%ST), StLr apresentou pós-acidificação elevada, enquanto que StBl mostrou baixa produção de ácido, especialmente em pH 4,5. Resultados semelhantes foram observados nas misturas leite-soro 10%ST e 8%ST (Figura 6).

Figura 6. Pós-acidificação de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST (○ pH 4,5, □ pH 5,0, ◇ pH 5,5). Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; P < 0,05.

Contagem de células viáveis de bactérias probióticas

As contagens das células viáveis de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST após 24 horas de armazenamento estão apresentadas na Figura 7.

Em leite, as contagens de Lb, La e Lr foram mais altas que 7,03 log UFC/mL, significativamente diferentes das contagens de BI (8,79 log UFC/mL, em média). Apesar da contagem dos inóculos possuir número de células semelhantes, as contagens de bifidobactérias foram maiores em todas as misturas estudadas. Nenhuma diferença nas contagens de *L. bulgaricus* e bifidobactéria foi observada, porém as contagens foram maiores quando a fermentação alcançou pH 4,5. As contagens de *S. thermophilus* foram maiores que 8,5 log UFC/mL.

Em mistura leite-soro 10%ST, as contagens variaram significativamente de 6,88 log UFC/mL (para La em pH 5,5) a 8,91 log UFC/mL (para BI em pH 4,5). Um ligeiro declínio nas contagens de La foi observado em comparação com a contagem obtida em leite, enquanto que *L. rhamnosus* alcançou contagens 8,22 log UFC/ml em média. Chiavari et al. (2005) encontraram resultados similares para *L. rhamnosus* AT194 e *L. rhamnosus* CLT2/2 em bebidas fermentadas de leite de égua.

Quando a mistura leite-soro 8%ST foi utilizada, queda brusca nas contagens de *L. acidophilus* foi verificada (Figura 7), as quais foram as mais

baixas observadas nas misturas (aproximadamente 6,66 log UFC/mL). As variações nas contagens de *L. acidophilus* sugerem que a composição das misturas leite-soro influenciou o crescimento desse microrganismo, seja pela falta de algum fator de crescimento ou pela presença de substância inibidora.

Outra tendência foi observada no crescimento de Lb e Bl, cujas contagens foram significativamente mais altas em pH 4,5 em todas as bases, indicando que maior tempo de fermentação proporcionou aumento nas contagens desses microrganismos e, ainda, que o pH mais baixo do meio não influenciou negativamente o desenvolvimento de *B. animalis* subsp. *lactis*. As contagens de *S. thermophilus* também foram mais altas em pH 4,5.

Figura 7. Contagens de células viáveis de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em leite (12%ST) e misturas leite-soro contendo 10% e 8% ST após 24 horas de armazenamento (○ pH 4,5, □ pH 5,0, ◇ pH 5,5). Médias (n = 2) na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes; $P < 0,05$.

5.5. Bebida láctea probiótica elaborada a partir das misturas leite-soro 10% ST e 8% ST (base láctea)

Parâmetros cinéticos de acidificação

Os parâmetros cinéticos das bebidas lácteas elaboradas com as misturas leite-soro 10% e 8%ST, açúcar e estabilizante estão apresentados na Tabela 7.

A composição das co-culturas e o teor de sólidos influenciaram a velocidade máxima de acidificação das bebidas lácteas (Tabela 7). Uma vez adicionada a sacarose e aumentado o teor de sólidos original (8 e 10%) para 12,1% e 14,5%, os parâmetros cinéticos tiveram comportamento diferente, concordando com o observado por Oliveira e Damin (2003).

Em bebidas obtidas de base láctea 10% (BL10), nota-se que a co-cultura StLb obteve $V_{\max}$ menor ($15,70 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$), enquanto que StBl e StLr apresentaram valores semelhantes (Tabela 7). Na primeira parte do estudo, StLr apresentou $V_{\max}$ bem menor quando comparada às outras co-culturas estudadas (Tabela 6) em misturas 8% e 10% ST, enquanto StBl apresentou os maiores valores. Nota-se que a adição de sacarose influenciou especialmente a $V_{\max}$ de StLr, uma vez que, em misturas 10%, apresentou $V_{\max}$ igual a $12,60 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$ (Tabela 6). Os valores aqui obtidos foram maiores do que aqueles observados nas misturas leite-soro 10%. Essa tendência foi observada por Oliveira e Damin (2003). As autoras estudaram o efeito do aumento do teor de sólidos e da adição de sacarose sobre os parâmetros de acidificação de

StLb, StLa e StLr. Os resultados mostraram que em leites fermentados com teor de sólidos acima de 19%, o valor de $V_{\max}$ foi aumentado.

Porém, em bebidas com base láctea 8% (BL8), não foi observada a mesma tendência. $V_{\max}$ não apresentou diferença estatística para as diferentes co-culturas. Nota-se que StBl, diferentemente do que já foi estudado, exibiu $V_{\max}$ ligeiramente mais baixa que StLb e StLr ($14,83 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$). Esse valor foi similar àquele observado em leite (12%ST) ($14,45 \times 10^{-3} \text{ upH.min}^{-1}$). Como visto no estudo das misturas leite-soro, leite e soro, a $V_{\max}$ de StBl foi influenciada negativamente pelo aumento do teor de sólidos, comportamento também evidenciado nesta etapa da pesquisa. Outro fator que pode ter afetado o comportamento de StBl foi a adição de sacarose. Por outro lado, StLr apresentou $V_{\max}$ mais alta que aquela observada em mistura leite-soro 8%, confirmando a hipótese de que o açúcar tem efeito positivo sobre essa co-cultura.

Os tempos necessários para alcançar $V_{\max}$ variaram de 3,38 h a 4,15 h, sem diferença estatística nas bebidas (Tabela 7). Essa variação foi aproximadamente 1 hora menor que aquelas observadas nas misturas anteriores, nas quais os tempos para atingir $V_{\max}$ ficaram entre 2,90 h a 4,98 h (Tabela 6). A adição de sacarose, e conseqüente aumento do teor de sólidos, tiveram influência positiva neste parâmetro. Pode-se dizer que as diferentes co-culturas atingiram $V_{\max}$ em tempos similares nas diferentes bebidas. Nota-se que as co-culturas apresentaram padrão mais homogêneo nas bebidas lácteas em relação ao perfil de acidificação.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos de bebidas lácteas elaboradas com base leite-soro a 10 e 8% adicionadas de açúcar e estabilizante

Bebida láctea	Co-cultura	$V_{\max}$ ($\times 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)	$t_{V_{\max}}$ (h)	pH correspondente a $V_{\max}$
BL10	StLb	15,70 ^a $\pm$ 1,492	3,95 ^a $\pm$ 0,547	5,10 ^a $\pm$ 0,056
	StBI	18,73 ^b $\pm$ 2,075	3,82 ^a $\pm$ 0,489	5,71 ^c $\pm$ 0,111
	StLr	18,32 ^{ab} $\pm$ 2,459	4,10 ^a $\pm$ 0,547	5,70 ^{bc} $\pm$ 0,115
BL8	StLb	15,55 ^a $\pm$ 1,681	3,38 ^a $\pm$ 0,783	5,38 ^{ab} $\pm$ 0,222
	StBI	14,83 ^a $\pm$ 1,589	4,15 ^a $\pm$ 0,827	5,46 ^{bc} $\pm$ 0,209
	StLr	16,02 ^a $\pm$ 2,445	4,11 ^a $\pm$ 0,617	5,55 ^{bc} $\pm$ 0,216

n=6; médias dadas com desvio padrão; BL10 =10% de sólidos lácteos, BL8= 8% de sólidos lácteos

^a $V_{\max}$ = velocidade máxima, $t_{V_{\max}}$ = tempo necessário para atingir a velocidade máxima; pH _{$V_{\max}$} = pH no qual $V_{\max}$ é alcançada. ^b Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes (Teste de Tukey, $P \leq 0,05$).

O pH em que $V_{\max}$ é atingido variou significativamente entre as co-culturas e as bebidas com 10 e 8% (Tabela 7). StLr e StBl apresentaram valores similares de $\text{pH}_{V_{\max}}$ nas duas bebidas, diferindo significativamente da co-cultura StLb. Os valores de pH aqui observados foram menores que aqueles encontrados nas misturas leite-soro, especialmente para a co-cultura StLr em BL8. De todos os parâmetros aqui estudados, $\text{pH}_{V_{\max}}$ parece ser o que tem mais influência sobre o tempo final de fermentação. Quando $V_{\max}$ é atingida em pH alto, mesmo tendo altos valores, o tempo de fermentação não diminui. Se $V_{\max}$ é atingida em pH mais baixo (como nos casos da co-cultura StLb), t_{pH} é menor, como será visto no parâmetro $t_{\text{pH}4,5}$ abaixo.

Os tempos de fermentação estão exibidos na Figura 8. StLb atingiu pH 4,5 em tempos menores, 4,80 h em BL10 e 4,62 h em BL8. Esses valores foram significativamente diferentes daqueles observados com as co-culturas StBl e StLr. A co-cultura StBl atingiu o pH desejado em 6,96 e 6,95 horas e StLr, em 7,91 e 7,12 h, nas bases 10 e 8%, respectivamente. Como pode ser observado, não houve variação significativa nos tempos de fermentação de cada co-cultura em diferentes bases

Figura 8. Tempo de fermentação (tpH) de *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos. Médias (n = 6); letras diferentes são significativamente diferentes; $P < 0,05$. (○ StLb, □ StBl ◇ StLr).

Pode-se notar que, com a adição de sacarose, os tempos de fermentação diminuíram para as diferentes co-culturas. Porém, essa diferença apresentou perfil diverso para cada uma delas, sendo mais pronunciado quando utilizada StLr em BL8, cuja diferença entre os tempos de fermentação foi de 6,90 h – aproximadamente o dobro. Estudos já demonstraram a influência da sacarose no perfil de acidificação de bactérias probióticas em leites com diferentes teores de sacarose e extrato seco (Oliveira & Damin, 2003). As autoras observaram que, em leites adicionados de 8% de sacarose, as co-culturas StLb, StLa e StLr alcançaram pH em tempo inferior. Porém, em leite, a diferença entre os tempos de fermentação de StLr foi de 1,8 h.

Em misturas leite-soro é mais difícil o desenvolvimento do StLr, que apresentou tempos altos de fermentação na primeira parte do estudo. Para melhor desempenho. Parece ser de fundamental importância que tal co-cultura tenha uma fonte de sacarose disponível no meio de fermentação. StLr comportou-se de maneira lenta nas misturas, no leite e no soro, sendo classificado como microrganismo de baixa acidificação; porém seu perfil foi alterado quando da adição de sacarose. StLr passou a apresentar $V_{\max}$ mais alta, $\text{pH}_{V_{\max}}$ baixo e tpH similar ao de StBl, indicando que os dois microrganismos podem ser apropriados para produção de bebidas lácteas probióticas adoçadas.

Contagem de células viáveis de bactérias probióticas

As contagens dos microrganismos ao longo do período de armazenamento estão dispostas na Figura 9.

Embora as bebidas tenham sido inoculadas com quantidades similares de bactérias, estas se comportaram de maneira diferente durante o período de 28 dias, variando significativamente entre elas e diminuindo conforme o tempo aumentou.

Em BL10, *L. bulgaricus* apresentou contagens acima de 8 log UFC/mL durante os primeiros 7 dias (Figura 9). Nas duas semanas seguintes, as contagens se mantiveram entre 8 e 7 log UFC/mL (d14 e d21). Porém, no final do período, Lb exibiu contagens menores que 6 log UFC /mL, menos que o mínimo exigido pela legislação.

B. lactis, como *L. bulgaricus*, obteve contagens maiores que 8 log UFC /mL no primeiro dia, porém esse número caiu para 7,84 log UFC/mL em d7. Nas duas últimas semanas, as contagens de Bl permaneceram constantes, em torno de 6,20 log UFC/mL (Figura 9).

L. rhamnosus apresentou contagens surpreendentemente baixas 24 h após o armazenamento (Figura 9). Embora o inóculo inicial de Lr tenha sido $1,4 \times 10^8$ UFC/mL, como os outros microrganismos aqui estudados, o mesmo exibiu contagens em torno de 6,4 log UFC/mL no primeiro dia (d1). A partir de d7, as contagens de células viáveis permaneceram abaixo de 6 log UFC/ml, indicando a dificuldade do uso do *L. rhamnosus* em bebidas lácteas probióticas, pois as contagens não se mantiveram acima do limite mínimo estabelecido por lei.

Estudando as contagens dos microrganismos em BL8, observa-se que Lb e Bl exibiram comportamento similar durante os 28 dias de armazenamento. As contagens em d1 foram superiores a 8 log UFC/mL (8,45 log UFC/mL para

Lb e 8,30 log UFC/mL para BI) e mantiveram-se sem diferença estatística até d7. Depois de 14 dias, as contagens mantiveram-se entre 7 e 6 log UFC/ml. Porém, no último dia de armazenamento, Lb apresentou contagem próxima de 5 log UFC/ml (5,15 log UFC/mL), enquanto que BI exibiu 6,02 log UFC/mL.

L. rhamnosus apresentou a mesma tendência já anteriormente observada em BL 10, exibindo contagens entre 5,8 log UFC/mL (d7) e 5,38 log UFC/mL (d28), durante o período de armazenamento.

Nas misturas leite-soro 10% e 8%, *L. rhamnosus* exibiu contagens acima de 8 log UFC/mL (Figura 7), porém os tempos de fermentação até pH 4,5 naquelas misturas foram 11,7 e 14,2 horas, ou seja, aproximadamente 5 a 7 horas mais que nas bebidas lácteas. Embora *L. rhamnosus* tenha apresentado parâmetros cinéticos desejáveis para a produção de bebidas lácteas, a fermentação em tempo muito menor (Figura 8) ocasionou contagem extremamente baixa já no primeiro dia de armazenamento. Esse fato sugere que *L. rhamnosus* necessita de tempo de fermentação alto para desenvolvimento apropriado de células viáveis em número.

Oliveira et al. (2002) observaram comportamento diferente em bebidas lácteas fermentadas por *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* em co-cultura com *S. thermophilus*. As contagens de Lb, La e Lr foram $2,4 \times 10^8$ UFC/mL, $1,7 \times 10^8$ UFC/mL e $4,1 \times 10^7$ UFC/mL, respectivamente, e mantiveram-se estáveis por 21 dias. Depois de 28 dias de armazenamento, a viabilidade das células viáveis apresentou queda, porém manteve-se acima de 6 log UFC/mL para as diferentes culturas.

Thamer e Penna (2005) estudaram o efeito do teor de soro, frutooligosacarídeos (FOS) e açúcar sobre a viabilidade de *L. bulgaricus*, *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* e *S. thermophilus* em bebidas lácteas. Os autores observaram que as contagens dos microrganismos probióticos variaram de 6,95 a 12,98 log UFC/mL. Os resultados mostraram que as maiores contagens foram obtidas quando o teor de sólidos foi mais alto e a acidez do produto final foi mais baixa. Também ficou demonstrado que o aumento dos teores de FOS e soro tiveram efeito significativo sobre as contagens de *S. thermophilus*.

Segundo Donkor et al. (2006), vários são os fatores que podem afetar a sobrevivência de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. Entre eles estão incluídos a cepa de probiótico utilizada, o pH, a presença de peróxido de hidrogênio e DE oxigênio dissolvido e a concentração de metabólitos, tais como ácido lático, ácido acético, e a capacidade tamponante do meio (DAVE; SHAH, 1997; SHAH, 2000B; SHAH ; JELEN, 1990; SHAH ; RAVULA, 2000; TALWALKAR ; KAILASAPATHY, 2004). A viabilidade também depende da disponibilidade de nutrientes, promotores de crescimento ou inibidores, concentração de solutos, nível de inóculo, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de estocagem (DAVE; SHAH, 1997; SHAH 2000b).

As contagens de *S. thermophilus* nas bebidas lácteas estão apresentadas na Figura 10. As contagens de St em co-cultura com *L. bulgaricus*, variaram significativamente durante a vida-de-prateleira, apresentando queda a partir de d14. Porém, em d21, houve ligeira recuperação nas contagens, sendo as mais altas observadas em BI10 e BL8, no último dia

de armazenamento (d28). As contagens de St em co-cultura com *B. lactis* e *L. rhamnosus* foram menores que aquelas observadas com *L. bulgaricus*, variando de 7,90 log UFC/mL a 8,27 log UFC/mL nas duas bebidas. Pode-se dizer que, as contagens nas bebidas contendo 8% de sólidos lácteos foram menores que aquelas exibidas em BL10 (Figura 10).

Figura 9. Contagens de células viáveis de *L. bulgaricus*, *B. lactis* e *L. rhamnosus* em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos durante 28 dias de armazenamento (○ StLb, □ StBl ◇ StLr). Médias (n = 6); P < 0,05; (d1...d7= dias de armazenamento).

Figura 10. Contagens de células viáveis de *S. thermophilus* em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos durante 28 dias de armazenamento (○ St em co-cultura com Lb, □ St em co-cultura com Bl, ◇ St em co-cultura com Lr). Médias (n = 6); $P < 0,05$; (d1...d7= dias de armazenamento).

Pós-acidificação

A variação nos valores de pH e acidez titulável das bebidas lácteas durante o período de armazenamento estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

A redução do valor de pH das bebidas ao longo do período variou conforme o teor de sólidos e a co-cultura empregados (Figura 11). Pode-se observar que os valores de pH diminuíram bruscamente nos primeiros 7 dias para todas as co-culturas em BL10 e BL8. A variação nas semanas seguintes, até 21 dias de armazenamento, foi menor; porém, após 28 dias de armazenamento, as bebidas apresentaram pH significativamente mais baixos do que aqueles observados em d1.

Observou-se que os valores de pH foram mais altos na BL 8 para todas as co-culturas. Como já exposto anteriormente, a co-cultura StLb tem característica de pós-acidificação acentuada, conforme a Figura 11. StBl e StLr apresentaram curvas similares, embora estatisticamente diferentes, sendo que StBl obteve valores mais baixos de pH.

Durante o período de armazenamento, a acidez total titulável aumentou significativamente em todas as bebidas lácteas (Figura 12). Conforme observado no pH (Figura 11), o desenvolvimento de acidez foi mais baixo em BL8, porém, as co-culturas apresentaram valores sem diferença estatística entre elas durante o período de d7 a d21. Em d28, os valores foram significativamente mais altos que em d1. Foi observado que StLb exibiu valores mais altos de acidez, como esperado.

Figura 11. Pós-acidificação em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento (○ StLb, □ StBl ◇ StLr). Médias (n = 6); P < 0,05; (d1...d7= dias de armazenamento).

Figura 12. Variação na acidez titulável em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 durante o período de armazenamento. (o StLb, □ StBl ◇ StLr). Médias (n = 6); P < 0,05; (d1...d7= dias de armazenamento).

Evolução da cor das bebidas lácteas durante o armazenamento

Os resultados para os parâmetros CIELAB, L*, a*, b* e c* ao longo do período de armazenamento, estão apresentados na Tabela 9 e nas Figuras 14 e 15.

Valores de L* representam luminosidade ou brilho, com escala variando de preto (0) a branco (100); a* equivale ao eixo que varia de verde (-100) a vermelho (100), b*, azul (-100) a amarelo (100) e o croma (c*) equivale à saturação.

Na Tabela 8 estão apresentados os parâmetros L*, a*, b* e c* das matéria-primas das bebidas lácteas: leite, soro, misturas leite-soro 10% e 8% e preparado de morango.

Tabela 8. Valores da luminosidade (L*), das coordenadas (a*, b*) e croma (c*) nas matérias-primas das bebidas lácteas.

matéria-prima	L*	a*	b*	c*
Leite	83,94 ^d	-1,51 ^d	9,57 ^d	9,69 ^b
Soro	32,31 ^b	-3,98 ^a	-0,75 ^a	4,05 ^a
mistura leite-soro 10%	84,40 ^d	-2,04 ^c	9,73 ^e	9,95 ^b
mistura leite-soro 8%	80,03 ^c	2,95 ^b	9,13 ^c	9,76 ^b
preparado de morango	5,31 ^a	15,70 ^e	6,27 ^b	16,90 ^c

n=3; ^a Valores na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes

Figura 13. Fotografia das matérias-primas (leite, soro, misturas leite-soro 10% e 8% e preparado de morango) utilizadas para elaboração das bebidas lácteas (BL10 e BL8).

Pode ser observado na Tabela 9 que L^* variou conforme os teores de leite e soro presentes em cada bebida, uma vez que o valor de L^* para leite é 83,9, significativamente diferente do L^* do soro, 32,3 (Tabela 8). Sendo assim, a BL10 apresentou valores significativamente mais altos que BL8, independentemente da co-cultura utilizada. Esses valores variaram durante o período de armazenamento, apresentando tendência decrescente. Observa-se que a BL10 elaborada com StBl exibiu variação maior na luminosidade da amostra, enquanto que em BL8, StBl e STLb apresentaram comportamento similar. StLr não apresentou variação significativa.

Na Figura 14 estão representados os valores de a^* para bebidas lácteas durante o período de armazenamento.

Os valores de a^* foram positivos para ambas as bebidas, uma vez que a tonalidade da cor tende ao vermelho (Figura 14). Porém, como observado em L^* , a variação entre as bebidas é influenciada pelo teor de soro e de leite, que exibiram valores de a^* iguais a -1,51 e -3,40, respectivamente. Deste modo, BL10, apresentou valores mais baixos que BL8, independentemente da co-cultura utilizada. Pode ser observado que, em BL8, houve declínio acentuado da cor ao longo do período de armazenamento. Em BL 10, o mesmo comportamento foi exibido pela co-cultura StBl.

Na Tabela 9 encontram-se os valores de b^* para as bebidas lácteas. Observa-se que BL10 exibiu valores mais próximos de zero (neutro), enquanto que BL8 apresentou valores negativos, com tendência a azul. As diferenças encontradas neste parâmetro, também se devem aos diferentes teores de leite e soro das misturas (b^* igual a 9, 57 e -0,75, respectivamente). Em todos os

tratamentos foi observada tendência crescente nos valores, ao longo da vida-de-prateleira.

Os valores de croma (c^*) variaram de 22,92 a 29,20 ao longo da vida-de-prateleira (Figura 15). Os valores de c^* obtidos para BL10 foram menores que BL8. Esse comportamento pode ser facilmente entendido, uma vez que o cálculo de c^* depende de a^* e b^* . A tendência observada em c^* é a mesma que em a^* para todos os tratamentos.

Tabela 9. Valores da luminosidade (L*) e b* de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento

teor de sólidos lácteos	co-cultura	dias de armazenamento	L*	b*
BL10	StLb	d1	67,40 ^l	-0,106 ^j
		d7	66,93 ^{ijkl}	-0,073 ^{jl}
		d14	67,23 ^{kl}	-0,110 ^j
		d21	67,46 ^l	0,193 ^o
		d28	66,91 ^{ijkl}	0,066 ^{mn}
	StBl	d1	68,67 ^m	-0,393 ⁱ
		d7	66,35 ^{hi}	-0,086 ^j
		d14	66,11 ^h	-0,143 ^j
		d21	66,17 ^h	0,010 ^{mn}
		d28	66,53 ^{hij}	0,080 ⁿ
	StLr	d1	67,03 ^{ijkl}	-0,003 ^{lm}
		d7	66,56 ^{hij}	-0,086 ^j
		d14	66,71 ^{hijk}	0,016 ^{mn}
		d21	66,60 ^{hij}	0,180 ^o
		d28	66,43 ^{hij}	0,067 ^{mn}
BL8	StLb	d1	62,40 ^g	-1,210 ^e
		d7	59,17 ^{ab}	-1,137 ^{ef}
		d14	59,25 ^{ab}	-1,010 ^g
		d21	59,16 ^a	-0,997 ^g
		d28	60,03 ^{cde}	-0,947 ^g
	StBl	d1	62,77 ^g	-1,330 ^d
		d7	60,77 ^f	-1,110 ^f
		d14	60,34 ^{def}	-1,103 ^f
		d21	60,46 ^{ef}	-0,960 ^g
		d28	60,51 ^{ef}	-0,847 ^h
	StLr	d1	59,72 ^{abcd}	-1,503 ^{ab}
		d7	59,17 ^{ab}	-1,663 ^a
		d14	59,25 ^{ab}	-1,376 ^{cd}
		d21	59,16 ^a	-1,366 ^{cd}
		d28	59,30 ^{ab}	-1,436 ^{bc}

BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos;

Figura 14. Variação da coordenada a^* em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 durante o período de armazenamento.

(○ StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; Médias ($n = 6$); $P < 0,05$. (d1...d7= dias de armazenamento).

Figura 15. Variação do croma (C^*) em bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (BI) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) em bebidas lácteas BL10 e BL8 durante o período de armazenamento refrigerado.

(○ StLb, □ StBI ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias ($n = 6$); $P < 0,05$.

Aspectos reológicos

A Figura 16 evidencia os reogramas característicos das bebidas lácteas (BL8) estudadas aos 28 dias de armazenamento.

Estes produtos podem ser caracterizados como fluidos não-newtonianos, do tipo pseudoplástico, com tixotropia resultante da quebra estrutural durante o cisalhamento. Isto pode ser observado pela diferença entre as curvas ascendente e descendente da relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento (Figura 16). Estes resultados são consistentes com aqueles descritos por Inagaki (1983), Ramaswamy & Basak (1991) para iogurte, e, para bebidas lácteas por Penna *et al.* (2001), Oliveira *et al.* (2002), Penna *et al.* (2006).

Aos resultados de reologia obtidos a 5°C para as seis bebidas lácteas probióticas durante os 28 dias de armazenamento foram ajustados aos modelos de Oswald-de-Waele para ambos os ciclos ascendente e descendente.

Os coeficientes de determinação (R^2) para a curva ascendente variaram de 0,40 a 0,94, mostrando falta de ajuste dos resultados ao modelo da Lei da Potência. Quando os resultados da curva descendente foram ajustados usando o mesmo modelo matemático, os valores de R^2 variaram de 0,91 a 0,99. Desta forma, a caracterização reológica das bebidas lácteas probióticas preparadas a partir de dois teores de sólidos lácteos 10 e 8% será discutida com base nos resultados da curva descendente.

Nas Figuras 17 e 18 encontram-se os dados do índice de comportamento de escoamento (n) e do índice de consistência (k) obtidos pela aplicação do modelo reológico de Oswald-de-Waele ($\tau = ky^n$), ciclo descendente.

Para o Índice de comportamento de escoamento (n), ciclo descendente, os valores variaram de 0,022 (StLb em d21) a 0,050 (StLr em d28) para BL10, sendo inferiores para BL8 (variação de 0,014, com StLb em d7, a 0,025, com StLr em d28). Observa-se, através da Figura 17, que os valores para o índice de comportamento de escoamento mantiveram-se constantes durante o armazenamento para bebidas lácteas elaboradas com a co-cultura StLb.

Figura 16. Reograma das bebidas lácteas contendo 8% (BL8) de sólidos lácteos após 28 dias de armazenamento refrigerado. (○ StLb, □ StBl ◇ StLr)

Figura 17. Índice de comportamento de escoamento (n) de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Modelo Oswald-de Waele, ciclo descendente.

(○ StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; Médias (n = 6); P < 0,05 (d1...d7= dias de armazenamento).

O comportamento do índice de consistência (k) de bebidas lácteas probióticas elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado pode ser visto na Figura 17. Observa-se que estes variaram de 0,32 (StLr em d14) a 1,54 Pa.sⁿ (StLr em d28), tendo a co-cultura StLr apresentado intensa variação no comportamento, exibindo valores mais altos em d28, tanto em BL10 como em BL8. Bebidas elaboradas com StLb mostraram tendência constante durante o armazenamento.

Os resultados da viscosidade aparente das bebidas lácteas probióticas ao longo do armazenamento antes e após o cisalhamento (medida realizada a 60 rpm) estão apresentados nas Figuras 19 e 20. Os valores da viscosidade aparente inicial das bebidas lácteas probióticas foram mais altos em bebidas com teor de sólido maior (BL10), variando de 303,30 (StBl em d1) a 722,30 mPa (StLr em d28) (Figura 19). A viscosidade em Bl 8 não variou significativamente entre as co-culturas e entre os dias de armazenamento, apresentando valores baixos entre 84,6 a 180,0 mPa, conforme observado na Figura 19.

Esses valores foram muito superiores àqueles encontrados a 60rpm (Figura 20). Neste ponto, a viscosidade variou de 39,67 a 233 mPa exibindo valores significativamente mais baixos em BL8, como visto na viscosidade inicial.

Figura 18. Índice de consistência (k) de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (BI) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Modelo Oswald-de –Waele, ciclo descendente. (○ StLb, □ StBI ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); P < 0,05.

Figura 19. Viscosidade aparente de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Dados obtidos antes do cisalhamento. (o StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); P < 0,05.

Figura 20. Viscosidade aparente de bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos elaboradas com *L. bulgaricus* (Lb), *L. acidophilus* (La), *L. rhamnosus* (Lr) e *B. lactis* (Bl) em co-cultura com *S. thermophilus* (St) durante o período de armazenamento refrigerado. Dados obtidos após o cisalhamento e a 60 rpm. (o StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); $P < 0,05$.

Análise sensorial

Os resultados das análises sensoriais baseadas na escala não estruturada de 1 (desgostei muitíssimo) a 9 (gostei muitíssimo) referentes aos atributos aparência, sabor e consistência das bebidas lácteas BL10 e BL8 podem ser observados nas Figuras 21, 22 e 23.

De maneira geral, pode-se dizer que, em relação à aparência, as bebidas contendo 10% de sólidos lácteos obtiveram maior aceitação quando analisadas no primeiro dia de armazenamento (Figura 21), sendo que a bebida elaborada com StLr obteve valor mais alto, porém sem diferença significativa. Esses valores podem ser relacionados com aqueles obtidos em relação à cor, nos quais Bl 10 apresentou maior luminosidade e menores valores de a^* e c^* .

As bebidas elaboradas com 8% de sólidos lácteos mostraram comportamento contrário, exibindo perfil de aceitação mais alto em 21 dias. A bebida elaborada com StLb obteve o valor mais baixo na escala, 5,26 pontos.

Na Figura 22 estão apresentados os resultados referentes ao sabor das bebidas lácteas.

As bebidas contendo 10% de sólidos lácteos apresentaram o mesmo perfil observado no atributo aparência (Figura 21), com valores maiores no primeiro dia de armazenamento. Essa tendência decrescente observada em d21 deve-se provavelmente ao fato do desenvolvimento de acidez (Figuras 11 e 12) e de outras substâncias provenientes do metabolismo das bactérias lácticas acumuladas durante o período de armazenamento.

As bebidas elaboradas com 8% de sólidos lácteos não apresentaram variação entre o primeiro e vigésimo primeiro dia de análise (Figura 22), excluindo-se a bebida elaborada com StLb.

Nota-se que as bebidas elaboradas com maior teor de sólidos obtiveram maior aceitação, especialmente no primeiro dia de análise. Bebidas elaboradas com a co-cultura StLb apresentaram valores menores na escala, entre os participantes, enquanto que as elaboradas com StBl e StLr, apresentaram maior índice de aceitação, independentemente do teor de sólidos utilizado.

O atributo consistência variou pouco, conforme visto na Figura 23. Bebidas com 10% de teor de sólidos apresentaram melhor aceitação, quando comparadas às que continham 8%. As bebidas obtidas através da fermentação com a co-cultura StLb não apresentaram diferença estatística nos dois dias de análises (Figura 23). BL10 elaborada com StLr exibiu o índice de aceitação mais baixo em d21, enquanto que quando foi utilizada a c-cultura StLb, a aceitação foi melhor.

Figura 21. Variação da aparência segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. (○ StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); $P < 0,05$.

Figura 22. Variação do sabor segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. (○ StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); $P < 0,05$.

Figura 23. Variação da consistência segundo análise sensorial das bebidas lácteas contendo 10% (BL10) e 8% (BL8) de sólidos lácteos nos tempos d1 e d21 de armazenamento refrigerado. (○ StLb, □ StBl ◇ StLr); BL10: 10% de sólidos lácteos; BL8: 8% de sólidos lácteos; (d1...d7= dias de armazenamento). Médias (n = 6); $P < 0,05$.

6. Conclusões

1. O soro apresentou efeito positivo sobre a velocidade máxima das co-culturas aqui estudadas, bem como as diferentes composições das co-culturas influenciaram o parâmetro estudado.

2. O teor de sólidos influenciou a velocidade de acidificação das co-culturas StLb e StBl, enquanto que StLa e StLr não foram induzidas a comportamento diferente em relação a este parâmetro.

3. Todas as culturas apresentaram contagens maiores em pH 4,5, quando comparadas às obtidas em pH 5,5. Essa constatação demonstra o efeito do pH de parada sobre a contagem de células viáveis dos probióticos, pois, à medida que a fermentação avançou e atingiu pH mais baixo, os microrganismos provavelmente estavam mais adaptados ao meio e mais ativos.

4. A co-cultura StLb foi a mais rápida a fermentar os diferentes meios estudados e a StLr, a mais lenta;

5. Com a adição de açúcar e de estabilizante, os parâmetros cinéticos mostraram comportamento diferenciado daqueles obtidos em misturas leite-soro. $V_{\max}$ aumentou, enquanto $t_{V_{\max}}$ e t_{pH} diminuíram.

6. O pH no qual $V_{\max}$ é atingida teve maior influência sobre o tempo final de fermentação; quanto mais baixo o pH, menor foi o tempo de fermentação.

7. Nas bebidas lácteas, as contagens de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* mantiveram-se acima do limite exigido pela legislação até 28 dias de armazenamento do produto refrigerado.

8. A pós-acidificação, cor e reologia variaram durante o período de armazenamento, influenciando a análise sensorial, cujos atributos obtiveram maior aceitação em bebidas elaboradas com 10% de sólidos lácteos.

9. Os resultados indicaram que a bebida láctea elaborada com a co-cultura StBI foi a melhor alternativa para desenvolvimento de uma bebida probiótica com boas características sensoriais e funcionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS³

ABBOTT, A. Gut reaction. **Nature**, v.427, p.284-286, 2004.

ACNIELSEN. Tendências e Análises. Relatórios e Estudos. Estudos Globais. Os Produtos Mais Quentes do Mundo – Alimentos e Bebidas (2002). **Os produtos mais quentes do mundo**: informações sobre o crescimento de alimentos e bebidas. 2002. 22p. Disponível em: <http://www.acnielsen.com.br/reports/documents/OsProdutosMaisQuentesdoMundo.pdf>. Acesso em: 29.03.07

ADRIAN, J. **Valeur alimentaire du lait**. Paris: Maison Rustique, 1973. 229p.

AHMED, F.E. Genetically modified probiotics in foods. **Trends in Biotechnology**, v.21, n.11, p.491-497, 2003. [Review].

ALANDER, 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, n.1, p.351-354, 1999.

ALMEIDA, K.E. **Utilização de soro de queijo Minas frescal para elaboração de bebidas lácteas fermentadas**. Botucatu, 1999. 98p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual de São Paulo.

³ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROCA, R.O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas preparadas com soro de queijo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.187-192, 2001.
- ALVAREZ, V.B.; JI, T.; BALAKRISHNAN, S. Acid whey as an ingredient in a chocolate-flavored beverage. **Milchwissenschaft**, v.58, n.9/10, p.524-527, 2003.
- ANTUNES, A. E. C., MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , v. 27, n.1, p.83-90, 2007 .
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Arlington: AOAC, 1995. 1141p.
- 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.
- BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D.K.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.119-126, 2003.
- BASAK, S.; RAMASWAMY, HS. Simultaneous evaluation of shear rate and time dependency of stirred yoghurt rheology as influenced by added pectin and strawberry concentrate. **Journal of Food Engineering** , v. 21, p. 385-393. 1994.
- BÉAL, C.; DESCHAMPS, N.; JUILLARD, V.; ROISSART, H.; RICHRAD, J.; SARAUX, B. Cinétiques de croissance et d'acidification des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F.M., eds. **Bactéries lactiques**. Loriga: Chemin de Saint Georges, 1994. v.1, p.367-401.

- BÉAL, C.; LOUVET, P.; CORRIEU, G. Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.148-154, 1989.
- BENEZECH, T.; MAINGONNAT, JF. Characterization of rheological properties of yoghurt. A review. **Journal of Food Engineering**, v.21, n.4, p. 447-472, 1994.
- BEUCLER, J.; DRAKE, M.; FOEGEDING, E.A. Design of a beverage from whey permeate. **Journal of Food Science**, v.70, n.4, p.S277-S285, 2005.
- BOIRIE, Y.; DANGIN, M.; GACHON, P.; VASSON, M.P.; MAUBOIS, J.L.; BAUFRÈRE, B. Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.14930-14935, 1997.
- BOUDIER, J.F.; LUQUET, F.M.; PERR, C. **Utilisation des lactosérums en alimentation humaine et animale**. Massy: Centre de Documentation Internationale des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles, s.d. 136p.
- BRANDÃO, S.C.C. Soro: um desafio para as fábricas de queijos. **Leite & Derivados**, n.15, p.13-18, 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SISLEGIS: Sistema de Consulta à Legislação. **Instrução Normativa n.16, de 23 de agosto de 2005**. Aprovar o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=3742>. Acesso em: 30 out. 2005.
- BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal of Dairy Technology**, v.50, p.21-27, 1997.

- CABRERA SANTOS, M.C.; MARTINEZ, G.; ESPINOSA, B.; ORTEGA FLEITAS, O.; REAL DEL SOL, E. Utilizacion de suero acido em la elaboracion de um postre concentrado azucarado. **Alimentaria**, n.260, p.107-110, marzo, 1995.
- CACHON, R., JEANSON, S., ALDARF, M. & DIVIES, C. (2002). Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82, 281–288.
- CHAMMAS, G. I.; SALIBA, R.; CORRIEU, G.; BEAL, C. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk “laban”. **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.52–61, 2006.
- CHIAPPINI, C.C.J.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação do soro de queijo quanto aos coliformes totais e coliformes fecais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, n.327, p.230-232, 2002.
- CHIAVARI C.; COLORETTI F.; NANNI M.; SORRENTINO E.; GRAZIA L. Use of donkey's milk for a fermented beverage with lactobacilli. **Lait**, v.85, p.481-490, 2005.
- COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P.S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M.C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v.64, p.409–421, 1997
- COLLET, L.S.F.C.A. **Influência da adição de caseinato de sódio sobre o escoamento e posterior recuperação estrutural do iogurte batido**. São Paulo, 2005. 105p. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia Química – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.
- CONSUMO DE IOGURT SUBIU 702%. Leite e Derivados, n.99, julho, p.42-50, 2007.

- CORRIEU, G.; SPINLER, H.E.; PICQUE, D.; JOMIER, Y. Procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activité acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en œuvre. Fr. Pat. 88 14456, 1988.
- DAHM, L.; FUHRMAN, E. Dairy innovations: probiotics, prebiotics and whey are making dairy-based drinks leaders in healthy formulations. (Beverage R&D) In: GOLIATH: Business Knowledge on Demand. Industry Information. Business News. Browse by Publication. **Beverage Industry**. November, 2006. Disponível em: http://goliath.ecnext.com/coms2/gi_0199-6084250/Dairy-innovations-probiotics-prebiotics-and.html. Acesso em: 15.01.07.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of level of starter culture on viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts. **Food Australia**, v.4, n.49, p.164-168, 1997.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effectson viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2804-2825, 1998.
- DELLAGLIO, F.; ROISSART, H.; TORRIANI, S.; CURK, M.C.; JANSSEN, D. Caractéristique générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F.M., eds. **Bactéries lactiques**. Lorica: Chemin de Saint Georges, 1994. v.1, p.25-116.
- DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S.; VLAEMINCK, G. Specific characteristics of microorganism used for fermented milks. **Bulletin of International Dairy Federation**, n.277, p.4-16, 1992.
- DETHEMERS, A.E. Sensory evaluation guide for testing food and beverage products. **Food Technol.**, Chicago, v.11, p.50-57, 1981.
- DODDS, P. Whey beverage technology. **Cultured Dairy Products Journal**, v.54, n.3, p.17-20, 1989.

- DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.16, p.1181–1189, 2006.
- DORAL, R.P.; AKILA, N.; SIVAKUMAR, T. Membrane processing of Channa whey and its utilization. **Indian Veterinary Journal**, v.84, n.4, p.426-427, 2007.
- DRGALIĆ, I.; TRATNIK, L.; BOŽANIĆ, R. Growth and survival of probiotic bacteria in reconstituted whey. **Lait**, v.85, p.171-179.
- DRYER, J. Marketing insights: a whey to make some money. **Dairy Foods**, v.107, n.3, p.28, 2006.
- 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, pt.2, p.319-340, 1996.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISEY, D.; THORNTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E.M.M.; O' SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. Probiotics: from myth to reality: demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, n.1/4, p.279-292, 1999.
- EI-NEMR, T.M.; AWAD, S.A.; ALI, A.H. Cheese whey and skimmed milk as a base for probiotic dairy fermented products supplemented with some herb oils. In: EGYPTIAN CONFERENCE FOR DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY, 9, Cairo, 2004. **Proceedings**. Cairo: International Agriculture Center, 2004. p.103-115.
- FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I.; DESJARDINS, M.P.; GARDNER, N.; FLISS, I.; CHAMPAGNE, C. Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.174–181, 2007.

- FEDERATION INTERNATIONALE DE LATIERE. 150:1991. Yaourt: determination da lácidity titratable (methode potenciometrique). Bruxelles, 1991. 1f.
- FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas: caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e probióticos**: atualização e prospecção. Viçosa: UFV, 2003. p.7-33.
- FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Probióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.2, n.8, p.40-43, 1999.
- FERREIRA, C.L.L.F. Valor nutritivo e bioterapêutico de leites fermentados. In: LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G. **Leites fermentados e bebidas lácteas**: tecnologia e mercado. Campinas: ITAL, 1997. cap.1, p.1-7.
- FERREIRA, C.L.L.F.; RODRIGUES, W.S.; PIMENTEL, G.M. Aproveitamento do soro de queijo na fabricação de bebida fermentada com bactérias lácticas. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LATICÍNIOS, 1, Belo Horizonte, 1996. **Anais**. Belo Horizonte, 1996. s.p.
- FERREIRA, C.L.L.F. **Produtos lácteos fermentados**: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: UFV, 1993. 96p. (Universidade Federal de Viçosa, n.93).
- FOSCHINO, R.; CAFARO, I.; OTTOGALLI, G. Studio sulla vitalità di batteri «probiotici» presenti in campioni di latti fermentati del commercio. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.47, p.151-164, 1997.
- FULLER, R. **History and development of probiotics**. In: FULLER, R., ed., New York: Marcell Dekker, 1994, p.1-8.
- FURTADO, M.M.; MAGALHÃES, J.P.; LOURENÇO NETO, J.P.M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118p.

- GALLARDO-ESCAMILLA, F.J.; KELLY, A.L.; DELAHUNTY, C.M. Mouthfeel and flavour of fermented whey with added hydrocolloids. **International Dairy Journal**, v.17, p.308-315, 2007.
- GALLARDO-ESCAMILLA, F.J.; KELLY, A.L.; DELAHUNTY, C.M. Sensory characteristics and related volatile flavor compound profiles of different types of whey. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.2689–2699, 2005.
- GANDHI, D.N.; PATEL, R.S. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. **Cultured Dairy Products Journal**, v.29, n.1, p.25-27, 1994.
- GAVA, A.J. Princípios de Tecnologia de Alimentos. 2 ed. São Paulo: Nobel, 283p. 1979
- GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2483-2494, 1989.
- GIROTO, J.M.; PAWLOSKY, U. Soro de leite: custos de equipamentos para o seu processamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.57, n.327, p.117-120, 2002.
- 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 and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, p.139-157, 1999.

- GRANDI, J.G. Leites fermentados, manteigas e queijos. In: AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Biotechnologia**: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blucher, 1983. v.5, p.123-131.
- HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUIS IN'T VELDT, J.H.J. Selection in strains for probiotic use. In: FULLER, R., ed. **Probiotics**: the scientific basis. London: Chapman Hall, 1992. p.209-224.
- HERNANDEZ-MENDOZA, A.; ROBLES, V.J.; ANGULO, J.O.; DE-LA-CRUZ, J.; GARCIA, H.S. Preparation of a whey-based probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. **Food Technology and Biotechnology**, v.45, n.1, p.27-31, 2007.
- HOFFMANN, F.L.; PENNA, A.L.B.; VINTURIN, T.A. Avaliação da qualidade de diferentes marcas comerciais de bebidas lácteas - sabor morango. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15, 1997, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora, 1997. pág 129.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.
- INAGAKI, T. Viscous behavior of soft yogurt. **Bulletin Nippon Vet. Zootech. College**, v.35, p.225-229, 1986.
- 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.

- ISMAIL, A.A.; HASSAN, A.A.; MAHRAN, G.A.; EL-HOFI, M.A. Technological and chemical studies on the manufacture of fermented dairy products from milk by products. I. Manufacture of whey beverage with kefir aroma by continuous shaking during incubation at room temperature. In: EGYPTIAN CONFERENCE FOR DAIRY SCIENCE AND TECHNOLOGY, 5, Cairo, 1992. **Abstracts**. Cairo: Egyptian Society of Dairy Science, 1992. p.264.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Research, Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- ITSARANUWAT, P.; HAL-HADDAD, K.S.; 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. [Review]
- JELLEN, P.; GALLMANN, P.; COOLBEAR, T. Current and future applications of fermentation technology in the dairy industry. In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Fermented milk**. Brussels: International Dairy Federation, 2003. p.10–20. [Proceedings of the IDF Seminar on aroma and texture of fermented milk, Kolding, Denmark, 1–3 June 2002].
- JOKAR, A; GOLMAKANY, M.T.; KARBASI, A. A dairy chocolate beverage prepared from whey permeate sweetened by date syrup. **Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources of Isfahan University of Technology**, v.10, n.4B, p.427-433, 2007.
- KAR, T.; MISRA, A.K. Therapeutic properties of whey used as fermented drink. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.163-169, 1999.
- KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.45-57, 1999.

- 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.
- KNEIFEL, W.; ULBERTH, F.; ERHARD, F.; JAROS, D. Aroma profiles and sensory properties of yoghurt and yoghurt-related products. I. Screening of commercially available starter cultures. **Milchwissenschaft**, n.47, p.362-365, 1992.
- KRISHNA, G.G.; RAO, B.V.R.; RAO, T.J. Yogurt from whey based reconstituted milk. **Journal of Food Science and Technology**, v.21, n.1, p.48-49, 1984.
- 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.
- KURMANN, J.A. Starters with selected intestinal bacteria. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.227, p.41-55, 1988.
- LAMPRESH, E.D.; FOSTER, E.M. The survival of starter organisms in concentrated suspensions. **Journal of Applied Bacteriology**, n.26, p.359-369, 1963.
- LAYE, I.; KARLESKIND, D.; MORR, C.V. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yogurt. **Journal of Food Science**, v.58, p.991-995, 1993.
- LIUTKEVICIUS, A.; TAMULIONYTE, D.; SEKMOKIENE, D. Functional food development: impact of technological factors on the quality of whey beverages with flaxseed oil. **Milchwissenschaft**, v.62, n.1, p.73-76, 2007.
- LUCAS, A.; SODINI, I.; MONET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v.14, p.47-53, 2004.

- MACHADO, R.M.G.; FREIRE, V.H.; SILVA, P.C.; FIGUEIREDO, D.V.; FERREIRA, P.E. **Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios**. Belo Horizonte, 2002. 224p. (Projeto Minas Ambiente).
- MAGALHÃES, G.; MOSQUIM, M.C.A.V.; PEIXOTO, E.C.; MONTEIRO, R.R. Desenvolvimento de bebida láctea achocolatada a partir de leite integral e soro em pó. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LATICÍNIOS, 1, 1996, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte, 1996. s.p.
- MARAGKOUDAKIS, P. A.; MIARIS, C.; ROJEZ, P.; MANALIS, N.; MAGKANARI, F.; KALANTZOPOULOSA, G.; TSAKALIDOUA, E. Production of traditional Greek yoghurt using *Lactobacillus* strains with probiotic potential as starter adjuncts. **International Dairy Journal**, v.16, p.52-60, 2006.
- MARTIN-DIANA, A.B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Effect of milk fat replacement by polyunsaturated fatty acids on the microbiological, rheological and sensorial properties of fermented milks. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n.84, p.1599-1605, 2004.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.
- MATTO, J.; ALAKOMI, H.-L.; VAARI, A.; VIRKAJARVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp, *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v.16, 1029–1037, 2006.
- MCKINLEY, M.C. The nutrition and health benefits of yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.1, p.1-12, 2005.
- MELLO, E.M. **Obtenção e caracterização de concentrado protéico de soro de queijo por ultrafiltração**. Campinas 1989. 118p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia dos Alimentos - Universidade de Campinas.

- MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**. v. 9, p. 175-191, 2003.
- MIGLIORANZA, L.H.S.; MATSUO, T.; CABALLERO-CORDOBA, G.M.; DICH, J.B.; CYRINO, E.S.; OLIVEIRA, I.B.N.; MARTIS, M.S.; POLEZER, N.M.; DICH, I. Effect of long-term fortification of whey drink with ferrous bisglycinate on anemia prevalence in children and adolescents from deprived areas in Londrina, Parana, Brazil. **Nutrition**, v.19, n.5, p.419-421, 2003.
- MOHEBBI, M.; NAJAFI, M.B.H. Optimization of production, storage, and quality of whey based fruit juice beverage. **Agricultural Sciences and Technology**, v.18, n.2, p.1-10, 2004.
- MORAES, M.A.C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: UNICAMP, 1985. 85P.
- MUKHOPADHYAY, R.; TALUKDAR, D.; CHATTERJEE, B.P.; GUHA, A.K. Whey processing with chitosan and isolation of lactose. **Process Biochemistry**, v.39, n.3, p.381-385, 2003.
- MULVIHILL, D.M. Whey proteins and their thermal denaturation: a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v.11, p.43-75, 1987.
- MUNÕS, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation in quality control**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240p.
- NEVES, B.S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. **Leite & Derivados**, v.2, n.10, p.50-54, 1993.
- 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**, n.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, n.1, p.1-21, 2002a.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, n.6, p.2336-2341, 2002b.
- 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.
- 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.
- OTTOGALLI, G. Caratteristiche e significato della microflora dei formaggi. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.36, p.207-225, 1986.
- OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, n.1/4, p.279–289, 2002a.
- PARASKEVOPOLOU, A.; ATHANASIADS, I.; BLEKAS, G.; KOUTINAS, A..A.; KANELLARI, M.; KIOSSEOGLOU, V. Influence of polysaccharide addition on stability of a cheese whey kefir-milk mixture. **Food Hydrocolloids**, v.17, n.5, p.615-620, 2003.
- PAZ-FRASSINO, M.T.; PEREZ, J.; NUNEZ DE VILLAVIVENCIO, M.; HERNANDEZ, R. Desenvolvimento de um produto lácteo à base de leite de soja aromatizado com chocolate. **Alimentaria**, v.291, p.83-86, 1998.
- PENNA, A. L. B. ; CONVERTI, A. ; OLIVEIRA, M. N. Simultaneous effects of total solids content, milk base, heat treatment temperature and sample temperature

on the rheological properties of plain stirred yogurt. ***Food Technology and Biotechnology***, v. 44, p. 517-520, 2006.

PENNA, A. L. B. ; OLIVEIRA, M. N. ; TAMIME, A.Y. Influence of carrageenan and total solids content on the rheological properties of lactic beverages made with yogurt and whey. ***Journal of Texture Studies***, Geneva, v. 34, n. 1, p. 95-113, 2003.

PENNA, A.L.B., SIVIERI, K., OLIVEIRA, M.N. Relation between quality and rheological properties of lactic beverages. ***J. Food Eng.*** London, v.49, n.1, p.7 - 13, 2001

PICQUE, D.; PERRET, B.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Caractérisation et classification de bactéries lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d'acidification. ***LWT - Food Science and Technology***, v.25, p.181–186, 1992.

PIEN, J. Boissons à base de lait et de produits laitiers. ***Industries Alimentaires et Agricoles***, v.87, n.5, p.595-602, 1970.

PIFARRE, A.M.; MARTIN, O.; PORTELA, M.L.; LANGINI, S.H.; WEISSTAUB, A.R.; GRECO, C.; FERRER, P.R. Acceptability and nutritional quality of a beverage based on orange juice and whey powder, preserved by heat or high-intensity pulsed electric fields (HIPEF). ***Archivos Latinoamericanos de Nutricion***, v.56, n.4, p.356-360, 2006.

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; GOMEZ, R.J.H.C. Soro de leite - obtenção, características e aproveitamento: revisão. ***Semina: Ciências Agrárias***, v.13, n.1, p.92-96, 1992.

RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. ***Yoghurt***: Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. 466p. (Fermented fresh milk products and their cultures, v.1).

- RAMASWAMY, H.S. ; BASAK, S. Rheology of stirred yogurts. ***Journal of Texture Studies***, Geneva v.22, p. 231-241, 1991.
- RAVULA, R.R.; SHAH, N. P. Selection enumeration of *Lactobacillus casei* from yoghurts and fermented milk drinks. ***Biotechnology Techniques***, v.12, p.819–822, 1998.
- RICHARDSON, D. Probiotics and product innovation. ***Nutrition & Food Science***, v.4, p.27-33, 1996.
- ROBINSON, R.K.; TAMIME, A.W. Yogurt: a review of the product and its manufacture. ***Journal of the Society of Dairy Technology***, v.28, n.3, p.149-163, 1975.
- ROSSO, V. V. & MERCADANTE, A.Z. Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***, v.8, p.347–352, 2007.
- SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão. ***Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos***, n.31, v.2, p.176-185, 1997.
- SAHU, C.; PATEL, S.; CHOUDHARY, P.L. Technology for manufacture of whey based mango-herbal (lemongrass) beverage. ***Journal of Food Science and Technology***, v.42, n.5, p.421-424, 2005.
- SALMINEN, S.; GORBACH, S.; SALMINEN, K. Fermented whey drink and yogurt-type product manufactured using *Lactobacillus* strain. ***Food Technology***, v.45, n.6, p.112, 1991.
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt culture on the survival of bifidobacteria in fermented milks. ***Journal of the Society of Dairy Technol.***, v.42, n.2, p.58-60, 1994.

- SANTOS, J.P.V.; FERREIRA, C.L.L.F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.3, p.44-50, 2001.
- SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1284-1289, 2007.
- SAXELIN, M.; KORPELA, R.; MAYRA-MA KINEN, A. Introduction: classifying functional dairy products. In: MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M., eds. **Functional dairy products**. Boca Raton: Woodhead Publishing; Cambridge: CRC Press, 2003. p.1–16. (Woodhead Publishing in food science and technology).
- SCHMIDT-HEBBEL, H. **Química y tecnología de los alimentos**. Santiago: Editorial Salesiana, 1956. 313p.
- SENSIDONI, A.; JARRAH, S.; ORLANDO, C.; SIMCIC, M. Formulazione di una bevanda a base di frutta e polvere di siero di latte. **Latte**, v.20, n.2, p.151-154, 1995.
- SHAH, N. P. Some beneficial effects of probiotic bacteria. **Bioscience Microflora**, v.19, p.99–106, 2000.
- 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.
- SHAH, N.P.; JELEN, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. **Journal of Food Science**, v.55, p.506–509, 1990.
- SHAKER, R.Y.; JUMAH, R.R.; ABUJDAVIL, B. Rheological properties of plain yogurt during coagulation process: impact of fat content and preheat treatment of milk. **Journal of Food Engineering**, v.44, p.175-180, 2000.

- SHUKLA, F.C.; SING, A.S.B. Studies on the preparation of fruit beverages using whey end buttermilk. **Journal of Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.102-105, 2004.
- SILVA, D.J.P.; PEREIRA, V.F.; BARROS, A.R.; MOTTA, F.B.; ARAUJO, M.A.; PASSOS, F.J.V. Gerenciamento de resíduos em uma indústria de produtos lácteos. **Leite & Derivados**, n.91, p.26-37, 2006.
- SINGH, W.; KAPOOR, C.M.; SRIVASTAVA, D.N. Standartization of technology for the manufacture of guava whey beverage. **Indian Journal of Dairy Science**, v.52, n.5, p.268-271, 1999.
- SPADOTI, L.M. **Uso de leite reconstituído na fabricação de queijo mussarela**. Piracicaba, 1998. 101p. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo.
- SPINNLER, H.E.; CORRIEU, G. Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement. **Journal of Dairy Research**, v.56, p.755-764, 1989.
- SPREER, E.; MIXA, A. **Milk and dairy product technology**. New York: Marcel Dekker, 1998. 483p. (Food science and technology, v.84).
- STONE, H.S.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Pratices**. Orlando, USA, Academic Press, p.338, 1993.
- SURESH, K.B.; JAYAPRAKASHA, H.M. Process of optimization for preparation of beverage from lactose hydrolised whey permeate. **Journal of Food Science and Technology**, v.41, n.1, p.27-32, 2004.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p.117–124, 2004.

- TAMIME, A. Y.; SAARELA, M.; SØNDERGAARD, A. K.; MISTRY, V. V.; SHAH, N. P. Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products. In A. Y. Tamime, **Probiotic dairy products**. (p. 39-72), Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2005.
- TAMIME, A.Y. Cultura “starters” lácticas e probióticas. In: LERAYER, A.L.S.; SALVA, T.J.G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997.
- TAMIME, A.Y.; DEETH, H. **Yogurt science and technology**. Exeten: Pergamon Press, 1989.
- THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p.393-400, 2005.
- UNITED STATES. Dairy Export Council. **Manual de referência para produtos de soro dos E.U.A.** Arlington: USDEC, 2001.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A Enumeration of *L. casei* in the presence of *L. acidophilus*, Bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, n.4, p.271-275, 2000.
- VISHAL, T.; JHA, Y.K. Development of whey beverage with antagonistic characteristics and probiotics. **International Journal of Food Properties**, v.7, n.2, p.261–272, 2004.
- WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J.; **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Boca Raton,London, CRC Press Taylor & Francis, 782p., 2006.
- WASEN, I. Soro lácteo: lucro para a indústria e proteção ao meio ambiente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15, Juiz de Fora, 1997, **Anais**. Juiz de Fora, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Programmes and Projects. Food Safety. Publications. Food Production to consumption: publications. **Health and nutritional properties of probiotics in food powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation, Cordoba, Argentina, 1 – 4 October 2001**. Geneva: FAO/WHO, 2001. 34p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html. Acesso em: 07.06.03.

XANTHOPOULOS, V.; PETRIDIS, D.; TZANETAKIS, N. Characterization and classification of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains isolated from traditional Greek yogurts. **Journal of Food Science**, v.66, n.5, p.747-752, 2001.

XANTHOPOULOS, V.; PICQUE, D.; BASSIT, N.; BOQUIEN, C.Y.; CORRIEU, G. Methods for the determination of aroma compounds in dairy products: a comparative study. **Journal of Dairy Research**, v.61, n.2, p.289-297, 1994.

YALCIN, S.; WADE, V.N.; HASSAN, M.N. Utilization of Chhana whey for the manufacture of soft drinks. **Gida**, v.19, n.5, p.351-355, 1994.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leite fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.24, v.4, p.674-672, 2004.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P.C.; DE VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiology Letters**, v.190, n.2, p.305-308, 2000.

ANEXO I

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA

Nome: _____ Data: _____

AMOSTRA _____

1. Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2. Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

AMOSTRA _____

1. Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2. Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

AMOSTRA _____

1. Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2. Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

AMOSTRA _____

1.Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2.Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

AMOSTRA _____

1.Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2.Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

AMOSTRA _____

1.Aparência

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

2.Sabor:

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

3. Consistência (textura)

Desgostei MUITÍSSIMO

Gostei MUITÍSSIMO

ANEXO II

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....
2. Responsável Legal:.....
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
Documento de Identidade Nº:.....Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa:
2. Pesquisador:
Cargo/Função:.....Inscrição Conselho Regional Nº:
Departamento da FCF/USP: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - FBT.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Risco Mínimo (x) Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

4. Duração da Pesquisa: 3 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

Anexo 1 – Recrutamento de provedores para análise sensorial de bebidas lácteas probióticas.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Anexo 1 – Recrutamento de provadores para análise sensorial de bebidas lácteas probióticas.

Estamos convidando você para participar de uma análise sensorial de leite fermentado.

1. Você tem entre 18 e 60 anos?
☐ sim ☐ não
2. O produto a ser avaliado é um leite fermentado semelhante ao iogurte. Você tem alergia a algum componente do leite?
☐ sim ☐ não
3. Você costuma consumir produtos lácteos como leite fermentado, iogurte, queijos com frequência?
☐ sim ☐ não
4. Você está fazendo algum tratamento médico?
☐ sim ☐ não
5. Você está tomando algum medicamento?
☐ sim ☐ não
6. Você está gripado?
☐ sim ☐ não

A bebida láctea probiótica, produto semelhante ao iogurte líquido, é preparado e, acondicionado de acordo com as Boas Práticas de Fabricação de Alimentos, no Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A bebida é preparada com a incorporação de bactérias probióticas que são bactérias que trazem benefícios para a saúde do consumidor. Para a preparação deste bebida misturamos leite fermentado, soro de queijo, xx e xx. Antes da avaliação a bebida láctea é submetida às análises microbiológicas que asseguram sua segurança microbiológica.

O objetivo desta pesquisa como é aceita a bebida láctea probiótica segundo sua aparência, sabor e consistência. O produto será avaliado um dia após sua fabricação e após 21 dias de armazenamento sob refrigeração.

Para as avaliações da aparência, do sabor e da consistência das bebidas cerca de 50ml do produto será servido em copos de plástico branco, codificados com números de três dígitos. Serão servidas três amostras em cada sessão de análise. As análises serão realizadas sempre duas horas antes ou depois das refeições e, entre uma amostra e outra os provadores tomarão um gole de água antes de iniciar a análise novamente. Serão servidas quatro amostras em cada sessão de análise. As sessões serão repetidas uma vez para cada tempo de armazenamento do produto, isto é, será realizada uma sessão com as bebidas lácteas recém preparadas (um dia após sua fabricação) e outra sessão com aquelas que foram armazenados durante 21 dias.

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

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

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Keila Emílio de Almeida. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av Prof Lineu Prestes, 580. Bloco 16. Fone:30913692. e-mail: keilaem@usp.br.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....
.....
.....
.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, 14 de janeiro de 2007.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Keila Emílio de Almeida