

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

Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na
acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado

Daniela Marques Saccaro

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Maricê Nogueira de Oliveira

São Paulo
2008

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 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos técnicos de laboratório Alexandre, Ivani e Nilton.

À Leila Bonadio, pela correção das referências.

Ao Jorge de Lima, pela correção do texto.

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

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado, e à FAPESP, pelo auxílio à pesquisa.

Agradeço especialmente aos meus pais, pelo incentivo no início desta jornada.

SUMÁRIO

página

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE QUADROS E TABELAS	v
RESUMO	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Leite fermentado	3
2.1.1 Histórico e definição	3
2.1.2. Tecnologia de produção	4
2.2. Culturas ácido-láticas	6
2.2.1. Culturas iniciadoras	6
2.2.2. Probióticos	9
2.2.2.1. Mercado e definição	9
2.2.2.2. Legislação	11
2.2.2.3. Seleção das estirpes	13
2.2.2.4. Mecanismo de ação e efeitos terapêuticos	14
2.3. Características das culturas probióticas	17
2.4. Interações entre as culturas ácido-láticas	23
2.5. Detecção e identificação de bactérias probióticas	25
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Procedimento experimental para obtenção do leite fermentado composto por culturas probióticas e iniciadoras associadas	32
4.1.1. Leite	32
4.1.2. Culturas lácticas	32
4.1.3. Preparo do inóculo	32
4.1.4. Fermentação	33
4.1.5. Acondicionamento e armazenamento	34
4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos	34

4.3. Análises físico-químicas	35
4.3.1. Proteína, sólidos totais e gordura	35
4.3.2. Lactose	35
4.3.3. Valor de pH	36
4.3.4. Acidez total titulável	36
4.4. Enumeração seletiva	36
4.5. Determinação da textura	37
4.6. Análise estatística	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Caracterização do leite fermentado durante o período de estocagem	39
5.1.1. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> durante o armazenamento - CC2	39
5.1.2. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> durante o armazenamento - CC4.1	44
5.1.3. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. rhamnosus</i> durante o armazenamento - CC4.2	49
5.1.4. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> durante o armazenamento refrigerado - CC4.3	54
5.1.5. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> durante o armazenamento refrigerado – CC5	59
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	81
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO – Tabelas com os resultados comparativos das análises físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados nos ensaios em cultura mista e controle.	

LISTA DE FIGURAS

página

Figura 1. Perfil de textura de quatro amostras de leite fermentado registrado pelo aparelho TA-XT2 (F: altura obtida após a compressão das amostras, valor utilizado para a medição dos atributos).	38
Figura 2. Viabilidade de <i>S. thermophilus</i> (ST) e <i>L. bulgaricus</i> (LB) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.	42
Figura 3. Viabilidade de <i>S. thermophilus</i> (ST), <i>L. acidophilus</i> (LA), <i>L. bulgaricus</i> (LB) e <i>B. lactis</i> (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.	47
Figura 4. Viabilidade de <i>S. thermophilus</i> (ST), <i>L. acidophilus</i> (LA), <i>L. bulgaricus</i> (LB) e <i>L. rhamnosus</i> (LR) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.	52
Figura 5. Viabilidade de <i>S. thermophilus</i> (ST), <i>L. rhamnosus</i> (LR), <i>L. bulgaricus</i> (LB) e <i>B. lactis</i> (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.	57
Figura 6. Viabilidade de <i>S. thermophilus</i> (ST), <i>L. acidophilus</i> (LA), <i>L. bulgaricus</i> (LB), <i>L. rhamnosus</i> (LR) e <i>B. lactis</i> (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.	63
Figura 7. Tempo de fermentação dos leites compostos por culturas associadas a 42°C no pH de final 4,5.	67
Figura 8. Variação do pH dos leites fermentados durante o período de estocagem.	68
Figura 9. Variação da acidez dos leites fermentados durante o período de estocagem	68
Figura 10. Variação da firmeza dos leites fermentados durante o período de estocagem	70
Figura 11. Variação da consistência dos leites fermentados durante o período de estocagem.	70
Figura 12. Variação da coesividade dos leites fermentados durante o período de estocagem.	71
Figura 13. Variação do <i>Breaking Point</i> (B.P) dos leites fermentados durante o período de estocagem	71
Figura 14. Unidades formadoras de colônia de <i>L. acidophilus</i> (colônias escuras) e <i>L. rhamnosus</i> (colônias claras) no meio seletivo MRS clindamicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.	75
Figura 15. Viabilidade do <i>L. acidophilus</i> (LA) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C.	75

- Figura 16.** Unidades formadoras de colônias de *L. rhamnosus* no meio seletivo MRS vancomicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5. 76
- Figura 17.** Viabilidade do *L. rhamnosus* (LR) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4 °C. 76
- Figura 18.** Unidades formadoras de colônia de *B. lactis* no meio seletivo RCA dicloxacilina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5 77
- Figura 19.** Viabilidade da *B. lactis* (BL) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4 °C. 77
- Figura 20.** Viabilidade do *S. thermophilus* (ST) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4 °C. 79
- Figura 21.** Viabilidade do *L. bulgaricus* (LB) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4 °C. 79
- Figura 22.** Composição dos leites fermentados com culturas associadas após a fermentação (D1) e no último dia de armazenamento (D21). 80

LISTA DE QUADROS E TABELAS

página

Quadro 1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas das bactérias probióticas.	16
Tabela 1. Requisitos físicos-químicos definidos para o leite fermentado.	13
Tabela 2. Meios de cultura seletivos usados na detecção de bactérias ácido-láticas.	29
Tabela 3. Métodos moleculares atualmente utilizados na diferenciação de bactérias ácido-láticas.	30
Tabela 4. Quantidade de cada cultura láctica adicionada no leite autoclavado para a preparação do inóculo.	33
Tabela 5. Co-culturas usadas na preparação dos leites fermentados.	34
Tabela 6. Esquema experimental utilizado para a fermentação dos leites compostos por culturas associadas.	35
Tabela 7. Quantidade de antibióticos empregada nos respectivos meios de cultura.	38
Tabela 8. Descritos cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> .	39
Tabela 9. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> durante o período de estocagem.	41
Tabela 10. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado durante o armazenamento refrigerado preparados com culturas associadas de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i>	43
Tabela 11. Descritos cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas <i>S.thermophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> .	45
Tabela 12. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> durante o período de estocagem	46
Tabela 13. Composição química do leite após a inoculação(D0) e do leite fermentado durante o armazenamento refrigerado preparados com culturas associadas de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> .	48
Tabela 14. Descritos cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. rhamnosus</i> .	49

Tabela 15. Pós-acidificação, acidez e textura do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S.thermophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.acidophilus</i> e <i>L.rhamnosus</i> no período de estocagem.	51
Tabela 16. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado durante o armazenamento preparados com culturas associadas de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> e <i>L. rhamnosus</i> .	53
Tabela 17. Descritos cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas <i>S thermophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L.rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> .	55
Tabela 18. Pós-acidificação, acidez e textura do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S.thermophilus</i> , <i>L.bulgaricus</i> , <i>L rhamnosus</i> e <i>B.lactis</i> durante o período de estocagem.	56
Tabela 19. Composição química do leite após inoculação (D0) e do leite fermentado durante o armazenamento preparados com culturas associadas de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i>	58
Tabela 20. Descritos cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L.rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> .	60
Tabela 21. Pós-acidificação, acidez e textura do leite após a inoculação (D0) e do do leite fermentado composto pela associação das culturas <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L.rhamnosus</i> e <i>B.lactis</i> durante o período de estocagem.	61
Tabela 22. Composição química do leite após a inoculação(D0) e do leite fermentado durante o armazenamento preparados com culturas associadas de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>B. lactis</i> .	64
Tabela 23. Descritos cinéticos de acidificação dos leites compostos por culturas associadas a 42 °C até pH 4,5.	66

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo estudar o perfil de acidificação e a inter-relação entre *Streptococcus thermophilus* TAO, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus acidophilus* LAC, *Lactobacillus rhamnosus* LBA, *Bifidobacterium lactis* BL04 como culturas associadas em leite fermentado. Cinco leites fermentados foram preparados, sendo a composição das co-culturas a variável estudada. O perfil de acidificação foi monitorado e os parâmetros cinéticos, calculados. Os produtos foram submetidos às análises físico-químicas e microbiológicas durante o armazenamento a 4°C. As associações em cultura mista provocaram a redução do tempo de fermentação dos leites. Durante os 21 dias de armazenamento o pH e a firmeza dos leites fermentados variaram. *Streptococcus thermophilus* TAO, *Bifidobacterium lactis* BL04 e *Lactobacillus rhamnosus* LBA forneceram contagens acima de 10^6 log UFC/mL, porém *Lactobacillus acidophilus* LAC e *Lactobacillus bulgaricus* LB340 foram inibidos em cultura mista, demonstrando dificuldades de crescimento quando associados às demais bactérias ácido-láticas.

Palavras-chave: probiótico, acidificação, interações bacterianas, leite fermentado, bactéria ácido-lática

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the acidification kinetic and inter-relation between *Streptococcus thermophilus* TAO, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus acidophilus* LAC, *Lactobacillus rhamnosus* LBA, *Bifidobacterium lactis* BL04 like association cultures in fermented milk . Five fermented milks were prepared and studied variable analyzed was the co-cultures composition. Acidification was monitored and the kinetic parameters were calculated. The products were submitted to physical chemistry and microbiological analyses during the storage at 4 °C. The associations in mixed cultures promoted the reduction of fermentation time of the milks. During 21 days of storage, pH and firmness of fermented milks varied. *Streptococcus thermophilus* TAO, *Bifidobacterium lactis* BL04 and *Lactobacillus rhamnosus* LBA presented counts above 10^6 log cfu/mL However, *Lactobacillus acidophilus* LAC and *Lactobacillus bulgaricus* LB340 were inhibited in mixed cultures demonstrating that these strains had difficulty to grow when in associated cultures with lactic acid bacteria.

Keywords: probiotic, acidification, bacterial interactions, fermented milk, lactic acid bacteria

1. INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos probióticos e/ou simbióticos são líderes dentro do mercado de alimentos funcionais e considerados prioridade de pesquisa em diversos países. A valorização dos alimentos funcionais no mercado mundial está estimulando a inovação de produtos alimentícios, gerando, deste modo, uma grande oportunidade para incentivar o consumo de alimentos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas.

Os lactobacilos e as bifidobactérias são considerados agentes probióticos porque são encontrados naturalmente no corpo humano, sobrevivendo à acidez do estômago e, assim sendo, são capazes de colonizar o intestino (MARSHALL, 1991). Contudo, diversas publicações mostraram que as culturas probióticas apresentam crescimento lento no leite. A presença de bactérias viáveis, e em alto número no produto lácteo durante sua estocagem, é condição essencial para assegurar o efeito probiótico (OLIVEIRA *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2008; TAMINE *et al.*, 2005).

Vários meios de cultura têm sido propostos para o cultivo de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, objetivando o isolamento, a quantificação e a avaliação da viabilidade dessas bactérias durante a estocagem sob refrigeração. No entanto, a maioria dos meios de cultura têm se revelado insatisfatórios para a diferenciação das espécies. Os meios de cultura seletivos devem estimular o crescimento da cultura relacionada e inibir as demais culturas presentes em produtos como iogurtes e leites fermentados.

A composição química do alimento lácteo, assim como a do meio de cultura, é influenciada diretamente pela atividade metabólica da bactéria, que interage intensamente com o meio durante o seu crescimento, ao converter determinados componentes em produtos metabólitos. Os carboidratos disponíveis e as proteínas, especialmente aminoácidos livres, são os componentes mais utilizados pelo metabolismo bacteriano (HELLER, 2001).

As estirpes comerciais devem favorecer as propriedades sensoriais do alimento; de tal modo, que é comum usar culturas probióticas associadas a outros tipos de culturas para a fermentação de produtos específicos, como, por exemplo, o iogurte, no qual as bactérias probióticas são freqüentemente associadas às bactérias iniciadoras (starters), *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, para aprimorar o sabor e a textura do produto e para diminuir o tempo de fermentação (SAARELA *et al.*, 2000).

Diversas bactérias iniciadoras e probióticas estão disponíveis comercialmente. Diferentes combinações de bactérias iniciadoras e probióticas acrescentam aos produtos lácteos fermentados características tecnológicas, nutricionais e terapêuticas (JUILLARD *et al.*, 1987). No entanto, as interações microbianas nesses produtos podem ser benéficas (proto-cooperação) ou desfavoráveis (antagonismo): ou seja, podem ocorrer mudanças indesejáveis na composição da microbiota bacteriana durante a produção e a estocagem do produto sob refrigeração (BELLENGIER; RICHARD; FOCAUD, 1997).

Apesar da grande diversidade de combinações probióticas encontradas comercialmente, poucos estudos foram realizados sobre as inter-relações entre as bactérias ácido-láticas (KNEIFEL, 1993). Assim, mais estudos sobre a relação entre essas bactérias devem ser efetuados, devido à grande importância destes microrganismos para a nutrição e a promoção da saúde do consumidor (RAJAGOPAL; SANDINE, 1990, KAILASAPATHY; RYBKA, 1997).

Em vista do exposto, este projeto visou estudar o perfil de acidificação e inter-relação entre *Streptococcus thermophilus* TAO, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus acidophilus* LAC, *Lactobacillus rhamnosus* LBA, *Bifidobacterium lactis* BL04 como culturas associadas em leite fermentado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite Fermentado

2.1.1 Histórico e definição

O leite fermentado é um alimento lácteo conhecido desde os primórdios da civilização. Algumas referências sobre este alimento são encontradas na Bíblia: Abraão acreditava que sua longevidade estava relacionada ao consumo de leite fermentado. Moisés considerava o leite fermentado um presente de Deus, assim como o mel e o vinho. Cientistas conhecidos, como Hipócrates, consideravam o leite fermentado não apenas um alimento, mas também um remédio, prescrevendo-o no tratamento de distúrbios estomacais e intestinais (OBERMAN, 1985). Na França, o leite fermentado foi relacionado à cura de infecções intestinais e considerado um fator de auxílio à digestão (LUQUET; CORRIEU, 2005).

No início do século 20, o bacteriologista russo Metchnikoff (Instituto Pasteur, França) foi o primeiro cientista a apresentar uma explicação sobre os efeitos benéficos das bactérias ácido-láticas presentes no leite fermentado (HUGHES; HOOVER, 1991). Ele atribuiu a ótima saúde e longevidade dos povos búlgaros ao consumo elevado e prolongado de leite fermentado (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Em 1908, Metchnikoff ganhou o prêmio Nobel após isolar o *Bacillus bulgaricus* e analisar os efeitos benéficos desse microrganismo no leite fermentado. Metchnikoff baseou seu estudo no fato de que as bactérias ácido-láticas, naturalmente presentes no intestino, apresentavam-se no leite e produziam substâncias que inibiam o crescimento de bactérias patogênicas e, assim prolongavam a longevidade dos consumidores.

O *Bacillus bulgaricus* não produzia álcool no leite, diferente de outros alimentos lácteos amplamente consumidos na época, como kefir e koumys. Metchnikoff acreditava que o crescimento de contaminantes bacterianos era

inibido pelo ácido láctico e outros produtos ainda não identificados, que atuavam sinergicamente no leite (HELFERICH & WESTHOFF, 1980).

Em 1917, Isaac Carasso começou a produzir industrialmente o leite fermentado em Barcelona; desde então uma grande quantidade deste alimento é fornecida à população (LUQUET; CORRIEU, 2005).

Originalmente, o processo de fermentação envolvia a coagulação do leite por microrganismos presentes naturalmente no alimento, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria-prima original (ALM, 1991). Atualmente, o leite fermentado pode ser definido como um produto adicionado ou não de substâncias alimentícias e fermentado mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, responsáveis pela coagulação e acidificação do leite (PIARD *et al.*, 1997).

2.1.2 Tecnologia de produção

Preparo do leite

O leite fresco é fornecido para a produção de iogurtes e leites fermentados em tanques refrigerados. Uma avaliação prévia é realizada e, em seguida, o leite é filtrado para a retirada dos resíduos sólidos e armazenado a 5°C.

O controle de qualidade do leite é realizado segundo:

- Condições sanitárias: a temperatura de transporte, o número total de microrganismos e células somáticas presentes e o grau de acidificação do produto;
- Características tecnológicas: análise do conteúdo de gordura e nitrogênio produzido e detecção dos antibióticos presentes.

O preparo do leite para a fermentação envolve diversas etapas:

- Padronização

A qualidade do leite depende da dieta alimentar e do estágio de lactação do animal, assim como da época do ano em que foi coletado. Esses fatores são os principais motivos pelo qual o leite deve ser padronizado, a fim de igualar o conteúdo de gordura e proteína para a produção do leite fermentado. A padronização permite a regulação da composição do leite segundo as especificações nutricionais e sensoriais do produto.

Assim que o leite chega na fábrica é aquecido até 45°C e a seguir, centrifugado. O conteúdo de gordura no leite deve ser menor do que 7% e o teor de sólidos totais deve ser ajustado para 14%.

- Homogeneização

A homogeneização é realizada para reduzir os glóbulos de gordura e impedir a separação do creme sobre a superfície do leite durante a fermentação, resultando no aumento da viscosidade do leite e conseqüente estabilidade do leite fermentado durante a estocagem (ALAIS, 1984).

- Tratamento térmico

O leite é submetido à pasteurização para eliminar microrganismos patogênicos ou agentes deteriorantes do produto, e para aprimorar as propriedades físicas do produto, como viscosidade e capacidade de retenção de água.

O tratamento térmico é realizado, na maioria das indústrias, através de um sistema tubular contínuo entre 92-95°C, equipamento no qual o leite é aquecido durante alguns minutos. O tratamento térmico provoca a desnaturação de mais de 85% das proteínas solúveis do soro, elementos responsáveis pela coagulação do leite (CASALIS, 1975).

Fermentação

O leite fermentado é o produto obtido da fermentação do leite, através da conversão da lactose em ácido láctico pelas culturas iniciadoras *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. A degradação da lactose favorece a redução do pH e, conseqüentemente, a precipitação das proteínas do leite.

A fermentação é finalizada quando o pH de desejado é atingido. O gel obtido é quebrado através de um sistema de bombeamento e imediatamente resfriado até 20°C, temperatura que facilita a adição do produto nas embalagens e limita as mudanças na estrutura do gel. O produto é posteriormente refrigerado a 4°C, mantendo-se a esta temperatura durante a estocagem, o transporte e a distribuição.

2.2 Culturas ácido-láticas

2.2.1. Culturas iniciadoras (starters)

As culturas do iogurte são compostas por *Streptococcus* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que são bactérias Gram-positivas, homofermentativas e termofílicas, cujo crescimento ótimo é obtido a 42°C (SPREER; MIXA, 1998).

O *S. thermophilus* tem a morfologia de cocos unidos, geralmente em cadeias curtas, e crescimento ideal entre 37 e 45°C, mas pode tolerar até 50°C. Algumas estirpes de *S. thermophilus* sintetizam exopolissacarídeos, polímeros bastante úteis na produção de leites fermentados firmes, responsáveis pela manutenção da textura e da viscosidade adequadas mesmo após a fermentação (COLLET, 2005).

O *L. bulgaricus* apresenta-se em forma de bastonetes unidos em cadeias longas, com crescimento ótimo entre 45-50 °C, embora resista a temperaturas até -15 °C (ROBINSON; TAMIME, 1975; DELLAGIO; TORRIANI; VLAEMINCK, 1992; SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

As bactérias do iogurte são agentes importantes na produção e conservação de produtos lácteos, especialmente iogurtes, leites fermentados e queijos (MOREIRA; ABRAHAM; ANTONI, 2000). Para a indústria de alimentos lácteos a análise do comportamento de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* como culturas associadas é considerada um fator mais importante do que avaliação destes microrganismos em cultura pura.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* apresentam uma relação de proto-cooperação no leite. A simbiose entre as bactérias iniciadoras começa quando o *L. bulgaricus* produz enzimas que degradam a caseína, liberando peptídeos e aminoácidos como treonina, metionina e valina, moléculas utilizadas como fatores de crescimento para o *S. thermophilus*. Em contrapartida, *S. thermophilus* produz ácido láctico, dióxido de carbono e ácido fórmico a partir da degradação da lactose, crescendo rapidamente até valor de pH 5,5. A liberação de ácido fórmico e do composto volátil dióxido de carbono estimula o desenvolvimento do *L. bulgaricus*. Ao final da fermentação, *L. bulgaricus* produz acetaldeído e ácidos graxos, compostos que contribuem para o desenvolvimento do sabor característico do iogurte (BÉAL; CORRIEU, 1994; HIGASHIO; YOSHIOKA; KIKUCHI, 1977; SPREER; MIXA, 1998).

Um aspecto importante referente às culturas iniciadoras está relacionado à fermentação. Os estreptococos produzem exclusivamente ácido láctico L(+), produto também formado no metabolismo humano e animal, enquanto os lactobacilos produzem ácido láctico D(-) ou uma mistura dos dois isômeros. Ao final da fermentação observa-se maior produção de ácido láctico, maior consumo de carboidratos e maior quantidade de células viáveis, além do aprimoramento do sabor e da textura do produto final (TAMIME; DEETH, 1989).

Segundo Rajagopal e Sandine (1990), a quantidade de aminoácidos e peptídeos disponíveis no leite deve ser suficiente para auxiliar no crescimento das bactérias iniciadoras e na degradação das proteínas do leite. As bactérias devem possuir um eficiente sistema proteolítico, que estimule seu crescimento e realize a rápida conversão da lactose em ácido láctico.

A análise da atividade proteolítica das bactérias iniciadoras é um fator importante para a avaliação do crescimento destas culturas. Renz e Puhan (1975) relataram que a atividade proteolítica realizada pelas bactérias iniciadoras pode apresentar alguns efeitos adversos em iogurtes e leites fermentados, produtos dos quais pode ocorrer a produção de sabor amargo devido ao acúmulo de peptídeos, resultado relacionado a intensa atividade proteolítica do *L.bulgaricus*.

Laye, Karleskind e Morr (1993) sugeriram que, de acordo com as concentrações e as proporções das culturas iniciadoras utilizadas, o sabor e a textura do iogurte podem ser prejudicados. As mudanças químicas observadas durante o armazenamento incluem diminuição do teor de lactose e acetaldeído, formação de ácido láctico e, pequena, mas potencialmente importante, mudança nas concentrações de outros compostos voláteis.

O estudo das diferentes associações de bactérias iniciadoras é muito importante para análise de interações antagonísticas e sinergismos entre as espécies, processo importante para a seleção de estirpes que possam interagir em protocooperação no leite (RAJAGOPAL; SANDINE,1990).

Atividade acidificante

Importantes informações sobre a fisiologia de estirpes industriais podem ser obtidas pelo estudo das condições da cultura através da avaliação do seu perfil de atividade cinética – crescimento, acidificação, rendimento em biomassa ou ácido láctico. A quantificação da atividade acidificante das bactérias lácticas permite obter conhecimentos relacionados à fermentação e comparar o desempenho de diferentes estirpes ou diferentes combinações destas durante a fermentação (LAMPRESH; FOSTER, 1963).

O perfil de acidificação das bactérias lácticas pode ser monitorado pela quantidade de ácido láctico produzido ou pelo pH, uma vez que a principal propriedade das bactérias ácido-lácticas é a produção de ácido (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A atividade acidificante durante o período de fermentação pode ser monitorada pelo sistema *Cinetique d' Acidification*, que avalia a curva de pH, medindo a queda do mesmo em intervalos regulares. A velocidade máxima de acidificação ($V_{m\acute{a}x}$) é calculada. O tempo para atingir a $V_{m\acute{a}x}$ e o pH correspondente também podem ser monitorados. De acordo com Picque *et al.* (1992), esses parâmetros são os que melhor descrevem a cinética de acidificação. Os parâmetros cinéticos de acidificação, como velocidade máxima de acidificação ($V_{m\acute{a}x}$) e tempo de fermentação (t_{pH}) de LAB em leite têm sido extensivamente documentados (KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003; LUCAS *et al.*, 2004; CHAMMAS *et al.*, 2006; ALMEIDA; TAMIME; OLIVEIRA, 2008; DAMIN, 2008).

2.2.2. Probióticos

2.2.2.1. Mercado e definição

O interesse por alimentos saudáveis, nutritivos e de grande aproveitamento pelo consumidor tem aumentado mundialmente. O uso destes produtos para a promoção do bem-estar e da saúde e, ao mesmo tempo, como redutor do risco de algumas doenças, está incentivando o desenvolvimento de novos ingredientes e, assim, estimulando a inovação dos produtos alimentícios e formando novos nichos de mercado (MATSUBARA, 2001).

Os produtos compostos por bactérias probióticas integram três grandes grupos comerciais: alimentos infantis, preparações farmacêuticas e produtos lácteos. Os produtos lácteos pertencem ao grupo mais representativo, constituído por iogurtes, leites fermentados, sorvetes e queijos, nos quais se utilizam

freqüentemente culturas iniciadoras e bifidobactérias (ou lactobacilos) como aditivo ou suplemento (GOMES; MALCATA, 1999).

O crescimento do setor de alimentos lácteos fermentados representa uma grande oportunidade para o aprimoramento de produtos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas, características altamente valorizadas pelas empresas do ramo alimentício. Outro benefício relacionado ao setor lácteo é o baixo custo tecnológico necessário para a produção dos alimentos fermentados (SIENKIEWICZ; RIEDEL, 1990).

Novas descobertas relacionadas a diversos aspectos científicos voltados a nutrição, especialmente ao estudo da dieta alimentar para a promoção da saúde, têm ampliado as aplicações dos probióticos *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. lactis* em alimentos (SANDERS; HUIS IN`T VELD, 1999; HELLER, 2001).

A definição de probiótico está relacionada à importância de células vivas como componentes essenciais e efetivos para a manifestação de efeitos benéficos. Huis In`t Veld e Havenaar (1991) definiram os probióticos como uma cultura pura ou mista composta por microrganismos vivos, que beneficiam a microbiota endógena intestinal de humanos e animais.

Segundo a legislação brasileira, probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008). Os microrganismos probióticos podem ser inoculados a partir de uma preparação que deve conter estirpes definidas e viáveis em número suficiente para alterar a microbiota do consumidor, por implantação ou colonização, e exercer efeitos benéficos à saúde (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

2.2.2.2. Legislação

Normas Internacionais

Segundo a IDF (*International Dairy Federation*) e o Codex Alimentarius, as principais normas internacionais relacionadas ao leite fermentado e iogurte são as seguintes:

- Produção

O termo iogurte só pode ser utilizado quando as culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são adicionadas no produto. Os probióticos *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., assim como bactérias com propriedades tecnológicas particulares, são consideradas culturas seguras e podem ser adicionadas nos alimentos.

- Viabilidade das culturas

A legislação de diversos países considera que a microbiota bacteriana deve ser viável durante toda a estocagem do produto, mas os níveis mínimos estabelecidos para a quantificação efetiva variam de 10^6 a 10^8 UFC/g, segundo a regulamentação local.

- Critérios analíticos

A quantidade de gordura, segundo o Codex Alimentarius, deve ser de pelo menos 3%, em iogurtes integrais, entre 0,5% e 3%, em iogurtes com pouca gordura (à base de leite semidesnatado), e até 0,5%, em relação aos iogurtes sem gordura (à base de leite desnatado).

O conteúdo protéico do iogurte deve ser de pelo menos 2,8% no produto final, valor equivalente a 33% do conteúdo de sólidos totais no leite desnatado.

A IDF recomenda o limite máximo de 0,7% de ácido láctico no iogurte, mas sua quantificação varia entre 0,6% e 15% em alguns países. De acordo com algumas normas nacionais, que utilizam o pH para expressar esse critério, este apresenta-se geralmente entre 4,5 e 4,6.

Normas brasileiras

As alegações sobre os alimentos funcionais são definidas, segundo a legislação brasileira, da seguinte forma:

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

De acordo com o regulamento técnico do Mercosul, de Identidade e Qualidade do Leite Fermentado, aprovado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pela Secretaria de Vigilância do Brasil (LERAYER *et al.*, 2002), o leite fermentado é definido como um produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, através de fermentação láctica mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade.

A fermentação do leite pode ser realizada com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.*, *S. thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

Os requisitos sensoriais definidos para leites fermentados são:

- Aspecto: consistência firme, pastosa, semi-sólida ou líquida.
- Cor: branca, de acordo com adição ou não de substâncias alimentícias e/ou corante(s) adicionado(s).
- Odor e sabor: característicos, de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou substância(s) aromatizantes/saborizante(s) adicionadas.

As principais características físico-químicas definidas para leites fermentados estão indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Requisitos físico-químicos definidos para o leite fermentado.

Produto	Gordura (g/100g)	Acidez (g/100g)	Proteína (g/100g)
Com creme	Min. 6,0	0,6 – 2,0	Min. 2,9
Integral	3,0 – 5,9	0,6 – 2,0	Min. 2,9
Parcialmente desnatado	0,6 – 2,9	0,6 – 2,0	Min. 2,9
Desnatado	Máx. 0,5	0,6 – 2,0	Min. 2,9

Fonte: Lerayer *et al.*, 2002

2.2.2.3. Seleção das estirpes

Os aspectos funcionais dos microrganismos probióticos devem ser estabelecidos através de estudos *in vivo* comprovadamente seguros aos humanos.

Segundo Fukushima *et al.* (1998), Donnet-Hughes *et al.* (1999), Foschino, Cafaro, Ottogalli (1997) e Salminen *et al.* (1999), os requisitos para a seleção de uma estirpe probiótica são:

- Tolerância à acidez do estômago.
- Aderência ao epitélio intestinal.
- Resistência no trato gastrointestinal.
- Estimulação imunológica.
- Atividade antagonística contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*.
- Viabilidade e estabilidade durante a produção e estocagem do produto.
- Produção de boas características sensoriais ao produto.

A estirpe selecionada deve realizar a fermentação do leite em cultura pura ou quando associada, além de ser viável durante todo o processamento e estocagem refrigerada do produto, assegurando a manifestação dos efeitos probióticos durante o consumo.

O produto probiótico deve ter vida média, variando de 15 a 30 dias, e propriedades sensoriais (cor, aroma, sabor e textura) aceitáveis.

Os microrganismos devem estar viáveis, apresentando-se em número elevado ($>10^6$ log UFC/mL) durante toda a estocagem do produto (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

2.2.2.4. Mecanismo de ação e efeitos terapêuticos

As bactérias ácido-láticas utilizadas atualmente na produção de iogurtes e leites fermentados pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (GOLDIN; GORBACH, 1992). As espécies de maior interesse são *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. brevis* e *B. lactis* (BARRETO, 2003).

As bactérias ácido-láticas são Gram-positivas e fermentadoras de lactose com a produção de ácido láctico, considerado o produto principal do seu metabolismo. Estas bactérias agem acidificando o alimento, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados (PIARD *et al.*, 1997).

Os probióticos usados em iogurtes e leites fermentados geralmente são espécies isoladas do intestino humano, como as bifidobactérias e os lactobacilos, que realizam a fermentação láctica do leite. A fermentação provoca a conversão dos carboidratos em ácidos orgânicos (DRIESSEN; LOONES, 1992), possibilitando a melhoria do sabor e da textura do alimento (TAMIME; DEETH, 1989).

As bifidobactérias sintetizam vitaminas do complexo B, elevando seu teor no produto fermentado. O teor de lactose é diminuído em aproximadamente 20 a 25% devido à sua degradação e utilização por esses microrganismos durante a fermentação do leite (TAMIME; MARSHALL; ROBINSON, 1995).

Mesmo com a sugestão de vários mecanismos com atuações independentes ou associadas, o modo de ação dos probióticos ainda não está completamente esclarecido. A exclusão competitiva é um dos processos mais considerados em diversos estudos sobre a atuação dos probióticos, que competem por nutrientes e sítios de fixação com outros patógenos ou mesmo com outras bactérias da microbiota intestinal (OUWEHAND *et al.*, 1999; CROSS, 2002). A exclusão competitiva demonstra a necessidade da ingestão de doses elevadas de probióticos, assim como a realização de administração contínua para manifestação de suas propriedades funcionais.

As principais atuações das bactérias ácido-láticas na defesa da microbiota intestinal são: (i) síntese de bacteriocinas (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999); (ii) produção de ácidos orgânicos voláteis (JIN; MARQUARDT; BAIDOO, 2000); (iii) liberação de peróxido de hidrogênio (HAVENAAR, HUIS IN`T VELD, 1992); (iv) ação direta sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo (KOZASA, 1986), e (v) liberação de enzimas hidrolíticas (DE VRESE *et al.*, 2001).

A adição de probióticos no leite ou em outros produtos fermentados beneficia a microbiota intestinal; tais benefícios já estão amplamente descritos na literatura e podem ser definidos como o aumento da modulação imunológica (defesas do organismo) e a prevenção de certas doenças e/ou incômodos em humanos; como diarreia, devido à infecção com *Helicobacter pylori*, má digestão de lactose, síndrome do intestino irritável, constipação, elevado crescimento bacteriano no intestino, câncer cervical, câncer de bexiga, colesterol, hipertensão, infecção do trato urinário e infecções relacionadas ao trato respiratório (GOLDIN, 1998; HOLPZAPFEL *et al.*, 1998; SALMINEM; MATTILA-SANDHOM; MATTO; SAARELA, 1999; OUWEHAND *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2007).

O consumo de probióticos auxilia na manutenção da saúde, restaurando o vigor corporal e combatendo diversos distúrbios (MITAL; GARG, 1992). A lista dos principais benefícios terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos está indicada no Quadro 1.

Quadro 1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas das bactérias probióticas

Efeitos benéficos	Aplicações terapêuticas
Aumento do valor nutricional dos alimentos	Prevenção de infecções urogenitais
Manutenção da microbiota intestinal	Proteção contra diarreias
Estimulação do sistema imune	Alívio da constipação
Redução da intolerância à lactose	Prevenção da osteoporose
Redução do colesterol	Prevenção de doenças hepáticas
Redução da pressão arterial	

Fonte: Fuller, 1989; Parvez *et al.*, 2006.

Diversos estudos indicaram que o controle preventivo contra infecções intestinais pode ser realizado através da administração de alimentos lácteos contendo *L. acidophilus* e/ou *B. bifidum* (RASIC; KURMANN, 1983; GORBACH; CHANG; GOLDIN, 1987).

Segundo Kim e Gilliland (1983), algumas pessoas não possuem a enzima β -D-galactosidase, responsável pela degradação da lactose. Isto resulta em desconforto intestinal e restrições alimentares; contudo, algumas bactérias iniciadoras e probióticas produzem essa enzima, permitindo o consumo de alimentos lácteos e a manifestação de seus efeitos benéficos em indivíduos intolerantes à lactose.

Gilliland e Walker (1989) afirmaram que o consumo de iogurte contribui para a redução do colesterol, diminuindo também o risco de ataques cardíacos.

2.3. Características das culturas probióticas

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis*

As bifidobactérias foram isoladas primeiramente a partir de fezes de crianças recém-nascidas em 1899 por Tissier, sendo descritas como microrganismos anaeróbicos de morfologia bífida (Instituto Pasteur, França) (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993). Tissier recomendou a administração de bifidobactérias em crianças com diarreia com o objetivo de combater esse distúrbio intestinal e restabelecer o seu domínio na microbiota (O'SULLIVAN *et al.*, 1992).

Atualmente, trinta espécies pertencem ao gênero *Bifidobacterium*, sendo que dez são de origem humana. As bifidobactérias são caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, anaeróbios, não esporulantes, produtores de ácido láctico e ácido acético, sem a formação de gás carbônico (GOMES; MALCATA, 1999).

A temperatura considerada ideal para o crescimento das bifidobactérias varia entre 37-41 °C, sendo que o limite máximo ocorre entre 43-45 °C e nenhum crescimento é obtido acima de 46 °C ou abaixo de 20 °C (GAVINI *et al.*, 1991). O pH ótimo para as bifidobactérias varia entre 6,5 e 7,0 e nenhum crescimento é observado acima de 8,5.

O grupo *Bifidobacterium spp.* compõe a maior parte da microbiota intestinal humana e animal (SANZ, 2007). Segundo Itsaranuwat, Hal Haddad e Robinson (2003), as bifidobactérias apresentam morfologias distintas, que variam desde o formato Y até a conformação de cocos, dependendo das condições de crescimento.

As bifidobactérias contribuem para manutenção do equilíbrio da microbiota, através de ações imunológicas e fisiológicas no trato intestinal (OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002).

Meghrous *et al.* (1990) foram os primeiros pesquisadores a provar que as bifidobactérias produzem substâncias antimicrobianas. Ações inibitórias

promovidas por bifidobactérias foram descritas por Gibson e Wang (1994) contra *Salmonela*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Shigella* e *Vibrio cholerae*.

A comprovação dos efeitos clínicos benéficos relacionados às bifidobactérias incentivou a utilização destes probióticos em produtos alimentícios como iogurtes e leites fermentados. Entretanto, as bifidobactérias apresentam pouco crescimento no leite, pois estão submetidas a situações de estresse no processo de fermentação, especialmente devido à elevação da acidez do meio, à baixa disponibilidade de fontes de nitrogênio e à sensibilidade ao oxigênio (NAGAWA; NAKABAYASHE; FUJINO, 1988; COLLINS; HALL, 1984).

Apenas estirpes de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* têm demonstrado habilidades para sobreviver em ambientes ácidos. Estas culturas são os probióticos preferencialmente utilizados comercialmente em produtos à base de iogurte (JAYAMANNE; ADAMS, 2006).

Segundo Matto *et al.* (2006), a *Bifidobacterium lactis* é a espécie mais utilizada em aplicações probióticas, já que o crescimento deste probiótico após a fermentação forneceu produtos com maior estabilidade durante a estocagem.

Gueimonde *et al.* (2004), relataram que as estirpes de *B. lactis* são bastante utilizadas em produtos probióticos na Europa devido à grande resistência desta espécie em meios ácidos e sob condições de estresse oxidativo. Contudo, mesmo as bactérias *B. lactis* consideradas estáveis podem apresentar limitações e deficiências tecnológicas para aplicações na indústria (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002). Por conta desses fatores, Yolanda (2007) sugere um método alternativo para aumentar a estabilidade e viabilidade das bifidobactérias, que pode ser desenvolvido através de aplicações prolongadas deste microrganismo em meios altamente ácidos. As mudanças fenotípicas e o aperfeiçoamento das propriedades biológicas estimularão o aumento da resistência das bifidobactérias à acidez do meio e possibilitarão o desenvolvimento de novas estirpes probióticas para utilização comercial.

Lactobacillus acidophilus

O *Lactobacillus acidophilus* foi isolado a partir de fezes de crianças lactentes em 1900 pelo pesquisador Moro e nomeado *Bacillus acidophilus*. Posteriormente foi designado *Lactobacillus* e anos depois, devido às vantagens de ingestão, a indústria de alimentos iniciou a produção de iogurtes com elevadas contagens deste microrganismo (ITSARANUWAT; HAL HADDAD, ROBINSON, 2003).

O *L. acidophilus* é descrito como um bacilo circular, Gram-positivo, imóvel e não esporulante. Este probiótico pertence ao grupo dos microrganismos homofermentativos restritos, comporta as espécies mais acidificantes (2,7% de ácido láctico) e as mais termofílicas (40-52°C). O crescimento a 16°C é raro ou muito lento; já em temperaturas superiores o crescimento depende da estirpe, sendo que algumas podem crescer a 45°C e outras a 48°C (DU PLESSIS *et al.*, 1996).

Encontrado naturalmente na microbiota intestinal e no trato urogenital humano, o *L. acidophilus* apresenta como principais funções: proteção contra patógenos, auxílio na digestão da lactose, elevação no padrão nutricional dos alimentos, estimulação da resposta imune intestinal e regulação dos níveis de colesterol no organismo (FULLER, 1991; GILLILAND, 1990).

Os benefícios nutricionais e terapêuticos obtidos pelo consumo de *L. acidophilus* como alimento ou complemento da dieta alimentar foram as principais metas de alguns estudos nos últimos 20 anos (SANDINE, 1979; SHAHANI; AYEBO, 1980).

Alguns pesquisadores sugeriram que o *L. acidophilus* poderia substituir o *L. bulgaricus* na produção do iogurte. Porém, o *L. acidophilus* apresenta baixo crescimento no leite, mesmo quando suplementado com nutrientes, além de produzir um leite fermentado menos saboroso quando comparado ao iogurte tradicional (TRAMER, 1973). Contudo, *L. acidophilus* começou a ser incorporado no iogurte tradicional a fim de aumentar a popularidade deste alimento, através da

perspectiva de que apenas esta cultura poderia sobreviver no trato gastrointestinal (DAVIS, 1970; VEDAMUTHU, 1974).

Diversos produtos probióticos estão em desenvolvimento com o objetivo de permitir o consumo de *L. acidophilus* em quantidades elevadas. De acordo com a literatura, a concentração mínima de células viáveis de *L. acidophilus* para produção dos efeitos terapêuticos é de 10^6 log UFC/mL ou grama do produto (KURMANN; RASIC, 1988).

O crescimento do *L. acidophilus* pode ser inibido no produto probiótico de acordo com a composição do meio e a disponibilidade de nutrientes. As principais substâncias inibidoras do crescimento do *L. acidophilus* são os ácidos láctico, acético e benzóico, além do peróxido de hidrogênio (COLLINS; ARAMAKI, 1980; GILLILAND; SPECK, 1977).

Segundo Fernandes e Shahani (1988), a adição de hidróxido de cálcio durante a fermentação pode ser uma alternativa para aumentar a viabilidade do *L. acidophilus*, devido à conversão do ácido láctico em lactato de cálcio, resultando na diminuição do teor de acidez do leite.

Gilliland, Stanley e Bush (1984) relataram que o *L. acidophilus* pode crescer em concentrações fisiológicas de elevada acidez e estabelecer-se no trato gastrointestinal, promovendo efeitos terapêuticos. Outros estudos demonstraram os efeitos benéficos deste microrganismo na estimulação da resposta imune intestinal, em experimentos com ratos, e na redução dos níveis de colesterol em porcos (LIN *et al.*, 1989; PERDIGON, 1989)

Apesar dos estudos clínicos relatados, as evidências científicas dos efeitos fisiológicos dos *Lactobacillus*, em especial da espécie *L. acidophilus*, não foram totalmente estabelecidas em humanos. Novas pesquisas sobre as características probióticas do *L. acidophilus* são necessárias para comprovar os efeitos positivos desta espécie na saúde de humanos e de animais.

Lactobacillus casei subsp. *ramnosus*

O *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* é um probiótico heterofermentativo facultativo, ou seja, que produz ácido láctico, após a fermentação de hexoses, e ácido láctico e acético, após a fermentação de pentoses. Os principais açúcares fermentados por esta bactéria são lactose, maltose, sacarose, frutose e ramnose (DELLAGLIO *et al.*, 1994; BÉAL; CORRIEU, 1994).

O *L. ramnosus* faz parte do grupo *L. casei*, formado por espécies com características distintas, como *L. ramnosus* GG, *L. ramnosus* GR-1 e *L. casei* Shirota. A disponibilidade de *L. ramnosus* pode ser apresentada de diversas formas aos consumidores; uma delas é através da ingestão de alimentos probióticos (BRIGIDI *et al.*, 2003; SAAVENDRA *et al.*, 2004). Produtos lácteos, como leite, iogurte, queijo e sorvetes, podem ser veículos em potencial para o consumo de *L. ramnosus* (HEKMAT; MCMAHON, 1992; RYBKA; KAILASAPATHY, 1995).

Segundo Hekmat e Reid (2007), a estirpe *L. ramnosus* GR-1 apresenta eficiente produção de ácidos e proliferação no leite. No entanto, a adição de suplementos como inulina e extrato de levedura provoca a elevação das contagens de *L. ramnosus* GR-1 no leite probiótico, gerando uma nova alternativa de alimento funcional para utilização como uma cultura base no desenvolvimento de outros produtos lácteos fermentados.

Estudos clínicos realizados com *L. ramnosus* GR-1 consideram este microrganismo um agente eficaz no tratamento e prevenção de infecções urogenitais em mulheres (REID, 2000). O uso de probióticos para restabelecer a microbiota vaginal promove a formação de uma barreira contra agentes patogênicos e poderá futuramente ser uma alternativa para a prevenção de infecções urinárias em mulheres. Os benefícios promovidos pelo uso de *L. ramnosus* GR-1 estão diretamente relacionados à utilização de antibióticos, provocando a renovação da microbiota urogenital através da criação de uma barreira microbiológica mais resistente à ação de microrganismos patogênicos (REID; COOK; BRUCE, 1987).

L. casei Shirota, estirpe probiótica desenvolvida pela Yakult¹, foi originalmente isolado do intestino humano em 1930 e, após diversos estudos, considerado viável para a colonização do intestino e o fortalecimento da microbiota intestinal humana (SPANHAAKA; HAVENAAR, 1993; TANAKA; OHWAKI, 1994).

O *L. casei* Shirota sobrevive à passagem no trato gastrointestinal e apresenta efeitos benéficos à saúde. Segundo Spanhaak, Havennar, Schaafsma (1998), o consumo de leite fermentado com *L. casei* Shirota três vezes ao dia (10^9 log UFC/mL) resultou no aumento da contagem de células viáveis de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* nas fezes.

Outros estudos clínicos também relataram mudanças na composição e atividade metabólica da microbiota fecal em indivíduos que consumiram leite fermentado com *L. casei* Shirota; contudo novas pesquisas são necessárias para demonstrar as alterações na microbiota intestinal provocadas pelo consumo, em longo prazo, deste produto (SPANHAAK; HAVENAAR; SCHAAFSMA, 1998).

A estirpe *L. rhamnosus* GG é considerada o agente probiótico mais estudado em ensaios clínicos com crianças e adultos. Este probiótico foi isolado do trato intestinal humano em 1983 e patenteado em 1985 por Sherwood Gorbach e Barry Goldin (SILVA *et al.*, 1987).

Fortes evidências dos efeitos benéficos promovidos pelo *L. rhamnosus* GG foram obtidas após a redução de casos de diarreia em indivíduos tratados com elevadas doses (10^9 log UFC/mL) deste probiótico (ISOLAURI *et al.*, 1991).

Alguns estudos relataram que o *Lactobacillus* GG pode reduzir o tempo de duração e/ou amenizar os sintomas de gastroenterites. Kaila *et al.* (1995) e Majamaa *et al.* (1995) relataram que as concentrações do anticorpo IgA aumentaram significativamente em crianças após a administração do probiótico *Lactobacillus* GG, fator que comprova o fortalecimento da microbiota intestinal.

¹ Yakult é uma empresa japonesa de produtos alimentícios, conhecida mundialmente devido à produção de leite fermentado com *Lactobacillus casei* Shirota

2.4. Interações entre as culturas ácido-láticas

A composição química do produto lácteo é influenciada diretamente pela atividade metabólica da bactéria, que interage intensamente com o meio ao converter determinados componentes em produtos metabólitos durante o seu crescimento. Os carboidratos disponíveis e as proteínas do leite, especialmente aminoácidos livres, são os componentes mais utilizados pelo metabolismo bacteriano.

Variadas espécies ou subespécies de LAB podem conferir distintas características aos produtos alimentícios. Os compostos metabólicos finais de determinadas culturas, puras ou mistas, podem contribuir para a elaboração de produtos com características sensoriais indesejáveis (HELLER, 2001).

Diferentes combinações de bactérias iniciadoras e probióticas acrescentaram aos alimentos lácteos fermentados características tecnológicas, nutricionais e terapêuticas (JUILIARD *et al.*, 1987). Contudo, as interações microbianas podem ser benéficas (protocooperação) ou desfavoráveis (antagonismo), ou seja, podem ocorrer mudanças indesejáveis na composição da flora bacteriana durante a produção e a estocagem refrigerada do produto (BELLENGIER; RICHARD; FOCAUD, 1997).

Segundo Vinderola, Mocchuitti e Reinheimeir (2002), diversos tipos de interações foram detectados entre as bactérias ácido-láticas, como estimulação, inibição e ausência de efeitos, sendo que, no geral, as bactérias probióticas foram as mais inibidas nesse estudo. A seleção da melhor combinação de estirpes deve ser uma medida adotada para aperfeiçoar o desempenho tecnológico e favorecer a sobrevivência bacteriana durante a estocagem refrigerada dos produtos lácteos.

As bactérias probióticas apresentam crescimento lento no leite devido a sua baixa atividade proteolítica, sendo prática comum a adição de bactérias do iogurte para reduzir o tempo de fermentação. Entretanto, *L. bulgaricus* produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada (pós-acidificação), o que afeta a viabilidade das bactérias probióticas. A fim de superar o problema da pós-acidificação, a

tendência é usar fermentos que contenham *L. acidophilus* e bifidobactérias (DAVE; SHAH, 1998).

Gomes e Malcata (1999) sugeriram que, devido à baixa velocidade de multiplicação das culturas probióticas em relação às bactérias lácticas tradicionais, o controle da assepsia e a adição de fatores promotores de crescimento devem ser pré-requisitos para obtenção de contagens elevadas de células probióticas viáveis durante a estocagem do produto.

No geral, a estabilidade das bactérias ácido-láticas é assegurada principalmente devido a três fatores: (i) disponibilidade de carboidratos e aminoácidos, (ii) degradação de componentes tóxicos, como o peróxido de hidrogênio, e (iii) limitação da concentração de íons hidrogênio no meio. As bactérias ácido-láticas crescem mais devagar sob pH ácido, pois a acidez do meio provoca a danificação celular, diminuindo a viabilidade durante a estocagem. Em alimentos fermentados, como o iogurte, as bactérias ácido-láticas em cultura mista são injuriadas devido ao ácido láctico produzido pelas demais bactérias presentes, assim como pela acidificação crescente do produto durante a estocagem (HUTKINS; NANNEN, 1993).

As atividades metabólicas das culturas iniciadoras e dos probióticos provocam mudanças específicas nas características químicas do produto, afetando suas qualidades sensoriais.

Componentes carbônicos, como ácido acético e láctico, acetaldeído, acetona e diacetil, são produtos metabólicos resultantes da fermentação da lactose e proteínas (CHANDAN, 1992).

Alguns fatores importantes utilizados para minimizar as dificuldades de produção são a seleção da cultura adequada, o tratamento térmico rigoroso e o controle da acidez do produto. O estado fisiológico dos organismos probióticos adicionados, as condições físicas de estocagem (tempo e temperatura) e a composição química do produto no qual os microrganismos serão adicionados (acidez, conteúdo de carboidratos utilizáveis, fontes de nitrogênio, conteúdo mineral, atividade de água e conteúdo de oxigênio) devem ser considerados. As

possíveis interações dos probióticos (bacteriocinas, antagonismo, sinergismo) com outras culturas iniciadoras são fatores que devem ser priorizados, pois podem influenciar a viabilidade das bactérias probióticas no produto elaborado (HELLER, 2001).

2.5. Detecção e identificação de bactérias probióticas

Para definir se as culturas iniciadoras e probióticas são viáveis, estratégias clássicas devem ser utilizadas. Diferentes métodos estão disponíveis para monitoramento das culturas como, por exemplo, variados meios e condições de incubação (temperatura, tempo e atmosfera), que proporcionam a variação na cobertura microbiológica do produto.

A avaliação das características fenotípicas é considerada um dos principais meios para identificação e diferenciação microbiológica. As características fenotípicas analisadas são o tipo de crescimento (anaeróbica, aeróbica, facultativa ou microaerófila), os fatores de crescimento, a morfologia (celular ou da colônia), a reação de Gram e as características da fermentação (CHARTERIS *et al.*, 1997; KLEIN *et al.*, 1998; Mc CARTHEY, 2002).

Os meios seletivos e as condições de incubação são empregados segundo o isolamento desejado do grupo bacteriano de interesse. Este processo explora as características de crescimento dos organismos, incluindo suas necessidades nutricionais, condições preferenciais para incubação (temperatura, pH e potencial redox) e suscetibilidade a certos componentes, como antibióticos, vitaminas e sangue. Vários tipos de agar e meios líquidos são necessários para examinar toda diversidade de microrganismos usualmente utilizados nos variados métodos de incubação (CHARTERIS *et al.*, 1997).

Arroyo, Cotton e Martin (1994) relataram que métodos rápidos e confiáveis são necessários para a rotina de enumeração das bactérias probióticas, permitindo o monitoramento das mudanças populacionais bacterianas durante a estocagem dos produtos. Para serem eficientes, as metodologias de enumeração não podem ser complexas, ou consumir muito tempo, e devem oferecer colônias

de fácil visualização (LIM; HUB; BACK, 1995).

No geral, meios seletivos são usados para isolamento de culturas iniciadoras ou/e probióticos específicos. Como mencionado anteriormente, determinados meios seletivos promovem o aprimoramento do grupo bacteriano de interesse (por exemplo, Beerens Agar é freqüentemente usado para isolar bifidobactérias de populações mistas) (BEERENS, 1990).

Diversos meios de cultura têm sido desenvolvidos para enumerar bactérias probióticas em iogurtes e leites fermentados (DAVE; SHAH, 1996). Na prática, a quantificação diferencial de bactérias probióticas e iniciadoras é prejudicada devido à presença de múltiplas espécies associadas estritamente relacionadas em produtos como iogurtes, leites fermentados e queijos.

Charteris *et al.* (1997) forneceram extensa revisão de diferentes técnicas para o isolamento de espécies probióticas. Diferentes meios possibilitam a diferenciação de grupos bacterianos baseados nas suas características de crescimento. Uma variedade de tipos de agar tem sido proposta para quantificação de LAB probióticas específicas e culturas iniciadoras. Alguns destes meios podem ser vistos na Tabela 4.

Poucos meios são realmente seletivos, de forma que uma confirmação da identificação dos isolados seja necessária.

A *International Dairy Federation* (IDF) (IDF, 1996, 1997 e 2003) sugere um protocolo padrão de MRS e M17, meios usados para quantificação das culturas iniciadoras *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, respectivamente.

A lista de meios usada para quantificação das LAB probióticas (*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*) é extensa e a seleção freqüentemente reflete a preferência do usuário, de acordo com as facilidades de obtenção, preparação e custos. A Tabela 2 apresenta alguns meios de cultura utilizados comercialmente.

Os tempos de incubação são também importantes, pois algumas LAB crescem mais rápido que outras. Assim, é necessário checar o crescimento por

dias consecutivos para assegurar que as colônias menores não foram perdidas.

Na prática geral para enumerar as bactérias das amostras, uma diluição em série deve ser inicialmente preparada. As diluições contendo entre 25 e 250 colônias são (geralmente) usadas para a contagem. Diversas amostras de cada diluição em série são preparadas a fim de permitir maior precisão no cálculo dos componentes da amostra original.

Análises microbiológicas de probióticos em produtos lácteos disponíveis no mercado demonstram que a identificação e a quantificação das espécies nem sempre correspondem à informação obtida no produto (HAMILTON-MILLER, 1999).

Segundo Pintado, Guyot e Ampe (2003) e Ercolini (2004), a legal ramificação das patentes e o desejo diário do consumidor por transparência na indústria de alimentos valorizam cada vez mais a realização de uma apuração dos rótulos dos alimentos para diferenciar as LAB usadas na indústria de alimentos e no mercado. Além disso, os novos métodos elaborados para o monitoramento e caracterização das culturas lácticas mistas (probióticas ou iniciadoras) permitem compreender e explorar tecnologicamente as interações bacterianas, aperfeiçoando o controle durante a produção e assegurando a qualidade do produto final disponível ao consumidor.

Apesar do grande interesse comercial envolvendo a utilização de culturas lácticas, não há muitas informações sobre as interações entre as bactérias probióticas e iniciadoras no leite fermentado. Mais estudos sobre a relação entre esses microrganismos devem ser realizados, devido à sua grande importância para a nutrição e a promoção da saúde do consumidor (RAJAGOPAL; SANDINE, 1990; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997).

Atualmente, novas estratégias para a detecção e identificação de bactérias probióticas e iniciadoras foram propostas. Os métodos moleculares são os mais utilizados dentre as técnicas consideradas, pois são particularmente úteis para a diferenciação de microrganismos em nível de espécie e linhagem. Isto é

importante porque no iogurte e leite fermentado várias linhagens podem estar presentes, sendo possível realizar análises bacterianas através de técnicas biotecnológicas no produto final.

As modernas técnicas utilizadas para a rápida detecção de lactobacilos, bifidobactérias e propionibactérias permitem a quantificação e análise da dinâmica de populações de uma linhagem individual baseadas em métodos moleculares, cujos princípios e aplicações incluem: amplificação do rRNA 16S, DNA *microarray*, seqüenciamento de genes específicos (L-lactato desidrogenase – *ldh*, *recA*, proteína *heat shock* de 60-Kda– *hsp60*, etc), análise dos resultados de PCR, RAPD e Real Time PCR por técnicas de *fingerprinting*, como Eletroforese de Campo Pulsado (PFE) e Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE). Esta última permite uma análise de amplicons do rDNA 16S, quantitativamente mais precisa, mais rápida e confiável do que qualquer outra análise em nível de espécie. A técnica que utiliza PCR em Tempo Real (*Real Time*), ou Q-PCR, deverá ser a mais utilizada no futuro para detecção, identificação e quantificação de *Bifidobacterium*. A Tabela 3 lista algumas técnicas moleculares usadas para a identificação de bactérias lácticas e probióticas.

Tabela 2. Meios de cultura seletivos usados na detecção de bactérias ácido-láticas.

Bactéria	Meio de cultura	Colônia	Incubação	Referências
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST agar	0,5 mm amarela	Aeróbica 37°C, 24h	Dave e Shah (1996)
	M17 agar	1,0mm amarela, irregular	Aeróbica 37°C, 48h	Jordano <i>et al.</i> , (1992)
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	MRS agar pH5,2	1,0 mm amarela, irregular	Aeróbica 37°C, 48h	Dave e Shah (1996)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS sorbitol	0,1 - 0,5 mm amarela, regular, opaca	Anaeróbica 37°C, 72h	Dave e Shah (1996)
	MRS clindamicina	0,1 - 0,5 mm amarela, irregular, opaca	Anaeróbica 37°C, 72h	Lankaphuthra e Shah (1996)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	MRS vancomicina	1,0 - 2,0 mm amarela, regular, brilhante	Anaeróbica 37°C, 72h	Tharmaraj e Shah (2003)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	RCPB pH5,0	1,0 mm azul, regular, opaca	Anaeróbica 37°C, 72h	Moriya <i>et al.</i> , (2006)
	BL gentamicina	0,1 - 0,5 mm amarela, regular, opaca	Anaeróbica 37°C, 72h	Lim <i>et al.</i> , (1995)

Tabela 3. Métodos moleculares atualmente utilizados na diferenciação de bactérias ácido-láticas.

Bactéria	Método de detecção	Origem	Referências
<i>Pediococcus sp., Weisella sp., Leuconostoc sp., Lactobacillus</i>	PCR – <i>Primer</i> grupo-específico Estudo da ecologia da microbiota intestinal	TGI	Walter <i>et al.</i> , 2001
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	PCR – <i>Primer</i> espécie-específico. Diferenciação das subspécies de <i>L. bulgaricus</i>	Alimentos	Torriani; Zapparali; Dellaglio, 1999
<i>Lactobacillus sp.</i>	PCR – RAPD r DNA 16S Diferenciação de <i>Lactobacillus</i> intestinal	TGI	Sui; Leighto; Brady, 2002
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Multiplex – PCR, <i>Primers</i> espécie-específicos de rDNA 16S, rDNA 23S e região intergênica Diferenciação de <i>Lactobacillus</i> e grupos relacionados – 93,6% de fidelidade	Alimentos TGI	Kwon <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactobacillus casei</i>	PCR <i>Primer</i> espécie-específico Monitoramento e diferenciação de subspécies de <i>L. casei</i> após ingestão	TGI	De Champs, 2003
<i>Bifidobacterium sp., Lactobacillus sp.</i>	PCR – <i>primer</i> espécie-específico e DGGE Estudo da microbiota na mucosa intestinal	TGI	Nielsen <i>et al.</i> , 2003
<i>Bifidobacterium sp., Lactobacillus sp.</i>	PCR 16S rDNA. Diferenciação e rotulagem comercial	Alimentos	Yeung <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus sp.</i>	PCR- 16S rDNA e região espaçadora de RFLP Diferenciação de espécies de <i>Lactobacillus</i>	Culturas Puras	Yavuz <i>et al.</i> , 2004
<i>Bifidobacterium sp.</i>	ERI – PCR – RAPD. Identificação de espécies Identificação de espécies	Culturas Puras	Ventura; Meylan; Zink, 2003
<i>Bifidobacterium sp.</i>	Real Time – PCR e FISH. <i>Primers</i> espécies e Genero-especifico da região rDNA 16S	TGI	Gueimond <i>et al.</i> , 2004 Ward; Roy, 2005

TGI: Trato Gastrointestinal

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar o efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas em leite fermentado.

O objetivo específico foi estudar o efeito da inter-relação entre as estirpes, *Streptococcus thermophilus* TAO, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB340, *Lactobacillus acidophilus* LAC, *Lactobacillus rhamnosus* LBA e *Bifidobacterium lactis* BL04 sobre o perfil de acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Procedimento experimental para obtenção do leite fermentado composto por culturas probióticas e iniciadoras associadas

4.1.1. Leite

O leite em pó desnatado Molico (Nestlé, Caçapava, Brasil), reconstituído a 12% de sólidos totais, foi homogeneizado com auxílio de agitador magnético e tratado termicamente a 85°C durante 15 minutos em sistema descontínuo. O leite tratado foi imediatamente resfriado em banho de gelo até atingir 10°C e, a seguir, transferido para garrafas de 250 mL previamente autoclavadas (121°C/15min), sendo imediatamente resfriado em câmara fria a 4°C por 24h.

4.1.2. Culturas lácticas

As culturas utilizadas para inoculação direta foram as seguintes:

- TA040, *Streptococcus thermophilus*, Danisco, França.
- LB340, *Lactobacillus bulgaricus*, Danisco, França.
- LAC4, *Lactobacillus acidophilus*, Danisco, França.
- LBA, *Lactobacillus rhamnosus*, Danisco, França.
- BL04, *Bifidobacterium lactis*, Danisco, Estados Unidos.

4.1.3. Preparo do inóculo

As culturas lácticas foram pesadas em quantidade suficiente para obtenção da contagem inicial de 10^8 log UFC/mL e posteriormente suspensas em *erlenmeyrs* com 25 mL de leite padronizado (10% de sólidos totais), previamente esterilizado (121°C/15 min).

As quantidades de culturas lácticas utilizadas para a preparação dos inóculos estão descritas na Tabela 4.

A partir destes inóculos foram preparadas quatro associações de culturas ou co-culturas: (i) CC4.1 - ST (TA040), LB (LB340), LA (LAC4) e BL (BL04); (ii) CC4.2 - ST (TA040), LB (LB340), LR (LBA) e LA (LAC4); (iii) CC4.3 - ST (TA040), LB (LB340), BL (BL04) e LR (LBA); e (iv) CC5 - ST (TA040), LB (LB340), BL (BL04), LA (LAC4) e LR (LBA). Como controle (CC2) foi utilizado o leite fermentado inoculado com LB (LB340) e ST (TA040). A tabela 5 apresenta as co-culturas elaboradas neste estudo e a tabela 6 fornece a quantidade de inóculo adicionada nos respectivos leites.

Tabela 4. Quantidade de cada cultura láctica adicionada no leite autoclavado para a preparação do inóculo.

Culturas	Quantidade (g)	Leite autoclavado (mL)
ST	0,0125	25
LB	0,2000	25
LA	0,1000	25
LR	0,4000	25
BL	0,1250	25

4.1.4. Fermentação

As garrafas estéreis contendo o leite a 12% pasteurizado foram colocadas em banho-maria acoplado ao sistema CINAC (Ysebaert, Frépillon, França) até a estabilização da temperatura em 42 °C; em seguida foram inoculadas as culturas. O esquema usado nos ensaios, considerando-se a base láctea (quantidade de leite) e as culturas (quantidade de inóculo), pode ser visto na Tabela 6. Após a inoculação, o leite adicionado com a cultura láctica foi homogeneizado e a cinética de acidificação prosseguiu pelo Sistema CINAC. Quando o leite atingiu valor de pH 4,5 (pH final), a fermentação foi interrompida. As garrafas com os leites fermentados foram transferidas para a câmara de fluxo laminar, na qual se realizou a quebra do coágulo, movimentando-se manualmente o produto com agitador de aço inox por aproximadamente 1 minuto.

Acondicionamento e armazenamento

Os leites fermentados homogeneizados foram envasados manualmente em potes plásticos de 50mL e imediatamente resfriados em banho de gelo; posteriormente, os potes foram armazenados a 4°C em câmara fria durante 21 dias. Os produtos foram submetidos às análises físico-químicas e as bactérias iniciadoras e probióticas foram enumeradas seletivamente, 24 horas após a fermentação e aos 7^o, 14^o e 21^o dias de armazenamento a 4°C.

Tabela 5. Co-culturas usadas na preparação dos leites fermentados.

Culturas e Siglas	Controle		Co-culturas		
	CC2	CC4.1	CC4.2	CC4.3	CC5
<i>S. thermophilus</i> (ST)	+	+	+	+	+
<i>L. bulgaricus</i> (LB)	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> (LA)		+	+		+
<i>L. rhamnosus</i> (LR)			+	+	+
<i>B. lactis</i> (BL)		+		+	+

Co-culturas: CC2 (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*); CC4.1 (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *L. acidophilus* + *B. lactis*); CC3.2 (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *L. acidophilus* + *L. rhamnosus*), CC3.3 (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *L. rhamnosus* + *B. lactis*) e CC5 (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *L. acidophilus* + *B. lactis* + *L. rhamnosus*).

4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos

A modelagem da atividade acidificante de misturas de culturas lácticas foi realizada através do Sistema *Cinétique d'Acidification*. Isto é, mediante um método automático para a quantificação da atividade bacteriana com base em medidas de valores de pH (SPINLER; CORRIEU, 1989). A partir dos dados obtidos, foram calculadas as velocidades máximas de acidificação (dpH/dt), expressas em miliunidades de pH/min ($V_{m\acute{a}x}$). No período final de incubação foram avaliados os seguintes parâmetros cinéticos:

$t_{vm\acute{a}x}$: tempo registrado na velocidade máxima de acidificação (min)

$pH_{vm\acute{a}x}$: pH registrado na velocidade máxima de acidificação

$t_{pH5,0}$: tempo registrado no pH 5,0 (min)

$t_{pH4,5}$: tempo de fermentação ou tempo registrado no pH 4,5 (min)

Tabela 6. Esquema experimental utilizado para a fermentação dos leites compostos por culturas associadas.

Código	Culturas	Quantidade total do inóculo (mL)	Quantidade de leite (mL)	Quantidade de leite com inóculos (mL)
CC4.1	ST LB LA BL	4	246	250
CC4.2	ST LB LA LR	8	242	250
CC4.3	ST LB LR BL	8	242	250
CC5	ST LB LA LR BL	9	241	250

Inóculos: 1mL das culturas ST, LB, LA e BL e 5mL de LR foram inoculados no leite autoclavado segundo as combinações descritas acima.

4.3. Análises físico-químicas

4.3.1. Proteína, sólidos totais e gordura

As porcentagens de proteína, sólidos totais e gordura dos produtos foram obtidas através de medições efetuadas em aparelho digital Ekomilk, EON Trading & Bulteh 2000, Stara Zagora, Bulgária. As análises foram realizadas em duplicata a partir de D0 (após a inoculação) e durante o período de estocagem.

4.3.2. Lactose

Os teores de lactose dos produtos foram determinados pelo método de titulação, utilizando-se solução de Fehling (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). As análises foram realizadas em duplicata, iniciando em D0 e prosseguindo durante o período de armazenamento.

4.3.3. Valor de pH

As medições dos valores de pH foram realizadas em potenciômetro digital Quimis, Diadema, São Paulo, nos 1^o, 7^o, 14^o e 21^o dias de armazenamento dos leites fermentados. As análises foram realizadas em quadruplicata.

4.3.4. Acidez total titulável

Para determinação do teor de acidez total titulável foi utilizado o método descrito por Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados foram expressos em graus Dornic. As análises de acidez foram efetuadas em quadruplicata a partir de D0 (antes da fermentação) e durante toda a estocagem do produto fermentado.

4.4. Enumeração seletiva

A análise microbiológica iniciou-se antes da fermentação (D0) e prosseguiu durante toda a estocagem. A diluição das amostras foi efetuada a partir de 9mL de água peptonada, no qual foi suspenso 1 mL de cada amostra (0,1% p/v) e homogeneizado durante dois minutos. A suspensão homogeneizada foi submetida a diluições seriadas, utilizando-se o mesmo diluente. As diluições apropriadas foram inoculadas nos meios seletivos em duplicata.

S. thermophilus e *L. bulgaricus* foram enumerados em M17 agar e MRS pH 5,4, respectivamente, após incubação aeróbica a 37°C durante 48 horas. Os probióticos *L. acidophilus*, *B. lactis* e *L. rhamnosus* foram enumerados nos meios seletivos MRS clindamicina, RCA dicloxacilina e MRS vancomicina após incubação a 37°C durante 72 horas em jarra de anaerobiose. Os meios M17 agar e MRS pH 5,4 foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Jordano *et al.* (1992) e Dave; Shah (1996); já os meios MRS clindamicina e MRS vancomicina foram preparados segundo os métodos descritos por Lankaphuthra; Shah (1996) e Tharmaraj; Shah (2003), respectivamente. A Tabela 7 ilustra a quantidade de antibióticos adicionada nos respectivos meios de cultura.

As condições de anaerobiose foram criadas usando-se AnaeroGen (Oxoid,

Basingstoke). Placas contendo de 30 a 300 colônias foram enumeradas e as unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g) foram calculadas. A seletividade dos meios de cultura foi confirmada através de observação microscópica da aparência das células nas colônias.

4.5. Determinação da textura

A análise do perfil de textura dos leites fermentados foi realizada em amostras mantidas sob temperatura de refrigeração (entre 4 e 6°C), através de teste de simples compressão com cilindro acrílico de 2,5 cm de diâmetro, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Inglaterra) controlado por microcomputador. A distância percorrida pelo cilindro na amostra foi de 10 mm numa velocidade de 10 mm/s. O atributo firmeza em Newtons (N) foi determinado segundo as recomendações de Damin *et al.* (2008), que corresponde à altura do primeiro pico da curva de simples compressão (Figura 1). Todas as análises foram realizadas em quadruplicata, após um dia (D1) de armazenamento dos produtos a 4°C. Além da firmeza, os atributos considerados nesta análise foram a consistência (N.sec), a coesividade (N) e o *Breaking Point* (N) dos produtos.

4.6 Análise estatística

A partir dos resultados obtidos foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação de médias mediante ao programa Statística versão 6.0. Em todas as análises foi considerado nível de significância $P \leq 0,05$.

Tabela 7. Quantidade de antibióticos empregada nos meios de cultura.

Cultura	Meio base	Antibiótico	Quantidade de antibiótico	Quantidade de meio
BL	RCA pH 7,1	dicloxacilina	250ul	250mL
LR	MRS pH 6,2	vancomicina	125ul	250mL
LA	MRS pH 6,2	clindamicina	2.500ul	250mL

Cultura Mãe (solução estoque): dicloxacilina 100 mg/ 50 mL, vancomicina 1000 mg/ 50 mL e clindamicina 2,5 mg/50 mL

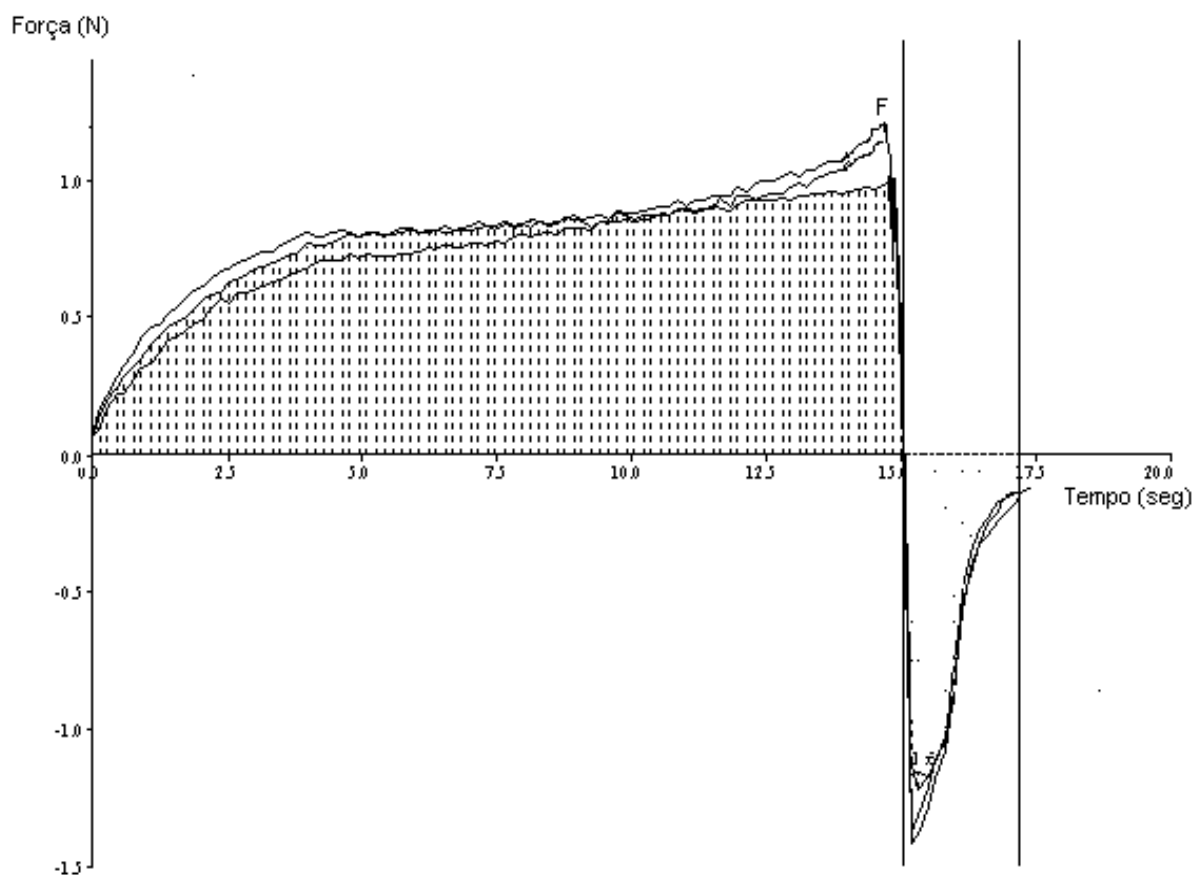


Figura 1. Perfil de textura de quatro amostras de leite fermentado registrado pelo aparelho TA-XT2. (F: altura obtida após a compressão das amostras, valor utilizado para a medição dos atributos).

5 RESULTADOS

5.1. Caracterização do leite fermentado durante a estocagem

5.1.1 Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o armazenamento – CC2

Cinética de acidificação

A avaliação dos dados cinéticos fornecidos pelo sistema CINAC, após o monitoramento do ensaio controle composto pelas bactérias iniciadoras *S.thermophilus* (ST) e *L. bulgaricus* (LB), forneceu como resultado mais relevante o tempo médio total de 321,50 min (5,36h) obtido com a finalização da fermentação no pH final 4,5. A velocidade máxima média de acidificação de $16,97 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ foi atingida após 209,10 min de fermentação em pH 5,45. A Tabela 8 apresenta os resultados dos dados cinéticos neste ensaio.

Tabela 8. Descritores cinéticos de acidificação do leite a 42°C até pH 4,5 composto pela associação das culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Co-cultura	Amostras	$t_{v_{\text{máx}}}$ (min)	$V_{\text{máx}}$ ($\cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$)	$\text{pH}_{v_{\text{máx}}}$	$t_{\text{pH}5,0}$ (min)	$t_{\text{pH}4,5}$ (min)	pH final
STLB	STLB 1	214,20	16,51	5,38	240,00	320,00	4,51
STLB	STLB 2	210,00	16,71	5,44	240,00	322,00	4,51
STLB	STLB 3	208,20	16,81	5,43	240,00	322,00	4,50
STLB	STLB 4	204,00	17,84	5,54	242,00	322,00	4,51
	Média	209,10	16,97	5,45	240,50	321,50	4,51
	d.p	4,23	0,60	0,07	1,00	1,00	0,00
	C.V.(%)	2,02	3,51	1,23	0,42	0,31	0,05

$t_{v_{\text{máx}}}$: tempo registrado na velocidade máxima; $V_{\text{máx}}$: velocidade máxima de acidificação; $\text{pH}_{v_{\text{máx}}}$: pH registrado na velocidade máxima; $t_{\text{pH}5,0}$: tempo registrado no pH 5,0; $t_{\text{pH}4,5}$: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação.

Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado durante o armazenamento

A medição do pH do leite fermentado em D1 forneceu o valor de 4,58. Nos dias posteriores da estocagem os valores obtidos a partir desta análise continuaram a apresentar diminuição, apontando declínio mais sutil e gradual. Os valores 4,20, 4,16 e 4,15 correspondem ao pH registrado respectivamente nos 7°, 14° e 21° dias de análise do leite fermentado no ensaio controle (Tabela 9).

Os dados obtidos pela titulação do leite fermentado com solução Dornic (NAOH 0,1N) demonstraram aumento acentuado da acidez durante o período de estocagem. Os valores em D1 e D21 foram, respectivamente, 113,26°D e 140,51°D (Tabela 9).

A análise da textura no ensaio CC2 demonstrou elevação contínua da firmeza e da consistência do leite fermentado entre D1 e D14, apresentando os valores 0,80 N e 1,24 N, e 9,13 Ns e 13,49 Ns, respectivamente. Ligeira diminuição destes atributos ocorreu em D21, segundo os dados 1,11N e 10,85 Ns, respectivamente. A coesividade do leite fermentado entre o 1° e o 14° dias de análise do ensaio CC2 diminuiu de -1,05 para -1,53N, seguida por ligeira elevação para -1,02N no D21. O *Breaking Point* da composição controle aumentou de 0,56N para 0,98N, em D1 e D14, respectivamente, mas pequena diminuição para 0,70N foi observada no D21 (Tabela 9).

Tabela 9. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o período de estocagem

Dias	pH	Acidez (°D)	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	Coesividade (N)	B.P. (N)
1	4,38 ± 0,01	113,26± 0,96	0,80 ± 0,00	9,13 ± 1,07	-1,05 ± 0,15	0,56 ± 0,19
7	4,20 ± 0,01	128,76± 0,50	0,96 ± 0,09	10,21 ± 0,83	-1,19 ± 0,15	0,66 ± 0,06
14	4,16 ± 0,01	135,26 ± 2,99	1,24 ± 0,10	13,49 ± 0,91	-1,53 ± 0,14	0,98 ± 0,04
21	4,15 ± 0,00	140,51 ± 5,45	1,11 ± 0,21	10,85± 0,82	-1,02 ± 0,15	0,70 ± 0,10

(N=4); B.P.: *Breaking Point*

Contagem de bactérias iniciadoras e probióticas

A diminuição no crescimento de LB foi observada durante o armazenamento refrigerado, sendo esta a estirpe mais inibida nesta composição.

A cultura com o melhor desempenho no ensaio controle foi o ST, fornecendo mais de 10^8 log UFC/mL células viáveis durante todo o período de análise. O D1 foi destacado como o período em que a contagem de ST esteve mais elevada, com valores acima de 10^9 log UFC/mL. Entre os 7^o, 14^o e 21^o dias de análise, a contagem do ST permaneceu em torno de 10^9 log UFC/mL.

O número de células viáveis de LB manteve-se acima de 10^7 /og UFC/mL entre D1 e D7, mas a redução de um ciclo logarítmico no crescimento desta estirpe ocorreu entre o 7^o. e o 14^o. dias de análise no ensaio controle. Uma contagem em torno de 10^6 log UFC/mL células viáveis de LB foi obtida em D14 e D21.

A Figura 2 descreve os valores das contagens das estirpes ST e LB no ensaio controle.

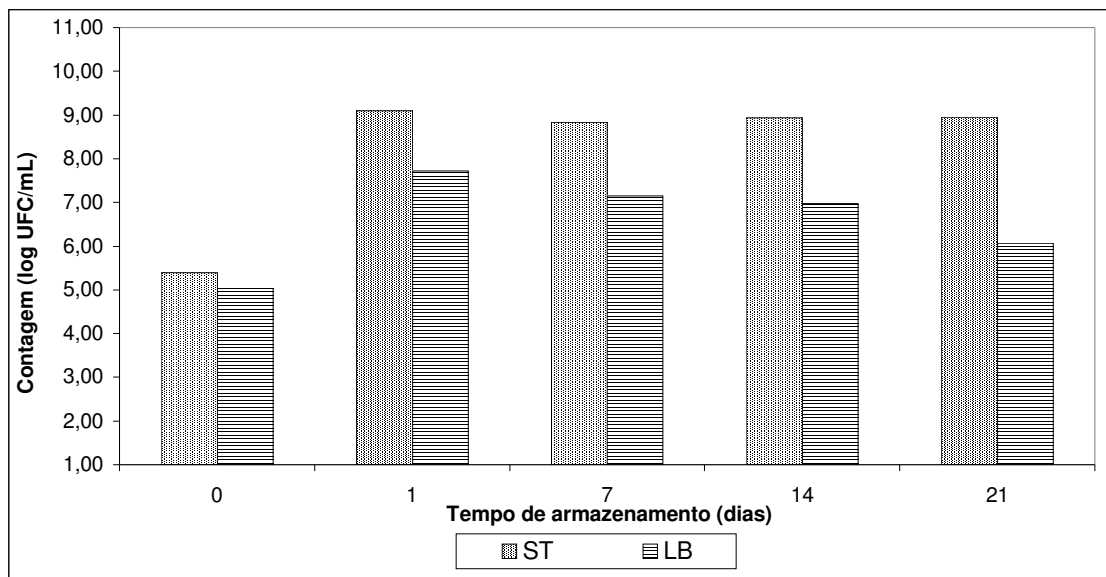


Figura 2. Viabilidade de *S. thermophilus* (ST) e *L. bulgaricus* (LB) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.

Composição química do leite e do leite fermentado

A composição química do ensaio controle é apresentada na Tabela 10 e os valores médios desta análise durante a estocagem estão indicados na Tabela XII (no anexo).

O teor de lactose do leite no ensaio controle foi de 4,10% ± 0,07. A percentagem de proteínas e de sólidos totais neste ensaio foram, respectivamente, 4,15% ± 0,06 e 11,45% ± 0,21.

No decorrer dos 21 dias de armazenamento refrigerado, os teores de lactose, proteína e sólidos totais do leite fermentado foram, em média, 4,02%, 4,39% e 12,52%, respectivamente.

Tabela 10. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado durante o armazenamento refrigerado preparados com culturas associadas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Dias	Lactose (%)	Proteína (%)	Sólidos Totais (%)
0	4,10 ± 0,07	3,15 ± 0,06	11,45 ± 0,21
1	4,07 ± 0,09	4,35 ± 0,01	12,42 ± 0,06
7	3,97 ± 0,01	4,44 ± 0,20	12,67 ± 0,55
14	3,97 ± 0,16	4,38 ± 0,25	12,49 ± 0,69
21	4,09 ± 0,06	4,37 ± 0,18	12,48 ± 0,54

(N=2)

5.1.2. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* durante o armazenamento – CC4.1

Cinética de acidificação

A análise dos dados cinéticos fornecidos pelo sistema CINAC, após o monitoramento do ensaio CC4.1, composto pela associação de quatro culturas, duas iniciadoras (ST e LB) e duas probióticas (LA e BL), forneceu como resultado mais relevante o término da fermentação no tempo médio de 285 min (4,75h). A velocidade máxima de acidificação foi de $16,18 \cdot 10^{-3}$ upH.min 10^{-1} , valor atingido após 189 min do início da fermentação em pH 5,37.

Os resultados dos dados cinéticos do ensaio em cultura mista CC4.1 estão apresentados na Tabela 11.

A associação dos probióticos LA e BL provocou o aumento da atividade proteolítica durante a fermentação do leite no ensaio CC4.1, efeito potencializado pela ação metabólica do ST e LB. Como resultado foi observada redução de 36 min no tempo médio total de fermentação em relação ao ensaio controle (Tabela 9), assim como a utilização de 30 min a menos para atingir a velocidade máxima média de acidificação.

Tabela 11. Descritores cinéticos de acidificação do leite a 42°C até pH 4,5 composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*.

Co-cultura	Amostras	T _{V_{máx}} (min)	V _{máx} ($\cdot 10^{-3}$ upH.min ⁻¹)	pH _{V_{máx}}	t _{pH5,0} (min)	t _{pH4,5} (min)	pH final
STLBLABL	LA 1	168,00	12,29	5,66	212,00	282,00	4,51
STLBLABL	LA 2	202,20	16,83	5,24	218,00	284,00	4,51
STLBLABL	LA 3	193,80	17,46	5,30	214,00	286,00	4,46
STLBLABL	LA 4	193,80	18,14	5,28	212,00	288,00	4,47
	Média	189,45	16,18	5,37	214,00	285,00	4,49
	d.p	14,84	2,65	0,19	2,83	2,58	0,02
	C.V.(%)	7,83	16,37	3,63	1,32	0,91	0,53

t_{V_{máx}}: tempo registrado na velocidade máxima; V_{máx}: velocidade máxima de acidificação; pH_{V_{máx}}: pH registrado na velocidade máxima; t_{pH5,0}: tempo registrado no pH 5,0; t_{pH4,5}: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação.

Pós-acidificação, acidez e firmeza do leite fermentado durante o armazenamento

No primeiro dia da estocagem o pH foi de 4,31, esse valor comprova o efeito da acidificação durante o processo de fermentação, através da atividade proteolítica das culturas ST, LB, LA e BL associadas no leite fermentado. Ligeira queda no pH ocorreu entre o 7^o. e o 14^o. dias de análise, 4,31 e 4,24, respectivamente. O pH do leite fermentado em cultura mista permaneceu em 4,24 no D21 (Tabela 12).

O valor da acidez do leite fermentado no ensaio CC4.1 foi de 128°D no primeiro dia de análise. Nos demais dias de armazenamento a acidez elevou-se gradualmente, chegando a 145°D no período final de estocagem refrigerada (Tabela 12).

Em relação à textura do leite fermentado composto pelos probióticos LA e BL associados às bactérias iniciadoras do iogurte, os valores da firmeza elevaram-se ligeiramente, de 0,97 N para 1,94 N, durante o 1º. e o 21º. dias de armazenamento. A análise da consistência também apresentou elevação dos valores, com aumento de 11,16 Ns para 18,69 Ns neste mesmo período.

A redução da coesividade de -1,26 N para -2,16 N foi obtida durante a análise da estocagem do leite fermentado no ensaio CC4.1. No mesmo período foi observado aumento de 0,66N para 1,21 N no *Breaking Point* deste produto (Tabela 12).

Tabela 12. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* durante o período de estocagem.

Dias	pH	Acidez (°D)	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	Coesividade (N)	B.P. (N)
1	4,31±0,00	128,01± 4,41	0,97 ± 0,05	11,16 ± 0,52	-1,26 ± 0,10	0,66 ± 0,24
7	4,31 ± 0,01	131,03 ± 5,57	1,40 ± 0,26	14,19 ± 0,21	-1,67 ± 0,15	0,96 ± 0,13
14	4,24 ± 0,01	135,71 ± 1,34	1,41 ± 0,22	15,28 ± 1,03	-1,69 ± 0,20	0,93 ± 0,12
21	4,24 ± 0,02	145,07 ± 0,57	1,94 ± 0,57	18,69 ± 2,80	-2,16 ± 0,46	1,21 ± 0,25

(N=4); B.P.: *Breaking Point*

Contagem de bactérias iniciadoras e probióticas

A contagem das bactérias probióticas LA e BL e iniciadoras ST e LB associadas em cultura mista no leite apresentava-se praticamente acima de 10⁶ log UFC/mL após a inoculação; porém, durante a estocagem foi observada inibição na viabilidade das culturas LA e LB e a manutenção da contagem de ST e BL (Figura 3), sendo que o ST foi a cultura que apresentou a contagem mais elevada neste ensaio, fornecendo com valores acima de 10⁸ log UFC/mL células viáveis durante todo o período de análise.

Em relação à BL, apesar desta estirpe demonstrar certa inibição em D1, a

elevação de um ciclo logarítmico nos valores da sua contagem ocorreu entre o 1^o. e o 7^o. dias de análise. O número de células viáveis de BL permaneceu ligeiramente constante até o D21, fornecendo valores acima de 10^7 log UFC/mL.

Apesar da diminuição de um ciclo logarítmico na contagem de LB entre D1 e D7, esta cultura apresentou grande estabilidade durante o período seguinte de estocagem, mantendo-se em torno de 10^6 log UFC/mL.

A cultura considerada menos viável no ensaio composto pelos probióticos LA e BL associados foi o LA, pois esta estirpe apresentou baixa contagem e não resistiu até o D14. Apesar deste probiótico apresentar contagem acima de 10^7 log UFC/mL em D1, a inibição de um ciclo logarítmico ocorreu entre D1 e D7 e, em seguida, entre D7 e D14, fornecendo os valores em torno de 10^5 log UFC/mL ao final dos 14 dias de armazenamento refrigerado.

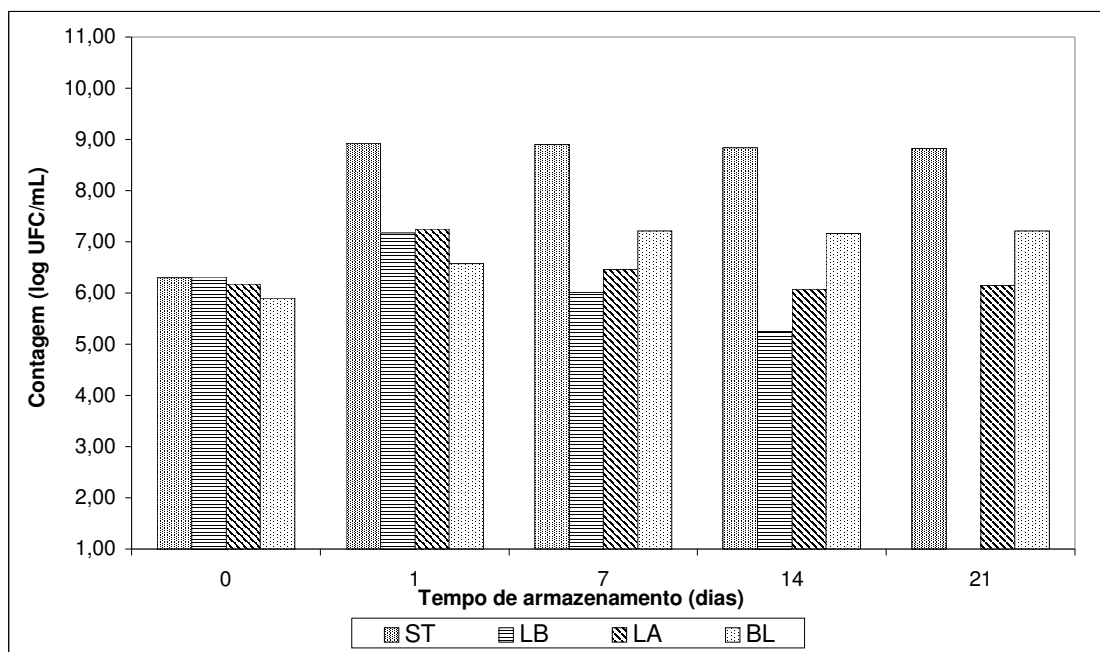


Figura 3. Viabilidade de *S. thermophilus* (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA) e *B. lactis* (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4 °C.

Composição química do leite e do leite fermentado

A composição química do leite fermentado no ensaio CC4.1 está apresentada na Tabela 13. Os valores médios durante a estocagem podem ser analisados na Tabela XII (no anexo).

O teor de lactose do leite no ensaio controle foi de $4,10\% \pm 0,07$. A porcentagem de proteínas e de sólidos totais neste ensaio foi, respectivamente, $4,13\% \pm 0,06$ e $11,45\% \pm 0,21$.

Já no leite fermentado, durante o período de estocagem, os teores de lactose, proteína e sólidos totais do leite foram, respectivamente, $4,04\%$, $4,47\%$ e $12,75\%$.

Tabela 13. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* durante o armazenamento.

Dias	Lactose (%)	Proteína (%)	Sólidos Totais (%)
0	$4,10 \pm 0,07$	$3,15 \pm 0,06$	$11,45 \pm 0,21$
1	$3,99 \pm 0,02$	$4,29 \pm 0,16$	$12,25 \pm 0,44$
7	$4,14 \pm 0,03$	$4,42 \pm 0,28$	$12,64 \pm 0,79$
14	$3,95 \pm 0,04$	$4,52 \pm 0,11$	$12,91 \pm 0,33$
21	$4,07 \pm 0,11$	$4,63 \pm 0,04$	$13,21 \pm 0,10$

(N=2)

5.1.3. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento - CC4.2

Cinética de acidificação

A fermentação do leite composto pelas culturas iniciadoras, ST e LB, e probióticas, LA e LR, no ensaio CC4.2 foi realizada em 271 min (4,51h).

A fermentação do leite na composição controle, segundo a Tabela 8, durou 50 min a mais do que a fermentação em cultura mista com LA e LR associados, demonstrando que a adição destes probióticos contribuiu para a diminuição do tempo da fermentação (Tabela 14).

A velocidade máxima média de acidificação do leite fermentado composto por LA e LR associados foi de $15,59 \cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$ atingida em pH 5,42, após aproximadamente 178 min do início da fermentação e 30 min antes da composição controle.

Tabela 14. Descritores cinéticos de acidificação do leite a 42 °C até pH 4,5 composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*.

Co-cultura	Amostras	$t_{\text{máx}}$ (min)	$V_{\text{máx}}$ ($\cdot 10^{-3} \text{upH} \cdot \text{min}^{-1}$)	$\text{pH}_{V_{\text{máx}}}$	$t_{\text{pH}5,0}$ (min)	$t_{\text{pH}4,5}$ (min)	pH final
STLBLALR	SBL 1	168,00	12,29	5,66	212,00	272,00	4,50
STLBLALR	SBL 2	186,00	16,26	5,35	208,00	272,00	4,51
STLBLALR	SBL 3	180,00	17,59	5,37	204,00	274,00	4,51
STLBLALR	SBL 4	181,80	16,20	5,29	200,00	266,00	4,51
	Média	178,80	15,59	5,42	206,00	271,00	4,51
	d.p	7,72	2,29	0,17	5,16	3,46	0,01
	C.V.(%)	4,2	14,1	3,1	2,6	1,3	0,1

$t_{\text{v máx}}$: tempo registrado na velocidade máxima; $V_{\text{m áx}}$: velocidade máxima de acidificação; $\text{pH}_{V_{\text{m áx}}}$: pH registrado na velocidade máxima; $t_{\text{pH}5,0}$: tempo registrado no pH 5,0; $t_{\text{pH}4,5}$: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação.

Pós-acidificação, acidez e firmeza do leite fermentado durante o armazenamento

No ensaio CC4.2 o valor do pH no 1º dia de análise foi de 4,42. Entre D7 e D14 o pH apresentou uma queda, estabilizando-se no 21º dia de armazenamento refrigerado com o valor 4,20 (Tabela 15).

A acidez do leite fermentado em D1 foi de 112,31ºD. No decorrer do período de armazenamento ocorreu uma elevação gradual, com os valores 122,19ºD, 125,01ºD e 136,68ºD, respectivamente, em relação aos 7º, 14º e 21º dias de análise.

Algumas variações na firmeza ocorreram durante o período de armazenamento refrigerado do leite fermentado. Inicialmente, foi registrada ligeira diminuição da firmeza entre D1 e D7, segundo os valores 0,92 N e 0,80 N, respectivamente. Em D14 e D21 ocorreu elevação dos dados dessa análise, na qual, o valor de 1,24 N foi obtido ao final do armazenamento (Tabela 15).

Assim como na análise da firmeza, a consistência do leite fermentado no ensaio CC4.2 também apresentou variações no decorrer da estocagem refrigerada, iniciando com o valor de 10,33 Ns no 1º dia de avaliação, apresentando posterior redução para 9,13 Ns em D7 e finalizando com elevação para 12,38 Ns em D21.

Ligeiro aumento na coesividade foi observado entre D1, D7 e D14, com os valores -1,26 N, -1,05 N e -1,00 N, respectivamente, seguido por redução para o valor de -1,48 N no 21º dia de análise. O *Breaking Point* do leite fermentado em cultura mista apresentou variações durante todo o período de armazenamento. Em D1 e D7 ocorreu diminuição de 0,80 N para 0,56 N nos valores deste atributo; posterior aumento de 0,67 N para 1,07 N, respectivamente, ocorreu em D14 e D21 (Tabela 15).

Tabela 15. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* durante o período de estocagem.

Dias	pH	Acidez(°D)	Firmeza(N)	Consistência(N.s)	Coesividade (N)	B.P.(N)
1	4,42 ± 0,01	112,31 ± 4,07	0,92 ± 0,11	10,33 ± 1,67	-1,26 ± 0,20	0,80 ± 0,08
7	4,32±0,00	122,19 ± 0,60	0,80 ± 0,11	9,13 ± 1,07	-1,05 ± 0,08	0,56 ± 0,19
14	4,20 ± 0,01	125,01 ± 3,74	0,88 ± 0,12	9,62 ± 1,06	-1,00 ± 0,13	0,67 ± 0,06
21	4,20 ± 0,02	136,68 ± 0,58	1,24 ± 0,17	12,38 ± 1,05	-1,48 ± 0,15	1,07 ± 0,29

(N=4); B.P.: *Breaking Point*

Contagem de bactérias iniciadoras e probióticas

A interação entre as bactérias ácido-láticas ST, LB, LA e LR no leite fermentado sob refrigeração favoreceu o desenvolvimento do ST no ensaio CC4.2 ($>10^8$ Log UFC/mL) durante toda a estocagem refrigerada.

O desenvolvimento das culturas LA e LB diminuiu cerca de dois ciclos logarítmicos entre D1 e D7. Os valores obtidos pela contagem de células viáveis de LA e LB encontravam-se em torno de 10^7 Log UFC/mL em D1 e 10^5 Log UFC/mL em D7. O crescimento do LB manteve-se em torno de 10^5 log UFC/mL em D14, mas foi inibido em um ciclo logarítmico no período seguinte, fornecendo a contagem de 10^4 Log UFC/mL no último dia de estocagem refrigerada. O LA foi considerada a estirpe menos viável do ensaio CC4.2, pois sobreviveu apenas até o 7° dia da estocagem, ao contrário do LB, que manteve-se até o D21, apesar da baixa contagem.

O LR apresentou pouco crescimento em relação às demais estirpes (em D0 e D1) em torno de 10^6 log UFC/mL células viáveis, respectivamente. Mas, ao contrário das culturas LB e LA, o LR sobreviveu até o D21 e com uma contagem mais elevada. A Figura 4 apresenta a contagem microbiológica do ensaio CC4.2.

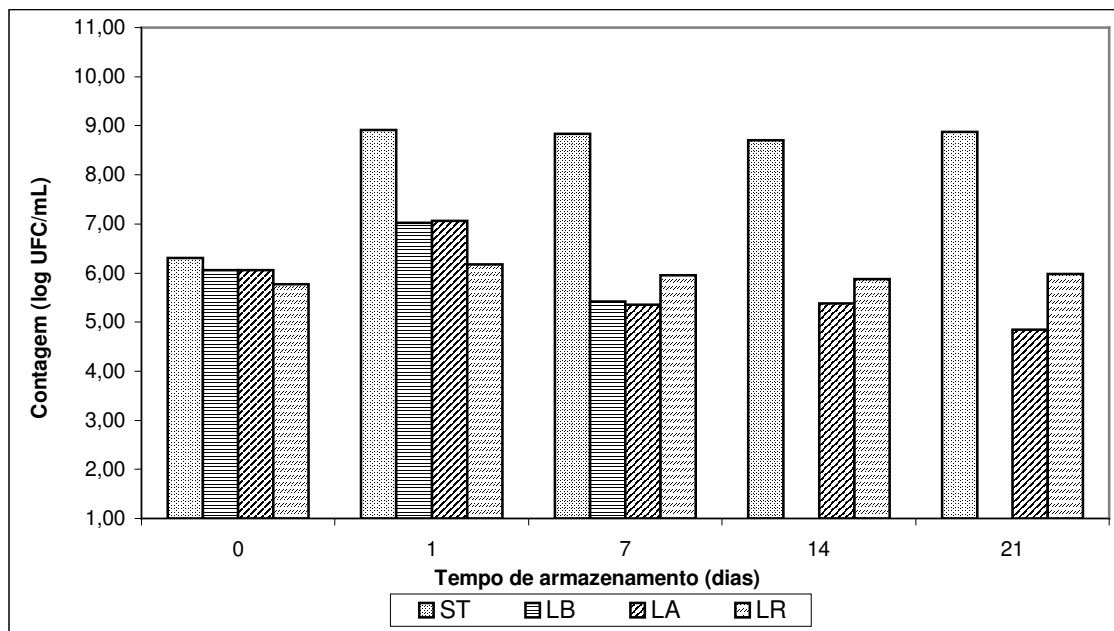


Figura 4. Viabilidade de *S. thermophilus* (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA) e *L. rhamnosus* (LR) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.

Composição química do leite e do leite fermentado

A Tabela 16 apresenta a composição química do leite fermentado no ensaio CC4.2 e a Tabela XII, no anexo, fornece os valores médios desta análise durante a estocagem.

O teor de lactose do leite no ensaio controle foi de 4,10% ± 0,07. A porcentagem de proteínas e de sólidos totais neste ensaio foram, respectivamente, 4,13% ± 0,06 e 11,45% ± 0,21.

O teor de lactose, proteína e sólidos totais do leite fermentado composto pelos probióticos LR e LA associados apresentou ligeira variação, sendo, respectivamente, 3,88%, 4,16% e 11,92%.

Tabela 16. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* durante o armazenamento.

Dias	Lactose (%)	Proteína (%)	Sólidos Totais (%)
0	4,10 ± 0,07	3,15 ± 0,06	11,45 ± 0,21
1	3,77 ± 0,01	3,99 ± 0,21	11,45 ± 0,58
7	3,78 ± 0,01	4,14 ± 0,25	11,86 ± 0,68
14	3,92 ± 0,10	4,35 ± 0,07	12,43 ± 0,21
21	4,06 ± 0,04	4,17 ± 0,27	11,93 ± 0,75

(N=2)

5.1.4. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o armazenamento – CC4.3

Cinética de acidificação

A Tabela 17 apresenta os dados cinéticos monitorados no sistema CINAC durante a fermentação do ensaio CC4.3.

A análise dos dados cinéticos no ensaio CC4.3, composto pelas culturas probióticas LR e BL associadas, forneceu como principal resultado o tempo médio total de fermentação de 275 min (4,59h), com redução de 46,5 min no tempo de fermentação em relação ao controle. A redução do tempo de fermentação foi efetuada devido à adição dos probióticos LR e BL, que contribuíram para a aceleração da acidificação do leite através da hidrólise da lactose em metabólitos secundários.

A velocidade máxima média de acidificação da cultura mista neste ensaio foi de $17,68 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹, atingida em pH 5,48 após 184 min de fermentação. A partir desse resultado foi possível notar diminuição de 41 min em relação ao tempo necessário para o controle atingir a velocidade máxima de acidificação (Tabela 17).

Tabela 17. Descritores cinéticos de acidificação do leite a 42°C até pH 4,5 composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*.

Co-cultura	Amostras	t _{máx} (min)	V _{máx} (.10 ⁻³ upH.min ⁻¹)	pH _{v_{máx}}	t _{pH5,0} (min)	t _{pH4,5} (min)	pH final
STLBLRBL	LR 1	186,00	17,10	6,05	202,00	272,00	4,51
STLBLRBL	LR 2	184,20	17,29	5,25	200,00	272,00	4,51
STLBLRBL	LR 3	181,80	18,07	5,33	204,00	278,00	4,50
STLBLRBL	LR 4	184,20	18,26	5,27	204,00	278,00	4,50
	Média	184,05	17,68	5,48	202,50	275,00	4,50
	d.p	2,11	0,51	0,44	2,00	0,06	0,01
	C.V(%)	1,14	2,81	8,36	0,98	1,25	0,12

t_{máx}: tempo registrado na velocidade máxima; V_{máx}: velocidade máxima de acidificação; pH_{v_{máx}}: pH registrado na velocidade máxima; t_{pH5,0}: tempo registrado no pH 5,0; t_{pH4,5}: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação.

Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado durante o armazenamento

No período de estocagem ocorreu diminuição sutil e gradual do pH, apresentando os valores 4,33 e 4,23 em D1 e D21, respectivamente .

Algumas variações na acidez do leite fermentado em cultura mista ocorreram durante o período de armazenamento refrigerado, com leve declínio de 121°D para 118°D, respectivamente, entre D1 e D7, seguido por ligeiro aumento de 119°D para 124°D, respectivamente, no 14^o e 21^o. dias de análise.

A avaliação da textura do leite fermentado composto pelos probióticos LR e BL associados apresentou elevação da firmeza entre o 1^o e o 14^o dias de análise, segundo os valores 0,99 N e 1,37 N, respectivamente. No D21, a firmeza do leite fermentado permaneceu no valor de 1,37 N. Gradual elevação da consistência foi

observada nesta composição, cujos valores correspondentes ao D1 e D21 foram de 11,33Ns e 15,49Ns, respectivamente.

A coesividade do leite fermentado em cultura mista diminuiu gradativamente no decorrer da estocagem, de acordo com os seguintes valores: -1,28N, -1,44 N, -1,67 N e -1,75 N, relacionados, respectivamente, a D1, D7, D14 e D21. A análise do *Breaking Point* indicou algumas variações nos dados durante a estocagem. Entre D0 e D7 foi registrada uma sutil elevação deste atributo de 0,80N para 1,10N, seguida por posterior diminuição para 0,92 N no 21^o. dia de análise.

A Tabela 18 fornece os valores da pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado no ensaio CC4.1 durante o armazenamento refrigerado.

Tabela 18. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o período de estocagem.

Dias	pH	Acidez (°D)	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	Coesividade (N)	B.P.(N)
1	4,33 ± 0,03	121,59 ± 5,57	0,99 ± 0,08	11,33 ± 0,57	-1,28 ± 0,14	0,80 ± 0,27
7	4,28 ± 0,01	118,55 ± 1,70	1,13 ± 0,16	12,37 ± 1,85	-1,44 ± 0,21	0,93 ± 0,08
14	4,25 ± 0,00	119,26 ± 2,75	1,37 ± 0,15	14,44 ± 1,02	-1,67 ± 0,19	1,10 ± 0,20
21	4,23 ± 0,02	124,51 ± 4,20	1,37 ± 0,20	15,49 ± 2,45	-1,75 ± 0,26	0,92 ± 0,46

(N=4); B.P.: *Breaking Point*

Contagem de bactérias iniciadoras e probióticas

Os resultados da análise microbiológica do leite fermentado composto pela associação dos probióticos LR e BL e bactérias iniciadoras ST e LB podem ser observados na Figura 5.

O ST foi considerada a stirpe de maior viabilidade do ensaio CC4.3, pois apresentou as contagens mais elevadas (10^9 log UFC/mL) durante todo o período de estocagem. Já a BL não forneceu contagens tão elevadas como o ST, mas apresentou crescimento satisfatório, mantendo-se em torno de 10^6 log UFC/mL durante todo o período de análise.

Neste ensaio o crescimento do LR não apresentou variações significativas durante a estocagem, permanecendo com valores em torno de 10^6 log UFC/mL.

A análise microbiológica do LB indicou algumas variações: contagens acima de 10^7 log UFC/mL foram obtidas no 1º. dia de análise, mas posterior diminuição de um ciclo logarítmico ocorreu entre D1 e D7. Essa inibição foi superada no período final de armazenamento, com contagens acima de 10^6 log UFC/mL.

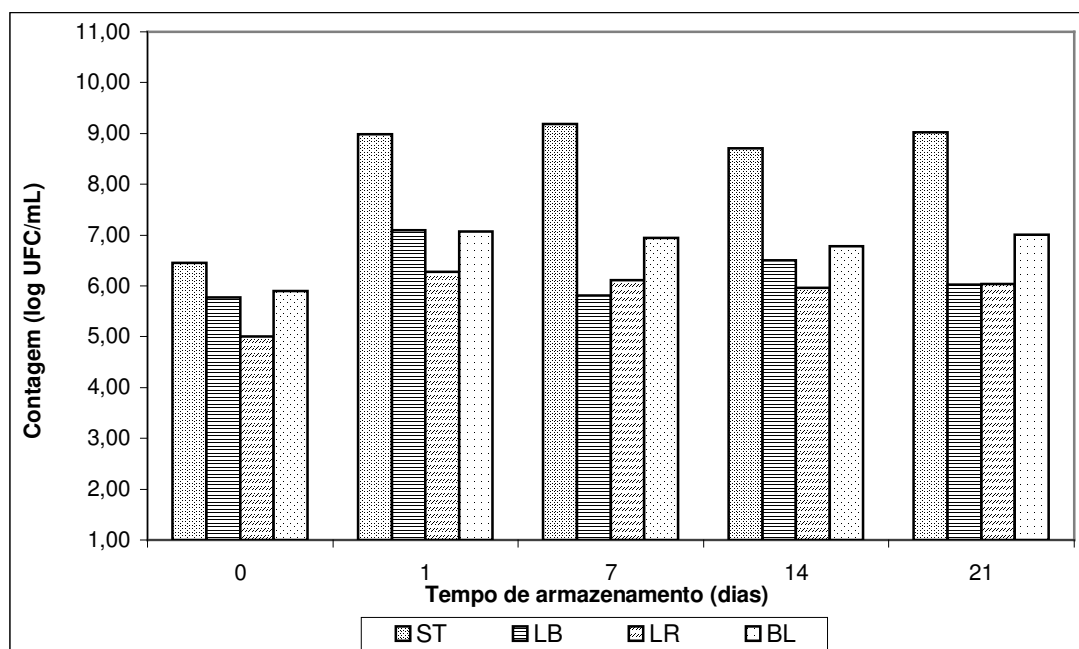


Figura 5. Viabilidade de *S. thermophilus* (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. rhamnosus* (LR) e *B. lactis* (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4°C.

Composição química do leite e do leite fermentado

A Tabela 19 fornece os valores de proteínas, sólidos totais e lactose do leite fermentado durante o armazenamento refrigerado e a Tabela XII, no anexo, apresenta os valores médios desta análise durante o período de estocagem.

O teor de lactose do leite no ensaio controle foi de $4,10\% \pm 0,07$. A porcentagem de proteínas e de sólidos totais neste ensaio foi, respectivamente, $4,13\% \pm 0,06$ e $11,45\% \pm 0,21$.

O teor de lactose, proteína e sólidos totais do leite fermentado no ensaio CC4.3 foi de 3,78%, 3,95% e 11,32%, respectivamente.

Tabela 19. Composição química do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o armazenamento.

Dias	Lactose (%)	Proteína (%)	Sólidos Totais (%)
0	$4,10 \pm 0,07$	$3,15 \pm 0,06$	$11,45 \pm 0,21$
1	$3,67 \pm 0,04$	$3,94 \pm 0,06$	$11,30 \pm 0,17$
7	$3,59 \pm 0,06$	$3,74 \pm 0,40$	$10,75 \pm 1,06$
14	$3,71 \pm 0,09$	$3,87 \pm 0,35$	$11,11 \pm 0,98$
21	$4,04 \pm 0,05$	$4,23 \pm 0,04$	$12,11 \pm 0,06$

(N=2)

5.1.5. Acidificação e características do leite fermentado composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o armazenamento – CC5

Cinética de acidificação

A fermentação realizada a partir da adição de cinco culturas ácido-láticas (ST, LB, LA, LR e BL) atingiu o pH de parada 4,5 em menor tempo do que o controle, pois necessitou de aproximadamente 60 min a menos (Tabela 8) para realizar o processo.

O tempo médio utilizado no ensaio em cultura mista para atingir o pH de parada foi de 266 min (4,43h). A velocidade máxima média de acidificação no ensaio CC5 foi de $17,19 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹, atingida em pH 5,25, após 168,30 min do início da fermentação.

Os dados cinéticos do ensaio CC5 estão expostos na Tabela 20.

A fermentação no ensaio CC5 foi mais rápida do que o controle, provavelmente devido à potencialização da hidrólise da lactose realizada através da produção de elevada quantidade de enzimas hidrolíticas pelos três probióticos presentes. As culturas LA, LR e BL, quando associadas ao efeito metabólico de ST e LB, provocam maior acidificação do leite fermentado, acelerando o processo fermentativo.

Tabela 20. Descritores cinéticos de acidificação do leite a 42°C até pH 4,5 composto pela associação das culturas *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*.

Co-cultura	Amostras	$t_{m\acute{a}x}$ (min)	$V_{m\acute{a}x}$ (10^{-3} upH.min $^{-1}$)	$pH_{V_{m\acute{a}x}}$	$t_{pH5,0}$ (min)	$t_{pH4,5}$ (min)	pH final
STLBLALRBL	Mix 1	151,50	16,88	5,21	201,30	261,30	4,48
STLBLALRBL	Mix 2	153,30	16,35	5,23	203,10	267,30	4,49
STLBLALRBL	Mix 3	189,30	16,54	5,25	205,50	269,10	4,51
STLBLALRBL	Mix 4	185,10	18,40	5,29	205,50	273,30	4,49
STLBLALRBL	Mix 5	149,10	17,09	5,29	205,50	269,10	4,48
STLBLALRBL	Mix 6	181,50	17,88	5,24	205,50	259,50	4,50
	Média	168,30	17,19	5,25	204,40	266,60	4,49
	d.p	18,83	0,80	0,03	1,80	5,22	0,01
	C.V.(%)	11,19	4,64	0,62	0,88	1,96	0,27

$t_{m\acute{a}x}$: tempo registrado na velocidade máxima; $V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima de acidificação; $pH_{V_{m\acute{a}x}}$: pH registrado na velocidade máxima; $t_{pH5,0}$: tempo registrado no pH 5,0; $t_{pH4,5}$: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação.

Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado durante o armazenamento

O pH apresentou uma queda entre D1 e D7, com o valor de 4,33 e 4,27, fornecendo este mesmo valor no último dia de armazenamento refrigerado.

Os valores da acidez do leite fermentado composto pela associação dos probióticos BL, LA e LR apresentaram algumas variações; como a elevação dos dados D1 e D7, segundo os valores 115,30°D e 120,50°D, respectivamente, a redução para 116,47°D no D14 e a posterior elevação deste atributo no último dia de análise com o valor de 129,21°D.

Em relação à textura, no 1º e 7º dias de análise foi registrada elevação da firmeza de 0,86 N para 1,11 N e ligeiro declínio, para 1,08N, no D14. A seguir,

observou-se uma elevação da acidez para 1,18 N no D21. Apesar de algumas variações no decorrer da estocagem, no geral foi observado aumento de 9,80 Ns para 12 Ns, respectivamente, na consistência do leite fermentado no ensaio CC5 em D0 e D21. A coesividade do leite fermentado no ensaio CC5 diminuiu gradualmente durante todo o período de armazenamento refrigerado, apresentando os valores -1,11 N e -1,33 N em relação aos 1^o. e 21^o. dias da estocagem.

O *Breaking Point* obtido após as análises do texturômetro evidenciou grande elevação dos valores durante toda a estocagem. O ensaio CC5 apresentou elevação contínua deste parâmetro, segundo os dados 0,62 N, 0,88 N e 0,92 N, respectivamente, em D1, D7 e D14, mas finalizou a análise com declínio, de acordo com o valor de 0,89 N obtido em D21.

A Tabela 21 apresenta os dados das análises físico-químicas do ensaio CC5.

Tabela 21. Pós-acidificação, acidez e textura do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o período de estocagem.

Dias	pH	Acidez (°D)	Firmeza (N)	Consistência (N.s)	Coesividade (N)	B.P.(N)
1	4,33 ± 0,01	115,30 ± 2,69	0,86 ± 0,05	9,80 ± 0,58	-1,11 ± 0,08	0,62 ± 0,23
7	4,27 ± 0,04	120,50 ± 1,52	1,11 ± 0,24	11,55 ± 1,33	-1,29 ± 0,23	0,88 ± 0,13
14	4,28 ± 0,03	116,47 ± 3,29	1,08 ± 0,13	11,41 ± 0,65	-1,34 ± 0,11	0,92 ± 0,19
21	4,27 ± 0,01	129,21 ± 3,93	1,18 ± 0,21	12,00 ± 1,07	-1,33 ± 0,21	0,89 ± 0,09

(N=4); B.P: *Breaking Point*

Contagem de bactérias iniciadoras e probióticas

A contagem das espécies bacterianas (ST, LB, LA, LR e BL) avaliadas durante a estocagem do ensaio CC5 forneceu como resultados mais relevantes a elevada quantificação de todas as culturas no 1º. dia de análise e, também, o posterior declínio no período seguinte, prosseguindo com esse comportamento até o período final de armazenamento.

As bactérias que apresentaram maior contagem microbiológica foram ST e BL e as espécies que apresentaram o melhor desempenho nesta mistura foram ST, LR e BL. Esses resultados foram avaliados com base na manutenção de uma contagem satisfatória, ou seja, acima de 10^6 log UFC/mL até o final da estocagem.

A Figura 6 fornece os resultados da análise microbiológica do leite fermentado no ensaio CC5.

Apesar da contagem elevada do ST em D1 ($>10^9$ log UFC/mL), a diminuição de dois ciclos logarítmicos ocorreu em D7, prosseguindo em D14, com os valores acima de 10^8 log UFC/mL e 10^6 log UFC/mL, respectivamente. A contagem de ST manteve-se acima de 10^6 log UFC/mL no D21.

A análise microbiológica de LA iniciou com valores em torno de 10^7 log UFC/mL em D1. Queda de um ciclo logarítmico na contagem desta estirpe foi registrada entre o 1º. e o 7º. dias de análise do leite fermentado; essa mesma redução ocorreu entre D7 e D14. A estirpe LA cresceu apenas até o D14, apresentando, ao final da análise microbiológica, a contagem acima de 10^5 log UFC/mL

O desenvolvimento de LB foi semelhante ao de LA, já que esta cultura não cresceu até o 21º. dia de análise, apresentando a contagem acima de 10^5 log UFC/mL no D14.

O probiótico LR foi considerado mais viável do que LA e LB neste ensaio, porque forneceu contagens mais elevadas e sobreviveu até o final da estocagem. A contagem de LR no 1º. dia de análise encontrava-se acima de 10^7 log UFC/mL, mas a diminuição de um ciclo logarítmico ocorreu entre o 1º. e 7º. dias de

armazenamento, apesar dessa inibição o número de células viáveis de LR manteve-se em torno de 10^6 log UFC/mL entre D7 e D21.

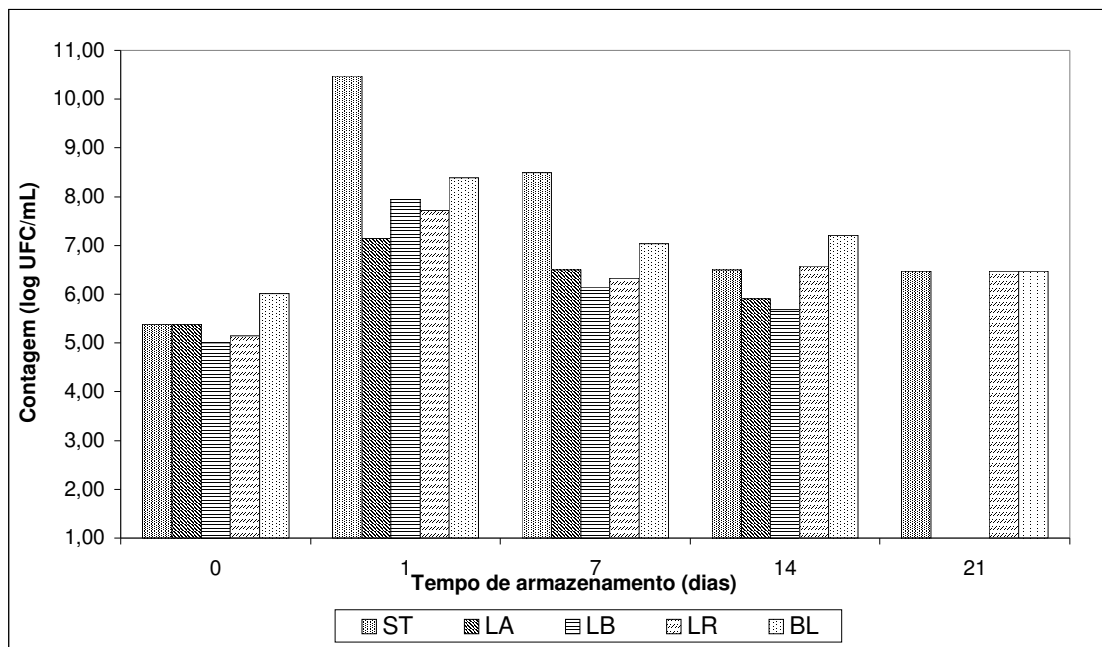


Figura 6. Viabilidade de *S. thermophilus* (ST), *L. bulgaricus* (LB), *L. acidophilus* (LA), *L. rhamnosus* (LR) e *B. lactis* (BL) no leite após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento a 4 °C.

Composição química do leite e do leite fermentado

A Tabela 22 fornece os dados obtidos a partir das análises físico-químicas de lactose, proteínas e sólidos totais do leite fermentado do ensaio CC5 e a Tabela XII, no anexo, apresenta os valores médios desta análise durante a estocagem.

O teor de lactose do leite no ensaio controle foi de $4,10\% \pm 0,07$. A porcentagem de proteínas e de sólidos totais neste ensaio foi, respectivamente, $4,13\% \pm 0,06$ e $11,45\% \pm 0,21$.

O teor de lactose, proteína e sólidos totais do leite fermentado obtido no ensaio CC5 foi de $3,83\%$, $4,28\%$ e $12,25\%$, respectivamente.

Tabela 22. Composição química do leite antes da fermentação (D0) e do leite fermentado preparado com culturas associadas de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* durante o armazenamento.

Dias	Lactose (%)	Proteína (%)	Sólidos Totais (%)
0	4,10 ± 0,07	3,15 ± 0,06	11,45 ± 0,21
1	3,90 ± 0,08	4,11 ± 0,13	11,79 ± 0,35
7	3,88 ± 0,02	4,20 ± 0,17	12,02 ± 0,48
14	3,66 ± 0,08	4,42 ± 0,06	12,61 ± 0,16
21	3,97 ± 0,07	4,40 ± 0,06	12,58 ± 0,14

(N=2)

6. DISCUSSÃO

Cinética de acidificação

O ensaio CC5, composto pela associação dos probióticos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*, foi considerado o estudo que possibilitou a maior otimização do tempo de fermentação do leite em cultura mista, apresentando valores significativos estatisticamente. Este necessitou de apenas 266 min (4,43h) para atingir o pH desejado, tempo médio muito inferior, se comparado aos 321,50 min utilizados pelo controle (Figura 7).

A associação de cinco culturas no ensaio CC5 possivelmente intensificou a hidrólise da lactose, devido à produção de grande quantidade de enzimas hidrolíticas; como resultado foi constatada acelerada queda do pH durante a fermentação do leite nesta composição.

Em comparação ao controle, os ensaios CC4.1, CC4.2 e CC4.3 apresentaram menor tempo médio de fermentação, 285, 271 e 275 min, respectivamente. Sendo que, os ensaios CC4.2 e CC4.3 não forneceram valores significativamente diferentes. Esse resultado permite constatar que as culturas probióticas possuem grande participação na acidificação do leite fermentado em cultura mista.

Segundo Heller (2001), o tempo de fermentação do leite composto pelas bactérias iniciadoras pode ser menor do que 2,5 horas, devido à relação de simbiose entre as estirpes. Já a fermentação realizada a partir de culturas probióticas utilizando o *L. acidophilus* como substituto do *L. bulgaricus* pode durar de 6 a 8 horas. Relativo a este estudo é possível ressaltar que a utilização do número maior de culturas, como a combinação das culturas iniciadoras com dois ou três probióticos, possibilitou a redução do tempo de fermentação do leite.

Não foram observadas diferenças significativas relacionadas aos parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$, $pH_{m\acute{a}x}$ e pH final ($P \leq 0,05$) neste estudo.

De acordo com a Tabela 23 a velocidade máxima média de acidificação mais elevada foi obtida a partir da associação dos probióticos *B. lactis* e *L. rhamnosus* (CC4.3) com o valor de $17,68 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹. A elevada viabilidade dos probióticos *B. lactis* e *L. rhamnosus* em cultura mista no leite fermentado possibilitou esse resultado.

O ensaio CC4.2, composto pelos probióticos *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*, apresentou a menor velocidade máxima média de acidificação com o valor de $15,59 \cdot 10^{-3}$ upH.min⁻¹ (Tabela 23). A ausência da *B. lactis* nesta composição e a baixa viabilidade do *L. acidophilus* em cultura mista deve ter influenciado esse resultado.

Tabela 23. Descritores cinéticos* de acidificação dos leites fermentados compostos por culturas associadas a 42°C até pH 4,5.

Co-culturas	t _{vmáx} (min)	V _{máx} (.10 ⁻³ upH.min ⁻¹)	pH _{vmáx}	t _{pH5,0} (min)	pH final
CC5	168,30 ±18,83 ^b	17,19 ±0,80	5,25 ±0,03	204,40 ±1,80 ^c	4,49 ±0,01
CC4.1	189,45 ±14,84 ^a	16,18 ±2,65	5,37 ±0,19	214,00 ±2,83 ^b	4,49 ±0,02
CC4.2	178,80 ±7,72 ^a	15,59 ±2,29	5,42 ±0,17	206,00 ±5,16 ^a	4,51 ±0,01
CC4.3	184,05 ±2,11 ^a	17,68 ±0,51	5,48 ±0,44	202,50 ±2,00 ^a	4,50 ±0,01
CC2	209,10 ±4,23 ^b	16,97 ±0,60	5,45 ±0,07	240,50 ±1,00 ^d	4,51 ±0,00

Média ± desvio padrão; (N=4);

*t_{vmáx}: tempo registrado na velocidade máxima; V_{máx}: velocidade máxima de acidificação; pH_{vmáx}: pH registrado na velocidade máxima; t_{pH5,0}: tempo registrado no pH 5,0; t_{pH4,5}: tempo registrado no pH 4,5; pH final: pH registrado no final da fermentação;

a, b, c, d: valores na mesma coluna com letras diferentes significativamente (P ≤ 0,05).

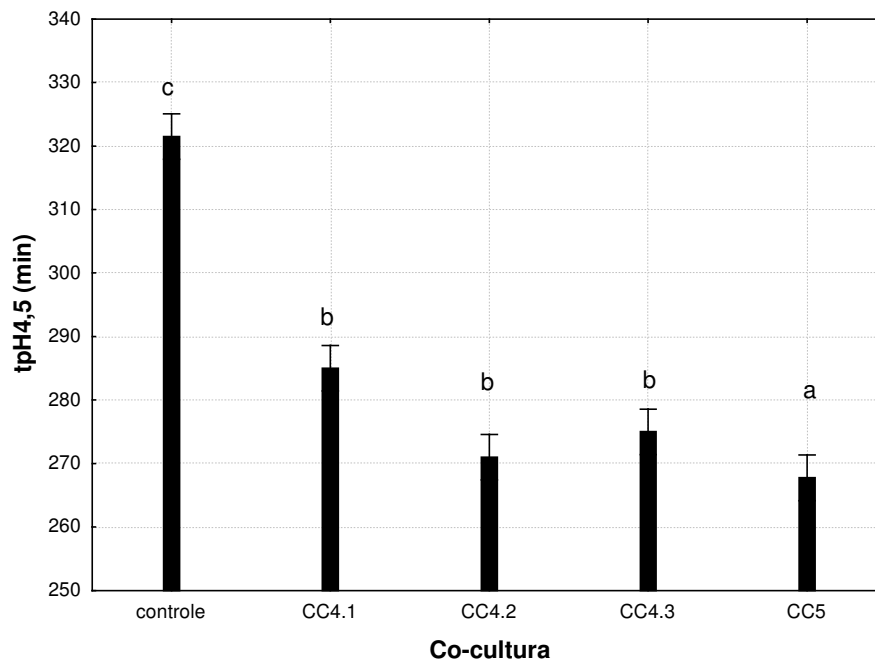


Figura 7. Tempo de fermentação dos leites compostos por culturas associadas a 42°C no pH de parada 4,5. Médias (N = 4) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Pós-acidificação, acidez e textura dos leites fermentados durante o armazenamento

A análise do pH e da acidez forneceram variações significativas durante a estocagem refrigerada dos leites fermentados. A Tabela I (no anexo) e as Figura 8 e 9, respectivamente apresentam os resultados obtidos.

O ensaio CC5 forneceu os valores de pH mais estáveis durante todo o período de estocagem refrigerada. Entretanto, o ensaio CC4.2 foi considerado um diferencial entre os demais estudos em cultura mista, já que apresentou os leites fermentados com os menores valores de pH.

A combinação dos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* (CC4.1) produziu o leite fermentado de maior acidez, com o valor máximo de 145°D no D21, dado superior ao 140,51°D do controle. Por outro lado, a associação dos probióticos

B. lactis e *L. rhamnosus* (CC4.3) foi considerada a composição de menor acidez, com o valor de 124,5°D no D21 (Figura 9 e Tabela II, no anexo).

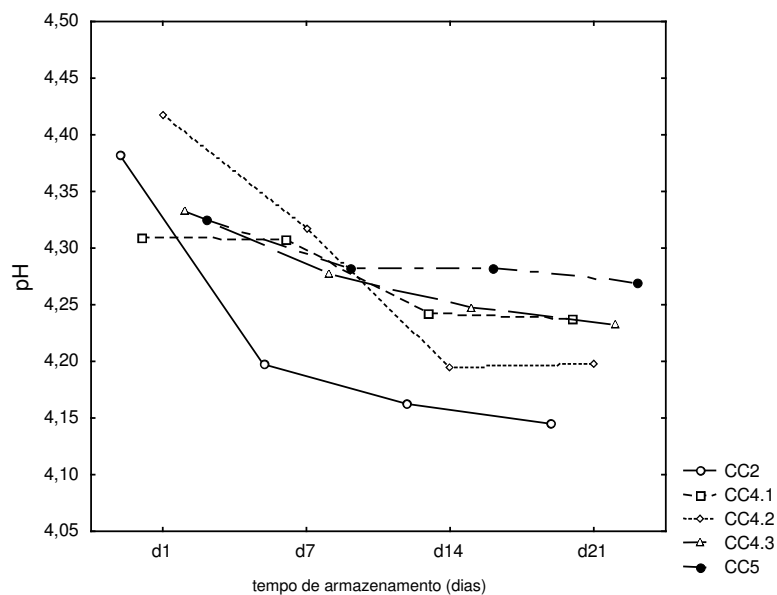


Figura 8. Variação do pH dos leites fermentados durante o período de estocagem

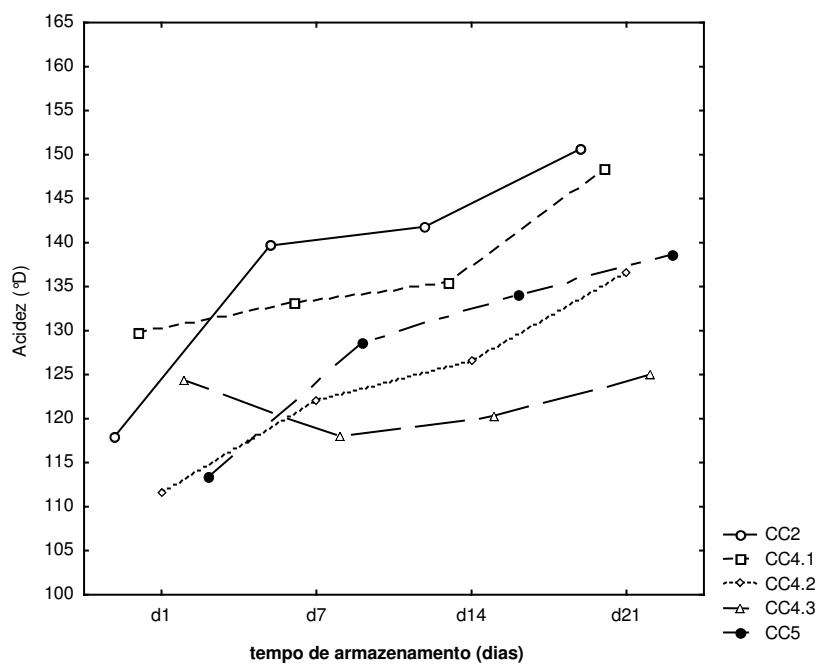


Figura 9. Variação da acidez dos leites fermentados durante o período de estocagem

A análise dos resultados da firmeza e da consistência dos leites fermentados durante os 21 dias de armazenamento está apresentada respectivamente nas Figuras 10 e 11 e nas Tabelas III e IV (no anexo). Observou-se o aumento destes atributos na primeira semana de armazenamento, sendo que, após esse período, notaram-se variações significativas segundo a associação de culturas empregada.

O leite fermentado de textura mais firme e consistente foi obtido no ensaio CC4.1, composto pelos probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis*. Já as amostras com a menor firmeza e consistência foram obtidas no ensaio CC4.2, através da associação dos probióticos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*. A ausência da *B. lactis* no ensaio CC4.2 possivelmente está associado ao baixo aprimoramento da textura das amostras.

A combinação das estirpes *L. rhamnosus* e *B. lactis* no ensaio CC4.3 também forneceu leites fermentados com firmeza e consistência satisfatórias, mas os valores não foram tão elevados como no ensaio CC4.1.

De Vuyst e Degeest (1999) consideraram que diferentes estirpes de *Lactobacillus* podem produzir diversos tipos de exopolissacarídeos (EPS). Atualmente, as culturas mais estudadas em relação à formação de EPS são *L. rhamnosus* e *S. thermophilus*, permitindo a produção de leites fermentados com textura mais aprimorada. Neste estudo, a combinação das culturas *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* produziu o leite fermentado de maior firmeza e consistência.

Os valores do *Breaking Point* dos leites fermentados foram significativamente semelhantes. Contudo, variações significativas da coesividade dos produtos foram observadas entre D7 e D21 ($P \leq 0,05$).

Os leites fermentados com maior coesividade foram obtidos nos ensaios CC5 e CC4.2. Já o leite fermentado de menor coesividade foi obtido no ensaio CC4.1 com o valor mínimo de -2,16 N no D21 (Figura 12 e Tabela V, no anexo).

Os leites fermentados com maior *Breaking Point* foram obtidos nos ensaios CC4.1 e CC4.3 (Figura 13 e Tabela VI, no anexo). Entretanto, o ensaio CC4.2

apresentou os produtos com os menores valores deste atributo durante a estocagem refrigerada.

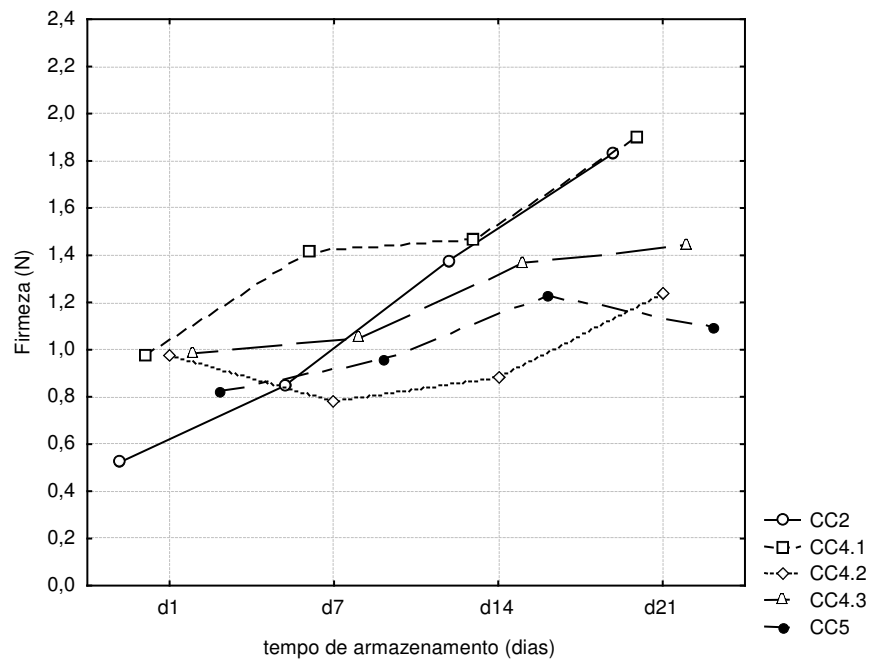


Figura 10. Variação da firmeza dos leites fermentados durante o período de estocagem

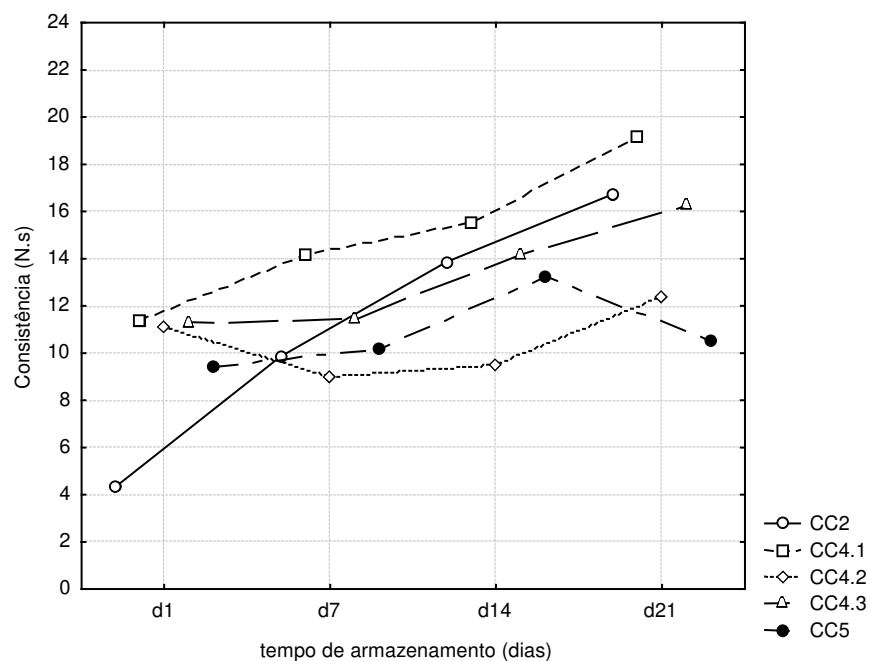


Figura 11. Variação da consistência dos leites fermentados durante o período de estocagem

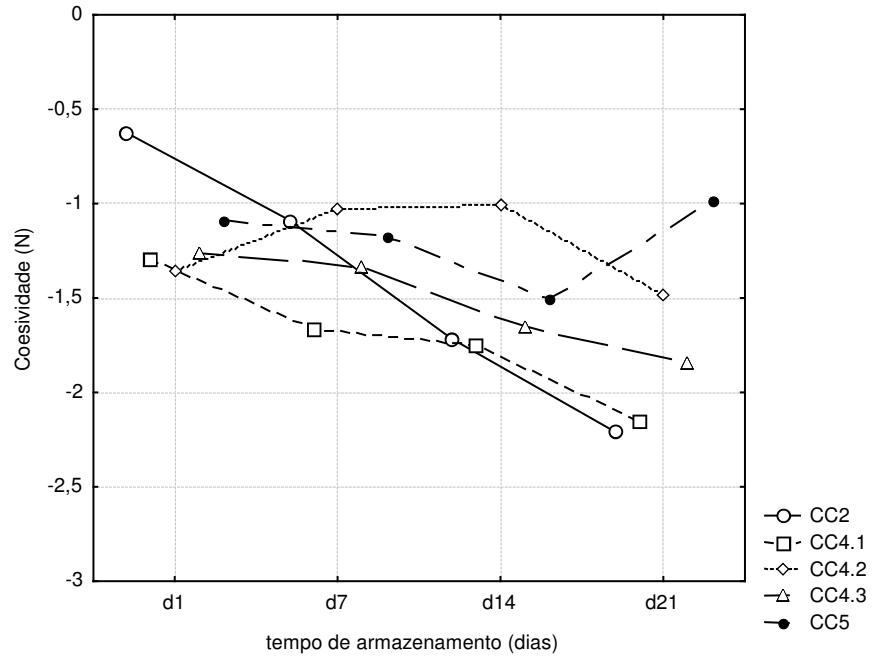


Figura 12. Variação da coesividade dos leites fermentados durante o período de estocagem

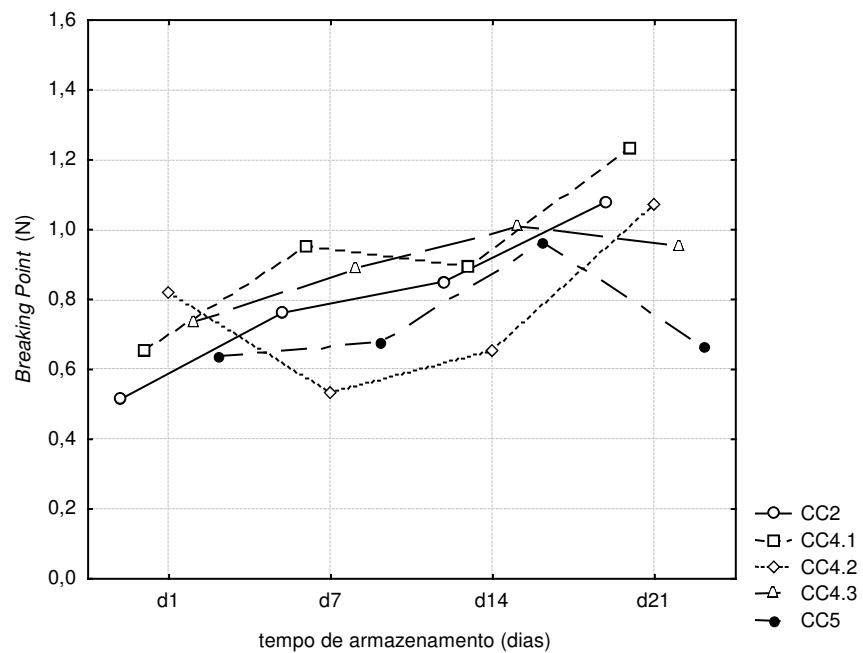


Figura 13. Variação do *Breaking Point* (B.P.) dos leites fermentados durante o período de estocagem

Contagem de bactérias lácticas

O probiótico *L. acidophilus* (LA) foi considerado a estirpe de menor viabilidade no leite fermentado em cultura mista, pois apresentou baixa contagem e não sobreviveu após o 14^o. dia de análise em nenhum dos ensaios (Figura 15 e Tabela VIII, no anexo).

O ensaio CC5, do qual o LA estava associado aos probióticos *L. rhamnosus* e *B. lactis*, foi o estudo que apresentou o maior número de células viáveis de LA.

O ensaio CC4.2, composto pela combinação dos probióticos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, foi a associação que provocou a maior inibição do desenvolvimento do LA, já que esta estirpe sobreviveu apenas até o 7^o. dia de análise, com a baixa contagem de 10⁵ log UFC/mL. A ausência da *B. lactis* nesta composição influenciou diretamente a viabilidade do LA no leite fermentado. Segundo Samona e Robinson (1994), o desenvolvimento de *L. acidophilus* é estimulado quando associado à bifidobactérias, pois estas produzem acetato, composto metabolizado pelo *L. acidophilus*.

Zacarchenco e Massaguer-Roir (2004) constataram a redução de dois ciclos logarítmicos nas contagens de *L. acidophilus*, quando associado a *S. thermophilus* e *B. longum*, ao final da estocagem do leite fermentado em cultura mista. Já Vinderola, Mocchiutti e Reinheimer (2002) consideraram o *L. acidophilus* a estirpe mais inibida no iogurte em cultura mista em relação às demais bactérias ácido-lácticas avaliadas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium* spp).

Gilliland e Speck (1977) consideram o peróxido de hidrogênio, substância resultante do metabolismo do *L. bulgaricus*, o principal agente responsável pela diminuição da viabilidade do *L. acidophilus* em cultura mista no iogurte. A partir desse resultado, esses pesquisadores concluíram que o iogurte não deve ser considerado um meio adequado para a inoculação do *L. acidophilus*, já que, devido ao longo período de estocagem, não é possível considerar que o

L. acidophilus sobreviva em contagem suficiente para beneficiar a microbiota intestinal.

Thamer e Penna (2005) consideraram que os produtos com acidez elevada, como, por exemplo, os iogurtes conduzem à maior perda de viabilidade celular das bactérias relacionadas do que os produtos com baixa acidez (por exemplo, o queijo), sendo necessário efetuar uma seleção cuidadosa das estirpes utilizadas. Ao contrário do exposto anteriormente, os probióticos *L. acidophilus* e *B. lactis* não apresentaram baixa viabilidade no ensaio CC4.1, considerado o mais ácido, já que a *B. lactis* forneceu a contagem mais elevada neste estudo e o *L. acidophilus*, apesar da elevada inibição em cultura mista, resistiu com contagem acima de 10^5 Log UFC/mL até o D14.

Na Figura 14 pode-se observar o aspecto das colônias de *L. acidophilus* (colônias escuras) no meio seletivo MRS clindamicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

O probiótico LR foi considerado mais estável do que o *L. acidophilus* no leite fermentado em cultura mista, devido à manutenção da alta viabilidade desta estirpe durante toda a estocagem (Figura 17 e Tabela IX, no anexo). Segundo Kontula (1999), o *L. rhamnosus* utiliza melhor os derivados de lactose do que o *L. acidophilus*, com aproveitamento de 97-99% e 84-96%, em comparação a utilização de glicose, respectivamente.

O desenvolvimento do probiótico *L. rhamnosus* (LR) foi mais estimulado quando associado a *B. lactis* e *L. acidophilus* (CC5), fornecendo contagem acima de 10^6 log UFC/mL durante todo o período de estocagem. Já nos ensaios CC4.2 (*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*) e CC4.3 (*L. rhamnosus* e *B. lactis*), os resultados das contagens de células viáveis de LR foram semelhantes, mas não forneceram valores tão elevados quanto aos obtidos no ensaio CC5.

Nighswonger *et al.* (1996) consideraram que a produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas produzidas por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* inibiu a estabilidade dos probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* associados no iogurte durante 28 dias de estocagem refrigerada a 5°C. Neste trabalho também é

possível notar uma ligeira inibição de LR quando associado a LA no leite fermentado, segundo a Figura 17.

Na Figura 16 pode ser observado o aspecto das colônias de *L. rhamnosus* no meio seletivo MRS vancomicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

A *B. lactis* (BL) foi considerada a estirpe probiótica de maior viabilidade para utilização em cultura mista no leite fermentado durante o período de estocagem, pois sua contagem manteve-se em torno de 10^7 log UFC/mL durante a estocagem de todos os leites fermentados analisados (Figura 19 e Tabela X, no anexo).

A BL apresentou bom desempenho quando associada aos probióticos *L. rhamnosus* no ensaio CC4.3 e *L. acidophilus* no ensaio CC4.1, mas a combinação desta cultura com o *L. acidophilus* forneceu maior estimulação para o seu desenvolvimento no leite fermentado.

Zacarchenco (2004) relatou que a *B. longum* manteve contagem constante e acima de 10^8 log UFC/mL quando associada a *S. thermophilus* e *L. acidophilus* ao longo de todo o período de estocagem refrigerada.

Damin *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do tempo de estocagem do iogurte composto por *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*, respectivamente em cocultura com *S. thermophilus*, e concluíram que o iogurte preparado com a cocultura *S. thermophilus* e *B. lactis* apresentou maior estabilidade reológica e viabilidade celular durante a estocagem refrigerada.

A associação da BL conjuntamente com o *L. rhamnosus* e *L. acidophilus* foi considerada a combinação mais prejudicial para esta cultura, especialmente devido à baixa contagem desta estirpe no final do período de estocagem.

Na Figura 18 pode ser visto o aspecto das colônias de *B. lactis* no meio seletivo RCA dicloxacilina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

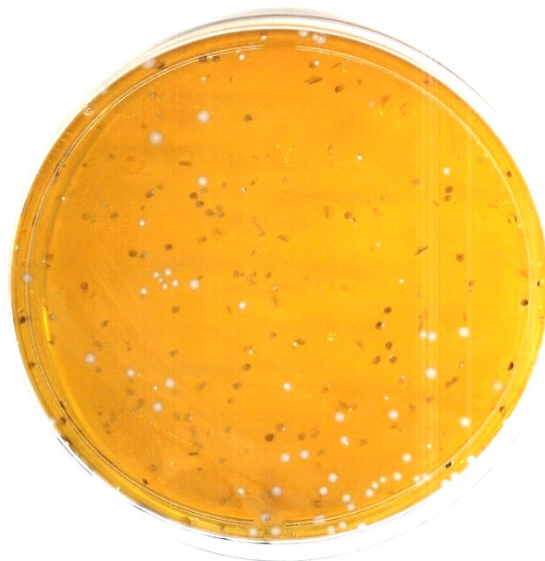


Figura 14. Unidades formadoras de colônia do *L. acidophilus* (colônias escuras) e *L. rhamnosus* (colônias claras) no meio seletivo MRS clindamicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

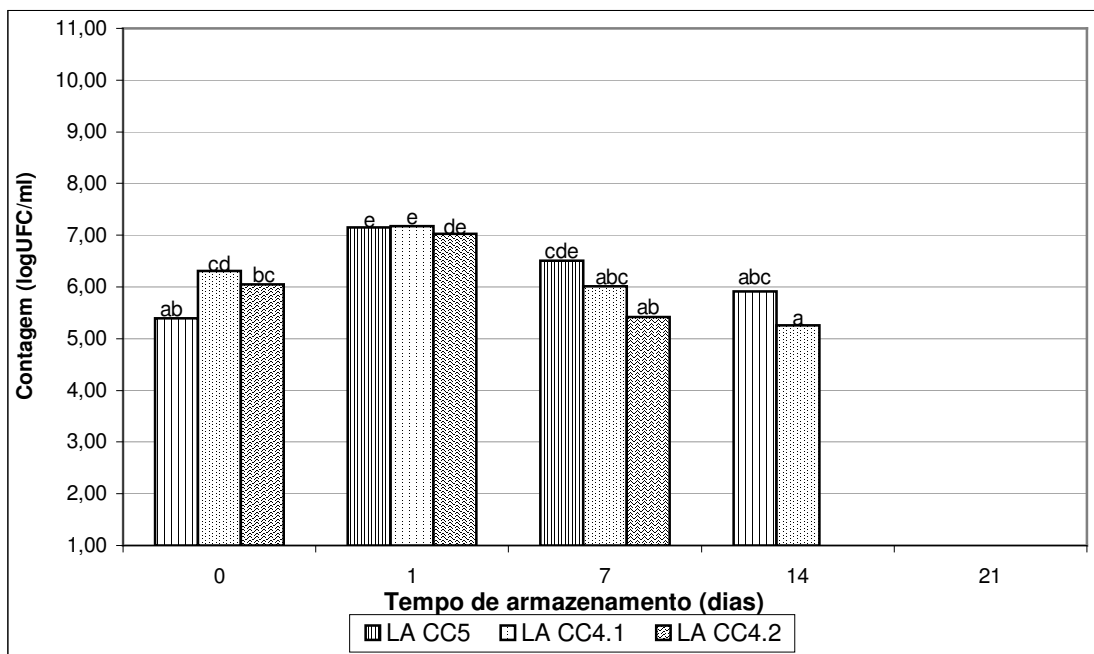


Figura 15. Viabilidade do *L. acidophilus* (LA) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C. Médias (N = 2) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

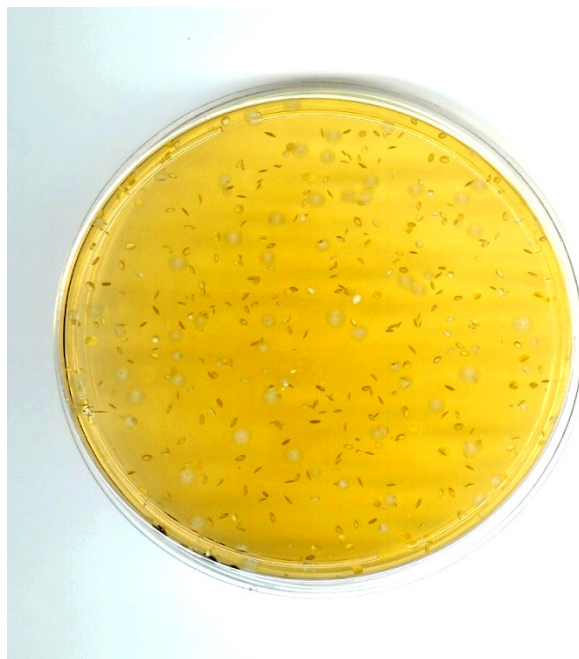


Figura 16. Unidades formadoras de colônias de *L. rhamnosus* no meio seletivo MRS vancomicina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

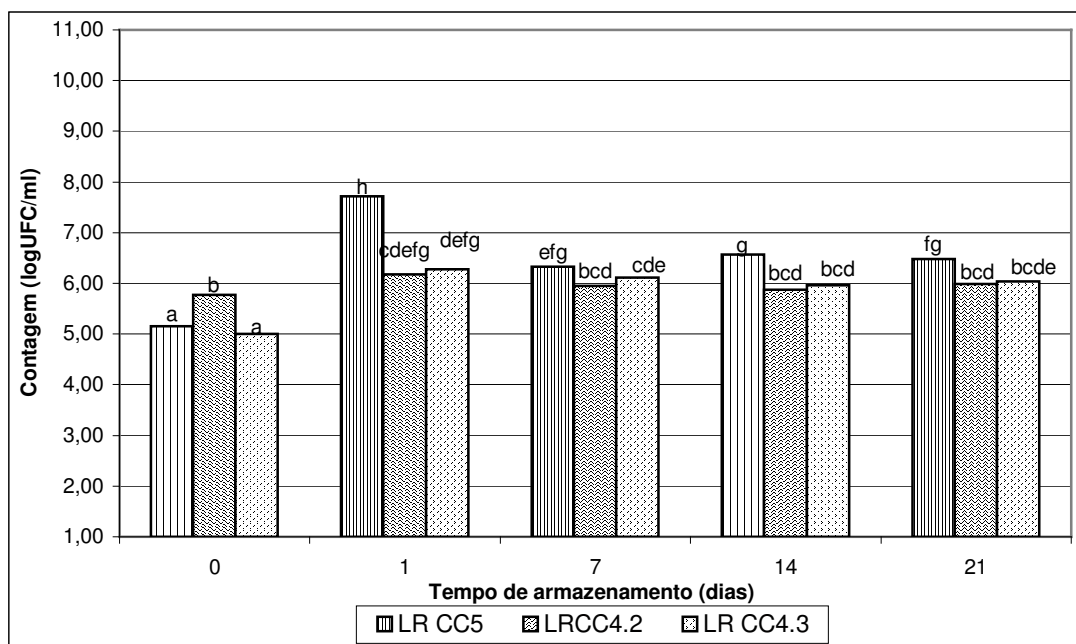


Figura 17. Viabilidade do *L. rhamnosus* (LR) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C. Médias (N = 2) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

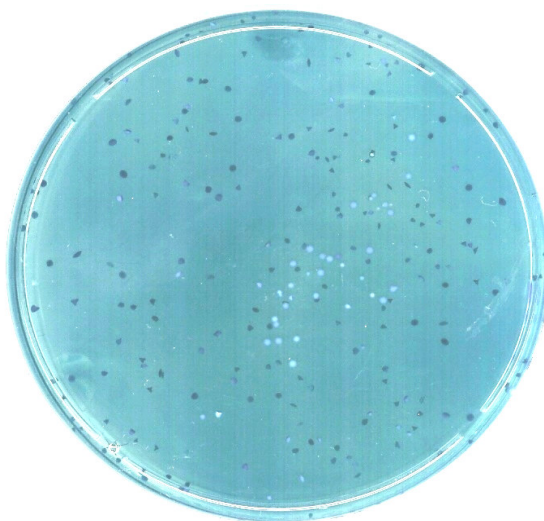


Figura 18. Unidades formadoras de colônia de *B. lactis* no meio seletivo RCA dicloxacilina após a fermentação do leite (D1) em cultura mista no ensaio CC5.

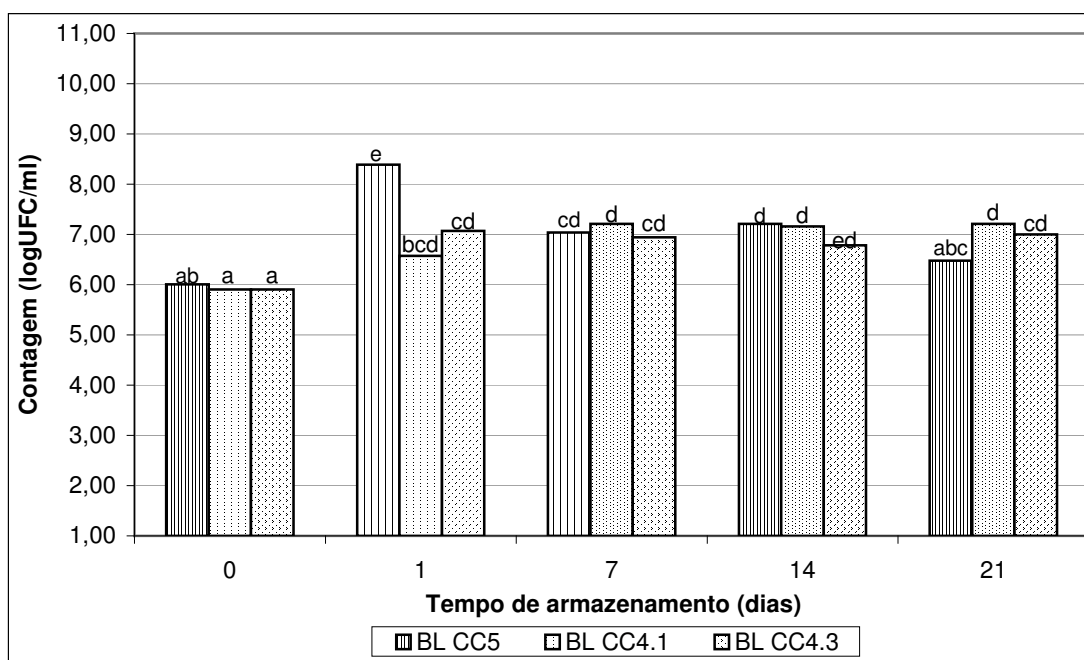


Figura 19. Viabilidade de *B. lactis* (BL) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C. Médias (N = 2) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

A cultura iniciadora *S. thermophilus* (ST) foi considerado a estirpe mais estimulada neste estudo, pois apresentou as contagens mais elevadas mesmo após os 21 dias de estocagem refrigerada (Figura 20 e Tabela XI, no anexo).

A quantificação das unidades formadoras de colônia de ST foi praticamente similar em todos os ensaios, fornecendo contagem acima de 10^8 log UFC/mL durante toda a estocagem (Figura 20). Oliveira *et al.* (2002) relataram que o *S. thermophilus* predominou em todos os produtos, apresentando contagem acima de 10^9 log UFC/mL no iogurte em cultura mista.

O ensaio CC5, composto por três probióticos (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*), apresentou a composição mais prejudicial para o desenvolvimento do ST, provocando queda de dois ciclos logarítmicos desta estirpe ao final da estocagem. Apesar dessa inibição, o ST manteve-se viável neste ensaio, pois apresentou contagem acima de 10^6 log UFC/mL ao final do período de análise.

O *L. bulgaricus* (LB) foi considerado uma cultura viável para utilização no leite fermentado quando associado às combinações probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis* (CC4.1), e *L. rhamnosus* e *B. lactis* (CC4.3), mantendo contagem acima de 10^6 log UFC/mL até o final do período de estocagem (Figura 21 e Tabela VII, no anexo).

Os ensaios CC4.2 (*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*) e CC5 (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis*) foram considerados os mais prejudiciais para o desenvolvimento do LB, fornecendo valores entre 10^4 e 10^5 log UFC/mL no ensaio CC4.2, entre D14 e D21, e não apresentando nenhum crescimento no D21 do ensaio CC5.

A ausência de *B. lactis* na composição do ensaio CC4.2 pode estar relacionada à baixa viabilidade do LB neste estudo, já que este apresentou contagens satisfatórias em todos os ensaios dos quais a *B. lactis* estava presente (Figura 21).

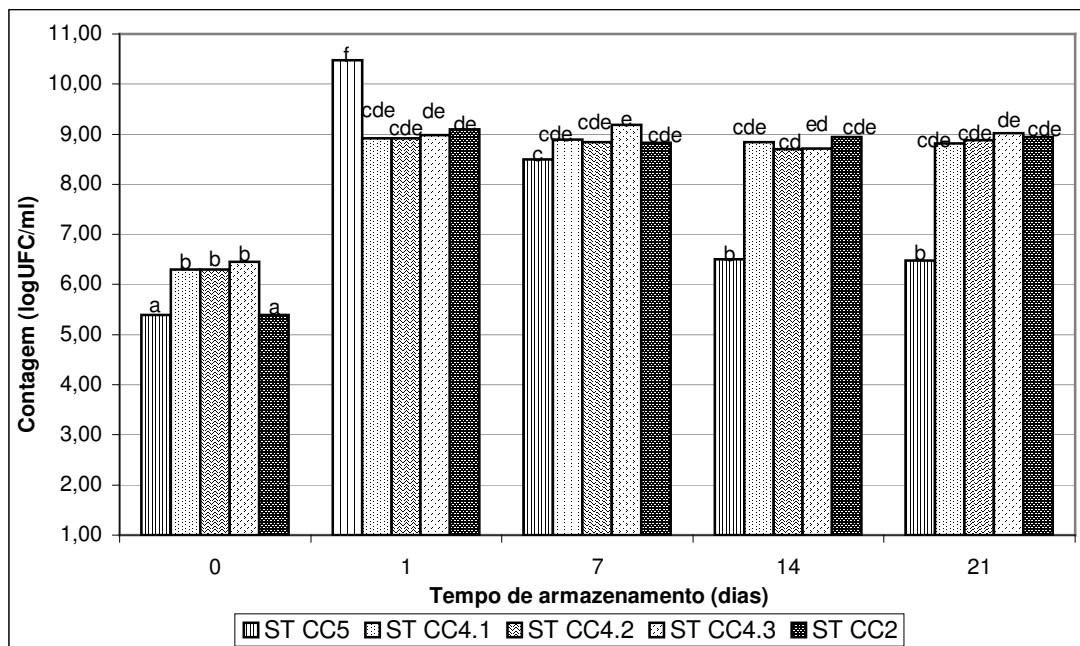


Figura 20. Viabilidade do *S. thermophilus* (ST) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C. Médias (N = 2) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

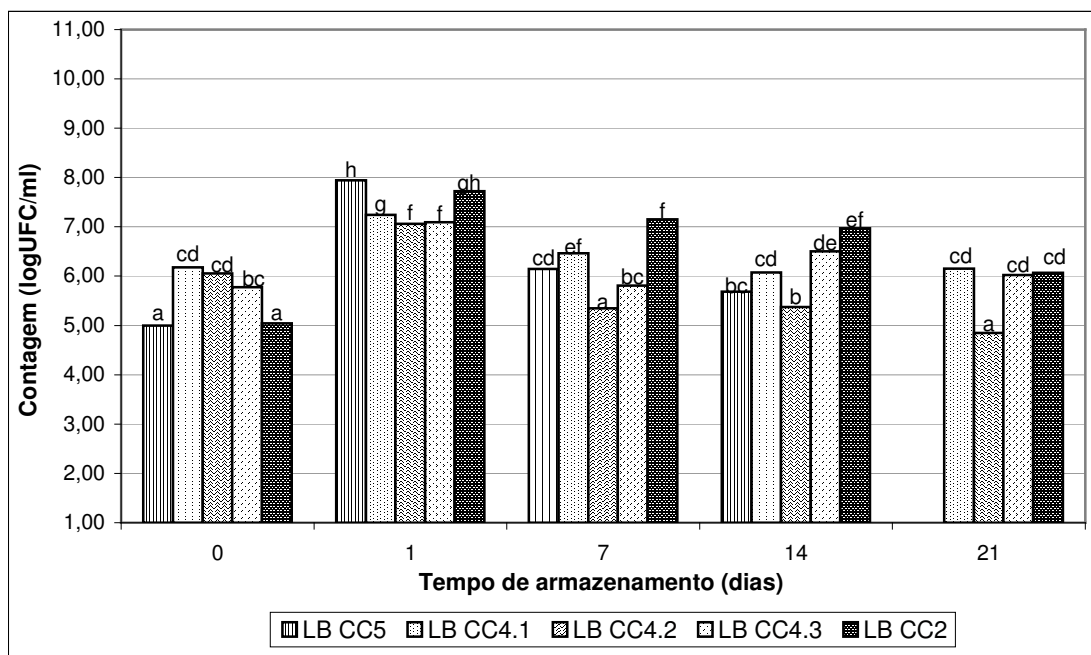


Figura 21. Viabilidade do *L. bulgaricus* (LB) nos leites após a inoculação (D0) e nos leites fermentados durante o armazenamento a 4°C. Médias (N = 2) com diferentes letras são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Composição química dos leites e leites fermentados

As médias dos teores de lactose, proteína e sólidos totais dos leites foram respectivamente, $4,10 \pm 0,05$, $3,15 \pm 0,06$ e $11,45 \pm 0,16 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ em D0, sem diferença significativa entre eles. Entretanto durante a estocagem a composição química dos leites fermentados foi significativamente distinta ($P \leq 0,05$) de acordo com a Figura 22 e a Tabela XII (no anexo).

Os teores de sólidos totais dos leites fermentados apresentaram pequena, mas significativa ($P \leq 0,05$), variação, possivelmente devido ao tratamento térmico do leite ($85 \text{ }^\circ\text{C}/15 \text{ min}$), à fermentação ($42 \text{ }^\circ\text{C}$) e ao armazenamento refrigerado.

Os valores da composição química média dos leites e dos leites fermentados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (CUNHA *et al.*, 2002; VENTUROSOSO *et al.*, 2007; FANTI *et al.*, 2008).

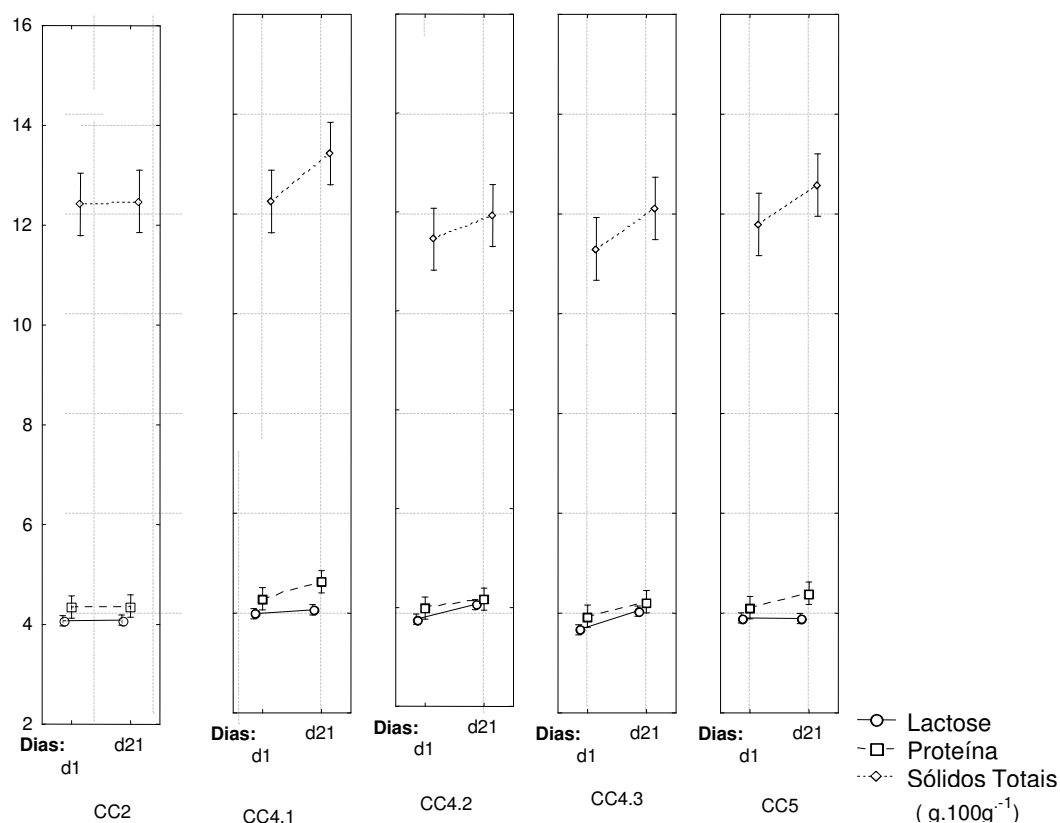


Figura 22. Composição dos leites fermentados com culturas associadas após a fermentação (D1) e no último dia de armazenamento (D21).

7. CONCLUSÕES

As associações de culturas lácticas elaboradas neste estudo afetaram a acidificação, diminuindo o tempo de fermentação dos ensaios relacionados.

A associação das culturas probióticas *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* com as iniciadoras do iogurte (CC5) apresentou maior redução do tempo de fermentação, valores de pH mais estáveis durante a estocagem e maior estimulação microbiológica dos probióticos, já que incentivou o crescimento destas estirpes no leite fermentado. Entretanto, a textura obtida com esta associação não foi tão satisfatória quando comparada à textura relativa aos leites fermentados compostos pelas associações probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis* (CC4.1) e *L. rhamnosus* e *B. lactis* (CC4.3).

De modo geral, empregando-se *L. acidophilus* e *B. lactis* (CC4.1) produziu-se o leite fermentado com os melhores atributos de textura. Este ensaio, porém, apresentou os produtos mais ácidos, superando os valores obtidos no controle.

A viabilidade de todas as estirpes estudadas foi influenciada pela associação de culturas lácticas durante a fermentação e armazenamento dos produtos. *S. thermophilus*, *B. lactis* e *L. rhamnosus* forneceram contagens efetivas para a manifestação dos efeitos probióticos, porém *L. acidophilus* e *L. bulgaricus* foram inibidos em cultura mista, demonstrando dificuldades de crescimento quando associados às demais bactérias ácido-láticas.

A utilização de quantidade maior de inóculo das culturas *L. acidophilus* e *L. bulgaricus* e/ou a adição de fatores de crescimento são medidas tecnológicas que podem contribuir para aumentar a viabilidade destas estirpes. Como conseqüência, isto pode permitir o aperfeiçoamento da inter-relação entre as culturas ST, LB, LA, LR e BL associadas no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

- ALAIS, C. Principe des techniques laitières. In: CHEFTEF, J.; CUE, J.L.; LORIENT, D., ed. **Science du lait**. Paris: Édition SEPAIC, 1984. p.247-310.
- ALM, L. The therapeutics effects of various cultures: an overview. In: ROBINSON, R.K., ed. **The therapeutical properties of fermented milks**. London, London: Elsevier Applied Science, 1991. p.45-64. (Elsevier Applied Food Science).
- ALMEIDA, K.E.; TAMIME, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.311-316, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação. VisaLegis. Glossário. Glossário de Vigilância Sanitária. **Probiótico**. Disponível em: http://e-glossario.anvisa.gov.br/glossary/public/scripts/php/page_search.php?lang=pt&letter=P. Acesso em: 25 set. 2008.
- ARROYO, L.; COTTON, L.N.; MARTIN, J.H. Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure cultures. **Cultured Dairy Products Journal of the American Cultured Dairy Products Institute**, v.29, n.2, p.20-24, 1994.
- BARRETO, G.P.M. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.119-126, 2003.
- BÉAL, C.; CORRIEU, G. Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *S. thermophilus* 404 and *L. bulgaricus* 398 at the different steps of their production. **LWT - Food Science and Technology**, v.27, p.86-92, 1994.
- BEERENS, H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium spp.* **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p.155-157, 1990.
- BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroides* strains in milk. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1520-1527, 1997.

² As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- BRIGIDI, P.; SWENNEN, E.; VITALI, B.; ROSSI, M.; MATTEUZZI, D. PCR detection of *Bifidobacterium* strains and *Streptococcus thermophilus* in faeces of human subjects after oral bacterio therapy and yoghurt consumption. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.203-209, 2003.
- CASALIS, J. Facterus technologiques influençant la consistance, la texture, l'arôme et le goût du yaourt. **Industries Alimentaires et Agricoles**, v.92, n.11, p.1253-1262, 1975.
- CHAMMAS, G.I.; SALIBA, R.; CORRIEU, G.; BEAL, C. Characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". **International Journal of Food Microbiology**, v.110, p.52-61, 2006.
- CHANDAN, C.R., ed. **Manufacturing yogurt and fermented milks**. Oxford: Blackwell Publishing, 1992. 364p.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Review article selective detection, enumeration and identification of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.1-27,1997. [Review].
- 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, E.B.; HALL, J.B. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *B.infantis* for a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.7, p.1376-1380, 1984.
- COLLINS, E.B.; ARAMAKI, K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.62, p.353, 1980.
- CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their hole protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.4, p.245-253, 2002.

- CUNHA, C.R.; SPADOTI, L.M.; ZACARCHENCO, P.B.; VIOTTO, W.H. Efeito do fator de concentração do retentado na composição e proteólise de queijo minas frescal de baixo teor de gordura fabricado por ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.1, p.82-87, 2002.
- DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v.39, p.40-55, 2008.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2804-2816, 1998.
- DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *bifidobacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.9, p.1529-1536, 1996.
- DAVIS, J.G. 'Dietary' or 'health' yogurt. **Dairy Industries**, v.35, p.827, 1970.
- DE CHAMPS, C.; MARONCLE, N.; BALESTRINO, D.; RICH, C. Persistence of colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* LCR35, after oral consumption. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1270-1273, 2003.
- DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p. 153-157, 1999.
- 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**. Loriga: 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 the International Dairy Federation**, n.277, p.4-16, 1992.

- DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIER, J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.421-429, 2001.
- 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.
- DONNET-HUGHES, A.; ROCHAT, F.; SERRANT, P.; AESCHLIRMANN, J.M.; SCHIFFRIN, J.E. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by acid lactic bacteria: effective dose. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.863-869, 1999.
- DRIESSEN, F.M.; LOONES, A. developments in the fermentation process. (liquid, stirred and set fermented milks) new technologies for fermented milks. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.277, p.28-40, 1992.
- 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, n.2, p.319-340, 1996.
- ERCOLINI, D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. **Journal of Microbiological Methods**, v.56, p.297-314, 2004.
- FANTI, M. G. N.; ALMEIDA, K. E.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, R. C.; FLORENCE, A.C. R.; GIOIELLI, L. A.; OLIVEIRA, M. N. Variação sazonal da composição físico-química, perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado em leites orgânicos comercializados em São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, 2008. (no prelo)
- FERNANDES, F.C.; SHAHANI, M.K. Effect of nutrient media and bile salts on growth and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.12, 1988.
- FOSHINO, 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.

- FUKUSHIMA, Y.; KAWATA, Y.; HARA, Y.; TEREDA, A.; MITSUOKA, T. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, p.39-44, 1998.
- FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v.32, p.439-442, 1991.
- GAVINI, F.; POURCHER, A.M.; NEUT, C.; MONGET, D.; ROMOND, C.; OGER, C.; IZARD, D. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.4, p.548-557, 1991.
- GIBSON, G.R.; WANG, X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.175-188, 1990.
- GILLILAND, S.E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.87, p.175-188, 1990.
- GILLILAND, S.E.; WALKER, D.K. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesteremic effect in humans. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.905-911, 1989.
- GILLILAND, S.E.; STALEY, E.T.; BUSH, J.L. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.3045, 1984.
- GILLILAND, S.E.; SPECK, L.M. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v.40, p.820, 1977.
- GODWARD, G.K.; SULTANA, K.; KAILASAPATHY, P.; PEIRIS, R.; ARUMUGASWAMY, N. (2000). The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. **Milchwissenschaft**, v.55, p.441-445.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant

- for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, p.139-157, 1999. [Review].
- GORBACH, L.S.; CAHNG, T.W.; GLODIN, B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. **Lancet**, v.2, p.1519, 1987.
- GUEIMONDE, M.; DELGADO, S.; MAYO, B.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A.; DE LOS REYES-GAVILA, C.G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v.37, p.839-850, 2004.
- GUEIMONDE, M.; TÖLKKO, S.; KORPIMÄKI, X.; SALMINEN, S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.7, p.4165-4169, 2004.
- HAMILTON-MILLER, J.M.T. Probiotics and prebiotics in the elderly. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, p.140-146, 1999. [Review].
- HAVENNAAR, R.; HUIS INT VELD, J.H.J. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B., ed. **The lactic acid bacteria**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1992. p.151-170. [The lactic acid bacteria in health & disease - v.1].
- HEKMAT, S.; REID, G. Survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in milk. **International Journal of Food Science & Technology**, v.42, p.615-619, 2007.
- HEKMAT, S.; MC MAHON, D.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in ice cream for use as a probiotic food. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1415–1422, 1992.
- HELFERICH, W.; WESTHOFF, D. History of yoghurt. In: HELFERICH, W.; WESTHOFF, D., ed. **All about yoghurt**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1980. p.1-10.
- HELLER, K.J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.374–379, 2001.

- HIGASHIO, K.; YOSHIOKA, Y.; KIKUCHI, T. Isolation and identification of growth factors of *S. thermophilus* produced by *L. bulgaricus*. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v.51, p.209-215, 1977.
- 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
- .HUGHES, D.B.; HOOVER, D.G. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.268-276, 1991.
- HUIS IN'T VELD, J.H.J.; HAVENAAR, R. Probiotics and animal health. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.51, n.4, p.562-567, 1991.
- HUTKINS, R.W.; NANNEN, N.L. pH homeostasis in lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2354-2365, 1993.
- IDF. 1997. Dairy Starter Cultures of Lactic Acid Bacteria (LAB) - *Standard of Identity, Standard No. 149A*, **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium.
- IDF. 1996. Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological Examination, Standard No. 122C, **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium.
- IDF. 2003. Yoghurt / Enumeration of Characteristic Microorganisms – Colony Count Technique at 37C, Standard No. 117, **International Dairy Federation**, Brussels, Belgium.
- 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.
- ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technology**, v.47, n.6, p.126-134, 1993.
- ISOLAURI, E.; JUTUNEN, M.; RAUTANEN, T.; SILLANAUKEE, P.; KOIVULA, T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, v.88, p.90-97, 1991.

- SARANUWAT, 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].
- JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, v.42, p.189-194, 2006.
- JIN, L.Z.; MARQUARDT, R.R.; BAIDOO, S.K. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88, K99 and 987 by the *Lactobacillus* isolates from porcine intestine. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.5, p.619-624, 2000.
- JORDANO, R.; SERRANO, E.C.; TORRES, M.; SALMERON, J. Comparison of three M17 media for the enumeration of *Streptococcus thermophilus* in fermented dairy products. **Journal of Food Protection**, v.55, p.999-1000, 1992.
- JUILLARD, V.; SPINLER, E.H.; DESMAUZEAUD, J.M.; BOQUIEN, Y.C. Phenomenes de cooperation et d'inhibition entre les bacteries lactiques utilices en industrie laitiere. **Lait**, v.67, p.149-172, 1987.
- KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; ARVILOMMI, H.; VESIKARI, T. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhoea. **Archives of Disease in Childhood**, v.72, p.51-53, 1995.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.– their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.52, p.28-33, 1997.
- KIM, H.S.; GILLILAND, S. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.959–966, 1983.

- KLAVER, F.A.M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v.47, p.151-164, 1998.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103-125, 1998.
- KNEIFEL, W.; JAROS, D.; ERHARD, F. Microbiota and acidification properties of yoghurt and yoghurt related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p.179-189, 1993.
- KONTULA, P.; SUIHKO, M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA SALDHOLM, T. The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.249-256, 1999.
- KOZASA, M. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promoter for animal feeding. **M.A.N. Microbiology Aliments Nutrition**, v.4, p.121-135, 1986.
- KRISTO, E.; BILIADERIS, C.G.; TZANETAKIS, N. Modeling 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.; RASIC, J.L. Technology of fermented special products. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.227, p.101-104, 1988.
- KWON, H.S.; YANG, E.H.; YEON, S.W.; KANG, B.H.; KIM, T.Y. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v.239, n.2, p.267-275, 2004.
- LAMPRECHT, E.D.; FOSTER, E.M. The survival of start of organisms in concentrated suspensions. **Journal of Applied Bacteriology**, n.26, p.359-369, 1963.
- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. A simple method for selective enumeration

of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt supplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Milchwissenschaft**, v.51, n.8, p.446-451, 1996.

LAYE, I.; KARLESKIND, D.; MORR, C.V. Chemical, microbiological and sensory properties of plain nonfat yoghurt. **Journal of Food Science**, v.58, p.991-995, 1993.

LERAYER, A.L.S.; MIGUEL, A.M.R.; GUEDES, A.L.A.; CARVALHO, A.F.; HAJDENWURCEL, J.R.; FONSECA, L.M.; MOSQUIM, M.C.A.; NUTTI, M.R.; FILHO, P.S.; BRANDÃO, S.C.C.; PORFÍRIO, T.A., eds. **Nova legislação comentada de produtos lácteos**. São Paulo: Revista Indústria de Laticínios, 2002. p.62-80.

LIM, K.S.; HUB, C.S.; BACK, Y.J. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2108-2112, 1995.

LIN, S.Y.; AYRES, J.W.; WINKLER, W.J.; SANDINE, W.E. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* results. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.2885-2899, 1989.

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

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

MAJAMAA, M.; ISOLAURI, E.; SAXELIN, M.; VESIKARI, T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. **Journal of Pediatrics Gastroenterology and Nutrition**, v.20, p.333-338, 1995.

MARSHALL, V.M. Gut derived-organisms for milk fermentations. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.51, p.548-553, 1991.

MATSUBARA, S. Alimentos funcionais: uma tendência que abre novas perspectivas aos laticínios. **Indústria de Laticínios**, n.34, p.10-18, 2001.

- MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R.; FUKUDA, M.; OYAIZU, H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microbiota examined with 16S rRNA-gene-target species-specific primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4506-4512, 1999.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, n.2, p.173-182, 2002.
- MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTA, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims - interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v.9, n.1, p.25-35, 1999.
- 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, p.1029-1037, 2006.
- McCARTNEY, A.L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.29-37, 2002.
- MEGHROUS, J.; EULOGE, P.; JUNELLES, A.M.; BALLONGUE, J.; PETITDEMANGE, H. Screening of *Bifidobacterium* strains for bacteriocin production. **Biotechnology Letters**, v.12, p.575-580, 1990.
- MITAL, B.K.; GARG, S.K. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews International**, v.8, n.3, p.347-389, 1992.
- MOREIRA, M.; ABRAHAM, A.; ANTONI, G. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.395-400, 2000.
- MORIYA, J.; FACHIN, L.; GÂNDARA, N.L.A.; VIOTTO, H, W. Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* in the presence of yoghurt bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.516-520, 2006.
- NAGAWA, M.; NAKABAYASHI, A.; FUJINO, S. Preparation of the bifidus powder. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.7, p.1777-1782, 1988.

- NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.39, n.1, p.13-126, 1999.
- NIELSEN, D.S.; MOLLER, P.L.; ROSENFELD, V.; PAERREGAARD, A.; MICHAELSEN, K.F.; JAKOBSEN, M. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7545-7548, 2003.
- NIGHSWONGER, B.D.; BRASHEARS, M.M.; GILLILAND, S.E. Viability of *L.acidophilus* and *L. casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.212-219, 1996.
- O`SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O`SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science and Technology**, v.3, p.309-314, 1992. [Review].
- OBERMAN, H. Fermented milks. In: WOOD, B.J.B., ed. **Microbiology of fermented foods**. London, New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1985. v.1, p.167-186.
- OLIVEIRA, M.N. Probióticos: seus benefícios para a saúde. **Nutrição em Pauta**, v.87, p.18-22, 2007.
- OLIVEIRA, M. N., SODINI, I., REMEUF, F., TISSIER, J. P., CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**, v.67, n.6, p.2336 - 2341, 2002.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.
- OUWEHAND, A.C.; SALVADORI, B.; FONDEN, R.; MONGENSEN, G.; SALMINEN, S.; SELLARS, R. Health effects of probiotics and culture-

- containing dairy products in humans. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.380, p.4-19, 2003.
- OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.I.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.279-289, 2002.
- OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, V.P.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v.9, p.43-52, 1999.
- PARVEZ, S.; MALIK, A.K.; KANG, S.; KIM, Y.H. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1171-1185, 2006. [Review].
- PAYNE, J.F.; MORRIS, A.E.J.; BEERS, P. Note: evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium sp* in milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.86, p.353-358, 1999.
- PERDIGON, G. (1989) Effect of LAB orally administered of yogurt on the immune system. **LAB Ferments** 57:p.77-84. In: ZHAO, R.; SUN, J.; MO, H.; ZHU, Y., eds. Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.23, p.195-200, 2007.
- PIARD, C.; HAUTEFORD, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, D.S.; FONS, M.; GRUSS, A. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.3068-3072, 1997.
- 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.
- PINTADO, J.; GUYOT, J.P.; AMPE, F. Multiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.921-933, 2003.

- RAJAGOPAL, S.N.; SANDINE, E.W. Associative growth and proteolysis of *S.thermophilus* and *L.bulgaricus* in skim milk. **Journal of Dairy Science**. v.73, p.894-899, 1990.
- RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. **Bifidobacteria and their role**: microbiological, nutritional-physiological, medical and technological aspects and bibliography. Basel: Birkhauser Verlag, 1983. 295p. (experimental Supplementum, v.39; Fermented Fresh Milk Products and their Cultures, v.2)
- REID, G.; BRUCE, A.W. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.77-80, 2001.
- REID, G. *In vitro* testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. **International Dairy Journal**, v.10, p.415-419, 2000.
- REID, G.; COOK, R.L.; BRUCE, A.W. Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract. **Journal of Urology**, v.138, p.330-335, 1987.
- RENZ, U.; PUHAN, Z. Factors promoting bitterness in yoghurt. **Milchwissenschaft**, v.30, p.265, 1975.
- ROBINSON, R.K.; TAMINE, A.W. Yoghurt: a review of the product and its manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.28, n.3, p.149–163, 1975. [Review].
- RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze - dried AB yoghurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, p.51-57, 1995.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, n.3, p.197-215, 2000.
- SAAVENDRA, J.M.; ABBI-HANNA, A.; MOORE, N.;YOLKEN, R.H. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.261-267, 2004.

- 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. [Review].
- SAXELIN, M.B.; GRENOV, U.; SVENSSON, R.; FONDEN, R.; RENIERO, R.; MATTILASANDHOL, T. The technology of probiotics. **Trends Food Science Technology**, v.10, p.387-392, 1999.
- SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends Food Science Technology**, v.10, p.107-110, 1999.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.563-572, 1998.
- SAMONA, A.; ROBINSON, R.K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **International Journal of Dairy Technology**, v.47, n.2, p.58-60, 1994.
- SANDERS, E.M.; HUIS IN'T VELD, J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory, and labelling issues. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.76, p.293-315, 1999.
- SANDINE, W.E. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. **Journal of Food Protection**, v.42, p.259, 1979.
- SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved strains. **International Dairy Journal**, v.17, n.11, p.1284-1289, 2007.
- SATOKARI, M.R.; VAUGHAN, E.E.; AKKERMANS, A.D.L.; SAARELA, M.; DEVOS, W.M. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.504-513, 2001.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics - approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.361S-364S, 2001.

- SHAH, N. P. Some beneficial effects of probiotic bacteria. **Bioscience Microbiota**, v.19, p.99–106, 2000.
- SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 127-131, 2000.
- 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.
- SHAHANI, K.M.; AYEBO, D.A. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.33, p.2448, 1980.
- SIENKIEWICZ, T.; RIEDEL, C.L. **Whey, and whey utilization**: possibilities for utilization in agriculture and foodstuffs production. 2. ed. Gelsenkirchen-Buer Mann, 1990. 379p.
- SILVA, M.; JACOBUS, N.V.; DENEKE, C.; GORBACH, S.L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, n.8, p.1231-1233, 1987.
- SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M.N.; REMEUF, F.T.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture, and probiotic cell counts in fermented milk processing. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2479-2488, 2002.
- SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAF SMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *L.casei* strain Shirota on the intestinal microbiota and immune parameters in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.52, n.12, p.899-907, 1998.
- SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R. The effects of ingestion of *Lactobacillus casei* Shirota strain fermented milk on the intestinal microbiota, its microbial metabolism and the immune system of human volunteers. TNO Report V92 148. Zeist, The Netherlands: TNO Nutrition and Food Research; 1993. *apud* REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.3763-3766, 1999.

- 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).
- SUI, J.; LEIGHTO, F.; BRADY, L. 16S ribosomal DNA analysis of the fecal lactobacilli composition of human subjects consuming a probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p.907-912, 2002.
- 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.; SONDERGARD, A.K.; MISTRY, V.V.; SHAH, N.P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In: TAMIME, A., ed. **Probiotic dairy products**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. cap.3, p.39-72.
- TAMIME, A.Y.; ROBINSON, H., eds. **Yogurt: science and technology**. Oxford: Pergamon Press, 1989. 431p.
- TANAKA, R.; OHWAKI, M. 1994. A controlled study on the ingestion of *Lactobacillus casei* fermented milk on the intestinal microbiota, its microbiology and immune system in healthy adults, p.85-104. In Proceedings of the XII Riken Symposium of Intestinal Flora. *apud* REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.9, p.3763-3766, 1999.
- TEMMERMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p.348-359, 2004.

- TEMMERMAN, R.; MASCO, L.; VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; SWINGS, J. Development and validation of a Nested-PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis method for taxonomic characterization of bifidobacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6380-6385, 2003.
- THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Effect of whey, sugar and fructooligosacharides on the probiotic lactic acid bacteria population in fermented beverages. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.41, n.3, p.393-400, 2005.
- THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Propionibacteria*. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2288-2296, 2003.
- THEUNISSEN, J.; BRITZ, T.J.; WITHUHN, R.C. Identification of probiotic microorganisms in African products using PCR-based DGGE analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, n.1, p.11-21, 2005.
- TORRIANI, S.; ZAPPAROLI, G.; DELLAGLIO, F. Use of PCR- based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4351-4356, 1999.
- TRABULSI, L.R.; SAMPAIO, M.M.S.C. Probióticos, prebióticos e simbióticos. In: TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. **Os probióticos e a saúde infantil**. São Paulo: Nestlé, 2000. 15p. (Temas de Pediatria da Nestlé, 3).
- TRAMER, J. Yoghurt cultures. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.26, p.16, 1973.
- THAMER, K.G; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de fructooligosacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, p.393-400, 2005.
- VEDAMUTHU, E.R. Cultures for buttermilk, sour cream and yogurt with special

comments on acidophilus yoghurt. **Cultured Dairy Products Journal of the American Cultured Dairy Products Institute**, v.9, p.16, 1974.

VENTURA, M.; MEYLAN, V.; ZINK, R. Identification and tracking of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.7, p.4296-4301, 2003.

VENTUROSO, R.C., ALMEIDA, K.E., RODRIGUES, A. M., DAMIN, M.R., OLIVEIRA, M.N. Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultra-som. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.34, n.4, out/dez, p. 607-613, 2007.

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology**. 2.ed. Boca Raton, CRC Press; London: Taylor & Francis, 2006. 782p. (Food Science and Technology, 146).

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G.W.; LIS, C.M.; MUNRO, K.; HAMMES, W.P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2578-2585, 2001.

WARD, P.; ROY, D. Review of molecular methods for identification, characterization and detection of bifidobacteria. **Lait**, v.85, p.23-32, 2005.

WOOD, B.J.B., ed. **The lactic acid bacteria in health and disease**. London, New York: Elsevier Applied Science, 1992. p.151-339.

YEUNG, P.S.M.; SANDERS, M.E.; KITTS, C.L.; CANO, R.; TONG, P.S. Species-specific identification of commercial probiotic strains. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1039-1051, 2002.

YOLANDA, S. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: a way of selecting improved probiotic strains. **International Dairy Journal**, v.17, p.1284–1289, 2007. [Review].

ZACARCHENCO, P.B., MASSAGUER-ROIG, S. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft**, v.59, n.5, p. 258-261, 2004.

ANEXO

Tabela I. Variação do pH do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
0	6,53 ± 0,04	6,55 ± 0,04	6,47 ± 0,01	6,56 ± 0,04	6,55 ± 0,11
1	4,38 ± 0,01	4,33 ± 0,01	4,31 ± 0,00	4,42 ± 0,01	4,33 ± 0,03
7	4,20 ± 0,01	4,27 ± 0,04	4,31 ± 0,01	4,32 ± 0,00	4,28 ± 0,01
14	4,16 ± 0,01	4,28 ± 0,03	4,24 ± 0,01	4,20 ± 0,01	4,25 ± 0,00
21	4,15 ± 0,00	4,27 ± 0,01	4,24 ± 0,02	4,20 ± 0,02	4,23 ± 0,02

(N=4)

Tabela II. Variação da acidez do leite após a inoculação (D0) e do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
0	27,30 ± 1,56	26,26 ± 1,14	26,26 ± 1,31	26,26 ± 1,31	26,26 ± 1,31
1	116,11 ± 0,96	115,30 ± 2,69	128,01 ± 4,41	112,31 ± 4,07	121,59 ± 5,57
7	128,76 ± 0,50	120,50 ± 1,52	131,03 ± 5,57	122,19 ± 0,60	118,55 ± 1,70
14	135,26 ± 2,99	116,47 ± 3,29	135,71 ± 1,34	125,01 ± 3,74	119,26 ± 2,75
21	140,51 ± 5,45	129,21 ± 3,93	145,06 ± 0,57	131,68 ± 0,58	124,512 ± 4,20

(N=4)

Tabela III. Variação da firmeza do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
1	0,80 ± 0,00	0,86 ± 0,05	0,97 ± 0,05	0,92 ± 0,11	0,99 ± 0,08
7	0,96 ± 0,09	1,11 ± 0,24	1,40 ± 0,26	0,80 ± 0,11	1,13 ± 0,16
14	1,24 ± 0,10	1,08 ± 0,13	1,41 ± 0,22	0,88 ± 0,12	1,37 ± 0,15
21	1,11 ± 0,21	1,18 ± 0,21	1,94 ± 0,57	1,24 ± 0,17	1,37 ± 0,20

(N=4)

Tabela IV. Variação da consistência do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
1	9,13 ± 1,07	9,80 ± 0,58	11,16 ± 0,52	10,33 ± 1,67	11,33 ± 0,57
7	10,21 ± 0,83	11,55 ± 1,33	14,19 ± 0,21	9,13 ± 1,07	12,37 ± 1,85
14	13,49 ± 0,91	11,41 ± 0,65	15,28 ± 1,03	9,62 ± 1,06	14,44 ± 1,02
21	10,85 ± 0,82	12,32 ± 1,07	18,69 ± 2,80	12,38 ± 1,05	15,49 ± 2,45

(N=4)

Tabela V. Variação da coesividade do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
1	-1,05 ± 0,15	-1,11 ± 0,08	-1,26 ± 0,10	-1,26 ± 0,20	-1,28 ± 0,14
7	-1,19 ± 0,15	-1,29 ± 0,23	-1,67 ± 0,15	-1,05 ± 0,08	-1,44 ± 0,21
14	-1,53 ± 0,14	-1,34 ± 0,11	-1,69 ± 0,20	-1,00 ± 0,13	-1,67 ± 0,19
21	-1,02 ± 0,15	-1,33 ± 0,21	-2,16 ± 0,46	-1,48 ± 0,15	-1,75 ± 0,26

(N=4)

Tabela VI. Variação do *Breaking Point* (B.P) do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4 e CC2

CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
0,56 ± 0,19	0,62 ± 0,23	0,66 ± 0,24	0,80 ± 0,08	0,80 ± 0,27
0,66 ± 0,06	0,88 ± 0,13	0,96 ± 0,13	0,56 ± 0,19	0,93 ± 0,08
0,98 ± 0,04	0,92 ± 0,19	0,93 ± 0,12	0,67 ± 0,06	1,10 ± 0,20
0,70 ± 0,10	0,89 ± 0,09	1,21 ± 0,25	1,07 ± 0,29	0,92 ± 0,46

(N=4)

Tabela VII. Contagem microbiológica (log UFC/mL) do *L.bulgaricus* (LB) no leite fermentado após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado nos ensaios CC5, CC4 e CC2.

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
0	5,04 ± 0,00	5,00 ± 0,00	6,18 ± 0,14	6,05 ± 0,21	5,78 ± 0,25
1	7,72 ± 0,07	7,95 ± 0,02	7,25 ± 0,01	7,06 ± 0,03	7,09 ± 0,03
7	7,15 ± 0,02	6,15 ± 0,00	6,46 ± 0,15	5,35 ± 0,49	5,81 ± 0,05
14	6,97 ± 0,05	5,68 ± 0,15	6,07 ± 0,05	5,38 ± 0,08	6,50 ± 0,14
21	6,07 ± 0,08	0,00	6,15 ± 0,01	4,85 ± 0,00	6,02 ± 0,03

(N=2)

Tabela VIII. Contagem microbiológica (log UFC/mL) do *L.acidophilus* (LA) no leite fermentado após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado nos ensaios CC5 e CC4.

Dias	CC5	CC4.1	CC4.2
0	5,39 ± 0,12	6,31 ± 0,06	6,05 ± 0,21
1	7,15 ± 0,01	7,17 ± 0,01	7,03 ± 0,03
7	6,50 ± 0,04	6,02 ± 0,09	5,42 ± 0,60
14	5,91 ± 0,01	5,26 ± 0,20	0,00
21	0,00	0,00	0,00

(N=2)

Tabela IX. Contagem microbiológica (log UFC/mL) de *L.rhamnosus* (LR) no leite fermentado após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado nos ensaios CC5 e CC4.

Dias	CC5	CC4.2	CC4.3
0	5,15 ± 0,21	5,78 ± 0,00	5,00 ± 0,00
1	7,71 ± 0,06	6,18 ± 0,14	6,27± 0,10
7	6,32 ± 0,00	5,95 ± 0,07	6,11± 0,10
14	6,57 ± 0,02	5,87 ± 0,06	5,96± 0,01
21	6,48 ± 0,00	5,98 ± 0,04	6,04± 0,05

(N=2)

Tabela X. Contagem microbiológica (logUFC/mL) da *B.lactis* (BL) no leite fermentado após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado nos ensaios CC5 e CC4.

Dias	CC5	CC4.1	CC4.3
0	6,01 ± 0,00	5,90 ± 0,00	5,90 ± 0,00
1	8,39 ± 0,01	6,57 ± 0,60	7,07± 0,10
7	7,04 ± 0,00	7,21 ± 0,02	6,95± 0,05
14	7,21 ± 0,01	7,16 ± 0,06	6,78± 0,03
21	6,48 ± 0,00	7,21 ± 0,05	7,00± 0,05

(N=2)

Tabela XI. Contagem microbiológica (log UFC/mL) de *S.thermophilus* (ST) no leite fermentado após a inoculação (D0) e no leite fermentado durante o armazenamento refrigerado nos ensaios CC5, CC4 e CC2.

Dias	CC2	CC5	CC4.1	CC4.2	CC4.3
0	5,39 ± 0,12	5,39 ± 0,12	6,30 ± 0,00	6,30 ± 0,43	6,45 ± 0,00
1	9,10 ± 0,10	10,48 ± 0,12	8,92 ± 0,06	8,91 ± 0,21	8,98 ± 0,02
7	8,83 ± 0,09	8,50 ± 0,10	8,89 ± 0,01	8,84 ± 0,01	9,18 ± 0,00
14	8,94 ± 0,03	6,50 ± 0,04	8,84 ± 0,06	8,70 ± 0,01	8,71 ± 0,02
21	8,95 ± 0,01	6,48 ± 0,00	8,82 ± 0,12	8,88 ± 0,07	9,02 ± 0,03

(N=2)

Tabela XII. Composição química do leite fermentado durante o período de estocagem nos ensaios CC5, CC4, e CC2.

Dias	Lactose	Proteína	Sólidos Totais
CC2	4,02 ± 0,07	4,39 ± 0,04	12,52 ± 0,11
CC4.1	4,04 ± 0,08	4,47 ± 0,14	12,75 ± 0,41
CC4.2	3,88 ± 0,14	4,16 ± 0,15	11,92 ± 0,40
CC4.3	3,75 ± 0,20	3,95 ± 0,21	11,32 ± 0,58
CC5	3,83 ± 0,12	4,28 ± 0,15	12,25 ± 0,41

(N=4)