

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus*
adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e
Bifidobacterium longum: Isolamento diferencial dos
microrganismos, multiplicação em diferentes
condições e efeitos nas características sensoriais dos
leites fermentados naturais ou modificados**

Patrícia Blumer Zacarchenco
Engenheira de Alimentos

Dr. Salvador Massaguer Roig
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade de Campinas para a obtenção do título de Doutora em
Tecnologia de Alimentos

CAMPINAS, 2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Zacarchenco, Patrícia Blumer

Z11L

Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*: isolamento diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados / Patrícia Blumer Zacarchenco. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Salvador Massaguer Roig
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lactobacilos. 2.Bifidobacterias. 3.Leite fermentado. 4.Estreptococo.
5.Probióticos. I.Roig, Salvador Massaguer. II.Universidade Estadual
de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

Ao Sá pelo amor e compreensão
que me trouxeram até aqui
e a minha mãe Sheila, pela vida e
exemplo de dedicação a família.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig pela paciência e tolerância com que orienta a todos;

A CAPES-CNPq, pela bolsa de estudos;

A todos do Laboratório de Microbiologia/Apoio (DTA/FEA/UNICAMP) pela cooperação e alegria, em especial, a Ana Lourdes, a Rosane, a Paty Prati, ao Luciano, ao Mark, a Aline, a Cláudia, a Marina e outros que dividiram comigo o dia-a-dia de trabalho. Em especial ao Leandro e a Danuta, pela dedicação, responsabilidade e interesse constantes;

Aos colegas do Laboratório de Laticínios (DTA/FEA/UNICAMP) pela apoio;

A Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA/UNICAMP) que tem sido meu segundo lar a 12 laboriosos e felizes anos.

A Deus, por todos eles

ÍNDICE

1. Resumo Geral	viii
2. Abstract	xiii
3. Introdução Geral	xvii
4. Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	01
1. Histórico	02
2. Leites fermentados	06
2.1. Principais microrganismos dos leites fermentados	07
2.1.1. Gênero <i>Bifidobacterium</i>	07
2.1.2. Gênero <i>Lactobacillus</i>	09
2.1.3. Gênero <i>Streptococcus</i>	10
2.1.4. Interações entre os gêneros <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus</i>	11
3. Seleção de linhagens probióticas	12
4. Benefícios a saúde humana	14
4.1. Efeitos nos distúrbios intestinais e infecções intestinais	17
4.2. Potencial de atividade anti-tumor	17
4.3. Potencial ação hipocolesterolêmica	18
5. A problemática de quantificação seletiva de probióticos em microbiotas mistas com bactérias láticas	20
6. Aspectos tecnológicos	23
7. Demais ingredientes de leites fermentados: fibras	26
7.1. Oligossacarídeos	28
7.2. Iogurtes adicionados de fibras	29
7.3. Soja e iogurtes	30
7.3.1. Isoflavonóides da soja	30
8. Referências bibliográficas	32

5. Capítulo 2: Enumeração de <i>Streptococcus thermophilus</i> na presença de <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> – efeito da temperatura de incubação e condições atmosféricas	41
Introdução	43
Materiais e Métodos	43
Resultados e Discussão	44
Conclusões	48
Referências Bibliográficas	48
 6. Capítulo 3: Enumeração diferencial de <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> na presença de <i>Streptococcus thermophilus</i>	50
Introdução	52
Materiais e Métodos	53
Resultados e Discussão	54
Conclusões	57
Referências Bibliográficas	57
 7. Capítulo 4: Efeito de diferentes concentrações e combinações de <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> no pH, acidez e desempenho sensorial durante a estocagem de <i>Streptococcus thermophilus</i>	60
Introdução	62
Materiais e Métodos	67
Resultados e Discussão	72
Conclusões	87
Referências Bibliográficas	88
 8. Capítulo 5: Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>.	92
Introdução	93
Materiais e Métodos	100

Resultados e Discussão	104
Conclusões	113
Referências Bibliográficas	115
 9. Capítulo 6: Avaliação microbiológica e de pós-acidificação de leites fermentados por <i>Streptococcus thermophilus</i>: efeito da adição e da forma de adição de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium longum</i> e da temperatura de estocagem.	 120
Introdução	122
Materiais e Métodos	125
Resultados e Discussão	129
Conclusões	138
Referências Bibliográficas	140
 10. Capítulo 7: Leite fermentado contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium longum</i>: desempenho sensorial de fibra de soja e aveia e teores de corante e aromatizante de morango.	 145
Introdução	147
Materiais e Métodos	154
Resultados e Discussão	163
Conclusão	172
Referências Bibliográficas	172
 11. Conclusões gerais	 177

RESUMO GERAL

Neste trabalho foram estudados dois modos de elaborar leite fermentado contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*. Elaborou-se leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*, ao qual foram adicionados *L. acidophilus* e/ou *Bif. longum* liofilizados. No outro modo de elaboração de leite fermentado contendo os três microrganismos, foi produzida mistura de volumes iguais de leite fermentado por *Streptococcus thermophilus*, leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e leite fermentado por *Bifidobacterium longum*. Todos esses três leites foram fermentados em separado pelos referidos microrganismos antes da mistura.

Foram estudadas as formas de incorporação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* a leite fermentado por *Streptococcus thermophilus* e suas conseqüências sobre as características sensoriais (sabor e acidez), viabilidade dos microrganismos e pós-acidificação dos produtos, ao longo da estocagem. Para isto, primeiramente, selecionou-se a metodologia de enumeração seletiva dos microrganismos. Mediram-se, então, as referidas características para os leites fermentados adicionados de probióticos na forma liofilizada em diferentes combinações e concentrações. O mesmo foi feito para o leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais de leites fermentados, em separado, por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*. Na seqüência, estudou-se a viabilidade destes microrganismos e as características de pH e acidez dos leites fermentados adicionados ou não de probióticos estocados a 4, 7, 10 e 15°C. Todas estas etapas foram realizadas com leite fermentado sem adição de corante, aromatizante, edulcorante ou demais ingredientes. Finalmente, verificou-se o desempenho sensorial dos leites fermentados com adição de corante e aromatizante de morango, aspartame e fibras de soja e aveia. Foram comparados os desempenhos sensoriais destas duas fibras e o modo de incorporação ao leite fermentado.

Na primeira etapa da seleção da metodologia de enumeração seletiva dos microrganismos, foi estudada a enumeração de *Str. thermophilus* na

presença de *L. acidophilus* e *Bif. longum*. Os agares ST e Lee, nas condições da literatura, mostraram-se não seletivos para *Str. thermophilus*. O ágar ST permitiu o crescimento do *L. acidophilus* e o ágar Lee permitiu o crescimento de *L. acidophilus* e *Bif. longum*. O ágar ST e o ágar Lee foram incubados a 30, 35, 37 e 45°C, o primeiro apenas em aerobiose e, o segundo, em aerobiose e microaerofilia. A 30 e 45°C, o *L. acidophilus* foi inibido no ágar ST e *L. acidophilus* e *Bif. longum* no ágar Lee. A recuperação de *Str. thermophilus* foi eficiente em todas as condições. Os ensaios foram realizados com suspensões isoladas e mistas dos microrganismos. Também foram realizados experimentos com leites fermentados adicionados dos probióticos liofilizados. A capacidade de cada meio de inibir os microrganismos também foi verificada.

Na segunda etapa da seleção, os meios modificados T e M-MRS e os meios seletivos Bile e LP-MRS foram avaliados na quantificação de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na presença de *Str. thermophilus*. Foram utilizadas suspensões microbianas isoladas e mistas, sendo 37°C, por 72h, em aerobiose as condições de incubação para estudo dos agares T, M e Bile-MRS. Todos os ensaios com LP-MRS foram realizados em anaerobiose. O ágar LP-MRS foi avaliado pela adição de quatro diferentes combinações de concentrações de cloreto de lítio e propionato de sódio (0,2; 0,4; 0,5 and 0,6% de LiCl com, respectivamente, 0,3; 0,6; 0,75 e 0,9% de propionato de sódio). A capacidade de cada meio de inibir os microrganismos também foi verificada. O ágar M-MRS possibilitou o crescimento de *Str. thermophilus*. A quantificação diferencial de *L. acidophilus* foi possível utilizando-se T e Bile-MRS, em aerobiose. Contudo, o ágar Bile-MRS é mais prático e econômico. A quantificação diferencial de *Bif. longum* foi possível através do LP-MRS, em anaerobiose, com a combinação de 0,6g/l de LiCl e 0,9 g/l de propionato de sódio.

Os leites fermentados elaborados pela adição de 5 combinações de *Bif. longum* e/ou *L. acidophilus* liofilizados ao leite fermentado por *Str. thermophilus* tiveram suas características sensoriais, de pH e acidez estudadas. Os efeitos sobre as características sensoriais tornaram-se significantes ($p < 0,05$) a medida que aumentava o tempo de estocagem. As combinações favoritas

continham, inicialmente, *Bif. longum* e *L. acidophilus* (10^8 e 10^7 ufc/ml, respectivamente) e *Bif. longum* apenas (10^8 ufc/ml). Estas combinações não diferiram significativamente do leite fermentado padrão (leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*), nem entre si. As notas mais baixas e os maiores valores de acidez titulável foram apresentados pela combinação contendo apenas *L. acidophilus* (10^8 ufc/ml, concentração inicial). Durante 21 dias de estocagem a 4°C, as contagens de células viáveis de *Str. thermophilus* não mudaram, as de *Bif. longum* mantiveram-se constantes ou reduziram em um ciclo logarítmico e, as de *L. acidophilus* reduziram de 1 a 2 ciclos logarítmicos. Não foi observada inibição da pós-acidificação pela bifidobactéria ou pelo *L. acidophilus*.

Os três leites fermentados, o primeiro por *Str. thermophilus*, o segundo por *Bif. longum* e o terceiro por *L. acidophilus* e o leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais de leite fermentado em separado por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* tiveram suas características sensoriais, de pH, acidez titulável e contagens de células viáveis determinadas, ao longo de 21 dias de estocagem a 4°C. Não houve diferença significativa entre o leite fermentado elaborado por mistura e aquele contendo apenas *Str. thermophilus*. O leite fermentado por *Str. thermophilus* apresentou a maior acidez e menor pH, enquanto o leite fermentado por *Bif. longum* apresentou a menor acidez e maior pH. As contagens de células viáveis de *Str. thermophilus* (10^9 e 10^8 ufc/ml) e *Bif. longum* (10^8 ufc/ml), tanto no leite fermentado elaborado pela mistura como nos isolados, mantiveram-se constantes até 21 dias de estocagem. As contagens de células viáveis de *L. acidophilus* reduziram-se em um ciclo logarítmico, permanecendo em 10^7 ufc/ml, até os 21 dias.

Para a etapa de estudo da influência das temperaturas de estocagem refrigerada de 4, 7, 10 e 15°C, ao longo de 21 dias, sobre a viabilidade dos microrganismos, pH e acidez foram elaborados leites fermentados por *Str. thermophilus* adicionados ou não de *Bif. longum* e *L. acidophilus* na forma liofilizada e na forma de leites fermentados em separado. As três formulações foram comparadas sensorialmente para os atributos sabor e acidez no

vigésimo primeiro dia de estocagem a 4° C. Os leites fermentados apenas por *Str. thermophilus* apresentaram valores de pH a 4, 7, 10 e 15°C, respectivamente, variando de 0,36, 0,32, 0,30 e 0,32 unidades de pH. Os leites fermentados adicionados de *Bif. longum* e *L. acidophilus* liofilizados apresentaram valores de pH variando de 0,36, 0,34, 0,35 e 0,34 unidades. O leite fermentado obtido da mistura de leites fermentados em separado apresentou variações de pH de 0,28, 0,39, 0,40 e 0,35 unidades. As contagens de *Str. thermophilus* (10^8 - 10^9 ufc/ml) e *Bif. longum* (10^7 - 10^8 ufc/ml) mantiveram-se constantes. No leite fermentado obtido da mistura de leites fermentados em separado as contagens de *Bif. longum* foram maiores que no leite fermentado adicionado de probióticos liofilizados. As contagens de *L. acidophilus* no leite fermentado com probióticos liofilizados a 4, 7, 10 e 15°C, após 21 dias de estocagem, reduziram-se de cerca de 10^8 para 10^7 ufc/ml. As contagens de *L. acidophilus* no leite fermentado adicionado de probióticos liofilizados a 7, 10 e 15°C ficaram em torno de 10^6 ufc/ml, enquanto as contagens a 4°C foram de 10^7 ufc/ml. Os leites fermentados por *Str. thermophilus* com e sem adição dos probióticos liofilizados não apresentaram diferença significativa entre si. O leite fermentado por *Str. thermophilus* com adição dos probióticos liofilizados não apresentou diferença significativa em relação ao leite fermentado obtido por mistura de leites fermentados em separado. Já este leite fermentado obtido por mistura de leites fermentados em separado diferiu significativamente ($p < 0,05$) do leite fermentado por *Str. thermophilus* sem qualquer adição.

Os desempenhos sensoriais de leite fermentado por *Str. thermophilus*, contendo ou não *L. acidophilus* e *Bif. longum* liofilizados ou incorporados na forma de leites fermentados em separado foram avaliados após 7 dias de estocagem a 4°C. Ao leite fermentado foram adicionados: fibra de aveia tratada ou sem pré-tratamento, fibra de soja de diferentes graus de moagem e diferentes teores de corante e aromatizante de morango. Quanto ao tipo de fibra e grau de moagem, o leite fermentado por *Str. thermophilus* contendo fibra de aveia obteve as maiores notas para sabor e não diferiu significativamente ($p < 0,05$) da bebida láctea comercial. A formulação com fibra de soja de maior grau de moagem foi preferida em relação a de menor intensidade de moagem.

Na comparação de teores de corante e aromatizante a formulação com 0,015g/l de corante e com 0,2g/l de aromatizante foram as preferidas. O tipo de pré-tratamento da fibra de aveia com melhor desempenho sensorial foi aquele onde a fibra foi pré-tratada por hidratação, aquecimento, homogeneização e tratamento térmico final. Não houve diferença significativa entre o leite fermentado por *Str. thermophilus* contendo probióticos liofilizados e a mistura de leites fermentados em separado, sendo que as formulações com aveia não diferiram significativamente da bebida comercial. As formulações elaboradas a partir de leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado dos probióticos liofilizados foram as menos preferidas. A formulação com leites fermentados em separado apresentaram contagens de células viáveis de probióticos maiores em um ciclo logarítmico que na formulação com probióticos liofilizados.

ABSTRACT

Fermented milks containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* elaborated by two ways different ways were studied. Fermented milk by *Str. thermophilus* added of *Bif. longum* and *L. acidophilus* were produced. The other way used to prepare the fermented milk containing the three microorganisms was the mixing of equal volumes of milks previously separated fermented by *Str. thermophilus*, *Bif. longum* and *L. acidophilus*.

Fermented milks containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* elaborated by two ways different ways and their post-acidification, sensory characteristics (taste and acidity) and microorganisms viability during storage were studied.

The first step was the selection of the methodology to enumeration of *Streptococcus thermophilus* (Str) in the presence of *Lactobacillus acidophilus* (LAC) and *Bifidobacterium longum* (BL). ST agar at 37°C/48h/aerobically and on Lee's agar at 37°C/48h/microaerophilic were tested and shown to be non-selective for Str. ST agar allowed the growth of LAC and Lee's agar allowed the growth of LAC and BL. ST agar (aerobically) and Lee's agar (aerobically and under microaerophilic) were incubated at 30, 35, 37 and 45°C. At 30 and 45°C LAC was inhibited with ST agar and either LAC and BL with Lee's agar. The recovery of Str was efficient under all conditions. The tests were carried out using isolated and mixed suspensions of these microorganisms. Counts were also made with Str fermented skim milk with added probiotics. The ability of each medium to inhibit the organisms was also tested.

The second step of methodology selection was the study of media to quantify selectively *Bifidobacterium longum* (BL) and *Lactobacillus acidophilus* (LAC) in the presence of *Streptococcus thermophilus* (Str). Modified (T and M-MRS) and selective (Bile and LP-MRS) media were assayed. Microbial suspensions isolated and mixed) were tested at 37°C/72h aerobically with T, M

and Bile-MRS. All tests using LP-MRS were done anaerobically. LP-MRS was tested under four different combinations of lithium chloride and sodium propionate concentrations (0.2; 0.4; 0.5 and 0.6% of LiCl with respectively 0.3; 0.6; 0.75 and 0.9% of sodium propionate). The ability of each medium to inhibit the organisms was also tested. M-MRS allowed the growth of *Str.* Differential counting of LAC was possible using T and Bile-MRS, aerobically, (the latter condition being more practical and economical). Differential counting of BL was possible using LP-MRS in anaerobiosis, with a combination of 0.6g/l of LiCl and 0.9 g/l of sodium propionate.

After selection of methodology to selective enumeration of the microorganisms, sensory, pH, titratable acidity and microbial counts characteristics of five combinations, of lyophilized *Bifidobacterium longum* and/or *Lactobacillus acidophilus* added to *Streptococcus thermophilus* fermented milk were studied. The taste and acidity sensory attributes were significantly ($p < 0.05$) perceived as the storage time increased. Favourite combinations contained, initially, *Bif. longum* and *L. acidophilus* (10^8 and 10^7 cfu/ml, respectively) and *Bif. longum* only (10^8 cfu/ml). These combinations did not differ significantly among them and neither from the standard fermented milk. The lowest sensory scores and highest titratable acidity values was for the milk fermented by *Str. thermophilus* added of lyophilized *L. acidophilus* (10^8 cfu/ml initial concentration). During the 21 days of storage at 4°C the viable cell counts of: *Str. thermophilus* did not change. *Bif. longum* viable cell counts kept constant or reduced 1 logarithmic cycle and *L. acidophilus* reduced 1 or 2 logarithmic cycle. We did not observe inhibition of over-acidification by bifidobacteria or *L. acidophilus*.

The fourth step was the study of sensory, pH, titratable acidity and microbial counts characteristics of milks fermented separately by *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* and a beverage prepared by mixing them were studied during 21 days of storage at 4°C. The mixed beverage and *Str. thermophilus* fermented milk did not differ significantly ($p < 0.05$) among them. Milk fermented by *Str.*

thermophilus and by *Bif. longum* showed, respectively, the highest titratable acidity and the lowest pH and the lowest titratable acidity and the highest pH. *Str. thermophilus* (10^9 e 10^8 cfu/ml) e *Bif. longum* (10^8 cfu/ml) viable cell counts were kept constant in the beverage and in the separated fermented milks, during all the storage. *L. acidophilus* viable cell counts, in the beverage and in the separated fermented milk, were reduced from 10^8 (initial counts) to 10^7 cfu/ml after 21 days of storage.

The study of the storage temperature influences in the viability of microorganisms were carried out at 4, 7, 10 and 15°C, during 21 days. Three different formulations of fermented milks were prepared and their pH and titratable acidity were also determined. The taste and acidity sensory attributes of the formulations stored during 21 days at 4°C were compared. One of the formulations was prepared by the mixing of milks fermented separately by *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum*. The second formulation contained only milk fermented by *Str. thermophilus* and the third was elaborated by adding lyophilized *L. acidophilus* and *Bif. longum* to a previously milk fermented by *Str. thermophilus*. Milk fermented only by *Str. thermophilus* showed pH values variations at 4, 7, 10 and 15°C, respectively, of 0,36, 0,32, 0,30 e 0,32 pH units. Fermented milks added of lyophilized probiotics showed pH values variations of 0,36, 0,34, 0,35 e 0,34 units and fermented milk prepared by mixing milk fermented separately by the three microorganisms showed variations of 0,28, 0,39, 0,40 e 0,35 pH units. *Str. thermophilus* (10^8 - 10^9 ufc/ml) and *Bif. longum* (10^7 - 10^8 ufc/ml) cell counts kept constant. *L. acidophilus* cell counts in the fermented milk prepared by the mixing stored at 4, 7, 10 and 15°C and in the fermented milk added of lyophilized probiotics stored at 4°C were reduced from 10^8 to 10^7 ufc/ml. *L. acidophilus* cell counts in the fermented milk added of lyophilized probiotics stored at 7, 10 and 15°C were reduced to 10^6 ufc/ml. The sensory evaluation concluded there were not significant differences ($p < 0,05$) between milk fermented only by *Str. thermophilus* and milk fermented by *Str. thermophilus* added of lyophilized probiotics. This formulation also did not differ from the fermented milk prepared by the mixing of fermented milks.

But, the fermented milk prepared by the mixing differ significantly from milk fermented only by *Str. thermophilus*.

Sensory evaluation of the attributes taste, color, odor and texture of milk fermented by *Str. thermophilus* added or not of lyophilized *L. acidophilus* and *Bif. longum* or milks fermented separately by *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum* were realized after 7 days of storage at 4°C. Formulations containing milk fermented by *Str. thermophilus* added of oat fibre pre-treated or untreated, soy fibre grounded at two degrees and different concentrations of coloring and flavouring agents. Milk fermented by *Str. thermophilus* added of oat fibre received the greater sensory scores and did not differ ($p < 0,05$) from commercial milk beverage used to compare. The favorite formulations were that added of 0,015g/l of coloring agent and 0,2g/l of flavouring agent. The oat fibre treatment by hydration, heat treatment intermediate, homogenization and final heat treatment produced the treat oat fibre used in the favorite formulation. There were not differences ($p < 0,05$) between milk fermented by *Str. thermophilus* added of lyophilized probiotics and the fermented milk prepared by the mixing of fermented milks. The formulations using these probiotics milks added of oat fibre did not differ from commercial milk beverage. The formulation prepared using the fermented milk prepared by the mixing of fermented milks showed the highest probiotics cell counts.

INTRODUÇÃO GERAL

Desde séculos atrás a humanidade reconhece a relação entre alimento e saúde. Alimento funcional é um dos termos que podem ser usados para se referir a alimentos com benefícios a saúde. Emprega-se, também, termos como nutracêuticos, alimentos probióticos e alimentos medicinais (medical foods). Dentre a grande variedade de alimentos funcionais, considerável percentual é abrangido por produtos lácteos fermentados contendo probióticos (Biström & Nordström, 2002).

O uso dos probióticos *Bifidobacterium* spp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leite fermentado tornou-se popular no final da década de 70 como resultado de grande aumento no conhecimento da taxonomia e ecologia das bifidobactérias. Sua popularidade também aumentou devido a sua baixa capacidade de acidificação durante o processo de pós-acidificação na estocagem (Gomes & Malcata, 1999).

A fabricação de produtos lácteos fermentados de alta qualidade contendo *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* é o maior desafio dos laticínios devido ao caráter sensível dos microrganismos nestes bio-produtos, o que aumenta as dificuldades naturalmente encontradas no desenvolvimento de novos produtos (exemplos: baixa palatibilidade e limitada aceitação pelo consumidor). As bifidobactérias, em particular, tendem a exibir fraco crescimento e produção de ácido no leite o que, invariavelmente, requer longos períodos de fermentação, condições de anaerobiose, baixo potencial redox pelo menos na fase inicial de crescimento, adição de fatores de crescimento ao leite (Gomes&Malcata, 1999). Também as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácido acético e láctico a taxa de 3:2 assim, crescimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma “a vinagre”, o que não é aceitável para os consumidores. O uso de culturas combinadas de bifidobactérias e *L.acidophilus* ou outras bactérias lácticas, como *L. delbruechii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, *Str. thermophilus* sozinho ou culturas aromáticas

mesofílicas tem sido defendido como uma solução para tais problemas (Vinderola et al., 2002).

As interações entre probióticos e fermento podem ter impacto sobre a qualidade do produto (Fondén et al., 2000 e Mattila-Sandholm et al., 2002). A combinação mais favorável de fermento e probióticos específicos deve ser determinada estudando-se as combinações possíveis e selecionando aquelas cujas propriedades sensoriais e de sobrevivência dos probióticos é mais vantajosa (Mattila-Sandholm et al., 2002). Neste trabalho, essas interações foram estudadas tanto nas etapas de enumeração seletiva dos microrganismos em conjunto, como no leite fermentado durante estocagem. O efeito de inibição entre probióticos e bactérias tradicionais do leite fermentado, iogurte e outros produtos lácteos está baseado nos produtos do seu metabolismo, entre eles, os ácidos láctico e acético e bacteriocinas (Vinderola et al., 2002; Mattila-Sandholm et al., 2002).

Grande número de estudos tem sido publicado sobre as características dos probióticos (Holzapfel & Schillinger, 2002; Mattila-Sandholm et al., 2002; Godward et al., 2000) e critérios para sua seleção (Gomes&Malcata, 1999; Mattila-Sandholm et al., 2002). As propriedades mais importantes incluem: (a) tolerância a acidez, ao suco gástrico humano e bile, o que é essencial para manter alto o número de células viáveis durante estocagem e durante passagem através do trato digestivo após a ingestão; (b) aderência a mucosa intestinal humana, o que é necessário para colonização temporária do trato gastro-intestinal; (c) produção de substâncias anti-microbianas, com concomitante inibição de patógenos, ou seja, efeito imuno-modulador mas não pró-inflamatório; (d) atividade antagonística contra patógenos como *Helicobacter pylori* e *Clostridium difficile* e (e) propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas. Os aspectos tecnológicos, segundo Mattila-Sandholm et al. (2002), considerados na seleção de probióticos são as boas propriedades sensoriais, a resistência a fagos, a viabilidade durante processamento e a estabilidade no produto e durante estocagem.

Para que os produtos lácteos fermentados sejam benéficos a saúde, devem ter ingestão semanal mínima de 300 a 400g e conter entre 10^5 e 10^7 ufc/g (Samona e Robinson, 1994; Rasic e Kurmann, 1978; Tamime et al., 1995; Shah, 2000). Por isto, a importância de se estudar a viabilidade dos microrganismos em produtos elaborados a diferentes temperaturas durante a estocagem, bem como examinar as formas de incorporação de probióticos sobre a viabilidade ao final da vida de prateleira.

Ao usar leite fermentado ou outros produtos lácteos contendo probióticos, o objetivo tem sido modificar a microbiota intestinal e os sistemas de barreiras do intestino beneficiando, assim, a saúde do hospedeiro. Três modos para melhorar a microbiota são: o uso de probióticos, de prebióticos e de simbióticos (FONDÉN et al., 2000; FOOKS et al., 1999; WALKER e DUFFY, 1998; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002). Fondén et al. (2000) afirmaram que produtos lácteos fermentados com bactérias lácticas têm sido usados no tratamento de doenças do trato gastro-intestinal como intolerância a lactose, gastro enterites agudas, efeitos adversos da radioterapia, constipação, alergias alimentares, entre outras. De acordo com Fondén et al. (2000), estas doenças estão associadas a distúrbios na microbiota intestinal e vários graus de inflamação da mucosa intestinal, levando ao aumento da permeabilidade intestinal.

Um parâmetro importante no desenvolvimento de produtos contendo probióticos e nos programas de qualidade das indústrias de alimentos e institutos de pesquisa é a capacidade de quantificar e diferenciar as células viáveis destes organismos (Shah, 2000). Adicionalmente, tais produtos devem atender a padrões de legislação, os quais estabelecem contagens mínimas de células viáveis que precisam ser determinadas (Brasil, 2000; Davidson et al, 2000). A escolha final do meio e do método deve considerar o tipo de alimento, as espécies ou linhagens a se enumerar e/ou isolar, bem como a natureza dos gêneros competidores. Assim, não se deve esperar, segundo Shah (2000), Roy (2001) e Lourens-Hattingh & Viljoen (2001) que os meios seletivos ou diferenciais funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para

as linhagens de cada espécie de interesse na situação. Estas afirmações, dos referidos autores, justificam a realização das etapas de seleção de metodologia para enumeração seletiva dos microrganismos *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*.

O aumento do número de bactérias benéficas como as bifidobactérias no intestino pode ser conseguido com o uso de prebióticos, que são componentes da dieta não digeríveis que passam através do cólon e estimulam a atividade de bactérias desejáveis *in situ*. De acordo com GOLDBERG (1994), a dieta rica em fibras dietéticas protege contra doenças como câncer de cólon, arterosclerose e hipercolesterolemia associada, diabetes, diverticulose, hipertensão e obesidade. Os dois tipos de fibras mais avaliados nos estudos clínicos para redução de colesterol e das concentrações de glicose no sangue são a fibra de aveia e a de soja. A soja e seus produtos têm atraído mais a atenção. Um grande número de estudos tem sido realizado procurando por ligações entre os fitoestrógenos da soja, o metabolismo de hormônios sexuais, a atividade biológica, enzimas intracelulares, síntese de proteínas, ação de fator de crescimento, proliferação de células malignas e angiogênese, ao nível molecular, ao nível dos tecidos e ao nível dos organismos (Mazur *et al.*, 1998). Por isto, decidiu-se comparar a avaliação sensorial de leite fermentado adicionado de fibra de soja e aveia, tratadas de diferentes modos, contendo ou não probióticos.

Os objetivos deste trabalho foram:

1. selecionar metodologia para enumeração de *Str. thermophilus* na presença de *L. acidophilus* e *Bif. longum* usando um sistema modelo constituído por suspensões dos microrganismos em água peptonada (isolados e em conjunto) e suspensões em leite fermentado.
2. selecionar metodologia para enumeração seletiva de *L. acidophilus* na presença de *Bif. longum* e *Str. thermophilus* e de *Bif. longum* na presença de *L. acidophilus* e *Str. thermophilus*, usando um sistema modelo de suspensões isoladas e mistas destes microrganismos.

3. estudar a influência nas características sensoriais, de pH, acidez e número de células viáveis da presença de leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de diferentes concentrações de *Bif. longum* e *L. acidophilus* liofilizados.
4. estudar, ao longo de 21 dias de estocagem a 4°C, as características sensoriais, de pH, de acidez titulável e de contagens microbianas dos leites fermentados separadamente por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* e de uma bebida lática elaborada pela mistura de volumes iguais destes leites fermentados.
5. estudar os efeitos de diferentes temperaturas de estocagem (4, 7, 10 e 15°C), do tempo de estocagem, do pH, da acidez titulável e dos modos de incorporação de *L. acidophilus* e *Bif. longum* aos leites fermentados sobre a população bacteriana (*Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*) destes produtos, bem como suas características sensoriais.
6. avaliar o desempenho sensorial de leites fermentados por *Str. thermophilus*, contendo ou não *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* adicionados liofilizados ou como leites fermentados em separado. Aos leites fermentados foram adicionados, também, fibra de aveia tratada ou sem pré-tratamento, fibra de soja de diferentes graus de moagem e diferentes teores de corante e aromatizante de morango. Todas estas formulações foram avaliadas sensorialmente.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Revisão bibliográfica¹

1. Histórico

Observa-se cada vez mais a existência de relação entre o alimento e a saúde. O grau com que a dieta influencia a prevenção de doenças como as cardiovasculares, câncer, hipertensão e obesidade ainda não está definido. Contudo, entre os especialistas já é aceito que 1/3 dos casos de câncer e 1/2 das doenças relacionadas ao coração, artérias e hipertensão estão relacionados a dieta. Os principais componentes alimentares associados com doenças cardiovasculares são as gorduras, especialmente as saturadas, além do baixo consumo de fibras, vegetais e frutas (28). Tais características da dieta, segundo Fondén et al. (21), devem-se a mudanças no estilo de vida, especialmente nos países do ocidente, e grandes esforços têm sido dedicados aos alimentos que apresentam, além das propriedades organolépticas e nutricionais, atributos específicos como promotores da saúde.

O desenvolvimento de tecnologias permite inovações nos produtos, resultando em um número cada vez maior de produtos funcionais (28). Os consumidores, que estão cada vez mais conscientes sobre a existência de relação entre saúde e alimentação, vêm aceitando a idéia de que a saúde é um presente controlável. Também, ressalta-se a importância da regulamentação dos apelos de benefícios a saúde usados na venda de alimentos funcionais. Berner & O'Donnel (5), Biström & Nordström (6), Goldberg (28) e Molyneaux & Lee (52) afirmaram que o interesse dos consumidores, e portanto o mercado de alimentos funcionais, é crescente devido a tendências como: (a) evidências clínicas da funcionalidade de ingredientes de alimentos sobre a saúde; (b) envelhecimento da população, aumentando o número de consumidores mais velhos interessados nos alimentos funcionais para a saúde; (c) custos dos tratamentos de saúde afetam os governos e empresas, que têm interesse em pesquisar caminhos para reduzi-los; (d) fornecimento de maiores informações pela mídia sobre saúde, dieta e nutrição; (e) as escolas de medicina enfatizam

¹ Revisão redigida segundo normas da revista Boletim SBCTA, para a qual foi enviada.

a educação do paciente quanto a uma dieta saudável, como parte de serviços ou tratamentos dos médicos; (f) desenvolvimento pela tecnologia de alimentos de alimentos saborosos que são, também, saudáveis; (g) diferenciação das marcas: empresas com capacidade de desenvolvimento de produtos usarão o interesse em produtos saudáveis como uma oportunidade de diferenciar e agregar valor às suas marcas de produtos.

O conceito de que a natureza confere aos alimentos componentes que os tornam, por si só, benéficos a saúde, além de terem função curativa, não é novidade. Chás e remédios são usados a séculos em muitas partes do mundo. Na sociedade moderna, volta-se para os medicamentos para tratar e prevenir doenças. Contudo, desde a descoberta da natureza química dos nutrientes dos alimentos, a humanidade tornou-se conhecedora da relação entre a estrutura molecular destas substâncias e seus efeitos no organismo humano (1, 28).

De acordo com Andlauer & Fürst (1), Hipócrates já reconhecia a relação entre alimento e saúde, enfatizando-a em seus escritos. A idéia de alimentos que trazem benefícios adicionais a saúde não é nova, ela deve ter-se firmado, segundo Goldberg (28), na década de 50, nos E.U.A., com a realização das avaliações nutricionais. A aproximação entre a medicina e a dieta começou na década de 70. Contudo, esta aproximação vem sofrendo renovação devido a descobertas da bioquímica, que defendem impactos positivos de certas substâncias sobre a saúde.

No Japão, de acordo com Holzapfel & Schillinger (31), a pelo menos 40 anos atrás, e na Europa, a pelo menos 20 anos, bactérias lácticas probióticas são usadas na fabricação de leites fermentados. O Japão é, atualmente, o líder mundial no desenvolvimento de alimentos funcionais. No Japão, os alimentos funcionais, também chamados alimentos para uso específico (foods for specified health use), são considerados como o segmento que oferece maiores oportunidades aos produtos lançados (28). Nos E.U.A. o crescimento deste mercado é ainda maior.

Há no meio científico, comercial e industrial vários termos usados para se referir a alimentos com propriedades benéficas a saúde. Molyneaux & Lee (52) diferenciaram alimentos funcionais de alimentos medicinais (medical foods). Estes autores salientaram que os alimentos funcionais são “produtos

que proporcionam benefícios específicos a saúde, além dos nutrientes tradicionais que contêm”, ou são “alimentos contendo componentes biologicamente ativos que trazem benefícios a saúde além de serem nutritivos. A definição para alimentos medicinais adotada pelo Departamento de Alimentos e Medicamentos dos E.U.A. (FDA, Food and Drug Administration) é: “alimentos formulados para serem consumidos ou administrados internamente, sob supervisão de um médico, destinados ao tratamento de uma doença ou condição que exige requerimentos nutricionais distintos estabelecidos por avaliação médica”.

As definições de alimentos funcionais reportadas por Berner & O'Donnel (5), Biström & Nordström (6) e Goldberg (28) podem ser resumidas como aqueles alimentos que têm impactos positivos na saúde do indivíduo, na sua performance física ou estado mental, além de seu valor nutricional. Os japoneses têm em seu país grande variedade de produtos chamados funcionais e, segundo Goldberg (28), salientaram três pré-requisitos para definir um alimento como funcional que são: (1) é um alimento e não uma cápsula, tablete ou pó formulado com ingredientes que ocorrem na natureza; (2) ele pode e deve ser consumido como parte da dieta diária; (3) o alimento tem uma função particular quando ingerido, servindo para regular um processo fisiológico particular como os mecanismos de defesa biológicos; redução da velocidade do processo de envelhecimento; controle de condições físicas e mentais; prevenção de doenças específicas; recuperação de doenças específicas.

Ainda quanto a definições, Andlauer & Fürst (1) definiram nutracêuticos como substâncias que podem ser consideradas alimentos ou partes do alimento e que proporcionam benefícios médicos e a saúde, incluindo prevenção e tratamento de doenças.

Dentre a grande variedade de alimentos funcionais, considerável percentual é abrangido por produtos lácteos fermentados contendo bactérias probióticas (6). Intensos esforços de pesquisa nos últimos anos confirmam a importância da microbiota para o trato gastro-intestinal. Contudo, a associação benéfica de microrganismo “produtor de ácido lático” no homem já é sugerida há mais de 100 anos (31). As bactérias lácticas associadas a produtos lácteos

fermentados foram defendidas pelos seus benefícios a saúde por Metchnikoff (1908), citado em Holzapfel & Schillinger (31). Ele sugeriu que a longevidade dos caucasianos estava relacionada a alta ingestão de produtos lácteos fermentados.

De acordo com Holzapfel & Schillinger (31), foi Vergio (1954) quem primeiro introduziu o termo “probiótico”. A palavra grega “probiótico” que significa “para a vida” tem sido usada, nos últimos anos, de diversos modos. Ela já foi proposta, em 1965 por Lilly & Stillwell, para descrever compostos produzidos por um protozoário que estimulava o crescimento de outro (29). Mas, no início dos anos 70, Sperti expandiu o termo para abranger extratos de tecidos que estimulavam o crescimento microbiano. Parker (1974), citado em Gomes & Malcata (29), aplicou o termo para descrever suplementos para ração animal que tinham efeito benéfico no hospedeiro contribuindo para o balanço da microbiota intestinal. Conseqüentemente, a palavra “probiótico” foi aplicada a “organismos e substâncias que contribuem para o balanço da microbiota intestinal”. Esta definição foi insatisfatória porque uma palavra imprecisa como “substâncias” pode incluir grande variedade de suplementos, incluindo antibióticos. Em 1989, Fuller revisou a definição frisando a importância de células vivas como componente essencial de um probiótico efetivo, definindo probiótico como “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro melhorando seu balanço intestinal” (29).

A definição de probióticos foi alterada na década de 90. Atualmente, probióticos são definidos como “microrganismos viáveis (bactérias lácticas e outras bactérias ou leveduras usadas na forma de células desidratadas ou em produto fermentado) que exibe o efeito benéfico na saúde do hospedeiro após a ingestão melhorando as propriedades da microbiota endógena” (21, 22, 29, 43, 74).

O uso de *Bifidobacterium* spp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leite fermentado tornou-se popular no final da década de 70 como resultado de grande aumento no conhecimento da taxonomia e ecologia das bifidobactérias. Sua popularidade também aumentou devido a baixa capacidade de acidificação durante o processo de pós-acidificação na estocagem e alta taxa de síntese de ácido láctico L(+) em relação ao ácido láctico D(-). Nos últimos

anos, vários países têm realizado trabalhos com bifidobactérias e suas aplicações tecnológicas e terapêuticas, entre eles: Japão, Dinamarca, Alemanha, Polônia, Rússia, Reino Unido e EUA. Grande número de patentes surgiu principalmente entre desenvolvimento de novos produtos e produção de fermento (29).

2. Leites fermentados

O consumo de leite fermentado data de muitos séculos, embora não haja registros precisos de quando foi feito o primeiro deles. Há citações do consumo de leite fermentado na Bíblia, pela cultura Budista, pelos antigos gregos e romanos (43). Desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff sugeriu que o consumo de leite fermentado com lactobacilos poderia prolongar a expectativa de vida, há crescente interesse nos benefícios à saúde que estes microrganismos podem trazer (28, 63, 76).

A suplementação da microbiota do iogurte com *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Bifidobacterium infantis*, *bifidum*, *adolescentis* a fim de aumentar o valor nutricional do produto gerou novos leites fermentados e iogurtes, chamados Aco-yoghurt, Acidophilus-Bifidus-Yoghurt, Special-Yoghurt, Biogarde, Bioghurt, Yakult (Yokult Honsha), Bio Pruneaux (Danone) (28, 43, 63, 74, 75).

A Resolução GMC 47/97, um regulamento do MERCOSUL ao Comitê do Codex Alimentarius, aprovada em novembro de 1997 define leite fermentado, iogurte e leite acidófilo, separadamente. Este regulamento entende por leite fermentado ou cultivado o produto adicionado ou não de outras substâncias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, cuja fermentação láctica se realiza com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.*, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras bactérias lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante

seu prazo de validade. Iogurte, entende-se o produto incluído na definição anterior, cuja fermentação se realiza com cultivos proto-simbióticos de *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aos quais pode-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (42). Estas definições também estão na Resolução do Ministério da Agricultura e Abastecimento (M.A.A.) nº 5 (13/11/2000) e na Instrução Normativa/ M.A.A. nº 36 (31/11/2000) (7, 8).

A seguir estão listadas algumas características dos gêneros de bactérias mais comumente usados na produção de leite fermentado contendo probióticos.

2.1. Principais microrganismos dos leites fermentados

2.1.1. Gênero *Bifidobacterium*

Bifidobactérias foram primeiramente isoladas e descritas por Tissier em 1899-1900, que as denominou *Bacillus bifidus*. Elas são bacilos, não produtores de gás, organismos anaeróbios, presentes nas fezes de lactentes. Vários estudos de identificação com outras espécies relacionadas foram realizados até que, em 1970, os *Lactobacillus bifidus*, como eram conhecidas as bifidobactérias, foram agrupadas na família *Actinomycetaceae* (10, 70, 76). Bifidobactérias são Gram-positivas, não formadoras de esporos, imóveis e catalase negativas (10, 29, 76). Elas têm várias formas incluindo bastonetes curtos, compridos e bifurcados em forma de Y. Atualmente, há 30 espécies diferentes no gênero *Bifidobacterium*, 10 das quais são de origem humana, 17 de origem animal, 2 de efluentes e 1 de leite fermentado (29). Contudo, apenas 5 espécies de *Bifidobacterium* atraíram a atenção dos laticínios para a produção de leite fermentado com uso terapêutico (10, 62, 64, 70, 76, 78).

As bifidobactérias são sacarolíticas, produtoras de ácido acético e láctico, sem geração de CO₂. Algumas espécies de bifidobactérias são capazes de fermentar carboidratos complexos como amilose, amilopectina, arabinogalactana e gomas (tragacante, arábica). O pH ótimo de crescimento é entre 6 e 7, com praticamente nenhum crescimento a pH 4,5-5 ou abaixo ou a pH 8,0-8,5 ou acima. Contudo, Samona & Robinson (69) reportaram bom

crescimento do *Bifid. adolescentis* em pH 4,0. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 37 – 41°C, com crescimento máximo a 43-45°C e, praticamente, nenhum crescimento a 25-28°C (10, 29, 76). As bifidobactérias não crescem abaixo de 20°C, nem acima de 46°C, sendo destruídas a 60°C. Embora sejam classificadas como anaeróbias, e as espécies *Bifid. infantis*, *Bifid. breve*, *Bifid. longum* e *Bifid. adolescentis* não tolerem oxigênio, algumas espécies podem tolerar (64).

As bifidobactérias são microrganismos de grande importância no ecossistema complexo e ativo do trato intestinal de humanos, de outros animais de sangue quente e abelhas. Elas estão distribuídas nos tratos gastro-intestinal e uro-genital do ser humano, sendo a extensão destes nichos determinada pela idade e dieta. A microbiota natural de recém nascidos lactentes é dominada por bifidobactérias (21), cuja proliferação é estimulada por componentes glicoprotéicos da κ -caseína no colostro humano. O número de bifidobactérias decresce com o aumento da idade e torna-se, dependendo do indivíduo/ de sua dieta, o terceiro gênero mais abundante após os *Bacteroides* e *Eubacterium*. De acordo com Fondén et al. (21), o final da idade adulta e início da senilidade é caracterizado por significativa redução no número de bifidobactérias, enquanto bactérias contaminantes como clostrídios e coliformes tendem a aumentar, em geral, devido a diminuição da secreção de suco gástrico neste grupo etário. Este perfil da idade pode ser influenciado pela ingestão diária de fatores bifidogênicos e pela fisiologia do hospedeiro (21, 29).

As bifidobactérias, selecionadas para as fermentações lácticas, têm como habitat natural o intestino grosso, principalmente o cólon. Em um adulto saudável, as bifidobactérias dividem seu habitat com outras bactérias anaeróbias, tais como *Bacteroides*, *Veillonellae* e *Eubacterium*. Lactobacilos e bifidobactérias anaeróbias podem ser parte dominante da flora fecal de 1×10^{10} ufc/ml (62, 64, 76). Segundo Samona & Robinson (69), a inoculação conjunta de bactérias do fermento tradicional usado na produção de iogurte tende a suprimir o crescimento das bifidobactérias, embora não leve a declínio significativo da população.

Na caracterização fenotípica de bifidobactérias, quanto ao perfil de fermentação de açúcares, Mara & Oragui (44) verificaram que apenas as

espécies isoladas de humanos têm capacidade de fermentar sorbitol. Contudo, Kaufmann *et al.* (37) elaboraram método de identificação de bifidobactérias usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) , sendo que a quantificação foi feita por hibridização de colônias.

2.1.2. Gênero *Lactobacillus*

O primeiro pesquisador a isolar bastonetes anaeróbios facultativos das fezes de lactentes foi Moro, que os chamou de *Bacillus acidophilus*, nome genérico para lactobacilos intestinais. Lactobacilos são, em geral, caracterizados como Gram-positivos, não formadores de esporos, não flagelados, homofermentativos e apresentam vias fermentativas de síntese de ácido láctico e acético, etanol e gás carbônico. Até o presente, 56 espécies do gênero *Lactobacillus* já foram identificadas. Destes microrganismos, os mais comumente sugeridos para uso dietético são as linhagens de *L. acidophilus*, cuja definição foi alterada, recentemente, devido reclassificações com base em técnicas genéticas de identificação (10, 29).

O crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer até 45°C, estando o ótimo entre 35-40°C. Sua tolerância a acidez varia de 0,3% a 1,9% (acidez titulável), com pH ótimo entre 5,5-6,0 (10, 29). Muitas linhagens de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são capazes de crescer na presença de 0,4% de fenol, mas são incapazes de crescer na presença de sais biliares. O *Lb. acidophilus*, por sua vez, cresce mesmo na presença de 0,5% de fenol e de 4% de sais biliares. Sendo o fenol um produto dos processos putrefativos do intestino grosso (assim como o indol, escatol, etc), a resistência a este produto pode ser usada como um indicador da capacidade de sobrevivência no intestino de algumas bactérias (63).

Os lactobacilos estão distribuídos em nichos ecológicos ao longo do trato intestinal de humanos genital constituindo parte importante da microbiota do ser humano e de animais superiores. A distribuição é afetada por fatores ambientais como: pH, disponibilidade de O₂, nível de substâncias específicas, presença de secreções e interações bacterianas. Algumas linhagens de *Lb. acidophilus* são capazes de sintetizar vitaminas como ácido ascórbico, niacina e vitamina B₁₂. Além disto, este microrganismo tem atividade de lipolítica que

influencia o valor nutricional do iogurte suplementado. A atividade proteolítica do *L. acidophilus* é comparável a do *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. É produtor de diacetil, acetoína e ácidos voláteis (acético, fórmico, capróico, caprílico, butírico, entre outros) (29).

2.1.3. Gênero *Streptococcus*

O *Streptococcus thermophilus* é, tradicionalmente, usado em conjunto com o *Lactobacillus delbrueckii* sub-espécie *bulgaricus* para fabricação do iogurte, sendo a presença de ambos determinada pela legislação de vários países, inclusive do Brasil (7, 8). Contudo, diversos tipos de leites fermentados, em diversas partes do mundo, são produzidos apenas com *Streptococcus thermophilus* (43, 76).

Segundo Rasic & Kurmann (63), o *Streptococcus thermophilus* é homofermentativo; termodúrico com temperatura ótima entre 40 e 45 °C; sobrevive à temperatura de pasteurização; algumas linhagens são produtoras de goma; é pouco proteolítico e não possui atividade lipolítica. O *Streptococcus thermophilus*, assim como os estreptococos lácticos são microrganismos altamente adaptados ao leite, seu melhor meio para multiplicação.

Na produção de iogurte, os ingredientes são leite e microbiota. O leite é convertido em iogurte pelo crescimento de bactérias lácticas específicas, que o acidificam. Rasic & Kurmann (63) colocaram a definição de iogurte da FAO/WHO, de 1977: “produto lácteo coagulado, obtido pela fermentação láctica do *Lactobacillus delbrueckii* sub-esp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, a partir do leite ou de outros produtos lácteos (leite concentrado), com ou sem aditivos (leite em pó desnatado ou integral, soro em pó). Os microrganismos no produto final devem estar viáveis e abundantes”.

Hoje, os iogurtes produzidos têm como microbiota essencial *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, cujo crescimento conjunto é favorecido por relações simbióticas. Os iogurtes podem ainda conter a chamada microbiota não essencial, que abrange microrganismos como: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidus*, *infantis*, *adolescentis* e *Propionibacterium shermanii*.

Os lactobacilos e estreptococos isolados de iogurte de diferentes procedências vêm sendo estudados desde o início do século XX (62). Houve ainda a identificação de outros microrganismos presentes no iogurte mas que, com o avanço das técnicas de isolamento com meios seletivos e/ou diferenciais e identificação baseada nas características genéticas, tiveram seus nomes alterados sendo reagrupados em família e gêneros diferentes daqueles criados pelos pesquisadores do início do século.

2.1.4 Interações entre os gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*

Nos produtos probióticos fermentados é importante que a cultura probiótica usada contribua para boas características sensoriais. Contudo, é bem comum o uso de bactérias probióticas em conjunto com outros tipos de bactérias (fermentos) para a fermentação do produto. As interações entre probióticos e fermento podem ter impacto sobre a qualidade do produto. De acordo com Fondén et al. (21) e Mattila-Sandholm et al. (46), é possível elaborar produtos lácteos fermentados, com excelentes propriedades sensoriais e boa sobrevivência das bactérias, pelo uso de fermentos e microrganismos probióticos juntos. Fermentos viáveis podem ser *Str. thermophilus*, culturas de iogurte e fermentos mesofílicos com diferentes combinações de linhagens de *Lactococcus*. A combinação mais favorável de fermento e bactérias probióticas específicas deve ser determinada estudando-se as combinações possíveis e selecionando aquelas cujas propriedades sensoriais e de sobrevivência dos probióticos é mais vantajosa (46). Quando da seleção do fermento, o impacto negativo sobre a sobrevivência do probiótico *in vivo* ou *in vitro* deve ser levado em consideração.

As bactérias lácticas, entre elas o *Lb. acidophilus*, exibem efeito antagonístico contra várias outras bactérias usadas na fabricação de produtos lácteos fermentados. Joseph et al (34) indicaram linhagens de *L. acidophilus* que inibiram algumas das linhagens de bifidobactérias, *L. delbrueckii* sub-espécie *bulgaricus* e *Str. thermophilus* produzindo bacteriocinas ou ácidos orgânicos. Vinderola et al. (79) obtiveram resultados semelhantes e encontram

também, algumas linhagens de bifidobactérias e algumas linhagens de bactérias tradicionais do fermento láctico inibindo o *L. acidophilus*.

O efeito de inibição entre probióticos e bactérias tradicionais de leite fermentado, iogurte e outros produtos lácteos está baseado nos produtos do seu metabolismo, entre eles, o ácido láctico que apresenta efeito bacteriostático ou bacteriocida contra vários outros organismos, em especial os formadores de esporos. A produção de outras substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio e antibióticos está documentada. O *Lb. acidophilus* produz dois tipos de antibióticos de amplos espectros antibacterianos (29, 46).

3. Seleção de linhagens probióticas

Grande número de estudos tem sido publicado sobre as características de bons probióticos (27, 31, 46) e critérios para sua seleção (29, 46). As propriedades mais importantes incluem: (a) tolerância a acidez, ao suco gástrico humano e bile, o que é essencial para manter alto o número de células viáveis durante estocagem e durante passagem através do trato digestivo após a ingestão; (b) aderência a mucosa intestinal humana, o que é necessário para colonização temporária do trato gastro-intestinal; (c) produção de substâncias anti-microbianas, com concomitante inibição de patógenos, ou seja, efeito imuno-modulador mas não pró-inflamatório; (d) atividade antagonista contra patógenos como *Helicobacter pylori* e *Clostridium difficile* e (e) propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas.

Adicionalmente, as linhagens selecionadas devem gerar produto final de sabor e textura aceitáveis, etapa de seleção que só pode ser atingida se houver fabricação do produto.

As linhagens de probióticos devem permitir, ainda, a produção em larga escala. Na verdade, devido a lenta propagação de linhagens de probióticos no leite pode ocorrer que percam a competição para outras bactérias lácticas presentes. Assim, trabalhar em assepsia e usar fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para altas contagens iniciais de células viáveis. Estudos (28, 30) têm deixado claro que a produção de fermentos de

bifidobactérias e *L. acidophilus*, na forma individual e altamente concentrada liofilizada ou congelada, para inoculação direta no leite processado, oferece grande flexibilidade no controle das características sensoriais e microbiológicas desejadas (em termos de taxa de bifidobactéria e lactobacilos). Mais recentemente, a taxa de 1:1 de concentrados congelados de *Bif. lactis* e *L.acidophilus* tem sido considerada adequada para crescimento ótimo e acidificação havendo, de acordo com Gomes & Malcata (29), certo grau de simbiose entre estes microrganismos. Adicionalmente, é importante que linhagens selecionadas para fermentos DVS (Direct-Vat-Set) possam atingir concentrações acima de 10^{10} - 10^{11} ufc/g a fim de permitir o desempenho desejado na fabricação comercial de produtos lácteos fermentados. Além deste pré-requisito, o fermento produzido deve apresentar estabilidade aceitável (3 a 12 meses) após o processamento, durante a estocagem e distribuição. Inoculação direta de um produto lácteo com cultura concentrada congelada ($5 - 10 \times 10^{10}$ ufc/g) é recomendada a taxa de 0,05 – 0,1mg por litro de leite (29, 66).

A fabricação de produtos lácteos fermentados funcionais também requer que as linhagens de probióticos sejam seguras. A linhagem que se pretende usar deve, obviamente, não ser patogênica para usos tecnológicos. Existe o consenso de que as bactérias lácticas sejam microrganismos benignos, com registros de segurança e ausência de registros de participação em surtos de toxinfecções. Doses altas de linhagens probióticas (10^{12} ufc/g) não apresentaram toxicidade e, entre diferentes espécies do gênero *Bifidobacterium*, apenas *Bif. dentium* foi considerado como patogênico ao homem devido a sua participação em cáries dentais (29).

A seleção de linhagens tolerantes pode, também, ser uma solução para minimização do efeito adverso do oxigênio nos bio-produtos fermentados contendo *Bifidobacterium* spp. e *L.acidophilus*. Os mecanismos de suscetibilidade de *Bifdobacterium* ao oxigênio molecular tem interessado pesquisadores a várias décadas (25, 29). Apenas na década de 90 houve mais elucidações sobre as explicações metabólicas para esse fato. Shimamura et al. (1990 e 1992), citados em Gomes & Malcata (29), estudaram o uso de oxigênio por diversas espécies de bifidobactérias quando carboidratos eram metabolizados, esclarecendo haver envolvimento da NADH-oxidase na

utilização de oxigênio. Estes pesquisadores concluíram haver forte relação inversa entre a sensibilidade ao oxigênio e as atividades das enzimas NADH-oxidase e NADH-peroxidase. *Bif. infantis*, *Bif.breve* e *Bif.longum* foram mais tolerantes ao oxigênio do que *Bif. adolescentis*, sendo os primeiros mais recomendáveis a aplicações industriais.

Boa estabilidade e atividade dos probióticos são considerados pré-requisitos para a funcionalidade ótima. Contudo, vários estudos (46, 57) têm mostrado que probióticos não viáveis podem ter efeitos benéficos tais como modulação imune e ligação a substâncias carcinogênicas. Assim, para algumas linhagens de probióticos pode ser suficiente que elas cresçam bem durante as etapas iniciais da produção (para obter alto número de células no produto) mas elas não, necessariamente, precisam permanecer com boa viabilidade durante estocagem.

Mattila-Sandholm et al. (46) salientaram que os requerimentos funcionais dos probióticos devem ser estabelecidos por métodos *in vitro* e os resultados destes estudos devem ter correspondência nos estudos com humanos. Estes autores reportaram ainda que critérios tecnológicos, de segurança e de real benefício a saúde devem ser considerados na seleção de linhagens de probióticos. Vários aspectos tecnológicos têm sido considerados na seleção de probióticos, como boas propriedades sensoriais, resistência a fagos, viabilidade durante o processamento e estabilidade no produto e durante estocagem.

De acordo com Mattila-Sandholm et al. (46, 47) e Gomes & Malcata (29) a seleção cuidadosa das linhagens empregadas e o bom monitoramento através do processo de fabricação são necessários para controlar os produtos de metabolismo e o pH final.

4. Benefícios a saúde humana

Na natureza, as bactérias lácticas habitam dois nichos principais: as mucosas humanas e a de animais e os alimentos. Muitas espécies de bactérias lácticas são usadas comercialmente para a produção de leites fermentados, produtos cárneos e outros alimentos. Estes produtos incluem iogurtes, queijos,

leitelho, salames e pickles. A principal área atualmente é a de produtos lácteos fermentados (21).

Em geral, a composição da microbiota de uma parte específica do trato intestinal é determinada pelo ambiente físico (motilidade intestinal) e químico (mudanças no pH). Contudo, a dieta é o principal fator contribuinte para as diferenças individuais na microbiota intestinal. De acordo com Fondén *et al.* (21) o a população de anaeróbios nas fezes de indivíduos com dieta típica do ocidente é maior que a de pessoas vegetarianas e vivendo na Ásia ou África. Variações na microbiota intestinal podem aumentar os estados de doenças associadas a mudanças na fisiologia e motilidade intestinal. Entre estas doenças estão as diarreias, constipações, câncer intestinal, desnutrição calórico-proteica e encefalopatia hepática (22, 31).

Fondén *et al.* (21) afirmaram que produtos lácteos fermentados com bactérias lácticas têm sido usados no tratamento de doenças do trato gastrointestinal como intolerância a lactose, gastro enterites agudas, efeitos adversos da radioterapia, constipação, alergias alimentares, entre outras. Tal afirmação é feita, também, por vários autores como Charteris *et al.* (10), Gomes & Malcata (29), O'Brien *et al.* (54), Mattila-Sandholm *et al.* (46), Walker & Duffy (81), Shortt (74), Fooks *et al.* (22), Holzapfel & Schillinger (31); Lourens-Hattingh & Viljoen (43), entre outros. De acordo com Fondén *et al.* (21), estas doenças estão associadas a distúrbios na microbiota intestinal e vários graus de inflamação da mucosa intestinal, levando ao aumento da permeabilidade intestinal.

Ao usar leites fermentados ou outros produtos lácteos contendo probióticos, o objetivo tem sido modificar a microbiota intestinal e os sistemas de barreiras do intestino beneficiando, assim, a saúde do hospedeiro. Três modos para melhorar a microbiota são: o uso de probióticos, de prebióticos e de simbióticos (21, 22, 31, 81).

Os aspectos nutricionais e benéficos a saúde de alimentos funcionais, que incorporam probióticos, têm recebido constante atenção. Apesar dos muitos estudos sobre os aspectos nutro-farmacêuticos benéficos das bactérias probióticas, os resultados obtidos são muito variáveis e, as vezes, inconsistentes com outros. Assim, ainda faltam evidências inequívocas para

alguns dos benefícios o que torna mais difícil de se estabelecer os “apelos à saúde” (health claims). Para eliminar estes problemas esforços têm sido feitos no mundo todo para organizar racionalmente as futuras pesquisas usando bases mais claras e confiáveis (por exemplo através de melhor planejamento experimental, aleatorização e controle por placebo, estudos “doublé-blind”) e explorando métodos validados estatisticamente, com espeial ênfase na integridade intestinal e modulação imunológica. Também tem ocorrido aumento do número de estudos de colonização e dose-resposta (29).

Os benefícios nutricionais dos probióticos têm sido mais estudados em produtos lácteos fermentados com bifidobactérias e lactobacilos. De acordo com Gomes & Malcata (29), estes produtos contêm grande variedade de compostos dependendo do tipo de leite usado (leite de vaca, de ovelha, de cabra), do tipo de microrganismos adicionados (e suas atividades bioquímicas específicas) e dos processos de fabricação empregados. Eles são caracterizados por níveis mais baixos de lactose residual e níveis mais altos de aminoácidos livres, em relação ao leite comum, além da presença de certas vitaminas. Além disto, os leites fermentados pelas bifidobactérias contêm, preferencialmente, mais ácido láctico L(+) (que é mais facilmente metabolizado pelos seres humanos que o ácido láctico D -). O ácido láctico L(+) absorvido no intestino é usado como fonte de energia (21).

Rasic & Kurmann (1983), citados em Gomes & Malcata (29), e Tamime *et al.* (76) reportaram a síntese de ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, piridoxina e vitamina K por *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias. Estes autores também mencionaram que estas substâncias são lentamente absorvidas pelo corpo. As vitaminas do complexo B são freqüentemente obtidas como ingredientes naturais de alimentos; assim, a adição de bifidobactérias a dieta ajudará a atingir os níveis diários recomendáveis destes nutrientes. A biodisponibilidade de minerais como cálcio, zinco, ferro, manganês, cobre, e fósforo para o hospedeiro, pode ser melhorada pelo consumo de produtos lácteos fermentados contendo bifidobactérias devido o abaixamento do pH gástrico (o que facilita a ionização destes minerais, pré-requisito para a absorção) e melhora a digestibilidade das proteínas.

A literatura científica é rica em mostrar os benefícios a saúde vinculados ao consumo de produtos lácteos fermentados e probióticos (lactobacilos, bifidobactérias). O assunto vem sendo seriamente estudado por muitos pesquisadores, entre eles, tem-se: Bhutta *et al.* (9), Gendrel *et al.* (24), Martini *et al.* (45), Ouwehand *et al.* (58), Micanel *et al.* (50), Nizami *et al.* (53), Onwulata *et al.* (55), Pochart *et al.* (61), Saarela *et al.* (68), Lourens-Hatting e Viljoen (43), Fondén *et al.* (21).

4.1. Efeitos nos distúrbios intestinais e infecções intestinais

O epitélio intestinal intacto e a microbiota normal representam barreira a movimentação de bactérias patogênicas, antígenos e outras substâncias do lúmen intestinal para o sangue. Em pessoas saudáveis esta barreira é estável protegendo o hospedeiro e assegurando o funcionamento intestinal normal. Quando a microbiota normal ou as células epiteliais estão prejudicadas, como nos casos desencadeados por radiações, tratamentos químicos diversos (antibióticos, quimioterapia), ingestão de antígenos ou patógenos, a alteração da permeabilidade facilita a invasão sanguínea por patógenos, antígenos estranhos e outras substâncias prejudiciais. Várias revisões na literatura sugerem o uso de probióticos no tratamento de desordens intestinais como diarreia aguda em crianças (9) causada por rotavírus ou bactérias, alergias alimentares e desordens do cólon causadas por radioterapia pélvica e associadas a câncer de cólon (21, 22, 29, 43, 68). Em todos estes estados de desequilíbrio, a alteração da microbiota, a mudança da capacidade de barreira do intestino e diferentes processos inflamatórios estão presentes, oferecendo oportunidade para o uso de bactérias probióticas não só para o tratamento mas, para a prevenção destas doenças.

4.2. Potencial de atividade anti-tumoral

A microbiota do cólon, de acordo com Fondén *et al.* (21) e Gomes&Malcata (29), têm-se mostrado envolvida nos processos carcinogênicos. Este efeito é mediado por enzimas microbianas tais como β -glucuronidase, β -glucosidase, nitroreductase e uréase, que convertem pró-carcinogênicos em carcinogênicos. Estudos como os de Mital & Garg (51) e

Kurmann & Rasic (1991), citados em Gomes & Malcata (29), mostraram que algumas linhagens de *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* são capazes de fazer decrescer o nível de enzimas responsáveis pela ativação de alguns pró-carcinógenos e, conseqüentemente, diminuir o risco de desenvolvimento de tumores.

4.3. Potencial de ação hipocolesterolêmica

Estudos indicam redução estatisticamente significativa no colesterol sérico durante o consumo de largas doses (680 a 5000ml/d) de alguns produtos lácteos fermentados, sendo a teoria postulada para este efeito hipocolesterolêmico a presença de ácidos orgânicos como o ácido úrico, ácido orótico e ácido hidroximetilglutárico, os quais inibem a síntese de colesterol (29, 58). Infelizmente, estes dados não permitem extrapolação para condições mais realísticas de consumo (as doses usadas são excessivamente altas). Também se deve ter cuidado com estudos realizados em animais como porcos e ratos sobre a ingestão de probióticos e sua ação hipocolesterolêmica pois há diferenças na regulação do metabolismo destes animais e do homem.

Segundo Fondén et al. (21), a importância dos microrganismos probióticos em baixar o colesterol sérico e reduzir riscos de doenças coronarianas e arteriosclerose é o objetivo de várias pesquisas e, até o presente, requer mais investigações.

A Tabela 1 apresenta os principais efeitos potenciais benéficos a nutrição e saúde dos alimentos funcionais contendo probióticos.

Tabela 1. Potenciais benefícios nutricionais e a saúde dos alimentos funcionais contendo probióticos (adaptada de Gomes & Malcata, 1999)

Efeitos benéficos	Possíveis causas e mecanismos
Melhora da digestibilidade	Quebra parcial de proteínas, gorduras e carboidratos
Melhora do valor nutricional	Altos níveis de vitaminas B e certos aminoácidos livres (metionina, lisina, triptofano)
Melhora da utilização da lactose	Redução de lactose no produto e maior disponibilidade de lactase
Ação antagonística em patógenos entéricos	Desordens como diarreia, colites, diverticulites controladas por acidificação, inibidores microbianos, prevenção da adesão de patógenos
Colonização do intestino	Sobrevivência a acidez gástrica, resistência a lisozima e a baixa tensão superficial do intestino, aderência a mucosa intestinal, multiplicação no trato intestinal, modulação imunológica
Efeito anti-carcinogênico	Conversão de compostos carcinogênicos a compostos inócuos. Ação inibitória contra alguns tipos de câncer, em particular os do trato gastrointestinal pela degradação de pré-carcinógenos, redução de enzimas promotoras de processos cancerígenos e estimulação do sistema imune
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese de colesterol. Uso de colesterol por assimilação e precipitação com sais biliares deconjugados
Modulação imunológica	Melhora a formação de macrófagos, estimula a produção das células supressoras e de γ -interferon

Os estudos sobre a efetividade de bifidobactérias e *Lb. acidophilus* em conferir os benefícios listados apresentam dados controversos, ora favoráveis a ingestão de alimentos com estes microrganismos, ora sem resultados positivos. Para exemplificar pode-se citar o trabalho de Ibrahin e Bezkorovainy (32), que investigaram a produção de bacteriocinas por 5 linhagens de *Bifidobacterium* (*Bifid. infantis*, *longum*, *bifidum* e *thermophilum*), usando *E. coli* como patogênico padrão, e não detectaram a presença dessas substâncias com a metodologia empregada. Tamime *et al.* (76) apontaram a falta de evidências

diretas dos benefícios a saúde de pessoas saudáveis, embora as vendas de “bio-leites” (bio-milks) e/ou “bio-iogurtes” (bio-yoghurts) tenham aumentado. O aumento nas vendas, por sua vez, reflete a busca pelo consumidor de produtos com benefícios a saúde em seus apelos.

5. A problemática de quantificação seletiva de probióticos em microbiotas mistas com bactérias lácticas

Atualmente, muitos produtos lácteos contêm bifidobactérias e *L. acidophilus* além de *Str. thermophilus*. Um parâmetro importante no desenvolvimento de produtos lácteos fermentados contendo probióticos e nos programas de qualidade assegurada das indústrias de alimentos e institutos de pesquisa é a capacidade de quantificar e diferenciar as células viáveis destes organismos (72). Adicionalmente, tais produtos devem atender a padrões de legislação, os quais estabelecem contagens mínimas de células viáveis que precisam ser determinadas (7, 8, 17).

Há necessidade de métodos simples e confiáveis para enumeração de rotina, tanto de *Bifidobacterium* sp. quanto de *L. acidophilus*, como também dos organismos dos fermentos tradicionais. Estas quantificações são importantes para determinar as contagens iniciais de bactérias probióticas após a fabricação do produto, para verificar a viabilidade destas células durante a estocagem refrigerada e, também, no produto na cadeia de distribuição (43).

O monitoramento das quantidades e da sobrevivência de linhagens de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* em iogurtes probióticos foi, de acordo com Lourens-Hattingh & Viljoen (43), negligenciada no passado pela falta de meios seletivos viáveis para a enumeração. A escolha final do meio e do método deve considerar o tipo de alimento, as espécies ou linhagens a se enumerar e/ou isolar, bem como a natureza dos gêneros competidores. Assim, não se deve esperar, segundo Shah (72), Roy (65) e Lourens-Hattingh & Viljoen (43) que os meios seletivos ou diferenciais funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse na situação.

Os meios de cultura para enumeração de bactérias lácticas em bioiogurtes podem ser divididos, segundo Lourens-Hattingh & Viljoen (43), em três grupos: (a) meios gerais que permitem contagem total de colônias sem diferenciá-las em gênero ou espécie, como por exemplo o ágar Man Rogosa Sharpe (MRS); (b) meios formulados para contar seletivamente um gênero, como por exemplo o ágar Neomicina-Ácido Nalidíxico-Cloreto de Lítio (NNLP) para isolamento de *Bif. bifidum* ou o ágar M-17, para *Str. thermophilus*; (c) meios diferenciais que permitem a enumeração de quatro tipos de bactérias através de características visuais distintas (cor e forma da colônia), como por exemplo o ágar Triptona-Proteose-Peptona-Yeast extract com corante azul da Prússia (TPPY agar).

Vários meios foram sugeridos na literatura para enumeração de *Str. thermophilus*. Entre eles está o ágar ST utilizado por Dave & Shah (15) e, também, neste trabalho. O ágar Lee empregado, inicialmente, na enumeração de bactérias do fermento de iogurtes (*Str. thermophilus* e *L. delbrueckii* sub-esp. *bulgaricus*) foi sugerido por Lee et al. (41). Vinderola et al. (80) empregaram o ágar leite desnatado (skim milk agar SMA) para enumerar *Str. thermophilus* e *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus*. Medina & Jordano (49), Rybka & Kailasapathy (66) e Davidson et al. (17) utilizaram ágar M17 para enumeração de *Str. thermophilus* em produtos lácteos fermentados contendo *Str. thermophilus* e/ou *L. delbrueckii* sub-esp. *bulgaricus* e probióticos. Mas, Karagül-Yücerr et al. (35) empregando o mesmo ágar M17 na enumeração de *Str. thermophilus* em iogurtes carbonatados contendo *L. acidophilus* e *Bif. longum* contudo, reportaram crescimento de *L. acidophilus* no meio para contagem de *Str. thermophilus*. Shah (72), Charteris et al (10) e Lourens-Hattingh & Viljoen (43) apresentaram revisões de meios de culturas seletivos, diferenciais e gerais para enumeração de bactérias tradicionais do fermento láctico e bactérias probióticas. Vinderola & Reinheimeir (79) estudaram o desempenho de vários meios existentes para enumeração de *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* e bactérias do iogurte.

Por sua vez, há vários meios sugeridos para a enumeração diferencial de *Bifidobacterium* na literatura, como os propostos por: Samona & Robinson (70), Lapierre et al. (39); Rada & Koc (62); Vinderola & Reinheimeir (79); Dave

& Shah (15); Payne *et al.* (59); Ghoddusi & Robinson (26); Shah (72); Charteris *et al* (10); Lankaputhra *et al* (38), entre outros pesquisadores. Shah (73) relatou o crescimento de *Str. thermophilus* no ágar LP-MRS nas concentrações de inibidores sugeridos por Lapierre *et al.* (39), situação também verificada pelos autores deste trabalho.

Alguns dos meios de cultura para enumeração seletiva de bifidobactérias na presença de bactérias lácticas são formulados usando muitos ingredientes. Alguns dos agentes inibitórios destes meios precisam ser esterilizados por filtração, o que os torna meios de difícil preparo, envolvendo muito tempo do analista na sua elaboração. Meios que se encaixam nestas características são: NPLN-MRS (49), NNL-MRS (79, 81), NKB-MRS (2) e OG-MRS. Há, por outro lado, meios como o ágar LP-MRS (cloreto de Lítio e Propionato) (39, 81) que podem ser formulados mais facilmente, visto que seus ingredientes não precisam ser esterilizados por filtração, em separado dos demais ingredientes.

Vinderola & ReinHEMEIR (79); Dave & Shah (15); Ghoddusi & Robinson (26) e Lankaputhra *et al* (38) são alguns dos pesquisadores que sugeriram ou estudaram meios diferenciais e/ou seletivos para quantificação de *L. acidophilus*. Vinderola & ReinHEMEIR (80) estudaram os seguintes meios de cultura para enumeração de *L. acidophilus*: ágar SM (skim milk); ágar MRS (man rogosa sharpe) tradicional, ágar MRS modificado com galactose, com trealose, ágar MRS adicionado de sais inibitórios e antibióticos (NPNL-MRS, NNL-MRS, NKB-MRS, Bile,MRS, OG-MRS); ágar M17 tradicional e modificado com galactose. Dave & Shah (15) estudaram o ágar MRS-salicina e MRS-sorbitol para enumeração seletiva de *L. acidophilus*. Ghoddusi & Robinson (26) avaliaram o ágar TPY- PB (tryptose proteose peptona prussian blue) para contagem diferencial de *L. acidophilus* em conjunto com *Str, thermophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus*. Lankaputhra *et al* (38) avaliaram meios para enumeração seletiva de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp e indicaram o ágar Maltose-MRS para quantificação de *L. acidophilus* e o ágar NNLP-MRS para quantificação de *Bifidobacterium* sp.

Vinderola *et al.* (80) estudando a sobrevivência da microbiota probiótica de iogurtes na Argentina, relataram que ao usar o ágar Bile-MRS na

enumeração de *L. acidophilus* era necessária a incubação em aerobiose, a fim de restringir o crescimento de *Bifidobacterium*. O ágar LS para seleção de lactobacilos (Lactobacillus Selection Agar) como meio seletivo para *Lb. acidophilus* foi estudado por Vinderola & Reinhemir (79) que citou seu uso por Speck (1978).

6. Aspectos tecnológicos

As espécies mais freqüentemente empregadas na fabricação de produtos lácteos probióticos são originárias do intestino de humanos porque, de modo geral, se aceita que estas espécies são mais adaptadas as necessidades fisiológicas do hospedeiro do que linhagens selvagens ou que estão presentes no intestino de outros animais. As linhagens de origem humana incluem: *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum*, *Bif. breve*, *Bif. infantis*, *Bif. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *ramnosus* e *Enterococcus faecium*. É importante lembrar que cada linhagem dentro de uma mesma espécie exibe comportamento único quanto a taxa de crescimento, taxa metabólica, atividade proteolítica e promoção de sabor. Conseqüentemente, o gerenciamento de tais fatores através de tecnologias desenvolvidas “sob medida” (tailored manufacturing) permitirá que essas espécies encontrem várias aplicações industriais, com sucesso. Casos de produtos lácteos fermentados por bifidobactérias de origem animal também são reportados, sendo estas linhagens de mais fácil cultivo e capazes de suportar mais as condições adversas da produção industrial, como o baixo pH e presença de níveis detectáveis de oxigênio. Assim, o recentemente identificado *Bif. lactis* é um candidato promissor devido a sua boa tolerância a acidez e ao oxigênio (29).

A fabricação de produtos lácteos fermentados de alta qualidade contendo *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* é o maior desafio dos laticínios devido ao caráter sensível dos microrganismos nestes bio-produtos, o que aumenta as dificuldades naturalmente encontradas no desenvolvimento de novos produtos (exemplos: baixa palatibilidade e limitada aceitação pelo consumidor). As bifidobactérias, em particular, tendem a exibir fraco

crescimento e produção de ácido no leite o que, invariavelmente, requer longos períodos de fermentação, condições de anaerobiose, baixo potencial redox pelo menos na fase inicial de crescimento, adição de fatores de crescimento ao leite (28). Também, as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácido acético e láctico a taxa de 3:2; assim, crescimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma “a vinagre”, o que não é aceitável para os consumidores. O uso de culturas combinadas de bifidobactérias e *L. acidophilus* ou outras bactérias lácticas, como *L. delbruechii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, *Str. thermophilus* sozinho ou culturas aromáticas mesofílicas tem sido defendido como uma solução para tais problemas (79).

O aumento das taxas de crescimento, a redução do tempo de fermentação, a ausência de certos defeitos sensoriais e a melhora do valor nutricional dos produtos “bifidus” são vantagens que justificam os esforços no desenvolvimento de produtos. Contudo, efeitos adversos sobre a viabilidade de *Bifidobacterium* e *L. acidophilus* quando na presença de outras bactérias lácticas tem sido reportados (16, 29).

Rasic & Kurmann (63) apresentaram estudos sobre a pós-acidificação de iogurte com e sem a adição de *Lb. acidophilus*, verificando que nos suplementados com esta bactéria os níveis de pós-acidificação foram menores que nos iogurtes sem adição, o que pode reduzir problemas de pós-acidificação, e conseqüente liberação de soro, durante estocagem e comercialização dos produtos.

Corre *et al.* (13) listaram também os motivos pelos quais os custos na aquisição das bifidobactérias são, em média, cinco vezes maiores que os dos demais fermentos normalmente usados. Entre estes motivos, predominaram: a dificuldade de manipulação (exigência de anaerobiose), o tempo de geração mais longo que dos demais fermentos e o alto preço dos meios para seu crescimento.

Segundo Lourens-Hattingh & Viljoen (43) *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. podem também ser cultivados separadamente antes da incorporação no “bio-iogurte” a fim de assegurar níveis desejados de culturas probióticas no produto final para o mercado varejista. Outro estudo que é de relevância para o processamento de leites fermentados é o de Dave & Shah

(16), que estudaram a sobrevivência de bactérias do iogurte e probióticas em embalagens plásticas e de vidro. Para as amostras estocadas nas embalagens de vidro, as contagens de bifidobactérias foram maiores em até 1,6 ciclos logarítmicos que as estocadas em plásticos. Shah (72) também reportou estudos onde há maior sobrevivência de bifidobactérias quando se faz desaeração do leite.

Vinderola et al. (79) realizaram estudos com várias linhagens de bactérias lácticas e probióticas e os efeitos de substâncias como sais, edulcorantes, açúcares, corantes, aromatizantes e sucos naturais de frutas sobre seus crescimentos. Verificaram que KCl, edulcorantes, alguns dos aromas e aromatizantes testados, nas concentrações usados no mercado, não influenciaram o crescimento das linhagens testadas. Observaram também que o efeito de sucos de frutas e de alguns compostos conjuntos corantes/aromatizantes sobre o crescimento era dependente das linhagens.

Segundo Tamime et al. (76), nos últimos anos na Europa, Estados Unidos e Leste Europeu os novos produtos lácteos fermentados têm apresentado as seguintes características: (i) incluem *Lactobacillus acidophilus* (A), *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus casei* subespécie *casei* biovar *shirota*, *Lactobacillus* linhagem GG (similar ao *Lactobacillus casei* sub-espécie *rhamnosus*), e/ou combinações destas com as bactérias do fermento tradicional; (ii) contêm linhagens de bactérias isoladas de humanos, que sejam capazes de sobreviver e crescer no trato intestinal, aderindo as células epiteliais do intestino; (iii) têm mais que 10^6 células viáveis por grama ou mililitro do produto.

Além dessas características, os produtos lácteos fermentados que se propõem trazer benefícios a saúde, devem ter ingestão semanal mínima de 300 a 400g e conter entre 10^5 e 10^7 ufc/g (63, 69, 72, 76). Tamime et al. (76) salientaram ainda que, possíveis desenvolvimentos nessas áreas envolvendo bifidobactérias incluem: (i) seleção de linhagens capazes de fermentar o leite dentro de um tempo aceitável; (ii) aplicações mais amplas desses nos laticínios; (iii) manipulação genética, se possível, para melhorar seu crescimento no leite e reduzir as grandes quantidades de ácido acético produzidas; (iv) como nem sempre os estudos *in vitro* podem ser relacionados

com os ensaios *in vivo*, ou os resultados de estudos com animais podem ser aplicados ao comportamento humano, melhoras no planejamento dos experimentos com humanos precisam ser conseguidas; (v) maiores envolvimento de profissionais da área médica no estudo de efeitos benéficos dos microrganismos terapêuticos e (vi) melhor fusão das pesquisas em bifidobactérias e maior colaboração entre cientistas, nutricionistas e tecnólogos dos diferentes países.

7. Demais ingredientes de leites fermentados: fibras

O valor nutricional e potencial terapêutico dos alimentos são características-chaves no desenvolvimento de novos produtos fabricados para consumidores que valorizam os benefícios à saúde que os alimentos podem trazer. O uso integrado de fibras e probióticos em leites fermentados constitui alimento funcional, visto que se encaixa nas definições deste tipo de alimento. No entanto, deve-se verificar os aspectos tecnológicos da elaboração de tais produtos. Segundo Fernández-García et al. (20), os constituintes da fibra dietética podem interagir com componentes dos alimentos durante o processamento, levando a mudanças na biodisponibilidade de nutrientes e na textura e sabor final do produto.

Além do grande interesse de introduzir bactérias vivas probióticas no cólon através de suplementação pela dieta, sabe-se também que o aumento do número de bactérias benéficas como as bifidobactérias no intestino pode ser conseguido com o uso de prebióticos, que são componentes da dieta não digeríveis que passam através do cólon e, seletivamente, estimulam a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis *in situ*. Devido ao potencial sinérgico entre probióticos e prebióticos, alimentos contendo combinações destes ingredientes são, frequentemente, referidos como simbióticos. Os prebióticos podem afetar o crescimento e sobrevivência de probióticos, influenciando o crescimento e metabólitos tanto de probióticos como do fermento. A interação entre os probióticos e os prebióticos *in vivo* pode ser favorecida pela adaptação dos microrganismos ao substrato

prebiótico antes do consumo. Isto pode resultar em vantagem competitiva para o probiótico se ele for consumido junto com o prebiótico (46). Há grande interesse na produção de oligômeros não digeríveis, que promovem o crescimento de bifidobactérias. Os oligômeros mais estudados são os galacto-oligômeros (rafinose, estaquiose) e os fruto-oligômeros (sintetizados ou hidrolisados de inulina). A aveia contém altas quantidades de fibras dietéticas fermentáveis, referidas como β -glucanos e arabinoxilanos. De acordo com JASKARI et al. (33) já está devidamente estabelecido que estas substâncias da aveia tem efeitos benéficos sobre o metabolismo de lipídios e glicose no intestino.

Nutricionalmente, o termo fibra é restrito ao material filamentoso dos alimentos. Os termos fibra dietética ou glicídios não aproveitáveis, segundo FRANCO (23), são nomes dados a todas as estruturas celulares de paredes vegetais que não são digeridas pelos sucos digestivos humanos, mas são parcialmente atacadas pelas bactérias do cólon, incluem celulose, hemicelulose, ligninas, ceras, gomas e mucilagens. O termo fibra crua, por sua vez, significa o resíduo heterogêneo restante de tratamentos sucessivos de alimentos de origem vegetal com álcalis e ácidos diluídos, sob condições especiais. De acordo com o referido autor, a celulose e hemicelulose são encontradas nos vegetais variando em quantidade e digestibilidade, sendo a celulose de alguns vegetais folhosos e do milho doce resistentes ao ataque bacteriano no cólon, e responsáveis por ação irritante em algumas pessoas. As fibras dietéticas têm a propriedade de aumentar a gordura fecal, isto é, reduzir a absorção de gordura pelo trato intestinal. As substâncias indigeríveis de leguminosas, como a soja, são ricas em fibra crua, conferindo apreciável motilidade intestinal (18).

As fibras podem ser classificadas, ainda, quanto ao seu efeito fisiológico em solúveis em água (pectinas, gomas e algumas hemiceluloses) e insolúveis (celulose, lignina e certas hemiceluloses). Entre os alimentos mais ricos em fibras insolúveis estão as verduras e os cereais e, segundo FRANCO (23), a aveia é um cereal rico em fibras solúveis, que retardam o esvaziamento gástrico e a velocidade do trânsito intestinal. As fibras insolúveis, por sua vez, aceleram o trânsito intestinal. Estes dois tipos de fibras sofrem ação

fermentativa das bactérias do cólon, sendo as insolúveis menos utilizadas pelos microrganismos. As fibras insolúveis ocasionam maior perda de cátions pelas fezes, sendo que a celulose se liga ao cálcio e a lignina exerce ação quelante nos ácidos biliares. De modo geral, ambos os tipos atuam reduzindo a taxa glicêmica em diabéticos insulino-dependentes ou os tratados com sulfoniluréias (22).

De acordo com Goldberg (27), a dieta rica em fibras dietéticas é protetora contra doenças como câncer de cólon, arterosclerose e hipercolesterolemia associada, diabetes, diverticulose, hipertensão e obesidade. Os dois tipos de fibras mais avaliados nos estudos clínicos para redução de colesterol e das concentrações de glicose no sangue são a fibra de aveia e a de soja. Também as gomas guar e fisilium têm apresentado resultados positivos na redução dos níveis sanguíneos destes constituintes. FERNÁNDEZ-GARCIA et al. (19) relataram que a quantidade diária de fibra dietética recomendada para um adulto é de 25 a 30g.

7.1. Oligossacarídeos

Os prebióticos identificados até o presente são carboidratos não digeríveis incluindo lactulose, inulina, e vários tipos de oligossacarídeos que fornecem uma fonte de carboidrato fermentável às bactérias benéficas do cólon (45). Alguns amidos também escapam a digestão completa durante a passagem através do intestino grosso e chegam ao cólon como fontes de carboidratos fermentáveis para as bactérias intestinais. Amidos granulares sintetizados por várias plantas são exemplos destes amidos resistentes, sendo incompletamente digeridos devido ao seu tamanho e conformação molecular (45).

Segundo Teuri *et al.* (82), os fruto-oligossacarídeos (FOS) são componentes dietéticos caracterizados recentemente, considerados prebióticos e fibra dietética, sendo assim chamados por terem frutose na sua constituição. Sendo fibras dietéticas, quando passam pelo cólon, melhoram seu funcionamento. Como prebióticos, são carboidratos que resistem a digestão e são fermentados no cólon. Os FOS têm sido estudados intensivamente na

última década, e muitos efeitos benéficos a saúde foram encontrados como a redução da constipação intestinal, da produção de substâncias tóxicas no intestino, do colesterol sérico total, da pressão sanguínea e dos níveis de glicose nos indivíduos diabéticos, além de aumentar o número de bifidobactérias no cólon.

Os galacto-oligosacarídeos (GOS) são compostos de unidades de lactose e galactose. São encontrados naturalmente no leite humano e, em menor quantidade, no leite de bovinos, tendo sido menos estudados que os FOS. No leite humano, os GOS atuam como fator bifido na manutenção da microbiota normal do intestino de crianças. Sai Prakash *et al.* (71) reportaram que os GOS são, com frequência, encontrados em produtos lácteos fermentados e hidrolisados onde há ação da β -galactosidase. Comercialmente são produzidos a partir da lactose por ação da β -galactosidase, onde os resíduos de galactose são unidos a lactose, em um fenômeno chamado transgalactosilação. Os GOS têm sido usados no Japão para ajudar na manutenção de boas condições gastrintestinais, uma vez que aumentam o número de bifidobactérias. Este aumento do número de bifidobactérias foi observado quando da ingestão diária de 10g de GOS, em jovens, e 2,5g em idosos. A supermultiplicação das bifidobactérias gerou alteração na composição da microbiota do cólon, com decréscimo na população de outras bactérias como *Bacteroides*, *Clostridium* e *Fusobacterium*. Há relatos de flatulência em um grupo de pessoas sob estudos, que ingeriram 10g de GOS por dia, mas outros estudos não reportaram o problema (71, 77). O estudo realizado por Teuri *et al.* (77) reportaram o aumento de sintomas gastrintestinais e da frequência fecal em adultos, consumindo 15g de GOS por dia.

7.2. Iogurtes adicionados de fibras

Fernández-García *et al.* (20) estudaram o efeito da adição de fibras de aveia ao iogurte, e comparando seu desempenho com os iogurtes não adicionados de fibras, apresentaram resultados importantes como o uso conjunto de bifidobactérias e linhagens típicas de iogurte, nesses iogurtes, reduzindo o crescimento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Estes

pesquisadores sugeriram o uso de bifidobactérias e *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* como fermentos e relataram que a porcentagem de etanol e outros compostos voláteis foi maior nos iogurtes contendo bifidobactérias.

Collins *et al.* (12) desenvolveram uma mistura de leite, batata doce, sacarose e gelatina, que foi fermentada com bactérias típicas do iogurte. A adição da batata, na forma de purê e de farinha, fez o teor de fibras e de vitamina A aumentar, e o teor de gordura diminuir, quando comparados aos teores do iogurte não adicionado de batata. Além disto, a batata forneceu fibra dietética e amido a formulação, que funcionaram como espessantes e estabilizantes. A dificuldade na elaboração do produto relatada pelos pesquisadores foi a obtenção de mistura homogênea da batata com o leite.

7.3. Soja e iogurtes

Tamime *et al.* (76) colocaram que a produção de produtos similares a iogurtes utilizando leite de soja (extrato hidrossolúvel de soja) é interessante em países com deficiências de proteína animal, como o Brasil, ou para a produção de iogurtes “vegetarianos”. Alguns autores já publicaram sobre a produção de produtos similares a iogurtes usando leite de soja, entre eles Maslov *et al.* (1990) citado em Tamime *et al.* (76), que elaboraram uma bebida de soja fermentada usando *Bifidobacterium* spp. e, em 16 horas de incubação a 37°C, havia 10^8 - 10^9 ufc/ml do microrganismo e 50g/l de ácido láctico. Tamime *et al.* (76) citaram avaliações das características de iogurtes elaborados com extrato hidrossolúvel de soja e leite bovino, feitos com linhagens de iogurtes, adicionados e não adicionados de *Bifidobacterium* spp. isolados de produtos comerciais.

7.3.1. Isoflavonóides da soja

Por volta de 60 anos atrás, cientistas da área de veterinária reportaram a presença, nos vegetais, de compostos estrogênicos que induziam a maturidade em animais imaturos ou interferiam nos processos reprodutivos normais. Nos nossos dias já foram encontrados compostos com atividade de estrógeno em mais de 300 plantas. Estes compostos foram definidos como o nome genérico

de fitoestrógenos. Poucas classes destes compostos estão hoje identificadas, estabelecidas e estudadas: fitoestrógenos bisfenólicos semelhantes a hormônios; os isoflavonóides genisteína e daidzeína; as coumestanas (coumestrol); as ligninas secoisolariciresinol (SECO) e matairesinol (MAT). Esses compostos são de grande interesse devido a sua atividade estrogênica, antiestrogênica, anticarcinogênica, anticancerígena, antiviral, antifúngica e antioxidante (48).

A família do reino vegetal mais abundante em fitoestrógenos é a *Leguminosae*. Das 13.000 espécies de legumes, apenas 20 são comumente consumidas pelos humanos. A soja e seus produtos têm atraído mais a atenção, dela já foram isolados isoflavonóides, fitoesteróis, inibidores de protease, hexafosfato inositol e saponinas. Um grande número de estudos tem sido realizado procurando por ligações entre os fitoestrógenos da soja, o metabolismo de hormônios sexuais, a atividade biológica, enzimas intracelulares, síntese de proteínas, ação de fator de crescimento, proliferação de células malignas e angiogênese, ao nível molecular, ao nível dos tecidos e ao nível dos organismos (48).

A genisteína é uma isoflavona que inibe o aparecimento e crescimento de tumores, aumentando seu período de latência, embora não atue sobre sua formação. Sobre este mecanismo de ação, contudo, há controvérsias. Mesmo assim, as isoflavonas vêm atraindo a atenção. Nos grãos de soja e produtos derivados as isoflavonas estão em concentrações que variam de 0,1 a 5mg/g, com valor médio de 3mg/g (3, 4, 30).

Coward *et al.* (14) analisando os grãos e a farinha de soja, por cromatografia líquida de alta resolução, encontraram ser igual o teor de genisteína dos dois. Os isoflavonóides da soja estão nos alimentos a base desta leguminosa, na forma de β -glucosídeos conjugados. Embora Barnes *et al.* (4), que examinaram grandes quantidades de produtos de soja, mostraram que os 6"-O-malonilglucosídeos são a principal forma dos isoflavonóides, com exceção do leite de soja integral e o tofu, que os apresentam apenas na forma de β -glucosídeos. O aquecimento da farinha de soja provoca aumento das quantidades de 6"-O-malonilglucosídeos conjugados. Ainda sobre as formas

sob as quais as isoflavonas aparecem nos grãos de soja, Eldridge (19) colocou as seguintes: glicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas.

Barnes (3) verificou que os índices de ocorrência de câncer de mama, próstata e cólon nas populações do sudeste da Ásia eram menores do que entre americanos e europeus do oeste, o que atraiu a atenção de médicos, epidemiologistas e grupos interessados em políticas de saúde pública. A dieta diferente destas populações foi relacionada, especificamente com as quantidades de soja ingeridas pelos asiáticos. Em alguns países do sudeste asiático o consumo variou, durante as pesquisas, de 35 a 54g de soja ou seus derivados (3, 14, 48).

8. Referências bibliográficas

1. ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**. v. 35, p. 171-176, 2002.
2. ARANY, C.B.; HACKNEY, C.R.; DUNCAN, S.E.; KATOR, H.; WEBSTER, J.; PIERSON, M.; BOLING, J.W.; EIGEL, W.N. Improved recovery of stressed Bifidobacterium from water and frozen yogurt. **Journal of Food Protection**. v. 58, n. 10, p.1142-1146, 1995.
3. BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **Journal of Nutrition**. v. 125, p. 777S-783S. 1995.
4. BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavonas and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 42, n. 8, p. 2466-2474. 1994.
5. BERNER, L.A.; O'DONNELL, J.A. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**. v. 8, p. 355 – 362, 1998.
6. BISTRÖM, M.; NORDSTRÖM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 372 – 379, 2002

7. BRASIL, M. A. A. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no **Diário Oficial da União** de 02 de janeiro de 2001, Seção I, págs 19 à 22. 2000.
8. BRASIL, M. A. A. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Instrução Normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Publicada no **Diário Oficial da União** de 08 de novembro de 2000, Seção I, págs 22 à 23. 2000.
9. BUTTHA, Z.A.; MOLLA, A.M. ISSANI, Z.; BADRUDDIN, S. HENDRICKS, P. SNYDER, J.D. Nutrient absorption and weight gain in persistent diarrhea: comparison of a traditional rice-lentil/yogurt/milk diet with soy formula. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 18, n. 1, p. 45-52, 1994.
10. CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**. v. 35, n. 1, p. 1-27, 1997.
11. CHRISTIANSEN, P.S.; EDELSTEN, D.; KHRISTIANSEN, J.R.; NIELSEN, E.W. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed populations. **Milchwissenschaft**. v. 51, n. 9, p. 502-504, 1996.
12. COLLINS, J.L.; EBAH, C.B.; MOUNT, J.R.; DRAUGHON, F.A.; DEMOTT, B.J. Proximate, nutritional and microbiological analyses of milk-sweet potato mixtures fermented with yogurt bacteria. **Journal of Food Science**. v. 56, n. 3, p. 682-684, 1991
13. Corre, C.; Madec, M.N.; Boyaval, P. Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 53, p. 189-194. 1992.
14. COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian Diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 41, n. 11, p.1961-1967. 1993.

- 15.DAVE, R.J.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* sub-specie *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 9, p.1529-1536, 1996.
- 16.DAVE, R.J.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. v. 7, s/ n. 11, p. 707– 715. 1997.
- 17.DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic cultures survival and implications fermented frozen yoghurt characteristics. **Journal Dairy Science**. v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.
- 18.DEETH, H.C. Handbook of dietary fiber: an applied approach. Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA. 1987, 472 pgs.
- 19.ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 30, n. 2, p.353-355. 1982.
- 20.FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MCGREGOR, J.U.; TRAYLOR, S. The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, s/n., p. 655-663. 1998.
- 21.FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin FIL-IDF** (Belgium) International Dairy Federation. n. 352, p. 5 – 30. 2000.
- 22.FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.
- 23.FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. 9ª edição. 1992
- 24.GENDREL, D., DUPONT, C., RICHARD-LENOBLE, D., GENDREL, C., CHAUSSAIN, M. Feeding lactose-intolerant children with a powdered fermented milk. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. v. 10, n.1, p. 44-46. 1990.
- 25.GARRO, M.S.; DE VALDEZ, G.F.; OLIVIER, G.; DE GIORI, G.S. Starter culture activity in refrigerated fermented soymilk. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 7, p. 808 – 810, 1999.

26. GHODDUSI, H.B.; ROBINSON, R.K. Enumeration of starter cultures in fermented dairy products. **Journal of Dairy Research**. v. 63, n. 1, p. 151-158, 1996.
27. GODWARD, G.; SULTANA, K.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; ARUMUGASWAMY, R.; REYNOLDS, N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 8, p. 441 - 445, 2000.
28. GOLDBERG, I. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. Editora Cahpman & Hall, New York. 1994. 571pgs.
29. 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, n. 4/5, p. 139-157, 1999.
30. GOODERHAM, M.J., ADLERCREUTZ, H., OJALA, S.T., WÄHÄLÄ, K. HOLUB, B.J. A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effect on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. **Journal of nutrition**. v. 126, n.8, p.2000-2006. 1996.
31. HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**. v.35, n. 2/3, p. 109 – 116, 2002.
32. IBRAHIM, S.A.; BEZKOROVAINY, A. Inhibition of *Escherichia coli* by *Bifidobacteria*. **Journal of Food Protection**. v. 56, n. 8, p. 713-715. 1993.
33. JASKARI, J.; KONTULA, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, s/ n., p. 175 – 181, 1998
34. JOSEPH, P.J.; DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Antagonism between yoghurt bacteria and probiotic bacteria isolated commercial starter cultures, commercial yoghurts and probiotic capsule. **Food Australia**. v. 50, n. 1, 20-23, 1998.

35. KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J.C.; WHITE, C.H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. **Journal Dairy Science**. v. 84, n.3, p. 543 – 550, 2001.
36. KARAGÜL-YÜCEER, Y.; COGGINS, P.C.; WILSON, J.C.; WHITE, C.H. Carbonated yoghurt: sensory properties and consumer acceptance. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 7, p. 1394-1398, 1999.
37. KAUFMANN, P.; PFEFFERKORN, A.; TEUBER, M.; MEILE, L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-Targeted probes by colony hybridization and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, n. 4, p. 1268-1273. 1997.
38. LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. **Food-Australia**. v. 48, n. 3, p. 113-118, 1996.
39. LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium-chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p.1192 - 1196, 1992.
40. LEE, Y-K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L.: In Handbook of Probiotics (Ed. John Wiley and Sons, Inc.), 1-22, 67-190 New York (1999).
41. LEE, S.V.; VEDAMUTHU, E.R.; WASHAM, C.J.; REINBOLD, G.W. An agar medium for differential enumeration of yoghurt starter bacteria. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 37, n. 5, p. 272 – 276, 1974.
42. LERAYER, A.L.S.; CARVALHO, A.F.; BUCIONE, A.; KESTENER, B.M.A.C.; MOSQUIM, M.C.A.; NUTTI, M.R.; SIMÃO, P. Nova legislação de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais, *diet*, *light* e enriquecidos. Fonte Comunicações e Editora. São Paulo. 1998. 212 pgs.
43. LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 1, p. 1 – 17, 2001.
44. MARA, D.D.; ORAGUI, J.J. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 55, s/n., p.349-357. 1983.
45. MARTINI, M.C., KUKIELKA, D., SAVAIANO, D.A. Lactose digestion from yogurt: influence of a meal and additional lactose. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 53, n.5, p.1253-1258. 1991.

46. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.
47. MATTILA-SANDHOLM, A.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 1, p. 1-17, 1999.
48. MAZUR, W.M.; DUKE, J.A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S. ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**. v. 9, s/ n., p. 193-200. 1998.
49. MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **Journal Food Protection**, v. 56, n. 8, p. 731-733, 1994.
50. MICANEL, N., HAYNES, I.N., PLAYNE, M.J. Viability of probiotic cultures in commercial Australian yogurts. **The Australian Journal of Dairy Technology**. v. 52, n.4, p. 24-27. 1997.
51. MITAL, B.K.; GARG, S.K. Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. **Food Reviews**. V.8, s/ n., p. 347-389. 1992.
52. MOLYNEAUX, M.; LEE, C.M. The U.S. market for marine nutraceutical products. **Food Technology**. v. 52, n.6, p.56-57. 1998.
53. NIZAMI, S.Q., BHUTTA, Z.A., MOLLA, A.M. Efficacy of traditional rice-lentil-yogurt diet, lactose free milk protein-based formula and soy protein formula in management of secondary lactose intolerance with acute childhood diarrhoea. **Journal of Tropical Pediatrics**. v. 42, n. 3, p. 133. 1996.
54. O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 12, p. 418 – 424, 1999.
55. ONWULATA, C.I., RAO, D.R., VANKINENI, P. Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 49, n. 6, p.1233-1237. 1989
56. OTERO, M.; RODRIGUEZ, T.; FERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ, J.; LIMA, L.B. Helado de yogur. **Alimentaria**, n. 278, p. 113-115, 1996.

57. OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**. v. 8, s/ n., p. 749 – 758, 1998.
58. OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**. v. 9, s/ n., p. 43 – 52, 1999.
59. PAYNE, J.F.; MORRIS, A.E.J.; BEERS, P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp in milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 2, p. 853-858, 1999.
60. PRASAD, J.; GIL, H.; SMART, J.; GOPAL, P.K. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**. v. 8, s/ n., p. 993 – 1002. (1998)
61. POCHART, P. DEWIT, O., DESJEUX, J-F., BOURLIOUX. Viable starter culture, β -galactosidase activity, and lactose in duodenum after yogurt ingestion in lactase-deficient humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 49, n. 5, p.828-831. 1989
62. RADA, V., KOC, J. The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. **Milchwissenschaft**. v. 55, n. 2, p. 65-67. 2000.
63. RASIC, J.L.; KURMANN, J.A. Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Published by the authors. 1978. 428 pg.
64. ROBERTS, C.M.; FETT, W.F.; OSMAN, S.F.; WIJEY, C.; O'CONNOR, J.V.; HOOVER, D.V. Exopolysaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 79, s/n., p.463-468. 1995.
65. ROY, D. Media for isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, s/ n. 167 – 182, 2001.
66. RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 7, p. 390 – 394, 1997.
67. RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8/9. p. 839-850, 1996.

68. SAARELA, M.; LÄHTEENMÄKI, L.; CRITTENDEN, R.; SALMINEN, S.; MATTILA-SANDHOLM, T. Gut barrier and health foods – the European perspective. **International Journal Food Microbiology**, v. 78, s/ n., p. 99 – 117, 2002.
69. SAMONA, A., ROBINSON, R.K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria en fermented milks. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 47, n. 2, p. 58-60. 1994.
70. SAMONA, A., ROBINSON, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 44, n.3, p. 64-66. 1991.
71. SAI PRAKASH, B.; SUYAMA, K.; ITOH, T.; ADACHI, S. Structure elucidation of major galacto oligossacharides formed by growing culture of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 37, p. 334-337. 1989
72. SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894 – 907, 2000.
73. SHAH, N.P. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milks products: a review. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 2, p. 72-76, 1997.
74. SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 12, p. 411-417, 1999.
75. TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. Fermented milks and their trends. Part II. Technological aspects. **Journal of Dairy Research**. v. 55, s/n., p. 281-307. 1988.
76. TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E., ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**. v. 62, n. 1, p. 151-187, 1995.
77. Teuri, U.; Korpela, R.; Saxelin, M.; Montonen, L.; Salminen, S. Increased fecal frequency and gastrointestinal symptoms following ingestion of galacto- oligosaccharide -containing yogurt. **Journal of Nutrition Science and Vitaminology**. v. 44, s/ n., 465-471. 1998.
78. VELAZQUEZ, M.; FEIRTAG, J. M. Isolation e partial physiological characterization of commercial strains of bifidobacteria. **Journal of Food Protection**. v. 60, n. 5, p. 537-543. 1997.

79. VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal Dairy Science**. v. 85, n. 4, p. 721-729, 2002.
80. VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 33, p. 97-102, 2000.
81. VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.
82. WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal of Nutrition and Biochemistry**. v.9, n. 12, p. 668 – 675. 1998.

CAPÍTULO II

ENUMERAÇÃO DE *Streptococcus thermophilus* NA PRESENÇA DE *Bifidobacterium longum* E *Lactobacillus acidophilus* – EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ATMOSFERA E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO

ENUMERAÇÃO DE *Streptococcus thermophilus* NA PRESENÇA DE *Bifidobacterium longum* E *Lactobacillus acidophilus* – EFEITO DAS CONDIÇÕES DE ATMOSFERA E TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO¹

ENUMERATION OF *Streptococcus thermophilus* IN THE PRESENCE OF *Bifidobacterium longum* AND *Lactobacillus acidophilus* – EFFECT OF INCUBATION TEMPERATURE AND ATMOSPHERIC CONDITIONS¹

The enumeration of *Streptococcus thermophilus* (Str) in the presence of *Lactobacillus acidophilus* (LAC) and *Bifidobacterium longum* (BL) on ST agar at 37°C/48h/aerobically and on Lee's agar at 37°C/48h/microaerophilic were shown to be non-selective for Str. ST agar allowed the growth of LAC and Lee's agar allowed the growth of LAC and BL. ST agar (aerobically) and Lee's agar (aerobically and under microaerophilic) were incubated at 30, 35, 37 and 45°C. At 30 and 45°C LAC was inhibited with ST agar and either LAC and BL with Lee's agar. The recovery of Str was efficient under all conditions. The tests were carried out using isolated and mixed suspensions of these microorganisms. Counts were also made with Str fermented skim milk with added probiotics. The ability of each medium to inhibit the organisms was also tested.

A enumeração de *Str. thermophilus* (Str) na presença de *L. acidophilus* (LAC) e *Bif. longum* (BL) em ágar ST (*Streptococcus thermophilus*) a 37°C/ 48h em aerobiose e em ágar Lee a 37°C/48h em microaerofilia mostrou-se não seletiva para *Str. thermophilus*. O ágar ST permitiu o crescimento do LAC e o ágar Lee permitiu o crescimento de LAC e BL. O ágar ST e o ágar Lee foram incubados a 30, 35, 37 e 45°C, o primeiro apenas em aerobiose e, o segundo, em aerobiose e microaerofilia. A 30 e 45°C, o LAC foi inibido no ágar ST e LAC e BL no ágar Lee. A recuperação de Str foi eficiente em todas as condições. Os ensaios foram realizados com suspensões isoladas e mistas dos microrganismos. Foram realizados experimentos com leite fermentado adicionado dos probióticos liofilizados. A capacidade de cada meio de inibir os microrganismos também foi verificada.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Milchwissenschaft, na qual foi aceito para publicação.

1. INTRODUCTION

At the beginning of the 20th century, Elie Metchnikoff suggested that the consumption of fermented milk could prolong life. Since then, interest has been shown in the microorganisms of these products, especially in bifidobacteria and *Lactobacillus* because of their capacity to treat or prevent diseases. There is considerable information in the literature about their function in human health (3, 2, 9, 16, 12, 19, 10, 24). Today many milk products contain such microorganisms (8, 17, 23, 16, 15, 18, 22, 5, 19, 25) and many may contain *Streptococcus thermophilus* (Str), *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (9, 23, 17, 25, 13, 14, 16).

An important parameter in product development and quality assurance is the ability to differentiate and determine the viable count of these organisms (22) and, in addition, they must obey the legal standards, which establish minimal viable cell counts (1, 8). Different media have been suggested in the literature for the enumeration of Str (15, 6, 23, 8, 3, 26, 27, 4, 14, 20).

The aim of this research was to select a methodology for Str enumeration in the presence of LAC and BL using a model system consisting of microbial suspensions in peptone water (both alone and mixed) as well as in Str fermented milk.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1.Material: Lactose, bacto peptone and tryptone (Difco, USA); agar, bromocresol purple, K₂PO₄ and sucrose (Merck, Ge); yeast extract (BioBrás, Brazil); CaCO₃ (Ecibra, Brazil); Microaerobac® (Probac®, Brazil); skim milk powder (Molico, Nestle, Brazil). Freeze dried cultures of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum* were used, codified by the supplier, respectively, as TA559, LAC4 and BL (Ezal®, Texel-Rhodia Food). ST and Lee's agars were prepared, respectively, according to DAVE and SHAH (6) and LEE *et al.* (15).

2.2.Microbial suspensions: Isolated suspensions of Str (ISST), LAC (ISLA) and BL (ISBL) were prepared with 1 unit of each freeze dried culture (10¹⁰ to

10¹¹ cell/unit), rehydrated in 9 ml 0.1% peptone water. The mixed suspension (MIX 3), was obtained by mixing equal volumes of ISST, ISLA and ISBL.

2.3.Fermented milks: Sterile (115°C/10min) reconstituted (11% total solids) skimmed milk was used for the mother cultures; fermented milks were prepared with 12% TS. The mother culture was prepared by inoculating sterile milk (10 ml test tube) with a loopful of freeze-dried Str, fermented (42°C) to coagulation and cooled. The fermented milk (FM) (300 ml) was prepared by inoculating sterile milk with 2% mother culture, fermenting (42°C) to pH 4.7 and chilling to 5°C. One unit of each freeze-dried culture (BL and LAC) was added to 100g of FM for production of fermented milk with added probiotic (FMPA) with 10⁸ cells/g of each microorganism.

2.4.Enumeration: The ISST, ISLA, ISLB, MIX3, FM and FMPA were diluted in 0.1% peptone water, pour plated in ST agar (aerobiosis) and spread plated on Lee's agar (aerobiosis and microaerophiliae) and incubated at 30, 35, 37 and 45°C. The microaerophilic atmosphere was generated by the Probac® system.

2.5. Statistical analyses: The experimental data was analyzed by the general Linear Model procedures of the Statistical Analysis System (SAS 8.02 TS level 02MO).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1.Viable cell counts of peptone water suspensions

Table 1 presents the cell counts in ST and Lee's agars of isolated Str, LAC and BL and MIX3. LAC grew in ST agar at 37°C forming pinpoint white colonies and, also, in Lee's agar at 37°C (microaerophiliae and aerobiosis). BL grew in Lee's agar at 37°C under microaerophiliae. The observed growth of LAC and/or BL, can interfere in selective counts of Str in mixed populations.

Table 1. Viable cell counts¹ in ST agar (aerobic) and on Lee's agar (aerobic and under microaerophilic conditions) of isolated *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum* and of MIX3 incubated at 30, 35, 37 and 45°C¹

Enumeration conditions			Incubation temperature (°C)			
Micr. susp	media	atmosphere	30	35	37	45
ISST ²	ST agar	aerobiosis	2.1x10 ¹¹	1.7x10 ¹¹	2.3x10 ¹¹	1.8x10 ¹¹
ISLA ²	ST agar	aerobiosis	- ⁴	5.3 x10 ⁹	6.6x10 ⁹	- ⁴
ISBL ²	ST agar	aerobiosis	- ⁵	- ⁵	- ⁵	- ⁵
Mix 3 ³	ST agar	aerobiosis	2.6x10 ¹⁰	2.3x10 ¹⁰	5.2x10 ¹⁰	3.3x10 ¹⁰
ISST ²	Lee agar	microaerofiliae	1.7x10 ¹¹	2.60x10 ¹¹	1.10x10 ¹¹	1.80x10 ¹¹
	Lee agar	aerobiosis	2.35x10 ¹¹	2.70x10 ¹¹	3.10x10 ¹¹	2.20x10 ¹¹
ISLA ²	Lee agar	microaerofiliae	- ⁴	2.50x10 ¹⁰	1.00x10 ¹⁰	- ⁴
	Lee agar	aerobiosis	- ⁴	9.40x10 ⁹	1.10x10 ¹⁰	- ⁴
ISBL ²	Lee agar	microaerofiliae	- ⁴	3.00x10 ¹⁰	2.70x10 ¹⁰	- ⁴
	Lee agar	aerobiosis	- ⁵	- ⁵	- ⁵	- ⁵
Mix 3 ³	Lee agar	microaerofiliae	2.30x10 ¹⁰	2.50x10 ¹⁰	2.70x10 ¹⁰	2.40x10 ¹⁰
	Lee agar	aerobiosis	3.00x10 ¹⁰	3.70x10 ¹⁰	3.10x10 ¹⁰	2.90x10 ¹⁰

1.results are means of duplicates.

2.ISST, ISLA and ISBL signify isolated suspensions of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum*

3.suspension obtained by mixing equal volumes of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum*.

4.no colonies found.

5. .no colonies found because BL is anaerobic.

The non growth of LAC at 30 or 45°C in ST or Lee's agars (Table 1) and the inability of BL to grow aerobically suggests the use of ST or Lee's agars, at these temperatures, aerobically, to selectively count *Str.*

The statistical analysis of the ISST counts in ST and Lee's agars (aerobically) showed that there was no statistical difference between these counts and those of MIX3 with respect to the incubation temperature. This

suggests the use of ST or Lee's agars aerobically, at 30 and/or 45°C, to enumerate Str either alone or in mixtures of Str, LAC and BL, since there was no significant difference between these cell counts and those at 37°C using the reference medium. However, the recovery of cells present in the MIX3 in ST or Lee's agars (aerobically) was of the order of $\times 10$ less than with ISST under the same conditions. This fact should be taken into consideration.

The evaluation of temperature influence using Lee's agar (aerobiosis or microaerophiliae), aiming at counting viable Str cells, showed that there was no significant difference between these four temperatures in the recovery of cells present in ISST or in MIX3. These results suggest the use of Lee's agar aerobically at 30 and/or 45°C to enumerate Str, both in the isolated form and in mixtures with LAC and BL. The counts from MIX3 were higher aerobically than under microaerophiliae, by about 50%, based on the average values. This suggests that aerobic conditions are more appropriate.

KARAGUL-YUCEER *et al.* (14) also reported the growth of LAC with M17 agar, used to enumerate Str in a LAC containing carbonated fermented milk based beverage. M17 agar was used and/or suggested in the enumeration of Str in the presence of LAC, by authors such as VINDEROLA *et al.* (27), RYBKA and KALAISAPATHY (20, 21), MEDINA and JORDANO (18), DAVIDSON *et al.* (8) and SHAH (23).

The difference between the counts obtained for ISST and MIX3 on ST and Lee's agars is probably due to inhibition of Str by BL and LAC. JOSEPH *et al.* (11) confirmed the inhibition of five strains of Str by LAC and BL due to organic acids and not to inhibitory substances like bacteriocins. DAVE and SHAH (7) studied bacteriocin production by LAC and its inhibitory action against lactic bacteria, including Str. They reported that LAC bacteriocin production in a model system is greater than in milk and whey based media. Our observations agree with this report, since such differences were not observed with fermented milk (Table 2).

Thus, we can suggest the use of ST or Lee's agars aerobically at 30 or 45°C to selectively quantify Str, either alone or in mixtures with LAC and BL. Compared to 45°C, 30°C appears to be more adequate since there is less dehydration of the culture medium during the incubation period.

3.2. Viable cell count in fermented milk

Table 2 shows the counts at 30, 35, 37 and 45°C in ST and Lee's agars from FM and FMFA.

The temperature influence evaluation using the ST and Lee's agars aerobically for enumeration of Str present in FM and in FMFA, showed there was no significant difference in the viable cell recovery among the four temperatures and the two media. These results suggest the use of ST or Lee's agars aerobically at incubation temperatures of 30 and/or 45°C to enumerate Str, either alone or mixed with LAC and BL.

Table 2. Viable cell counts ¹ in ST agar (aerobic) and Lee's agar (aerobic and microaerophilic) of FM and FMFA at 30, 35, 37 and 45°C ¹						
Enumeration conditions			Incubation temperature (°C)			
Micr. susp	media	atmosphere	30	35	37	45
FM ²	ST agar	aerobiosis	1.0x10 ⁹	7.8x10 ⁸	7.0 x10 ⁸	9.5x10 ⁸
FMFA ³	ST agar	aerobiosis	1.1x10 ⁹	1.1x10 ⁹	7.50x10 ⁹	1.2x10 ⁹
FM ²	Lee agar	microaerofiliae	1.0x10 ⁹	7.6x10 ⁸	7.1x10 ⁸	8.1x10 ⁸
	Lee agar	aerobiosis	8.3x10 ⁸	7.4x10 ⁸	6.6x10 ⁸	7.0x10 ⁸
FMFA ³	Lee agar	microaerofiliae	1.3x10 ⁹	1.9x10 ⁹	1.7x10 ⁹	7.70x10 ⁸
	Lee agar	aerobiosis	9.4x10 ⁸	1.6 x10 ⁹	1.6 x10 ⁹	9.2x10 ⁸
¹ .results are means of triplicate determinations. ² .FM is milk fermented by <i>Str. thermophilus</i> . ³ .FMFA is FM with added freeze dried <i>L. acidophilus</i> and <i>Bif. longum</i>						

The temperature influence evaluation using Lee's agar aerobically and at microaerophilic for enumeration of Str present in FM and in FMFA, showed that there was no significant difference in the viable cell recovery among incubation conditions tested. These results suggest the use of Lee's agar (aerobiosis or microaerophilic) incubated at 30 and/or 45°C to enumerate Str, either alone or mixed with LAC and BL.

The results above permit the suggestion to use ST or Lee's agars aerobically, or Lee's agar at microaerophilic at 30 or 45°C to enumerate Str either alone or mixed with BL or LAC. However, aerobic conditions are cheaper and more practical, and at 30°C, culture media dehydration during the incubation period is lower.

4. CONCLUSIONS

It was possible to inhibit growth of the LAC strain tested at 30 and 45°C, aerobically or at microaerophilic, using ST or Lee's agars. Inhibition of BL was possible at 30 and 45°C aerobically, using ST or Lee's agar.

The Str counts obtained from ISST in ST agar (aerobiosis) and Lee's agar (aerobiosis or microaerophilic) incubated at 30 and 45°C, were not significantly different from those obtained at 37°C under the same conditions.

The counts obtained from either ISST or MIX3 on Lee's agar, were slightly larger, aerobically than under microaerophilic.

The counts obtained from MIX3 were smaller than those from ISST, reflecting a possible inhibition of Str by BL and/or LAC in this model system. This was not observed with FM and FMFA.

The Str counts obtained for either FM or FMFA in ST agar (aerobiosis) and Lee's agar (aerobiosis or microaerophilic) incubated at 30 and 45°C, were not significantly different from those obtained at 37°C under the same conditions.

Inhibition of LAC and BL was obtained under the following conditions: ST agar/30 and 45°C/aerobiosis; Lee's agar/30 and 45°C/both atmosphere conditions, the former being more economical and practical.

5. REFERENCES

1. Brasil, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resolução nº 05 de 13/11/2000 publicada em 27 de novembro de 2000. p. 9-12.(2000)
2. Buttha, Z.A.; Molla, A.M. Issani, Z.; Badruddin, S. Hendricks, P. Snyder, J.D. J. Pediatric Gastroenterol. Nutr. **18** (1) 45-52 (1994).
3. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K. Int. J. Food Microbiology **35** (1) 1-27 (1997).
4. Chick, H.; Shin, H.S.; Ustunol, Z. J. Food Sci. **66** (3) 478-481 (2001).
5. Christiansen, P.S.; Edelsten, D.; Khristiansen, J.R.; Nielsen, E.W. Milchwissenschaft **51** (9) 502-504 (1996).
6. Dave, R.I.; Shah, N.P. J. Dairy Sci. **79** (9) 1529-1536 (1996).
7. Dave, R.I.; Shah, N.P. Int. Dairy J. **7** (11) 707-715 (1997).

8. Davidson, R.H.; Duncan, S.E.; Hackney, C.R.; Eigel, W.N.; Boling, J.W. **83** (4) 666-673 (2000).
9. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. Trends Food Sci. Tech. **10** (4/5) 139-157 (1999).
10. Hitchins, A.D.; McDonough, F.E. Am. J. Clin. Nutr. **49** (4) 675-684 (1989).
11. Joseph, P., Dave, R.I., Shah, N.P. Food Australia. **50** (1) 20-23 (1997).
12. Jiang, T.; Mustapha, A.; Savaiano, D.A. J. Dairy Sci. **79** (5) 750-757 (1996).
13. Karagül-Yüceer, Y.; Coggins, P.C.; Wilson, J.C.; White, C.H. J. Dairy Sci. **82** (7) 1394-1398 (1999).
14. Karagül-Yüceer, Y.; Wilson, J.C.; White, C.H. J. Dairy Sci. **84** (3) 543-550 (2001).
15. Lee, S.V.; Vedamuthu, E.R.; Washam, C.J.; Reinbold, G.W. J. Milk Food Tech. **37** (5) 272-276 (1974).
16. Lee, Y-K.; Nomoto, K.; Salminen, S.; Gorbach, S.L.: In Handbook of Probiotics (Ed. John Wiley and Sons, Inc.), 1-22, 67-190 New York (1999).
17. Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B.C. Int. Dairy J. **11** (1) 1-17 (2001).
18. Medina, L.M.; Jordano, R.J. J. Food Prot. **56** (8) 731-733 (1994).
19. Otero, M.; Rodriguez, T.; Fernández, M.; González, J.; Lima, L.B. Alimentaria nº278 113-115 (1996).
20. Rybka, S.; Kailasapathy, K. Int. Dairy J. **6** (8/9) 839-850 (1996)
21. Rybka, S.; Kailasapathy, K. Milchwissenschaft **52** (7) 390-394 (1997)
22. Shah, N.P. **52** (2) 72-76 Milchwissenschaft (1997)
23. Shah, N.P. J. Dairy Sci. **83** (4) 894-907 (2000).
24. Tahri, K.; Crociani, J.; Ballaongue, J.; Schneider, F. Letters Applied Microbiol. **21** (3) 149-151 (1995)
25. Tamime, A.Y.; Marshall, V.M.E., Robinson, R.K. J. Dairy Res. **62** (1) 151-187 (1995).
26. Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A.. Int. Dairy J. **9** (8) 497-505 (1999).
- Vinderola, C.G.; Gueimonde, M.; Delgado, T.; Reinheimer, J.A.; de los Reyes-Gavilán, C.G. Int. Dairy J. **10** (3) 213-220 (2000).

CAPÍTULO III

ENUMERAÇÃO DIFERENCIAL DE *Bifidobacterium longum* E *Lactobacillus* *acidophilus* NA PRESENÇA DE *Streptococcus* *thermophilus*

ENUMERAÇÃO DIFERENCIAL DE *Bifidobacterium longum* E *Lactobacillus acidophilus* NA PRESENÇA DE *Streptococcus thermophilus*¹

Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*¹

Modified (T and M-MRS) and selective (Bile and LP-MRS) media were assayed to quantify *Bifidobacterium longum* (BL) and *Lactobacillus acidophilus* (LAC) in the presence of *Streptococcus thermophilus* (Str). Microbial suspensions (isolated and mixed) were tested at 37°C/72h aerobically with T, M and Bile-MRS. All tests using LP-MRS were done anaerobically. LP-MRS was tested under four different combinations of lithium chloride and sodium propionate concentrations (0.2; 0.4; 0.5 and 0.6% of LiCl with respectively 0.3; 0.6; 0.75 and 0.9% of sodium propionate). The ability of each medium to inhibit the organisms was also tested. M-MRS allowed the growth of Str. Differential counting of LAC was possible using T and Bile-MRS, aerobically, (the latter condition being more practical and economical). Differential counting of BL was possible using LP-MRS in anaerobiosis, with a combination of 0.6g/l of LiCl and 0.9 g/l of sodium propionate.

Os meios modificados T e M-MRS e os meios seletivos Bile e LP-MRS foram avaliados na quantificação de *L. acidophilus* (LAC) e *Bif. longum* (BL) na presença de *Str. thermophilus* (Str). Suspensões microbianas isoladas e mistas foram utilizadas e incubadas a 37°C/ 72h em aerobiose em T, M e Bile-MRS. Todos os ensaios com LP-MRS foram realizados em anaerobiose. O ágar LP-MRS foi avaliado pela adição de quatro combinações de concentrações de cloreto de lítio e propionato de sódio (0,2; 0,4; 0,5 e 0,6% de LiCl e, respectivamente, 0,3; 0,6; 0,75 e 0,9% de propionato de sódio). A capacidade de cada meio inibir os microrganismos também foi verificada. O ágar M-MRS possibilitou o crescimento de Str. A quantificação diferencial de LAC foi possível utilizando-se T e Bile-MRS, sendo este último mais prático e econômico. A quantificação diferencial de BL foi possível através do LP-MRS com 0,6g/l de LiCl e 0,9g/l de propionato de sódio.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Milchwissenschaft, na qual foi aceito para publicação.

1. INTRODUCTION

The consumption of probiotics of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* has been linked to health improvement and relief/prevention of disorders, including, among others, acute episodes of diarrhoea (bacterial or viral infection); immune enhancing; prevention of radiotherapy-related diarrhoea; alleviation of Crohn's diseases and inhibition of superficial bladder cancer (28, 16, 15, 8, 10). According to GOMES and MALCATA (8), probiotics are defined as viable microorganisms (lactic and other bacteria and yeasts ingested as dried cells or in a fermented product), exhibiting a beneficial effect on the health of the host (upon ingestion) by improving the properties of its indigenous microflora.

Bifidobacteria were first isolated from the faeces of breast-fed infants and described in 1899-1900 by TISSIER. Before the current designation, bifidobacteria received other names, like *Bacillus bifidus* and *Lactobacillus bifidus*. This microbial group is gram-positive, catalase-negative, anaerobic and non-motile, presenting a rod shape and producing no gas (8, 28, 3).

L. acidophilus (LAC) was first named *Bacillus acidophilus* by MORO, in 1900, who isolated it from the faeces of breast-fed infants. Some characteristics of these microorganisms are: aerotolerant or anaerobic, strictly fermentative, gram-positive, non-flagellated rods or coccobacilli (8, 3).

Fermented milks containing bifidobacteria and/or LAC are produced using either single strains of these organisms alone or in combination with other lactic acid bacteria, mainly *Streptococcus* and *Lactobacillus*. Many articles have reported these kinds of fermented milk or yoghurt (19, 28, 8, 4, 5, 23, 27, 12).

Since the efficacy of added probiotic bacteria is dependent on the dose level, the viability must be maintained throughout the intended product shelf life. To monitor the maintenance of concentrations of viable probiotics, simple and inexpensive methods are desirable for use in quality assurance laboratories (10). These methods must determine the counts of *Bifidobacterium*, LAC and yoghurt bacteria (e.g. *Str. thermophilus*) and differentiate them. Additionally, fermented milk products must obey the legal standards, which establish minimal viable cell counts per gram or ml, of 10^6 (2).

Many media for the differential enumeration of *Bifidobacterium* are cited in the literature (24, 28, 14, 21, 29, 4, 20, 7, 27, 3, 13). Media for the differential enumeration of LAC have been reported by many authors (29, 4, 7, 3, 13).

Some selective media for the enumeration of bifidobacteria in the presence of lactic bacteria are formulated using many ingredients and/or their inhibitory agents must be filter-sterilized, being time-consuming to prepare (18, 29, 1, 17). However, LiCl and sodium propionate (14) can be added directly to the medium base before sterilization.

Previous experiments by the authors of this paper (31) detected the growth of Str on LP-MRS, as suggested by VINDEROLA and REINHEMER (29) for the differential enumeration of *Bifidobacterium* in the presence of yoghurt bacteria.

The aim of this research was to select methodology for the selective enumeration of LAC in the presence of Str and BL and for the selective enumeration of BL in the presence of Str and LAC, using a model system of peptone water suspensions of these microorganisms.

2. MATERIAL AND METHODS:

2.1. Material: Maltose and yeast extract (Merck, Ge); meat extract, bacto peptone, bacto bile, tri-ammonium citrate, tween 80 and agar (Difco, USA); sodium propionate, KH_2PO_4 ; magnesium sulphate $7\text{xH}_2\text{O}$, trehalose; (SIGMA, USA); lithium chloride, manganese sulphate $4\text{xH}_2\text{O}$ and sodium acetate $3\text{xH}_2\text{O}$ (Synth, Brasil); Anaerobac® (Probac®, Brasil); MRS agar (Oxoid, En). Freeze dried cultures of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum*, codified respectively as TA559, LAC4 and BL (Ezal®, Texel - Rhodia Food), supplied by Rhodia Food, were used.

2.2. Media: Maltose-MRS agar (M-MRS) was prepared according to HULL and ROBERTS (9); Bile-MRS agar according to IDF (1995) as reported by VINDEROLA and REINHEIMER (29); Trehalose MRS agar (T-MRS) according to VINDEROLA and REINHEIMER (29) and Lithium chloride - sodium

propionate agar (LP-MRS) according to LAPIERRE *et al.* (14), with the basal medium suggested by VINDEROLA and REINHEIMER (29).

2.3. Experimental procedures

2.3.1. Microbial suspensions: Isolated suspensions of Str (ISST), LAC (ISLA) and BL (ISBL) were prepared with 1 unit of each freeze dried culture (10^{10} to 10^{11} cell/unit) rehydrated in 9 ml 0.1% peptone water. The mixed suspension (MIX 3), was obtained by mixing equal volumes of ISST, ISLA and ISBL.

2.3.2. Testing M-MRS, T-MRS and Bile-MRS agars

Modified media: T-MRS (30) and M-MRS agar (4, 5, 9, 22); and selective media: Bile-MRS agar (29, 13) were assayed to quantify LAC in the presence of Str and BL at 37°C/72h aerobically.

2.3.3. Testing LP-MRS agar at different concentrations of the inhibitory agents

LiCl - sodium propionate agar (LP-MRS) (29) was assayed to quantify BL in the presence of Str and LAC at 37°C/72h anaerobically. Anaerobiosis was generated by the PROBAC® system. Concentrations of: 0.2; 0.4; 0.5 and 0.6% of LiCl and 0.3; 0.6; 0.75 and 0.9% of sodium propionate for LP-MRS, were tested.

2.3.4. Enumeration:

The suspensions described (ISST, ISLA, ISBL and MIX3) were serial decimal diluted in 0.1% sterile peptone water and pour plated with the media cited.

2.4. Statistical analyses:

The data from the experiments with M, T and Bile-MRS agar (Table 1) were analyzed by the General Linear Model procedures of the Statistical Analysis System (SAS 8.02 TS level 02M0). A p value < 0.05 was considered to be significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Viable cell counts in M-MRS, T-MRS and Bile-MRS agar under aerobiosis for Str, LAC, BL, isolated and in MIX3, are presented in Table 1.

Table 1. Viable cell counts^a in M-MRS, T-MRS and Bile-MRS agars of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum*, isolated and mixed, incubated at 37°C

Microorganisms	Culture media		
	M-MRS	T-MRS	Bile-MRS
ISST ^b	6.3 x10 ⁶	--- ^d	--- ^d
ISLA ^b	4.9x10 ⁹	5.5 x10 ⁹	7.5 x10 ⁹
ISBL ^b	--- ^e	--- ^e	--- ^e
Mix 3 ^c	2.2x10 ⁹	3.5x10 ⁸	1.7x10 ⁸
a. results are means of 3 replicates			
b. ISST, ISLA and ISBL mean Isolated suspensions of <i>Str. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> and <i>Bif. longum</i>			
c. suspension obtained by mixing equal volumes of <i>Str. thermophilus</i> , <i>L. acidophilus</i> and <i>Bif. longum</i> suspensions			
d. no colonies found			
e. no colonies found because BL is anaerobic			

From the counts presented in Table 1, it was observed that Str grew in M-MRS agar. The LAC counts obtained in M-MRS did not differ significantly from the counts of this microorganism in T-MRS and Bile-MRS agar, the counts of MIX3 in M-MRS being higher than in the other two media, probably due to the growth of Str in the M-MRS medium.

The counts of LAC from ISLA were higher than those from MIX3 when using T-MRS and Bile-MRS. This could be explained by the inhibitory effect of Str against LAC. SHAH *et al.* (26) reported an inhibitory effect of Str bacteriocin against *Bifidobacterium*. Other authors (5, 6, 11) also reported inhibitory effects of probiotic bacteria against yoghurt bacteria. VINDEROLA *et al* (30) reported the inhibitory effect of lactic and probiotic bacteria against LAC.

M-MRS was suggested by RYBKA and KAILASAPATHY (22) for the selective enumeration of LAC. DAVE and SHAH (4, 5, 6) suggested M-MRS agar for the enumeration of probiotics (LAC and bifidobacteria) in the presence of yoghurt bacteria. LANKAPUTHRA *et al.* (13) reported that *Streptococcus* from different sources, did not grow on M-MRS agar. The Chr.Hansen's

Laboratorium indicates M-MRS as the medium of choice for differential enumeration of *Lactobacillus* (3). However, in our experiments, Str grew (Table 1), interfering in the selective counts of LAC.

Bile and T-MRS showed good results for selective LAC enumerations, but Bile-MRS is less expensive and time-consuming than T-MRS.

The counts of Str, BL and LAC in LP-MRS agar with different concentrations of the inhibitory agents, from dilutions of 10^{-3} up to 10^{-8} , are presented in Table 2.

Table 2. Viable cell counts^a of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum* in LP-MRS at different concentration of lithium chloride and sodium propionate

		Concentration LiCl : Na propionate (g/l)							
		2 : 3		4 : 6		5 : 7.5		6 : 9	
microorganisms ^b	Dilution	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2	Exp.1	Exp.2
ISST	-3	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	- ^c	- ^c
ISBL		tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
ISST	-4	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	- ^c	- ^c
ISBL		tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
ISST	-5	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	9.1x10 ⁶	- ^c	- ^c
ISBL		tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
ISST	-6	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	2.2x10 ⁷	- ^c	- ^c	- ^c
ISBL		tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
ISST	-7	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
ISBL		tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	tmtc ^e	3.4x10 ⁹	tmtc ^e
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d
ISST	-8	5x10 ¹⁰	3x10 ¹⁰	2.6x10 ¹⁰	1.0x10 ¹⁰	- ^c	- ^c	- ^c	- ^c
ISBL		9.1x10 ⁹	7.0x10 ⁹	5x10 ⁹	5.8x10 ⁹	5.4x10 ⁹	4.6x10 ⁹	4.0x10 ⁹	5x10 ⁹
ISLA		- ^c	- ^c	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d	- ^d

a. Data from tests 1 and 2

b. ISST, ISLA and ISBL means Isolated suspension of *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* and *Bif. longum* suspensions

c. no colonies found

d. test did not performed

e. tmtc = too much to count

LAPIERRE *et al.* (14) were the first to suggest the use of LiCl and sodium propionate as inhibitory agents. They tested different LiCl and sodium propionate concentrations, suggesting a combination of 2g/l of LiCl and 3g/l of sodium propionate to suppress the growth of lactic acid bacteria (*Str*, *L. bulgaricus*, LAC and *Lactococcus cremoris*). They also reported that most

strains of streptococci were inhibited. VINDEROLA and REINHEMER (29) used MRS agar as the basal medium with the LiCl and sodium propionate concentrations suggested by LAPIERRE *et al.* (14). SHAH (25) reported that one strain of Str grew on LAPIERRE *et al.* (14) medium.

In our experiments, Str colonies grew in LP-MRS when the inhibitory agents were used at the concentrations suggested by VINDEROLA and REINHEMER (29). However the use of greater concentrations showed that LP-MRS could be used for BL selective enumeration (Table 2).

The LAC from ISLA did not grow at the inhibitory agent concentrations suggested by LAPIERRE *et al.* (14) and VINDEROLA and REINHEMER (29) (Table 2).

4. CONCLUSIONS

The Str tested here cannot be inhibited, under aerobiosis, using M-MRS agar.

T and Bile-MRS were capable of the differential enumeration of LAC in the presence of Str and BL, but Bile-MRS is less expensive and less time-consuming than T-MRS.

The LAC tested was inhibited, under anaerobiosis, in LP-MRS agar, at LiCl and sodium propionate concentrations of 2 and 3g/l, respectively.

The Str tested could not be inhibited, under anaerobiosis, in LP-MRS agar at LiCl and sodium propionate concentrations of 2 and 3g/l, respectively, but with three times these concentrations of the inhibitory agents, Str did not grow.

LP-MRS agar with LiCl and sodium propionate concentrations of 6 and 9g/l, respectively, was capable of the differential enumeration of BL in the presence of Str and LAC.

LiCl and sodium propionate have the advantage of being added before sterilization when used as inhibitory agents.

5. REFERENCES

1. Arany, C.B.; Hackney, C.R.; Duncan, S.E.; Kator, H.; Webster, J.; Pierson, M.; Boling, J.W.; Eigel, W.N. *J. Food Prot.* **58** (10): 1142-1146. (1995)
2. Brasil, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Resolução nº 05 de 13/11/2000 publicada em 27/11/2000. p. 9-12.(2000)
3. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K. *Int. J. Food Microbiology* **35** (1) 1-27 (1997)
4. Dave, R.J.; Shah, N.P. *J. Dairy Sci.* **79** (9):1529-1536. (1996)
5. Dave, R.I.; Shah, N.P. *Int. Dairy J.* **7** (1) 31-41 (1997a)
6. Dave, R.I.; Shah, N.P. *Int. Dairy J.* **7** (11) 707-715 (1997b)
7. Ghoddusi, H.B.; Robinson, R.K. *J. Dairy Res.* **63** (1) 151-158. (1996)
8. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. *Trends Food Sci. Tech.* **10** (4/5) 139-157 (1999)
9. Hull, R.R.; Roberts, A.V. *Australian J. Dairy Technol.* **39** (4) 160-164 (1984)
10. Ingham, S.C. *J. Food Prot.* **62** (1) 77-88 (1999)
11. Joseph, P., Dave, R.I., Shah, N.P. *Food Australia.* **50** (1) 20-23 (1997).
12. Karagül-Yüceer, Y.; Coggins, P.C., Wilson, J.C.; White, C.H. *J. Dairy Sci.* **82** (7) 1394-1398 (1999)
13. Lankaputhra, W.E.V.; Shah, N.P.; Britz, M.L. *Food-Australia.* **48** (3).113-118 (1996)
14. Lapierre, L.; Undeland, P.; Cox, L.J. *J. Dairy Sci.* **75** (5)1192-1196 (1992)
15. Lee, Y-K.; Nomoto,K.; Salminen, S.; Gorbach, S.L.: In *Handbook of Probiotics* (Ed. Jonh Wiley and Sons,Inc.), 1-22, 67-190 New York (1999)
16. Lee, Y.K.; Salminen, S. *Trends in Food Sci. and Technol.* **6** (7) 241-245 (1995)
17. Lim, K.S.; Huh, C.S., Baek, Y.J.. *J. Dairy Sci.* **78** (10) 2108-2112 (1995)

18. Martin, J.H.; Chou, K.M.. Cult. Dairy Products J. **27** (4) 21, 23-26 (1992)
 19. Medina, L.M.; Jordano, R. J. Food. Prot. **56** (8) 731-733 (1994)
 20. Payne, J.F.; Morris, A.E.J.; Beers, P. J. Appl. Microbiol. **86** (2) 853-858. (1999)
 21. Rada, V.;Koc, J. Milchwissenschaft. **55** (2): 65-67 (2000)
 22. Rybka, S.; Kailasapathy, K. Australian J. Dairy Technol. **50** (2) 51-56 (1995)
 23. Rybka, S.; Kailasapathy, K. Milchwissenschaft. **52** (7): 390-394 (1997)
 24. Samona, A.; Robinson, R.K. J. Society Dairy Technol. **44** (3) 64-66 (1991)
 25. Shah, N.P. Milchwissenschaft **52** (2) 72-76 (1997)
 26. Shah, N.P.; Linh, L.; Ly, L. Bioscience and Microflora. **18** (2) 125-131 (1999)
 27. Shah, N.P. J. Dairy Sci. **83** (4) 894-907 (2000)
 28. Tamime, A.Y.; Marshall, V.M.E., Robinson, R.K. J. Dairy Res. **62** (1) 151-187 (1995).
 29. Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. Int. Dairy J. **9** (8) 497-505 (1999)
 30. Vinderola, C.G., Mocchiutti, P.; Reinheimer, J. Dairy Sci. **85** (4) 721-729 (2002)
- Zacarchenco, P.B., Massaguer-Roig, S. In: 26th IDF World Dairy Congr. (Congrilait) Sep.24-27 (Paris FR) (2002), Poster n° E1-6, 1 CD-Rom Poster Proc.

CAPÍTULO IV

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E
COMBINAÇÕES DE *Bifidobacterium longum* E
Lactobacillus acidophilus NO pH, ACIDEZ E
CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DURANTE A
ESTOCAGEM DE LEITE FERMENTADO POR
*Streptococcus thermophilus***

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E COMBINAÇÕES DE
Bifidobacterium longum E *Lactobacillus acidophilus* NO pH, ACIDEZ E
CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DURANTE A ESTOCAGEM DE LEITE
FERMENTADO POR *Streptococcus thermophilus*¹**

**EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS AND COMBINATIONS OF
LYOPHILIZED *Bifidobacterium longum* AND *Lactobacillus acidophilus* ON
pH, ACIDITY AND SENSORY SCORES DURING SHELF-LIFE OF A
Streptococcus thermophilus FERMENTED MILK¹**

Sensory, pH, titratable acidity and microbial counts characteristics of five combinations, of lyophilized *Bifidobacterium longum* and/or *Lactobacillus acidophilus* added to *Streptococcus thermophilus* fermented milk were studied. The taste and acidity sensory attributes were significantly ($P < 0.05$) perceived as the storage time increased. Favourite combinations contained, initially, *Bif. longum* and *L. acidophilus* (10^8 and 10^7 cfu mL⁻¹, respectively) and *Bif. longum* only (10^8 cfu mL⁻¹). These combinations did not differ significantly among them and neither from the standard fermented milk. The lowest sensory scores and highest titratable acidity values was for the milk fermented by *Str. thermophilus* added of lyophilized *L. acidophilus* (10^8 cfu mL⁻¹ initial concentration). During the 21 days of storage at 4°C the viable cell counts of: *Str. thermophilus* did not change. *Bif. longum* viable cell counts kept constant or reduced 1 logarithmic cycle and *L. acidophilus* reduced 1 or 2 logarithmic cycle. We did not observe inhibition of over-acidification by bifidobacteria or *L. acidophilus*.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista International Dairy Journal, para a qual foi enviado em julho/2003.

RESUMO

Foram estudadas as características sensoriais, de pH e acidez de cinco combinações de leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* adicionados de *Bifidobacterium longum* e/ou *Lactobacillus acidophilus* liofilizados. Os efeitos sobre as características sensoriais tornaram-se significantes ($p < 0,05$) com o aumento do tempo de estocagem. As combinações favoritas continham, inicialmente, *Bif. longum* e *L. acidophilus* (10^8 e 10^7 ufc/ml, respectivamente) e *Bif. longum* apenas (10^8 ufc/ml). Estas combinações não diferiram significativamente do leite fermentado padrão, nem entre si. As notas mais baixas e os maiores valores de acidez titulável foram apresentados pela combinação contendo apenas *L. acidophilus* (10^8 ufc/ml, concentração inicial). Durante 21 dias de estocagem a 4°C , as contagens de células viáveis de *Str. thermophilus* não mudaram, as de *Bif. longum* mantiveram-se constantes ou reduziram em um ciclo logarítmico e, as de *L. acidophilus* reduziram de 1 a 2 ciclos logarítmicos. Não foi observada inibição da pós-acidificação pela bifidobactéria ou pelo *L. acidophilus*.

1. Introduction

The use of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria, normal inhabitants of the humane intestine, as dietary adjuncts, has been subject of researchers interest (Dave & Shah, 1997; Charteris, Kelly, Morelli & Collins, 1997; Gomes & Malcata, 1999). According to Dave & Shah (1997) yoghurt or yoghurt-like products have been used as the most popular vehicle for incorporation of probiotic organisms. During the past decade, probiotic products

have become increasingly popular and consumption of such products has increased worldwide.

Saxelin, Grenov, Svensson, Fondén, Reniero & Mattila-Sandholm (1999) reported that to maintain confidence in probiotic products it is important to demonstrate good survival of the bacteria in consumer products during their shelf life. In addition, a pleasant taste and attractive texture are essential for all dairy products, regardless of the “health message” of the product.

Gomes & Malcata (1999) reported that properties such as growth rate; metabolic rate; proteolytic activity and flavour promotion of several probiotic strains are species specific and that consequently success in industrial applications can be obtained through careful management of these factors and tailored manufacturing processes.

According to Tamime, Marshall & Robinson (1995), on recent years in Europe, United States and East Europe the new fermented dairy products have presented the following characteristics: (a) they include *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus casei* sub-specie *casei* biovar *shirota*, *Lactobacillus* GG Strain (similar to *Lactobacillus casei* sub-specie *ramnosus*), and/or combinations of these bacteria with common lactic starters; (b) they contain bacteria isolated from humane which are able to survive and to grow on the humane intestine and to adhere to epithelial intestine cells; (c) Present more than 10^6cfu mL^{-1} or gram^{-1} of the product.

The 10^6cfu mL^{-1} or gram^{-1} of the product value has been pointed by the authors Kurmann & Rasic (1991) cited by Rybka & Kalaisapathy (1997), Gomes & Malcata (1999) and Rasic & Kurmann (1983) cited by Gomes & Malcata (1999). Ouwehand & Salminen (1998) reported that international standards of

any cultured products sold with health claims must contain a minimum of 10^7 cfu g^{-1} of probiotic bacteria at use-by date. Also, Ishibashi & Shimamura (1993) cited by Davidson, Duncan, Hackney, Eigel & Boling (2000) reported that a minimum bacterial count of 10^7 cfu of *Bifidobacterium* mL^{-1} in fresh dairy products is recommended. According to Shah (1997) therapeutic effect only can be obtained with a minimum number of viable cells larger than 10^5 cfu g^{-1} in a product.

According to Saxelin *et al.* (1999) probiotic strains can be used with a support culture consisting of either *Str. thermophilus* or a yoghurt culture. They studied the fermentation of milk with yoghurt and probiotic culture together. The *Str. thermophilus* culture allowed very good survival of all the probiotic strains. These researchers also reported that when combined with a yoghurt culture the number of probiotic bacteria decreased during the shelf life period. However, they mentioned that it was not observe a reduction in the number of probiotic bacteria in some combinations of probiotic strains and yoghurt cultures concluding about the importance of selecting an optimal support culture to obtain good probiotic survival during the product shelf life.

Some authors like Rasic & Kurmann (1983) cited by Medina & Jordano (1994) reported that the use of bifidobacteria in cultured milks produces some of the following nutritional and technological advantages: i) mild sour taste; ii) limited after acidification; iii) less bitterness; iv) beneficial as intestinal organisms.

Davidson *et al.* (2000) fermented low fat ice cream mix with probiotic supplemented and traditional starters and evaluated them for culture survival, composition and sensory characteristics. The presence of probiotic bacteria in

the supplemented system, however, seemed to cause no differences in protein and lactose concentrations and sensory characteristics. But, Mital & Garg (1992) cited by Dave & Shah (1997) reported that it is not feasible to ferment milk using only probiotic organisms owing the longer fermentation time required to reduce the milk pH and due to some probiotic bacterial strains objectionable taste and also Laroia & Martin (1991) mentioned that sensory characteristics of dairy products cultured with *Bifidobacterium* were different from yogurts that used conventional cultures.

Production of high-quality fermented milk products containing *Bifidobacterium* spp. and *L. acidophilus* is, according to Gomes & Malcata (1999), a major challenge to dairy plants owing to the sensitive character of the microorganisms in these bio-products, which adds to the usual difficulties encountered in novel food products (i.e. poor palatability and consequent limited consumer acceptability). These authors mentioned Hoier (1992) who reported that bifidobacteria produces, during fermentation, acetic and lactic acids at the ratio 3:2, so excessive growth may yield products with vinegar-like taste and aroma. Careful selection of the strains employed and good monitoring throughout the manufacturing process are therefore compulsory in attempts to control efficiently the metabolic products and hence the final pH.

Samona, Robinson & Marakis (1996) investigated the production of acetic acid and others organic acids during 21 days of storage at 4°C of fermented milks prepared with different combinations of two yogurt cultures and *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum* and *Bif. longum*. The levels of acetic acid, when using yogurt starter “A” and a strain of *Bif. adolescentis* varied from 5.9 to 10,3 mmol L⁻¹, remaining stable on 8.8 mmol L⁻¹ on days 7 and 14. With yogurt starter “B”

and a strain of *Bif. bifidum* acetic acid levels varied from 2.9 to 8.8 mmol L⁻¹, remaining stable on days 14 and 21, and with yogurt starter “B” and a strain of *Bif. longum* they varied from 5.6 to 8.8 mmol L⁻¹, remaining stable on days zero to 14.

The acetic acid produced by bifidobacteria, which apparently has an inhibitory effect on *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, can prevent post-production acidification according to Samona et al (1996).

In spite of this inhibitory effect, it must be remembered that probiotics incorporation to the fermented milks can be realized by different ways which can influence the occurrence or existence of such inhibitory effect.

According to Tamime et al. (1995) fermented milk products are made using a single genus, or in combination with other lactic acid bacteria as mixed starter cultures. These authors reported that *Bif. bifidum* and *longum* are widely employed as mixed starter cultures in combination with *L. acidophilus* and yogurt organisms (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and/or *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*).

Tamime et al. (1995) also reported that different starter cultures (i.e. *Bif. bifidum* or *longum*, yogurt culture with or without *L. acidophilus*) are used to ferment the milks separately, followed by mixing. These authors reported that for manufacture of a Chilean product made with cultured skimmed milk, buttermilk and cream, called Progurt®, *Lb. acidophilus* and/or *Bif. bifidum* are added at 5-10g L⁻¹ to the cultured milk, before the homogenization stage.

Lourens-Hattingh & Viljoen (2001) reported that the probiotic culture can be added prior to fermentation simultaneously with the conventional yogurt cultures or after fermentation to the cooled (4°C) product before packaging.

Tamime *et al.* (1995) also reported that commercially produced bifidobacteria starters give more consistent activity than the in house production of liquid cultures which are subject to daily transfers.

The objectives of this research were to study the presence and concentration influence of *Bif. longum* e *L. acidophilus*, added in the liophilyzed form on the sensorial, pH, titratable acidity and microbial counts characteristics of a *Str. thermophilus* fermented milk.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Tryptone (Difco, Detroit, Mi, USA); sucrose (Merck, Darmstadt, Ge); KH₂PO₄ (SIGMA, St. Louis, MO, USA); bromo-cresol purple (Merck, Darmstadt, Ge); yeast extract (Merck, Darmstadt, Ge); bacto peptone, (Difco, Detroit, Mi, USA); agar (Difco, Detroit, Mi, USA); sodium propionate (SIGMA, St. Louis, Mo, USA); lithium Chloride (Synth, Diadema, SP, Brasil); Bacto Bile (Difco, Detroit, Mi, USA); Anaerobac® (Probac®, São Paulo, SP, Brasil); MRS agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, En); skim milk powder (Molico, Nestle, Araçatuba, SP, Brazil). Freeze dried starter cultures of *Str. thermophilus*, TA 559 (ST), *L. acidophilus*, LAC4 (LAC) and *Bif. longum*, BL (BL) from Ezal® - Texel supplied by Rhodia Food.

2.2. Methods

2.2.1. Enumeration

Samples of fermented milks were serial decimally diluted in 0.1% sterile peptone water, pour plated in ST agar (aerobiosis) at 30°C/48h according to Zacarchenco & Massaguer-Roig (2002), in Bile-MRS agar according to Vinderola & Reinheimer (1999) and in LP-MRS agar according Vinderola & Reinheimer (1999) with modified inhibitory agents concentrations (0.6g/l of lithium chloride and 0.9 g/l of sodium propionate).

2.2.2. Starter preparation

Sterile (115°C/10min) reconstituted (11% total solids) skimmed milk was used for the mother and intermediate cultures. Sterile milk (10mL) was inoculated with a loopful of freeze-dried ST in laminar air flow cabinet, fermented to coagulation at 42°C and cooled. Intermediate cultures (200 mL) were prepared in the same way.

2.2.3. Fermented milks preparation

Thirty liters of pasteurized (90°C/5min) reconstituted (12% total solids) skimmed milk was inoculated with 2% intermediate culture, fermenting to pH 4.7 at 45°C, chilling to 38°C and stirred during 2 minutes. The LAC and BL were added to ST fermented milk. The quantities of LAC and BL are specified at Table 1. Portions of 3700g of the cooled fermented milk were stirred during 40 seconds, liophylized LAC and BL were added and the stirring was kept during 1,5 minutes. After stirring the fermented milks were into plastic bottles previously disinfected and stored at 4°C (Figure 1).

Combination	Microorganisms	Initial Probiotics concentrations (IPC cfu/ml)	Weight of liofilized probiotics added ⁴
C1	ST ¹	----	----
C2	ST	----	----
	BL ²	1x10 ⁸	9,53g ⁵
C3	ST	----	----
	BL	1x10 ⁷	0,95g ⁵
	LAC ³	1x10 ⁸	6,01g ⁶
C4	ST	----	----
	BL	1x10 ⁸	9,53g ⁵
	LAC ³	1x10 ⁸	6,01g ⁶
C5	ST	----	----
	BL	1x10 ⁸	9,53g ⁵
	LAC ³	1x10 ⁷	0,6g ⁶
C6	ST	----	----
	LAC	1x10 ⁸	6,01g ⁶

1. ST=*Streptococcus thermophilus*

2. BL= *Bifidobacterium lactis*

3. LAC = *Lactobacillus acidophilus*

4. g/3700g of *Str. thermophilus* fermented milk

5. The weight of 1unit of liofilized *Bif. longum* is 1,03g and contain 4x10¹⁰ cells/g

6. The weight of 1unit of liofilized *L. acidophilus* is 0,65g and contain 4x10¹⁰ cells/g

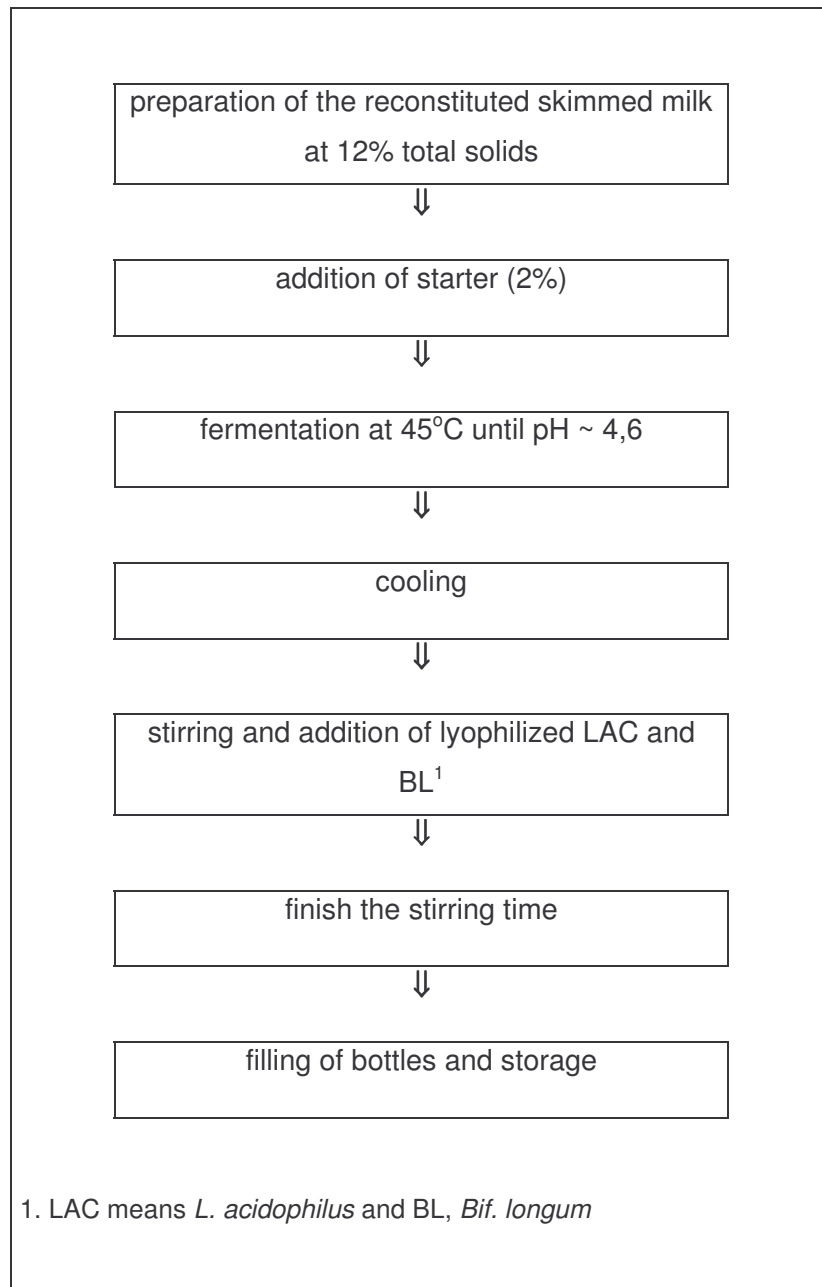


Figure 1. Processing steps of the fermented milks

2.2.4. Measurements during shelf life of fermented milks

The sensory evaluation, determinations of viable cell counts of ST, BL and LAC and measurements of pH and acidity of the fermented milks were realized during storage at 1, 7, 14 and 21.

2.2.5. pH and acidity measurements

Measurement of pH was carried out using a pH meter Model PH320 (WTW®). The titratable acidity was analyzed according to AOAC (1995). Measurements were realized in triplicate. **Table 1.** Probiotics initial concentrations of the fermented milks studied

2.2.6. Determinations of viable cell counts

ST Agar was prepared according to DAVE&SHAH (6), but incubated at 30°C. Bile-MRS agar was prepared according to IDF (1995) and Vinderola & Reinheimer, (1999). Lithium chloride - sodium propionate agar (LP-MRS) was prepared according to Lapierre, Undeland & Cox (1992) using the basal medium suggested by Vinderola & Reinheimer (1999), but inhibitory agents concentrations were 0,5g/l of LiCl and 0,75g/l of sodium propionate.

2.2.7 Sensory evaluation

The sensory evaluations to verify the differences among the taste and acidity preferences of each product were carried out by 35 untrained panelists. The sensory evaluations were carried out on samples (25g) served at 7°C, codified and presented to judges in randomized sequences according to Macfie, Bratchell, Greenhoff & Vallis (1989). The acceptability tests were realized with a 9-points balanced scale (1-dislike too much; 5- nor like neither dislike; 9- like too much), according to Meilgaard, Civille & Carr (1999).

2.2.8 Statistical analysis

The data from the sensory experiments with the fermented milks were analyzed by the ANOVA procedures, using Tuckey test to evaluate differences

among averages, by the Statistical Analysis System (SAS 8.02 TS level 02M0). A P value < 0.05 was considered to be significant.

3. Results and discussion

Data from measurements of pH, acidity, viable cell counts and average of scores obtained at sensory evaluations of fermented milks, realized at 1, 7, 14 and 21 days of storage of two processings are presented on Tables 2, 4, 6 and 8 respectively . Data from acidity and average sensory scores arranged in decreasing numerical order, and pH values arranged in increasing numerical order, are presented on Tables 3, 5, 7 and 9 together with the results of statistical treatment of sensory scores. Some sensory results showed numerical differences but, statistically, they were not different ($P < 0,05$).

Table 2. Values of pH, acidity, viable cell counts and average of scores obtained at sensory evaluations of fermented milks added or not of BL^x and LAC^y at day 1 of the storage for processings 1 and 2.

Proc.	Comb.	pH	Tit Acid ^z	ST ^t	LAC	BL	taste ^v	acidity ^v
1	C1	4.52	106.4	2.0x10 ⁹	- ^w	- ^w	6.9 ^a	7.2 ^a
1	C2	4.45	109.3	2.1 x10 ⁹	- ^r	1.0 x10 ⁸	6.3 ^{ab}	6.7 ^a
1	C3	4.65	102.6	2.0 x10 ⁹	3.5 x10 ⁷	2.0 x10 ⁷	5.5 ^b	6.3 ^{ab}
1	C4	4.63	94.9	2.0x10 ⁹	2.8 x10 ⁷	8.5 x10 ⁷	5.9 ^{ab}	6.3 ^{ab}
1	C5	4.54	112.1	2.0 x10 ⁹	1.7 x10 ⁷	7.4 x10 ⁷	6.1 ^{ab}	6.3 ^{ab}
1	C6	4.72	117.4	2.3 x10 ⁹	3.4 x10 ⁷	- ^s	5.2 ^b	5.5 ^b
2	C1	4.53	106.1	1.9x10 ⁹	- ^w	- ^w	7.4 ^a	6.5 ^a
2	C2	4.57	109.3	3.0x10 ⁹	- ^r	3.7 x10 ⁷	5.7 ^{ab}	6.1 ^a
2	C3	4.58	104.0	2.0x10 ⁹	5.3 x10 ⁷	4.4x10 ⁷	5.8 ^{ab}	6.6 ^a
2	C4	4.5	109.6	2.1x10 ⁹	4.3x10 ⁷	3.5x10 ⁷	5.5 ^b	6.6 ^a
2	C5	4.48	102.2	1.8x10 ⁹	2.4x10 ⁷	2.7x10 ⁷	6.6 ^{ab}	5.7 ^a
2	C6	4.78	120.4	2.2x10 ⁹	5.4x10 ⁸	- ^s	5.6 ^{ab}	5.6 ^a

x, y and t. BL, LAC and ST means, *Bif. longum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus*, respectively

z. Tit Acid means titratable acidity

v.- different letters indicate significant differences (P<0.05) among combinations of the fermented milks

w.- Fermented milk without addition of *Bif. longum* and *L. acidophilus*

r - Fermented milk without addition of *L. acidophilus*

s - Fermented milk without addition of *Bif. longum*

Table 3. Titratable acidity, pH and sensory scores order of the fermented milks at day 1 of storage for processings 1 and 2.

Parameter	Processing	Order ²
sensory attribute: taste ¹	1 ^o	C1 ^a > C2 ^{ab} > C5 ^{ab} > C4 ^{ab} > C3 ^b > C6 ^b
sensory attribute: taste ¹	2 ^o	C1 ^a > C5 ^{ab} > C3 ^{ab} > C2 ^{ab} > C6 ^{ab} > C4 ^b
sensory attribute: acidity ¹	1 ^o	C1 ^a > C2 ^a > C3 ^{ba} = C4 ^{ba} = C5 ^{ba} > C6 ^b
sensory attribute: acidity ¹	2 ^o	C3 ^a = C4 ^a > C1 ^a > C2 ^a > C5 ^a > C6 ^a
titratable acidity	1 ^o	C6 > C4 > C2 > C1 > C3 > C5
titratable acidity	2 ^o	C6 > C4 > C2 > C1 > C3 > C5
pH	1 ^o	C2 < C1 < C5 < C4 < C3 < C6
pH	2 ^o	C5 < C4 < C1 < C2 < C3 < C6

1. The order refers to the numerical score only.

2. The fermented milk combinations showing the same letter did not differ (P<0.05).

Table 4. Values of pH, acidity, viable cell counts and average of scores obtained at sensory evaluations of fermented milks added or not of BL^x and LAC^y at day 7 of the storage for processings 1 and 2.

Proc.	Comb.	pH	Tit Acid ^z	ST ^w	LA	BL	taste ^v	acidity ^v
1	C1	4.32	108.03	2.2	- ^w	- ^w	6.7 ^{ab}	6.2 ^a
1	C2	4.26	114.70	2.2 ^{x10⁹}	- ^r	1.9 x10 ⁷	6.5 ^{ab}	6.2 ^a
1	C3	4.33	113.43	2.2x10 ⁹	2.9 x10 ⁷	9.1 x10 ⁶	6.3 ^{ab}	6.2 ^a
1	C4	4.30	104.77	2.3	2.7 x10 ⁷	2.4 x10 ⁷	5.7 ^b	6.1 ^a
1	C5	4.28	115.93	2.1 ^{x10⁹}	1.8 x10 ⁷	2.2 x10 ⁷	7.0 ^a	6.7 ^a
1	C6	4.38	125.77	2.3 ^{x10⁹}	2.9 x10 ⁷	- ^s	6.3 ^{ab}	5.9 ^a
2	C1	4.2	114.43	2.3x10 ⁹	- ^w	- ^w	6.3 ^{ab}	5.8 ^a
2	C2	4.25	118.78	2.1x10 ⁹	- ^r	3.0 x10 ⁷	6.8 ^a	5.6 ^a
2	C3	4.22	116.44	2.6x10 ⁹	3.1 x10 ⁷	4.5x10 ⁷	6.6 ^{ab}	6.5 ^a
2	C4	4.22	117.78	1.9x10 ⁹	2.0x10 ⁷	3.6x10 ⁷	5.8 ^b	5.7 ^a
2	C5	4.2	114.60	1.9x10 ⁹	2.0x10 ⁷	4.6x10 ⁷	6.4 ^{ab}	6.0 ^a
2	C6	4.35	135.12	2.8x10 ⁹	5.9x10 ⁷	- ^s	5.8 ^b	6.0 ^a

x, y and t. BL, LAC and ST means, *Bif. longum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus*, respectively

z. Tit Acid means titratable acidity

v.- different letters indicate significant differences (P<0.05) among combinations of the fermented milks

w.- Fermented milk without addition of *Bif. longum* and *L. acidophilus*

r - Fermented milk without addition of *L. acidophilus*

s - Fermented milk without addition of *Bif. longum*

Table 5. Titratable acidity, pH and sensory scores order of the fermented milks after day 7 of storage for processings 1 and 2.

Parameter	Processing	Order ²
sensory attribute: taste ¹	1 ^o	C5 ^a > C1 ^{ab} > C2 ^{ab} > C3 ^{ab} = C6 ^{ab} > C4 ^b
sensory attribute: taste ¹	2 ^o	C2 ^a > C3 ^{ab} > C5 ^{ab} > C1 ^{ab} > C6 ^b = C4 ^b
sensory attribute: acidity ¹	1 ^o	C5 ^a > C1 ^a = C2 ^a = C3 ^a > C4 ^a > C6 ^a
sensory attribute: acidity ¹	2 ^o	C3 ^a > C5 ^a = C6 ^a > C1 ^a > C4 ^a > C2 ^a
titratable acidity	1 ^o	C6 > C5 > C2 > C3 > C1 > C4
titratable acidity	2 ^o	C6 > C2 > C4 > C3 > C5 > C1
pH	1 ^o	C2 < C5 < C4 < C1 < C3 < C6
pH	2 ^o	C1 = C5 < C3 = C4 < C2 < C6

1. The order refers to the numerical score only.

2. The fermented milk combinations showing the same letter did not differ (P<0.05).

Table 6. Values of pH, acidity, viable cell counts and average of scores obtained at sensory evaluations of fermented milks added or not of BL^x and LAC^y at day 14 of the storage for two processings 1 and 2.

Proc.	Comb.	pH	Tit Acid ^z	ST ^w	LA	BL	taste ^v	acidity ^v
1	C1	4.26	114.90	2.4	- ^w	- ^w	6.5 ^{ab}	6.3 ^a
1	C2	4.21	117.43	2.6	- ^r	4.0	6.9 ^a	6.2 ^a
1	C3	4.29	116.60	2.0x10 ⁹	6.7 x10 ⁶	2.1x10 ⁷	5.7 ^{ab}	5.8 ^a
1	C4	4.24	110.33	1.9	9.0 x10 ⁶	2.5x10 ⁷	5.6 ^b	5.7 ^a
1	C5	4.22	123.10	2.3x10 ⁹	6.0 x10 ⁵	9.0x10 ⁷	7.0 ^a	6.2 ^a
1	C6	4.35	135.07	2.4x10 ⁹	1.1 x10 ⁷	1x10 ⁶ - ^s	6.2 ^{ab}	5.9 ^a
2	C1	4.35	118.77	2.6x10 ⁹	- ^w	- ^w	6.5 ^{ab}	6.4 ^a
2	C2	4.22	119.10	2.4x10 ⁹	- ^r	4.9	7.4 ^a	5.7 ^a
2	C3	4.32	117.17	2.6x10 ⁹	1.2 x10 ⁷	4.4x10 ⁷	5.6 ^{ab}	5.5 ^a
2	C4	4.24	116.2	2.0x10 ⁹	1.5x10 ⁷	3.0x10 ⁷	5.5 ^b	5.0 ^a
2	C5	4.12	122.13	2.0x10 ⁹	6.0x10 ⁵	4.6x10 ⁷	6.7 ^a	5.9 ^a
2	C6	4.28	140.38	1.5x10 ⁹	1.8x10 ⁷	- ^s	5.0 ^{ab}	5.6 ^a

x, y and t. BL, LAC and ST means, *Bif. longum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus*, respectively

z. Tit Acid means titratable acidity

v.- different letters indicate significant differences (P<0.05) among combinations of the fermented milks

w.- Fermented milk without addition of *Bif. longum* and *L. acidophilus*

r - Fermented milk without addition of *L. acidophilus*

s - Fermented milk without addition of *Bif. longum*

Table 7. Titratable acidity, pH and sensory scores order of the fermented milks after day 14 of storage for processings 1 and 2.

Parameter	Processing	Order ²
sensory attribute: taste ¹	1 ^o	C5 ^a > C2 ^a > C1 ^{ab} > C6 ^{ab} > C3 ^{ab} > C4 ^b
sensory attribute: taste ¹	2 ^o	C2 ^a > C5 ^a > C1 ^{ab} > C6 ^{ab} > C3 ^{ab} > C4 ^b
sensory attribute: acidity ¹	1 ^o	C1 ^a > C2 ^a = C5 ^a = C6 ^a > C3 ^a > C4 ^a
sensory attribute: acidity ¹	2 ^o	C1 ^a > C5 ^a > C2 ^a > C6 ^a > C3 ^a > C4 ^a
titratable acidity	1 ^o	C6 > C5 > C2 > C3 > C1 > C4
titratable acidity	2 ^o	C6 > C5 > C2 > C1 > C3 > C4
pH	1 ^o	C2 < C5 < C4 < C1 < C3 < C6
pH	2 ^o	C5 < C2 < C4 < C6 < C3 < C1

1. The order refers to the numerical score only.

2. The fermented milk combinations showing the same letter did not differ (P<0.05).

Table 8. Values of pH, acidity, viable cell counts and average of scores obtained at sensory evaluations of fermented milks added or not of BL^x and LAC^y at day 21 of the storage for processings 1 and 2.

Proc.	Comb.	pH	Tit Acid ^z	ST ^w	LA	BL	taste ^v	acidity ^v
1	C1	4.25	107.60	2.1 x10 ⁹	- ^w	- ^w	6.7 ^a	6.3 ^a
1	C2	4.16	118.60	2.0 x10 ⁹	- ^r	2.0 x10 ⁷	6.4 ^{ab}	6.1 ^a
1	C3	4.24	114.43	2.0x10 ⁹	4.2 x10 ⁶	1.6 x10 ⁷	4.8 ^{cd}	5.2 ^{ab}
1	C4	4.20	108.77	2.0 x10 ⁹	5.0 x10 ⁶	1.3 x10 ⁷	5.6 ^{bc}	5.5 ^{ab}
1	C5	4.11	119.43	2.1 x10 ⁹	3.3 x10 ⁵	1.4 x10 ⁷	6.8 ^a	6.2 ^a
1	C6	4.22	123.67	2.1 x10 ⁹	9.0 x10 ⁶	- ^s	4.5 ^d	4.6 ^b
2	C1	4.18	130.13	3.1x10 ⁹	- ^w	- ^w	6.1 ^{ab}	5.8 ^a
2	C2	4.14	137.34	1.6x10 ⁹	- ^r	2.7 x10 ⁶	6.5 ^a	5.9 ^a
2	C3	4.17	127.89	2.2x10 ⁹	5.1 x10 ⁶	5.0x10 ⁶	5.0 ^b	5.5 ^{ab}
2	C4	4.16	130.77	1.4x10 ⁹	4.0x10 ⁶	2.8x10 ⁶	5.9 ^{ab}	5.8 ^a
2	C5	4.16	126.61	2.5x10 ⁹	3.7x10 ⁵	4.4x10 ⁶	6.1 ^{ab}	5.8 ^a
2	C6	4.28	153.82	1.8x10 ⁹	7.5x10 ⁶	- ^s	3.8 ^c	4.6 ^b

x, y and t. BL, LAC and ST means, *Bif. longum*, *L. acidophilus* and *Str. thermophilus*, respectively

z. Tit Acid means titratable acidity

v.- different letters indicate significant differences (P<0.05) among combinations of the fermented milks

w.- Fermented milk without addition of *Bif. longum* and *L. acidophilus*

r - Fermented milk without addition of *L. acidophilus*

s - Fermented milk without addition of *Bif. longum*

Table 9. Titratable acidity, pH and sensory scores order of the fermented milks after day 21 of storage for processings 1 and 2.

Parameter	Processing	Order ²
sensory attribute: taste ¹	1 ^o	C5 ^a > C1 ^a > C2 ^{ab} > C4 ^{bc} > C3 ^{cd} > C6 ^d
sensory attribute: taste ¹	2 ^o	C2 ^a > C5 ^{ab} = C1 ^{ab} > C4 ^{ab} > C3 ^b > C6 ^c
sensory attribute: acidity ¹	1 ^o	C1 ^a > C5 ^a > C2 ^a > C4 ^{ab} > C3 ^{ab} > C6 ^b
sensory attribute: acidity ¹	2 ^o	C2 ^a > C1 ^a = C5 ^a = C4 ^a > C3 ^{ba} > C6 ^b
titratable acidity	1 ^o	C6 > C5 > C2 > C3 > C1 > C4
titratable acidity	2 ^o	C6 > C2 > C5 > C3 > C1 > C4
pH	1 ^o	C5 < C2 < C4 < C6 < C3 < C1
pH	2 ^o	C2 < C5 = C4 < C3 < C1 < C6

1. The order refers to the numerical score only.

2. The fermented milk combinations showing the same letter did not differ (P<0.05).

3.1. Sensory evaluation of the taste attribute

The sensory differences among fermented milks added or not of LAC and BL (combinations) were significantly ($P<0.05$) perceived as storage time increased.

At 21 days of refrigerated storage sensory scores of the processing 1 and 2 for the attribute taste showed good similarity (Table 8). The most favourite combinations were C5 and C2 (Table 9). C5 contained BL and LAC (IPC of 10^8 and 10^7 cfu mL⁻¹, respectively) and C2 contained BL only (IPC de 10^8 cfu mL⁻¹). Furthermore, C5 and C2 received similar sensory scores and did not differ significantly ($P<0.05$). These favourite combinations did not differ significantly ($P<0.05$) from C1, the standard fermented milk (Table 8). Davidson et al (2000) found similar results in frozen yogurt. The combinations C3 and C6 received lowest sensory scores (Tables 8 and 9). C3 contained BL and LAC (IPC of 10^7 and 10^8 cfu mL⁻¹, respectively) and C6 contained LAC only (IPC de 10^8 cfu mL⁻¹). C6 was significantly ($P<0.05$) different from C5, C2 and C1 (Table 9), receiving the lowest sensory scores. Chandan & Shahani (1992), mentioned by Davidson *et al* (2000), reported that the activity of yogurt starter and probiotic bacteria caused specific changes in the products affecting sensory characteristics. Laroia & Martin (1991) mentioned that sensory characteristics of the fermented milk products cultured with bifidobacteria were different from the yogurts produced with traditional starters.

Baig & Prasad (1996) studied the effect of adding *Bif. bifidum* as a supplementary starter culture on the biochemical, microbiological and organoleptic characteristics of yogurt. These authors reported that supplementation with *Bif. bifidum* reduced ($P<0,05$) the flavour score slightly.

At 14 days of refrigerated storage sensory scores of combinations C5 and C2, from processings 1 and 2, were the most preferred combinations (Tables 6 and 7). These combinations received similar sensory scores and did not differ significantly ($P<0.05$) between each other. They did not differ significantly ($P<0.05$) from C1, the standard fermented milk (Table 6). The combination C4 differed significantly ($P<0.05$) from C5 and C2 and received the lowest sensory scores (Table 7). Until day 14th C4 and C6 did not differ from each other. This differentiation occurred after 14 days of storage.

At 7 days of refrigerated storage sensory scores of the processing 1 and 2 showed significant differences ($P<0.05$) among favourites combinations (Tables 4 and 5). In the first processing the favourites combinations were C5, C1 and C2 and C3 was the fourth preferred. Similar results were obtained at 21 days of storage (Tables 5 and 9). In the other hand, C2, C3 and C5 were the favourites combinations in processing 2, while C1 was the fourth preferred. The most preferred combinations C5 and C2 kept their positions in the preference order at 14 and 21 days of storage (Tables 7 and 9) although C1, C2, C3 and C5 did not differ significantly ($P<0.05$).

It was noted at 7 days of storage that C4 received the lowest sensory scores (Table 5) and differed significantly ($P<0.05$) from C5 in processing 1. In processing 2, in this same period of storage, C4 was the least preferred and differed significantly from C2.

At 1 day of refrigerated storage the fermented milks most preferred by the panelists were C1, C2 and C5 (Tables 2 and 3) and did not differ ($P<0.05$) from each other, in processing 1. These results are similar those found after 21 days of storage. In the processing 2, the favourites combinations were C1, C5

and C3 although C2 did not differ ($P<0.05$) from these favourites. At 1 day of storage, in processing 1, C6 received the lowest sensory scores and differed ($P<0.05$) from C1. In the processing 2, C4 received the lowest sensory scores.

The differences in the preference order of C3 and C1 can be related to others organic acids produced by the BL and/or LAC, instead of lactic acid, in the fermented milk C3. The production of higher quantities of acetic acid from 7th day to 14th of storage, for example, should cause sensory differences that panelist could perceive as suggested by Gomes & Malcata (1999).

The results presented by Samona et al. (1996) showed an increase of the acetic acid concentration at different shelf life periods at 4°C of yogurts that contained *Bif. adolescentis*, *Bif. bifidum* and *Bif. longum*. The increase in the acetic acid concentration varied according to probiotic strain and yogurt starter source used. Some yogurts reached, after 21 days of storage, the double of the acetic acid concentration measured at the day of yogurt processing. Our results regarding sensory preferences, probably, could be explained by the microorganisms behaviors similar to that described by Samona et al. (1996). The reduction in the sensory scores of C3 observed after 7 days, in processing 1, and after 14 days of storage, in processing 2, could be related to the acetic acid production described by Samona et al (1996).

3.2. Sensory evaluation of the acidity attribute

At 21 days of storage sensory scores for the attribute acidity were similar to those of the attribute taste (Table 8 and 9). The fermented milks C2, C5 and C1 received the highest scores and did not differ from each other. Similarly to

the attribute taste, C6 received the lowest sensory scores and differed from C2, C5 and C1 in the two processings.

At days 14, 7 and 1 of storage the fermented milks received acidity sensory scores that did not differ significantly ($P<0.05$) (Tables 2 to 7).

After 1 day of storage, in the processing 1, the most preferred fermented milks were C1, C2 and C3 that did not differ from each other significantly ($P<0.05$) (Tables 2 and 3). The fermented milk C6 received the lowest sensory scores, in the processing 1 and 2, and differed significantly ($P<0.05$) from C1 and C2. In the processing 2, the most preferred fermented milks were C3, C4 and C1.

The fermented milk C6 was the least preferred by the sensory panelists when evaluating the attributes taste and acidity. C6 showed the highest titratable acidity.

3.3. Measurements of pH and titratable acidity of the fermented milks

The fermented milk C6 that contained LAC and ST, showed the highest titratable acidity during the storage time in all the measurements realized, in the two processings. However the C6 fermented milk did not show the lowest pH which probably is due to differences in the ionization constant, amount and relative proportions of the organic acids produced. According to Shahani, Vakil & Kilara (1976) *L. acidophilus* produces lactic acid, acetic acid, benzoic acid, hydrogen peroxide and natural antibodies known as bacteriocins and microcins. In the fermented milk C6, ST produced the lactic acid during fermentation and storage and LAC produced additionally to lactic acid other acids like acetic acid, during storage period.

3.4. Viable cell counts of the fermented milks

All the fermented milks showed constant viable cell counts of ST during the 21 days of storage, in the two processings (Tables 2, 4, 6 and 8). Oliveira, Sodini, Remeuf, Tissier & Corrieu (2002) reported similar results for counts of *Str.thermophilus* in fermented lactic beverages containing probiotic bacteria. However, Vinderola, Mocchiutti & Reinheimer (2002) reported that lactic bacteria were inhibited by the probiotic bacteria and vice-versa. These authors stressed the existence of lactic bacteria strains which were not inhibited and the necessity of a careful restriction of the results obtained to the strains studied. The viable cell counts of ST in our study showed that the inhibition of ST by the BL and LAC did not occur.

Viable cell counts of BL and LAC related to the first and second processings, obtained during 21 days of storage at 4°C, from fermented milks C2, C3, C4, C5 and C6 are presented in Table 10.

Table 10. Comparison among viable cell counts of BL¹ e LAC²

Comb	Proc.	IPC ³ (cfu mL ⁻¹)	LAC and BL viable cell counts		Behaviour of BL ⁴	Behaviour of LAC ⁴
			day 1	day 21		
C2	1	1,0 x10 ⁸ B	1,0 x10 ⁸	2,0 x10 ⁷	decreased 1 log.cycle	---
	2	0 A 1,0 x10 ⁸ B 0 A	---	---	---	---
C3	1	1,0 x10 ⁷ B	2,0 x10 ⁷	1,6 x10 ⁷	it kept in same cycle	
		1,0 x10 ⁸ A	3,5 x10 ⁷	4,2 x10 ⁶		decreased 1 log.cycle
	2	1,0 x10 ⁷ B	4,4x10 ⁷	5,0x10 ⁶	decreased 1 log.cycle	
		1,0 x10 ⁸ A	5,3 x10 ⁷	5,1 x10 ⁶	---	decreased 1 log.cycle
C4	1	1,0 x10 ⁸ B	8,5 x10 ⁷	1,3 x10 ⁷	it kept in same cycle	
		1,0 x10 ⁸ A	2,8 x10 ⁷	5,0 x10 ⁶		decreased 1 log.cycle
	2	1,0 x10 ⁸ B	3,5x10 ⁷	2,8x10 ⁶	decreased 1 log.cycle	
		1,0 x10 ⁸ A	4,3x10 ⁷	4,0x10 ⁶		decreased 1 log.cycle
C5	1	1,0 x10 ⁸ B	7,4 x10 ⁷	1,4 x10 ⁷	it kept in same cycle	
		1,0 x10 ⁷ A	1,7 x10 ⁷	3,3 x10 ⁵		decreased 2 log.cycles
	2	1,0 x10 ⁸ B	2,7x10 ⁷	4,4x10 ⁶	decreased 1 log.cycle	
		1,0 x10 ⁷ A	2,4x10 ⁷	3,7x10 ⁵		decreased 2 log.cycles
C6	1	0 B	---	---	---	---
		1,0 x10 ⁸ A	3,4 x10 ⁷	9,0 x10 ⁶		decreased 1 log.cycle
	2	0 B	---	---	---	---
		1,0 x10 ⁸ A	5,4x10 ⁸	7,5x10 ⁶		decreased 2 log.cycles

1, 2. BL means *Bif. longum* and LAC means *L. acidophilus*

3. IPC means inoculated probiotics concentrations (cfu/ml)

4. these analyzes were done using viable cell counts determined on day 1 and on day 21.

The viable cell counts of BL were kept around 10⁷ and 10⁶ufc mL⁻¹ until the 21th of storage at 4°C (Table 10). The addition to the ST fermented milk of 10⁷ BL cells mL⁻¹ instead of 10⁸ represents an economic advantage.

The viable cell counts of LAC for fermented milk C5 from 14 days of storage were on the range of 10⁵ufc mL⁻¹ (Table 10) which represents a 2

logarithmic cycles reduction of LAC, since for the production of C5 were added 10^7 ufc mL⁻¹ of LAC and 10^8 ufc mL⁻¹ of BL. Gregurek (1999) reported that counts and the stability of bifidobacteria starter cultures used were higher than those of *L. acidophilus*. Vinderola et al (2002) reported that *L. acidophilus* was the sole species inhibited by the others tested (*Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Lb.casei*).

In the fermented milks C3, C4 and C6 the viable cell counts of LAC were kept above 1×10^6 ufc mL⁻¹ until the end of 21 days of storage

5. Conclusions

The taste and acidity sensory attributes were significantly ($P < 0.05$) perceived while storage time increased.

The favourite combinations contained, initially, *Bif. longum* and *L. acidophilus* (10^8 and 10^7 cfu mL⁻¹, respectively, C5) and *Bif. longum* only (10^8 cfu mL⁻¹, C2). These combinations did not differ significantly among them and neither from the standard fermented milk, C1.

The lowest sensory scores and highest titratable acidity values was for *L. acidophilus* combination (10^8 cfu mL⁻¹ initial concentration, C6). C6 differed significantly ($P < 0.05$) from C5, C2 and C1.

All the fermented milks showed constant viable cell counts of ST during the 21 days of storage. The viable cell counts of BL were kept constant or reduced 1 logarithmic cycle and viable cell counts of LAC were reduced 1 or 2 logarithmic cycle. The viable cell counts of all microorganisms agreed with minimal counts for probiotics to support beneficial health effects and with

Brazilian law standards that establish 10^6 cfu mL⁻¹ as minimal microbial counts for fermented milk.

The fermented milk C6 showed the highest acidity during the storage time in all the measurements realized.

We did not observe inhibition of over-acidification by bifidobacteria or *L. acidophilus*.

6. References

1. Association of Official Analytical Chemists. (1995). Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th edition. Washington, vol. 1-2.
2. Baig, M.I.; Prasad, V. (1996). Effect of incorporation of cottage cheese whey solids and *Bifidobacterium bifidum* in freshly made yoghurt. Journal of Dairy Research, 63, 467 – 473.
3. Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L.; Collins, J.K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. International Journal of Food Microbiology, 35 (1), 1-27.
4. Dave, R.I.; Nagendra, P.S. (1997). Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. International Dairy Journal, 7 (8/9), 537–545.
5. Davidson, R.H.; Duncan, S.E.; Hackney, C.R.; Eigel, W.N.; Boling, J.W. (2000). Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. Journal of Dairy Science, 83 (4), 666-673.
6. Gregurek, L. (1999). Effect of level of starter culture on viability of probiotic bacteria in yoghurts. Mljekarstvo, 49, 1, 3-8.

7. Godward, G.; Sultana, K.; Kailasapathy, K.; Peiris, P.; Arumugaswamy, R.; Reynolds, N. (2000). The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*, 55(8), 441-445.
8. Gomes, A.M.P.; Malcata, F.X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 4/5, 139-157.
9. Hoier, E. (1992). Use of probiotics starter cultures in dairy products. *Food Australia*, 44, 418-420.
10. Lapierre, L.; Undeland, P.; Cox, L.J. (1992). Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of *Bifidobacteria* in fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 75 (5), 1192-1196.
11. Laroia, S.; Martin, J.H. (1991). Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*, 26, 13-21.
12. Lourens-Hattingh, A.; Viljoen, B.C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11 (1/2), 1-17.
13. Macfie, H.J.; Bratchell, N.; Greenhoff, K.; Vallis, L.V. (1989). Designs to balance the effect of order presentation and first-order effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4 (2), 129-148.
14. Medina, L.M.; Jordano, R. (1994). Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 56(8), 731-733.

15. Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (1999) Controls for tests room, product, and panel; Attribute difference tests: How does attribute X differ between samples; Affective tests: consumer tests and in-house panel acceptance tests; Basic statistical methods; Guidelines for choice of technique. In M. Meilgaard, G.V. Civille, B.T. Carr, Sensory evaluation techniques, (pp. 23 36, 99 122, 231 304, 337 344) London: CRC Press Inc.
16. Oliveira, M.N.; Sodini, I.; Remeuf, F.; Tissier, J.P.; Corrieu, G. (2002). Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures, *Journal of Food Science*, 67(6) 2336-2341.
17. Ouwehand, A.C.; Salminen, S.J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, 8 (9), 749-758.
18. Rybka, S.; Kalaisapathy, K. (1997). Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. *Milchwissenschaft*, 52(7), 390-394.
19. Samona, A.; Robinson, R.K. (1994). Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 47(2), 58-60.
20. Samona, A.; Robinson, R.K.; Marakis, S. (1996). Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiology*, 13(4), 275-280.
21. Sanders, M.E.; Walker, D.C.; Walker, K.M.; Aoyama, K.; Klaenhammer, T.R. (1996). Performance of commercial cultures in fluid milk applications.. *Journal of Dairy Science*, 79 (6), 943-955.

22. Saxelin, M.; Grenov, B.; Svensson, U.; Fondén, R.; Reniero, R. & Mattila-Sandholm, T. (1999) The technology of probiotics Trends in Food Science & Technology, 10 (12): 387-392.
23. Shah, N.P. (1997). Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: A review. Milchwissenschaft, 52, 2, 72-76.
24. Shahani, K.M.; Vakil, J.R. (1976). Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II Isolation of acidophilin from *L. acidophilus*. Cultured Dairy Products Journal, 12, 2, 8 – 11.
25. Tamime, A. Y., Marshall, V.M.E., Robinson, R.K. (1995) Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. Journal of Dairy Research, 62, 1, 151-187.
26. Vinderola (1999) Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. Int. Dairy J. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. International Dairy Journal, 9, 8, 497-505.
27. Vinderola, C.G.; Mocchiutti, P.; Reinheimer, J.A. (2002). Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. Journal Dairy Science, 85, 4, 721-729.
28. Zacarchenco, P.B., Massaguer-Roig, S. (2002). Differential enumeration of *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus*. In: 26th IDF World Dairy Congr. (Congrilait) Sep.24-27 (Paris FR), Poster n° E1-6, 1 CD-Rom Poster Proc.

CAPÍTULO V

**AVALIAÇÃO SENSORIAL, MICROBIOLÓGICA E DE PÓS-ACIDIFICAÇÃO
DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITES FERMENTADOS
CONTENDO *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* E
*Lactobacillus acidophilus***

**AVALIAÇÃO SENSORIAL, MICROBIOLÓGICA E DE PÓS-ACIDIFICAÇÃO
DURANTE A VIDA DE PRATELEIRA DE LEITES FERMENTADOS
CONTENDO *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* E
*Lactobacillus acidophilus*¹**

Três leites fermentados, o primeiro por *Str. thermophilus*, o segundo por *Bif. longum* e o terceiro por *L. acidophilus* e o leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais dos leite fermentado em separado por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* tiveram suas características sensoriais, de pH, acidez titulável e contagens de células viáveis determinadas, ao longo de 21 dias de estocagem a 4°C. Não houve diferença significativa entre o leite fermentado elaborado por mistura e aquele contendo apenas *Str. thermophilus*. O leite fermentado por *Str. thermophilus* apresentou a maior acidez e menor pH, enquanto o leite fermentado por *Bif. longum* apresentou a menor acidez e maior pH. As contagens de células viáveis de *Str. thermophilus* (10^9 e 10^8 ufc/ml) e *Bif. longum* (10^8 ufc/ml), tanto no leite fermentado elaborado pela mistura como nos isolados, mantiveram-se constantes até 21 dias de estocagem. As contagens de células viáveis de *L. acidophilus* reduziram-se em um ciclo logarítmico, permanecendo em 10^7 ufc/ml, até os 21 dias.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a qual foi enviado.

MICROBIOLOGICAL, SENSORY AND POST-ACIDIFICATION EVALUATION
DURING SHELF-LIFE OF FERMENTED MILKS CONTAINING *Streptococcus*
thermophilus, *Bifidobacterium longum* AND *Lactobacillus acidophilus*

Sensory, pH, titratable acidity and microbial counts characteristics of milks fermented separately by *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* and a beverage prepared by mixing them were studied during 21 days of storage at 4°C. The mixed beverage and *Str. thermophilus* fermented milk did not differ significantly ($p < 0.05$) among them. Milk fermented by *Str. thermophilus* and by *Bif. longum* showed, respectively, the highest titratable acidity and the lowest pH and the lowest titratable acidity and the highest pH. *Str. thermophilus* (10^9 e 10^8 cfu/ml) e *Bif. longum* (10^8 cfu/ml) viable cell counts were kept constant in the beverage and in the separated fermented milks, during all the storage. *L. acidophilus* viable cell counts, in the beverage and in the separated fermented milk, were reduced from 10^8 (initial counts) to 10^7 cfu/ml after 21 days of storage.

1. INTRODUÇÃO

O uso de *Bifidobacterium* spp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados tornou-se popular no final da década de 70 como resultado de grande aumento no conhecimento da taxonomia e ecologia das bifidobactérias. Sua popularidade também aumentou devido a sua baixa capacidade de acidificação durante o processo de pós-acidificação na estocagem. Grande

número de patentes surgiu principalmente devido ao desenvolvimento de novos produtos e produção de fermento (8).

Produtos lácteos contendo probióticos constituem, de acordo com VINDEROLA *et al.* (24), importante segmento para os setores de desenvolvimento de novos produtos das indústrias e para o mercado. A incorporação de bifidobactérias nestes produtos, de acordo com estes autores, pode ser difícil devido as condições de atmosfera e pH requeridas por estes microrganismos.

VINDEROLA, BAILO e REINHEIMER (25) afirmaram que a adição de bactérias probióticas ao leite fermentado é prática amplamente adotada pelos laticínios. Contudo, estes autores reconheceram que fatores como acidez do iogurte, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem condicionar a sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados. Sobre condições de estocagem destes produtos, os mesmos autores salientaram não haver estudos suficientes sobre a sobrevivência dos probióticos durante a estocagem refrigerada.

As bifidobactérias são usadas em fermentações de leite de modo limitado devido seu lento crescimento. Embora o leite seja um meio satisfatório de crescimento porque contém todos os nutrientes essenciais, aminoácidos e pequenos peptídeos estão presentes em quantidades pequenas para suportar o crescimento de bifidobactérias. Contudo, casos de adaptação das bifidobactérias ao leite após sucessivas transferências têm sido reportados (8).

De acordo com KLAVER *et al.* (1993) citado por DAVE e SHAH (3) as bactérias probióticas crescem lentamente no leite devido a sua falta de atividade proteolítica, sendo prática comum a adição de bactérias do iogurte

para reduzir o tempo de fermentação. *Lactobacillus delbrueckii* spp *bulgaricus*, uma das bactérias do iogurte, produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada (pós-acidificação) o que afeta, segundo estes autores, a viabilidade das bactérias probióticas. A fim de superar o problema da pós-acidificação, de acordo com DAVE e SHAH (3), a atual tendência é usar fermentos chamados ABT, que contém *L. acidophilus*, bifidobactéria e *Str. thermophilus*. Também OLIVEIRA *et al.* (18) afirmaram que bactérias lácticas podem ser adicionadas durante a mistura final do produto, contudo, a solução mais barata é o uso de leite fermentado contendo probióticos.

Em geral, bifidobactérias crescem melhor em meios sintéticos do que em leite. Contudo estes meios são caros para produção de bifidobactérias em grande escala e podem causar sabores desagradáveis nos produtos lácteos finais. Assim, melhora das condições de crescimento para diferentes linhagens de bifidobactérias no leite através, por exemplo, da adição de fontes de nitrogênio ou substâncias que abaxiem o potencial redox do meio e a seleção de linhagens menos fastidiosas podem ser caminhos para o sucesso (8).

Produtos lácteos fermentados com bactérias lácticas têm sido usados no tratamento de doenças do trato gastro-intestinal como intolerância a lactose, gastro enterites agudas, efeitos adversos da radioterapia, constipação e alergias alimentares (6, 7, 8, 9, 11, 14, 17, 21, 26). De acordo com FONDÉN *et al.* (6), estas doenças estão associadas a distúrbios na microbiota intestinal e a vários graus de inflamação da mucosa intestinal, levando ao aumento da permeabilidade intestinal. A adição de bifidobactérias a dieta pode ajudar a atingir os níveis diários recomendáveis de vitaminas do complexo B. A biodisponibilidade de minerais também pode ser aumentada pelo consumo de

produtos contendo bifidobactérias devido o abaixamento do pH gástrico, além da melhora na digestibilidade das proteínas (6, 8, 11).

Cada linhagem dentro de uma mesma espécie exibe comportamento único quanto a taxa de crescimento, taxa metabólica, atividade proteolítica e promoção de sabor (8). VINDEROLA *et al.* (24) relataram que o sucesso da adição de bactérias probióticas é dependente das espécies e linhagens usadas, das interações metabólicas com bactérias lácticas, das condições de fermentação, do pH do produto, da presença de oxigênio e da temperatura de estocagem (24).

As bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácidos acético e láctico a taxa de 3:2; assim, crescimento excessivo pode gerar produtos com sabor e aroma “a vinagre”, o que não é aceitável para os consumidores. A síntese de ácido acético por bifidobactérias é relatada por SAMONA, ROBINSON e MARAKIS (19), LANKAPUTHRA, SHAH e BRITZ (12) e TAMIME, MARSHALL e ROBINSON (22). Nos produtos probióticos fermentados é importante que a cultura probiótica usada contribua para boas características sensoriais. As interações entre probióticos e fermento podem ter impacto sobre a qualidade do produto já que é bem comum o uso em conjunto destas bactérias. Fermentos viáveis podem ser *Str. thermophilus*, culturas de iogurte e fermentos mesofílicos com diferentes combinações de linhagens de *Lactococcus*. A combinação mais favorável de fermento e bactérias probióticas específicas deve ser determinada estudando-se as combinações possíveis e selecionando aquelas cujas propriedades sensoriais e sobrevivência é mais vantajosa (14).

De acordo com MATTILA-SANDHOLM et al. (14), MATTILA-SANDHOLM, MÄTTÖ E SAARELA (15) e GOMES e MALCATA (8) a seleção cuidadosa das linhagens empregadas e bom monitoramento através do processo de fabricação são necessários para controlar os produtos de metabolismo e o pH final. MATTILA-SANDHOLM, MÄTTÖ E SAARELA (15), ressaltaram que os aspectos tecnológicos considerados na seleção de probióticos são as propriedades sensoriais das linhagens, resistência a fagos, viabilidade durante o processamento e estocagem.

ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (29) estudaram as características sensoriais de leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de diferentes quantidades de *Bif. longum* e/ou *L. acidophilus* na forma liofilizada, os quais obtiveram diferentes notas nos testes de aceitação para o atributo sabor e acidez. As duas combinações preferidas neste estudo e que não diferiram entre si e com o padrão (sem probióticos) foram: a que continha *Bif. longum* e *L. acidophilus* (10^8 e 10^7 ufc/ml respectivamente), e a que continha BL (10^8). Neste estudo a combinação que possuía populações iguais de *Bif. longum* e *L. acidophilus* (10^8 ufc/ml de cada microrganismo) apresentou avaliação sensorial para o atributo sabor significativamente ($p < 0,05$) igual ao leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* (bebida padrão), na maior parte das vezes em que foi avaliada durante os 21 dias de estocagem.

De acordo com GOMES e MALCATA (8) trabalhar em assepsia e usar fatores promotores de crescimento são pré-requisitos para altas contagens iniciais de células viáveis de probióticos. O uso destes fatores se faz necessário em função da baixa velocidade de multiplicação dos probióticos em

relação as bactérias lácticas tradicionais, caso contrário a população probiótica ficaria muito abaixo da população do fermento.

GOMES e MALCATA (8) afirmaram ser que os fabricantes observem se os bio-produtos fermentados contêm número mínimo satisfatório de células ativas no momento do consumo de, pelo menos, 10^6 ufc/ml devido a dose mínima terapêutica diária que é de $10^8 - 10^9$ células viáveis realizável através de ingestão de 100g do bio-produto fermentado contendo $10^6 - 10^7$ ufc/ml. Alguns autores sugerem que para efeito terapêutico o produto deve conter $\geq 10^5$ células/ml (12, 20).

Os objetivos deste trabalho foram estudar, ao longo de 21 dias de estocagem a 4°C, as características sensoriais, de pH, de acidez titulável e de contagens microbianas dos leites fermentados separadamente por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* e de uma bebida láctica elaborada pela mistura de volumes iguais destes leites fermentados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Triptona (Difco, Detroit, Mi, USA); sacarose (Merck, Darmstadt, Ge); KH_2PO_4 (SIGMA, St. Louis, MO, USA); púrpura de bromo-cresol (Merck, Darmstadt, Ge); extrato de levedura (Merck, Darmstadt, Ge); bacto peptona, (Difco, Detroit, Mi, USA); ágar (Difco, Detroit, Mi, USA); propionato de sódio (SIGMA, St. Louis, Mo, USA); cloreto de lítio (Synth, Diadema, SP, Brasil); Bacto Bile (Difco, Detroit, Mi, USA); Anaerobac (Probac, São Paulo, SP, Brasil); ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, En); leite em pó desnatado (Molico, Nestle,

Araçatuba, SP, Brazil), leite desnatado UAT (SHEFA, Amparo, SP, Brasil). Culturas liofilizadas de *Str. thermophilus*, TA 559 (ST), *L. acidophilus*, LAC4 (LAC) e *Bif. longum*, BL (BL) da Ezal® - Texel fornecidos por Rhodia Food.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparação dos inóculos para os leites fermentados

Todas as etapas de manipulação dos microrganismos, tanto na forma liofilizada para sua ativação, como sua propagação, foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Leite desnatado reconstituído a 11%, esterilizado a 115°C/10min foi utilizado para o preparo do fermento contendo *Str.thermophilus*.

Leite reconstituído a 11% adicionado de 0,5% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C/10min, foi utilizado para o preparo de fermento de *L. acidophilus*.

Leite reconstituído a 11%, adicionado de 0,5% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C/10min, e enriquecido a 0,05% com solução de cisteína esterilizada por filtração, foi utilizado para o fermento de *Bif.longum*.

2.2.2. Obtenção do leite fermentado por *Bif.longum*

Cinco embalagens de 1 litro de leite UAT desnatado a 8% foram, assepticamente abertas e o leite acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e foi inoculado 4% de fermento constituído por *Bif.longum*. A fermentação ocorreu a 37°C por 20 a 22 horas, quando o produto foi batido, resfriado a 4°C e estocado. O leite fermentado por *Bif.longum* foi codificado por C2.

2.2.3. Obtenção dos leites fermentados por *L.acidophilus*

Cinco embalagens de 1 litro de leite UAT desnatado a 8% foram, assepticamente abertas e o leite acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e foi inoculado 2% de fermento constituído por *L. acidophilus*. A fermentação ocorreu a 37°C por 20 a 22 horas, quando o produto foi batido, resfriado a 4°C e estocado. O leite fermentado por *L. acidophilus* foi codificado por C3.

2.2.4. Obtenção do leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*

Foi preparado leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos, que foi fermentado por *Str.thermophilus*. O leite foi inoculado com fermento constituído por *Str. thermophilus* a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento. Este leite fermentado foi codificado por C1.

2.2.5. Elaboração da bebida láctea probiótica

Foi preparado leite desnatado reconstituído a 20% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos, que foi fermentado por *Str.thermophilus*. O leite foi inoculado com fermento constituído por *Str. thermophilus* a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3,5 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento.

Cada 3000g da bebida láctea probiótica foi elaborada pela mistura e batimento de 1000g de leite fermentado por *Str.thermophilus* a 20% de sólidos, 1000g de leite UAT fermentado por *L.acidophilus* e 1000g de leite UAT

fermentado por *Bif. longum*. O referido volume, a 38°C, foi batido por 2min em batedeira planetária, previamente higienizada, (marca Walita). Esta bebida foi codificada por C4.

2.2.6. Embalagem, codificação e estocagem da bebida láctea e dos leites fermentados

Após o batimento, as formulações foram embaladas em garrafas plásticas termosseláveis, previamente higienizadas, sendo, então, levadas para a câmara fria, a 4°C. Foram realizados dois processamentos, referidos neste texto como processamentos 1 e 2. Os códigos adotados para cada leite fermentado estão na Tabela 1.

Tabela 1. Códigos dos leites fermentados

Código	Microrganismos	Descrição
C1	STr ¹	leite fermentado por <i>Str. thermophilus</i>
C2	BL ²	leite fermentado por <i>Bif. longum</i>
C3	LA ³	leite fermentado por <i>L. acidophilus</i>
C4	STr ¹ BL ² LA ³	mistura de volumes iguais de C1, C2 and C3

1. STr significa *Str. thermophilus*

2. BL significa *Bif. longum*

3. LAC significa *L. acidophilus*

2.2.7. Acompanhamento da vida de prateleira dos leites fermentados.

Os leites fermentados foram avaliados após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado quanto a pH, acidez titulável, avaliação sensorial dos atributos de sabor e acidez, e determinação de células viáveis de *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*.

2.2.8. Determinações de pH e acidez

O pH foi determinado utilizando o potenciômetro PH320 da marca WTW. A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC (1), em triplicata.

2.2.9. Quantificações dos microrganismos

O ágar ST (*Streptococcus thermophilus*) foi preparado de acordo com DAVE e SHAH (4), mas incubado a 30°C (27). O ágar Bile-MRS foi preparado de acordo com IDF (1995) citado em VINDEROLA e REINHEIMER (25). O ágar Cloreto de Lítio – Propionato de Sódio (LP-MRS) foi preparado de acordo com LAPIERRE, UNDELAND e COX (10) usando o meio base sugerido em VINDEROLA e REINHEIMER (25), sendo as concentrações de agentes inibitórios 0,5g/l de LiCl e 0,75g/l de propionato de sódio (28). Os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

2.2.10. Análise sensorial

A avaliação do sabor e acidez de cada produto, nos dois processamentos, foi realizada utilizando-se equipe sensorial composta por 35 consumidores potenciais dos produtos, selecionados em função da disponibilidade, interesse e hábito de consumir bebidas lácteas.

As análises sensoriais foram realizadas em amostras (25g) servidas a 7°C, codificadas e apresentadas aos provadores em seqüências aleatorizadas de acordo com MACFIE et al (13). Os testes de aceitação foram realizados usando escala hedônica estruturada mista de 9 pontos (1 = desgostei

muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) de acordo com MEILGAARD, CIVILLE e CARR (16).

2.2.10. Análise estatística

Os resultados dos testes de aceitação foram avaliados através de Análise de Variância e teste de Tukey, usando o programa “Statistical Analysis System” (SAS 8.02 TS level 02M0). O valor de $P < 0.05$ foi considerado como significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas medidas de pH, acidez titulável, contagem de células viáveis e médias das notas obtidas nos testes de aceitação dos leites fermentados, durante a estocagem após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento refrigerado estão apresentados nas tabelas 2, 4, 6 e 8. Nas Tabelas 3, 5, 7 e 9 estes resultados foram ordenados em ordem numérica decrescente para acidez titulável e notas recebidas nos testes de aceitação para os atributos sabor e acidez e, em ordem crescente para pH.

Tabela 2. Valores de pH, acidez, contagens microbianas e médias das notas obtidas nos testes de preferência das formulações de leite fermentado medidas no dia 1 de estocagem a 4°C nos processamentos 1 e 2.

Proc.	Comb.	pH	Acid Tit ^V	STr ^I	LAC ^{II}	BL ^{III}	sabor ^{IV}	acidez ^{IV}
1	C1	4.44	107.7	1.8x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	5.8 ^a	6.0 ^{ab}
1	C2	5.11	64.5	- ^{VII}	- ^{VII}	4.7x10 ⁸	4.5 ^b	5.6 ^b
1	C3	4.68	77.2	- ^{VIII}	7.4x10 ⁸	- ^{VIII}	5.9 ^a	6.6 ^{ab}
1	C4	4.86	95.7	4.9x10 ⁸	1.3x10 ⁸	2.6x10 ⁸	6.5 ^a	6.7 ^a
2	C1	4.47	109.7	1.3x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	6.3 ^a	6.6 ^{ab}
2	C2	5.0	73.7	- ^{VII}	- ^{VII}	1.5x10 ⁹	1.9 ^c	4.0 ^c
2	C3	4.78	70.3	- ^{VIII}	2.4x10 ⁸	- ^{VIII}	4.6 ^b	5.3 ^{bc}
2	C4	4.88	96.0	7.4x10 ⁸	2.0x10 ⁸	4.0x10 ⁸	6.4 ^a	6.7 ^a

I, II e III. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

IV- Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

V. Acid Tit significa acidez titulável

VI.- leite fermentado apenas por STr

VII - leite fermentado apenas por BL

VIII - leite fermentado apenas por LAC

Tabela 3. Ordenação dos valores de acidez titulável, pH e notas das avaliações sensoriais dos leites fermentados por STr¹, BL² e LAC³ e da bebida láctea após 1 dia de estocagem obtidos nos processamentos 1 e 2.

Parâmetros	Processamentos	Ordenação ⁵
atributo sensorial: sabor ⁴	1	C4 ^a >C3 ^a >C1 ^a >C2 ^b
atributo sensorial: sabor ⁴	2	C4 ^a >C1 ^a >C3 ^b >C2 ^c
atributo sensorial: acidez ⁴	1	C4 ^a >C3 ^{ab} >C1 ^{ab} >C2 ^b
atributo sensorial: acidez ⁴	2	C4 ^a >C1 ^{ab} >C3 ^{bc} >C2 ^c
acidez titulável	1	C1 > C4 > C3 > C2
acidez titulável	2	C1 > C4 > C2 > C3
pH	1	C1 < C3 < C4 < C2
pH	2	C1 < C3 < C4 < C2

1, 2 e 3. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

4. A ordenação considerou apenas os valores numéricos.

5. As combinações de leites fermentados com a mesma letra não diferiram significativamente (P<0.05).

Tabela 4. Valores de pH, acidez, contagens microbianas e médias das notas obtidas nos testes de preferência das formulações de leite fermentado medidas no dia 7 de estocagem a 4°C nos processamentos 1 e 2

Proc.	Comb.	pH	Acid Tit ^V	STr ^I	LAC ^{II}	BL ^{III}	sabor ^{IV}	acidez ^{IV}
1	C1	4.3	114.2	3.7x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	5.0 ^a	5.6 ^{ab}
1	C2	5.12	64.6	- ^{VII}	- ^{VII}	3.9x10 ⁸	4.0 ^b	4.9 ^b
1	C3	4.7	77.2	- ^{VIII}	6.2x10 ⁸	- ^{VIII}	5.7 ^a	6.0 ^a
1	C4	4.69	114.5	1.1x10 ⁹	2.1x10 ⁸	2.7x10 ⁸	6.4 ^a	6.2 ^a
2	C1	4.34	116.1	2.2x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	6.7 ^a	6.6 ^a
2	C2	4.99	74.8	- ^{VII}	- ^{VII}	8.5x10 ⁸	2.8 ^c	4.2 ^b
2	C3	4.81	76.5	- ^{VIII}	2.7x10 ⁸	- ^{VIII}	4.9 ^b	5.4 ^{ab}
2	C4	4.69	110.0	6.3x10 ⁸	1.1x10 ⁸	2.7x10 ⁸	5.2 ^{ab}	5.5 ^{ab}

I, II e III. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

IV- Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

V. Acid Tit significa acidez titulável

VI.- leite fermentado apenas por STr

VII - leite fermentado apenas por BL

VIII - leite fermentado apenas por LAC

Tabela 5. Ordenação dos valores de acidez titulável, pH e notas das avaliações sensoriais dos leites fermentados por STr¹, BL² e LAC³ e da bebida láctea após 7 dias de estocagem obtidos nos processamentos 1 e 2.

Parâmetros	Processamentos	Ordenação ⁵
atributo sensorial: sabor ⁴	1	C4 ^a > C3 ^a > C1 ^a > C2 ^b
atributo sensorial: sabor ⁴	2	C1 ^a > C4 ^{ab} > C3 ^b > C2 ^c
atributo sensorial: acidez ⁴	1	C4 ^a > C3 ^a > C1 ^{ab} > C2 ^b
atributo sensorial: acidez ⁴	2	C1 ^a > C4 ^{ab} > C3 ^{ab} > C2 ^b
acidez titulável	1	C4 > C1 > C3 > C2
acidez titulável	2	C1 > C4 > C3 > C2
pH	1	C1 < C4 < C3 < C2
pH	2	C1 < C4 < C3 < C2

1, 2 e 3. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

4. A ordenação considerou apenas os valores numéricos.

5. As combinações de leites fermentados com a mesma letra não diferiram significativamente (P<0.05).

Tabela 6. Valores de pH, acidez, contagens microbianas e médias das notas obtidas nos testes de preferência das formulações de leite fermentado medidas no dia 14 de estocagem a 4°C nos processamentos 1 e 2

Proc.	Comb.	pH	Acid Tit ^V	STr ^I	LAC ^{II}	BL ^{III}	sabor ^{IV}	acidez ^{IV}
1	C1	4.27	129.6	1.2x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	6.5 ^a	6.0 ^a
1	C2	5.12	66.9	- ^{VII}	- ^{VII}	3.0x10 ⁸	3.5 ^c	4.6 ^b
1	C3	4.6	80.6	- ^{VIII}	3.1x10 ⁸	- ^{VIII}	5.3 ^b	5.7 ^{ab}
1	C4	4.56	123.5	1.1x10 ⁸	2.4x10 ⁸	2.3x10 ⁸	5.5 ^{ab}	5.6 ^{ab}
2	C1	4.24	127.8	1.3x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	6.4 ^a	6.5 ^a
2	C2	4.98	73.0	- ^{VII}	- ^{VII}	9.4x10 ⁸	2.6 ^c	4.1 ^b
2	C3	4.79	77.3	- ^{VIII}	1.1x10 ⁸	- ^{VIII}	4.7 ^b	5.4 ^{ab}
2	C4	4.56	116.6	6.2x10 ⁸	7.4x10 ⁷	2.3x10 ⁸	6.2 ^a	5.3 ^{ab}

I, II e III. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

IV- Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

V. Acid Tit significa acidez titulável

VI.- leite fermentado apenas por STr

VII - leite fermentado apenas por BL

VIII - leite fermentado apenas por LAC

Tabela 7. Ordenação dos valores de acidez titulável, pH e notas das avaliações sensoriais dos leites fermentados por STr¹, BL² e LAC³ e da bebida láctea após 14 dias de estocagem obtidos nos processamentos 1 e 2.

Parâmetros	Processamentos	Ordenação ⁵
atributo sensorial: sabor ⁴	1	C1 ^a > C4 ^{ab} > C3 ^b > C2 ^c
atributo sensorial: sabor ⁴	2	C1 ^a > C4 ^a > C3 ^b > C2 ^c
atributo sensorial: acidez ⁴	1	C1 ^a > C3 ^{ab} > C4 ^{ab} > C2 ^b
atributo sensorial: acidez ⁴	2	C1 ^a > C3 ^{ab} > C4 ^{ab} > C2 ^b
acidez titulável	1	C1 > C4 > C3 > C2
acidez titulável	2	C1 > C4 > C3 > C2
pH	1	C1 < C4 < C3 < C2
pH	2	C1 < C4 < C3 < C2

1, 2 e 3. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

4. A ordenação considerou apenas os valores numéricos.

5. As combinações de leites fermentados com a mesma letra não diferiram significativamente (P<0.05).

Tabela 8. Valores de pH, acidez, contagens microbianas e médias das notas obtidas nos testes de preferência das formulações de leite fermentado medidas no dia 21 de estocagem a 4°C nos processamentos 1 e 2

Proc.	Comb.	pH	Acid Tit ^V	STr ^I	LAC ^{II}	BL ^{III}	sabor ^{IV}	acidez ^{IV}
1	C1	4.19	135.5	1.4x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	5.8 ^a	6.1ab
1	C2	5.06	70.3	- ^{VII}	- ^{VII}	4.9x10 ⁸	4.2 ^b	5.3b
1	C3	4.63	78.9	- ^{VIII}	2.1x10 ⁸	- ^{VIII}	6.0a	6.4ab
1	C4	4.5	121.7	8.2x10 ⁸	4.0x10 ⁷	2.7x10 ⁸	6.1 ^a	6.5 ^a
2	C1	4.20	129.5	1.5x10 ⁹	- ^{VI}	- ^{VI}	6.6 ^a	6.2 ^a
2	C2	4.96	78.0	- ^{VII}	- ^{VII}	6.9x10 ⁸	2.6 ^c	4.6b
2	C3	4.78	85.7	- ^{VIII}	1.2x10 ⁸	- ^{VIII}	5.5 ^b	5.7ab
2	C4	4.53	119.7	4.8x10 ⁸	3.7x10 ⁷	2.3x10 ⁸	5.9 ^{ab}	6.4a

I, II e III. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

IV- Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

V. Acid Tit significa acidez titulável

VI.- leite fermentado apenas por STr

VII - leite fermentado apenas por BL

VIII - leite fermentado apenas por LAC

Tabela 9. Ordenação dos valores de acidez titulável, pH e notas das avaliações sensoriais dos leites fermentados por STr¹, BL² e LAC³ e da bebida láctea após 21 dias de estocagem obtidos nos processamentos 1 e 2.

Parâmetros	Processamentos	Ordenação ⁵
atributo sensorial: sabor ⁴	1	C4 ^a > C3 ^a > C1 ^a > C2 ^b
atributo sensorial: sabor ⁴	2	C1 ^a > C4 ^{ab} > C3 ^b > C2 ^c
atributo sensorial: acidez ⁴	1	C4 ^a > C3 ^{ab} > C1 ^{ab} > C2 ^b
atributo sensorial: acidez ⁴	2	C4 ^a > C1 ^a > C3 ^{ab} > C2 ^b
acidez titulável	1	C1 > C4 > C3 > C2
acidez titulável	2	C1 > C4 > C3 > C2
pH	1	C1 < C4 < C3 < C2
pH	2	C1 < C4 < C3 < C2

1, 2 e 3. STr, LAC e BL significa *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

4. A ordenação considerou apenas os valores numéricos.

5. As combinações de leites fermentados com a mesma letra não diferiram significativamente (P<0.05).

3.1. Análise sensorial do atributo sabor

Em todas as análises sensoriais para sabor (1, 7, 14 e 21 dias) em ambos os processamentos, C1 e C4 não diferiram entre si ($P < 0,05$) e diferiram, significativamente, de C2 (Tabelas 2, 4, 6 e 8). Após um dia de estocagem a 4°C, a bebida láctea obtida pela mistura de volumes iguais dos leites fermentados (C4) obteve maior pontuação. Após 7 e 14 dias de estocagem a 4°C, C4 e C1 obtiveram a maior pontuação média. No 7º dia, C3 apresentou avaliação sensorial estatisticamente igual a C4 (processamentos 1 e 2) e C1 (processamento 1). No 14º dia, C3 mostrou-se estatisticamente igual a C4 apenas no processamento 1. Após 21 dias de estocagem a 4°C, C3 apresentou avaliação sensorial estatisticamente igual a C4 (processamentos 1 e 2) e C1 (processamento 1).

Painéis sensoriais comparando “frozen yogurts” contendo *Bifidobacterium* com os “frozen yogurts” tradicionais, nos estudos de DAVIDSON et al (5), não apontaram diferenças entre os produtos. Também neste estudo, o leite fermentado produzido pela mistura de leites fermentados contendo probióticos (C4) não diferiu do tradicional (C1) no atributo sabor.

De maneira similar ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (29) encontraram em leites fermentados por ST_r adicionados de populações iguais de BL e LAC (10^8 ufc/ml) na forma liofilizada que o mesmo na maioria das vezes não diferiu do padrão (leite fermentado apenas por ST_r) ao longo de 21 dias de estocagem refrigerada da mesma forma que no presente trabalho.

3.2. ANÁLISE SENSORIAL DO ATRIBUTO ACIDEZ

Após um dia de estocagem a 4°C, a bebida láctea C4 obteve maior pontuação média, entre os provadores, para o atributo acidez não diferindo, significativamente ($p < 0,05$), de C1 em ambos processamentos. Nas análises sensoriais realizadas no 1º dia de estocagem, C4 diferiu significativamente de C2. C3 apresentou avaliação sensorial estatisticamente igual a C4 (processamento 1) e C1 (processamentos 1 e 2) (Tabelas 2 a 9).

Nos dias 7, 14 e 21 de estocagem, C4, C1 e C3 não diferiram entre si ($P < 0,05$). No 7º dia, C2 diferiu de C4 (processamento 1) e de C1 (processamento 2). Já no 14º dia, C2 foi significativamente diferente apenas de C1. No 21º dia de estocagem, C2 diferiu de C4 (processamentos 1 e 2) e C1 (processamento 2).

ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (29) encontraram em leites fermentados por STr adicionados de populações iguais de BL e LAC (10^8 ufc/ml) na forma liofilizada que o mesmo não diferiu do padrão (leite fermentado apenas por STr) ao longo de 21 dias de estocagem refrigerada.

3.3. MEDIDAS DE pH E ACIDEZ TITULÁVEL DOS LEITES FERMENTADOS

Os menores valores de pH e os maiores de acidez titulável foram encontrados no leite fermentado C1. Por sua vez, os maiores valores de pH e os menores de acidez titulável foram encontrados no leite fermentado C2. Estas observações puderam ser verificadas durante todo o período de estocagem, nos 2 processamentos (Tabelas 2 a 9). Os valores de pH de C2 são coerentes com a observação de GOMES e MALCATA (8) acerca do pH após fermentação de leites por bifidobactérias.

OLIVEIRA et al. (18) consideraram que variações de pH menores que 0,12 são decréscimos menores e, variações entre 0,14 e 0,32, decréscimos perceptíveis. Se considerarmos este modo de classificação de variações de pH, C1 apresentou queda entre 0,25 e 0,27 unidades de pH, C2 entre 0,04 e 0,05, C3 não apresentou variação entre 1º e 21º dias no 2º processamento, variando 0,05 unidades de pH no 1º, e C4 variou entre 0,35 e 0,36.

SHAH et al (20) analisando iogurtes comerciais contendo LAC e *Bif bifidum* encontraram valores iniciais (após processamento) de pH entre 4,07 e 4,36, que atingiram 3,8 a 4,26. Estes autores relataram variações de pH entre 0,07 e 0,42 nos produtos comerciais, com 33 dias de estocagem.

C4, que apresentou a maior variação de pH (Tabelas 2, 4, 6 e 8), mostrou contagens mínimas aceitáveis de células viáveis de BL e LAC, com a população de cada um mantendo-se acima de 10^6 ufc/ml após 21 dias de estocagem. LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (11) relataram que a pH 4,0 o número de células viáveis de LAC não decresceu significativamente. Contudo, há trabalhos que apontam perda de viabilidade de LAC nesta faixa de pH o que poderia ser, portanto, dependente da linhagem. LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (11) também afirmaram que a tolerância a acidez de *Bifidobacterium* depende da linhagem. Segundo TAMIME, MARSHALL e ROBINSON (22) a maioria das linhagens de bifidobactérias são sensíveis a pH menores que 4,6. Contudo, LANKAPUTHRA, SHAH e BRITZ (12) testando linhagens de *Bifidobacterium* spp, concluíram que *Bif.longum* e *Bif.pseudolongum* sobrevivem melhor em condições de acidez que outras linhagens de bifidobactérias testadas.

3.4. CONTAGENS DE CÉLULAS VIÁVEIS NOS LEITES FERMENTADOS

Os leites fermentados C1 e C4, que contêm STr, apresentaram contagens constantes de células viáveis deste microrganismo ao longo dos 21 dias de estocagem refrigerada. C4 apresentou contagens de STr ao redor de 10^8 ufc/ml e C1, ao redor de 10^9 ufc/ml, diferença devida a diluição do leite fermentado por STr para elaboração da bebida láctea. Também, devido a este efeito, nota-se valores de contagens de células viáveis de LAC e BL menores na bebida láctea que em C2 e C3. Os valores das contagens para STr variaram entre 1,2 e $3,7 \times 10^9$ ufc/ml (Tabelas 2, 4, 6 e 8). OLIVEIRA et al. (18) relataram que as contagens de STr predominaram em todos os produtos onde estava presente. Situação também encontrada por RADKE-MITCHELL e SANDINE (1986) e KNEIFEL et al. (1993) citados em OLIVEIRA et al. (18) para leite fermentado.

As contagens de células viáveis de LAC em C3 e C4 reduziram-se de valores ao redor de 10^8 ufc/ml para 10^7 ufc/ml após 21 dias de estocagem (Tabelas 2, 4, 6 e 8). Esta redução começou no 14º dia pelo que pode ser observado das contagens de LAC em C4 no 2º processamento. OLIVEIRA et al. (18) relataram a redução de 2 ciclos logarítmicos nas contagens de LAC após 28 dias de estocagem a 4°C, na presença de STr. Estes autores relataram também decréscimo acima de 1 ciclo logarítmico para LAC em fermentações apenas com este microrganismo. Os resultados de BOZANIC et al. (2), que elaboraram leites fermentados por LAC, como os aqui apresentados, mostraram contagens superiores a 10^6 ufc/ml.

Quanto as contagens de BL, não houve reduções consideráveis nas populações em C2 e C4 visto que as contagens mantiveram-se ao redor de 10^8

ufc/ml. LANKAPUTHRA, SHAH e BRITZ (12) realizaram estudos de sobrevivência, sob condições de acidez nos pH 3.7, 3.9, 4.1 e 4.3, com 9 linhagens de bifidobactérias. No estudo destes pesquisadores, após 24 dias de estocagem a 4°C, uma das linhagens de *Bif. longum* e uma de *Bif. pseudolongum* apresentavam contagens ao redor de 10⁸ufc/ml, mesmo valor das contagens obtidas no dia do processamento, antes de serem levados para estocagem refrigerada.

ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (29), relataram que as contagens de LAC e BL reduziram-se em 2 ciclos logarítmicos ao final da estocagem. No presente trabalho LAC mostrou contagens maiores ao final da vida de prateleira, mesmo com a diluição ocorrida na elaboração de C4. Também para BL as contagens mantiveram-se constantes no presente trabalho, enquanto em ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (29) houve reduções de até 2 ciclos logarítmicos.

VINDEROLA et al (25) concluíram que LAC é mais sensível que bifidobactérias nos meios ácidos estudados (iogurtes e leite acidificado com ácido láctico) na faixa de pH de 3,5 to 4,5. Verifica-se que a viabilidade de bifidobactérias e lactobacilos em leites fermentados relatada na literatura é bastante variável.

4. CONCLUSÕES

Em todas as análises sensoriais para os atributos sabor e acidez (1, 7, 14 e 21 dias), o leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* e a bebida láctea

elaborada pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* não diferiram entre si ($P < 0,05$).

Os menores valores de pH e os maiores de acidez titulável foram encontrados no leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*.

O leite fermentado apenas por *Bif. longum* apresentou a menor acidez titulável e maior pH.

A bebida láctea, que apresentou a maior variação de pH, manteve valores mínimos aceitáveis para *Bif. longum* e *L. acidophilus* (acima de 10^6 ufc/ml após 21 dias de estocagem).

O leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* e a bebida láctea elaborada pela mistura de volumes iguais de leites fermentados em separado, apresentaram contagens constantes de *Str. thermophilus* ao longo dos 21 dias de estocagem refrigerada. A bebida láctea apresentou contagens deste microrganismo ao redor de 10^8 ufc/ml e o leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*, ao redor de 10^9 ufc/ml

O efeito de diluição dos leites fermentados em separado durante o preparo da bebida láctea pode ser notado pelos valores das contagens de *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* mais baixas na bebida láctea que nos leites fermentados em separado.

As contagens de *L. acidophilus* no leite fermentado por este microrganismo e na bebida láctea reduziram-se de valores ao redor de 10^8 ufc/ml para 10^7 ufc/ml após 21 dias de estocagem, enquanto que para *Bif. longum*, mantiveram-se constantes, ao redor de 10^8 ufc/ml.

É possível elaborar a bebida láctea analisando-se a viabilidade de *Bif. longum* e *L. acidophilus* após 21 de estocagem a 4°C, e considerando-se que

ela não apresentou diferença nos atributos sabor e acidez quando comparada ao leite fermentado por *Str. thermophilus*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC-**Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**. 16^a ed. Washington, v. 1-2, 1995.
2. BOZANIC, R.; ROGELI, I.; TRATNIK, L.J. Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. **Milchwissenschaft**. v. 56, n. 11, p. 618-622, 2001.
3. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n.11, 2804 – 2816, 1998.
4. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 9, 1529-1536, 1996.
5. DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**. v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.
6. FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin FIL-IDF** (Belgium) International Dairy Federation. n. 352, p. 5 – 30. 2000.

7. FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.
8. 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, n. 4/5, p. 139-157, 1999.
9. HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**. v.35, n. 2/3, p. 109 – 116, 2002.
10. LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of Bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 5, p. 1192-1196, 1992.
11. LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 1, p. 1 – 17, 2001.
12. LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P.; BRITZ, M.L.. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. **Milchwissenschaft**. v. 51, n. 2, p. 65-69. 1996
13. MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order presentation and first-order effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**. v. 4, n. 2, p. 129-148. 1989.
14. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

15. MATTILA-SANDHOLM, A.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims – interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 1, p. 1-17, 1999.
16. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Controls for tests room, product, and panel; Attribute difference tests: How does attribute X differ between samples; Affective tests: consumer tests and in-house panel acceptance tests; Basic statistical methods; Guidelines for choice of technique. In M. MEILGAARD, G.V. CIVILLE, B.T. CARR, Sensory evaluation techniques. London: CRC Press Inc, 1999. p. 23 36, 99 122, 231 304, 337 344
17. O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 12, p. 418 – 424, 1999.
18. 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.
19. SAMONA, A.; ROBINSON, R.K.; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. **Food Microbiology**. v. 13, n. 4, p. 275-280. 1996.
20. SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M.L.; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**. v. 5, n. 5, p. 515-521. 1995.
21. SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 12, p. 411-417, 1999.

22. TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E., ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**. v. 62, n. 1, p. 151-187, 1995.
23. VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal Dairy Science**. v. 83, n. 9 , p. 1905-1911, 2000a.
24. VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**. v. 33, n. 2, p. 97-102. 2000b.
25. VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.
26. WALKER, W.A.; DUFFY, L.C. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. **Journal of Nutrition and Biochemistry**. v.9, n. 12, p. 668 – 675. 1998.
27. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* in the presence of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. **Milchwissenschaft** 2003a aceito para publicação
28. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG,S. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft** 2003b aceito para publicação

29. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Effect of different concentrations and combinations of lyophilized *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on pH, acidity and sensory scores during shelf-life of a *Streptococcus thermophilus* fermented milk. **International Dairy Journal** 2003c submitted

CAPÍTULO VI

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE PÓS-
ACIDIFICAÇÃO DE LEITE FERMENTADO POR
Streptococcus thermophilus: EFEITO DA ADIÇÃO E
DA FORMA DE ADIÇÃO DE *Lactobacillus*
acidophilus E *Bifidobacterium longum* E DA
TEMPERATURA DE ESTOCAGEM

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E DE PÓS-ACIDIFICAÇÃO DE LEITE
FERMENTADO POR *Streptococcus thermophilus*: EFEITO DA ADIÇÃO E
DA FORMA DE ADIÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* E *Bifidobacterium
longum* E DA TEMPERATURA DE ESTOCAGEM¹**

Foram determinados, ao longo de 21 dias de estocagem a 4, 7, 10 e 15°C, as contagens de células viáveis, o pH e a acidez titulável de leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* (STr) adicionados ou não de *Bifidobacterium longum* (BL) e *Lactobacillus acidophilus* (LAC). Foram comparados ao padrão (leite fermentado por STr) um leite fermentado por STr adicionado de BL e LAC liofilizados e outro obtido por mistura de volumes iguais de leites fermentados separadamente por STr, BL e LAC. O padrão apresentou valores de pH a 4, 7, 10 e 15°C, respectivamente, variando de 0,36, 0,32, 0,30 e 0,32 unidades de pH. O leite fermentado com LAC e BL liofilizados apresentou valores de pH variando de 0,36, 0,34, 0,35 e 0,34 unidades. O leite fermentado obtido por mistura apresentou variações de pH de 0,28, 0,39, 0,40 e 0,35 unidades. As contagens de STr (10^8 - 10^9 ufc/ml) e BL (10^7 - 10^8 ufc/ml) mantiveram-se constantes. No leite fermentado obtido por mistura as contagens de BL foram maiores que no leite fermentado com probióticos liofilizados. As contagens de LAC no leite fermentado com probióticos liofilizados a 4, 7, 10 e 15°C, após 21 dias de estocagem, reduziram-se de cerca de 10^8 para 10^7 ufc/ml. Ao final da estocagem, as contagens de LAC no leite fermentado com probióticos liofilizados a 7, 10 e 15°C ficaram em torno de 10^6 ufc/ml, enquanto as contagens a 4°C foram de 10^7 ufc/ml. O padrão e o leite com probióticos liofilizados não apresentaram diferença significativa entre si. O leite fermentado com probióticos liofilizados não apresentou diferença significativa em relação ao leite fermentado obtido por mistura. Já este leite fermentado obtido por mistura diferiu significativamente ($p < 0,05$) do leite fermentado padrão.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a qual será enviado.

1. INTRODUÇÃO

A temperatura máxima de estocagem recomendada pela legislação brasileira (2, 3) para bebidas lácteas e leites fermentados é de 10°C. No entanto, em vários trabalhos como os de SHAH et al. (24), BAIG e PRASAD (1), DAVE e SHAH (5), VINDEROLA et al (27), RYBKA e KAILASAPATHY (21), KARAGÜL-YÜCEER et al. (12), DAVE e SHAH (4) iogurtes e/ou leites fermentados são estocados a 4°C, enquanto VINDEROLA, BAILO e REINHEIMER (26), estocaram a 5°C. MEDINA e JORDANO (18), por sua vez, estocaram leite fermentado a 7°C.

Sobre condições de estocagem de iogurte, leite fermentado e bebidas lácteas, VINDEROLA, BAILO e REINHEIMER (26) relataram não haver estudos suficientes sobre a capacidade de sobrevivência dos probióticos durante a estocagem refrigerada. LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (15) afirmaram que a temperatura de estocagem de produtos fermentados contendo probióticos é importante para a viabilidade destes microrganismos. Estudos mostraram que as maiores taxas de sobrevivência de bactérias lácticas foram obtidas nas menores temperaturas de estocagem (15).

De acordo com LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (15), é prática comum na produção de iogurte probiótico usar fermentos culturas pré-misturados, de inoculação direta no tanque de fermentação de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. O *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. podem ser cultivados separadamente antes da incorporação ao bio-iogurte a fim de aumentar a quantidade de probióticos no produto final (15). Modler e Villa-Garcia (1993) citados em LOURENS-

HATTINGH e VILJOEN (15) colocaram que o procedimento ideal é cultivar *Bifidobacterium* spp. separadamente, seguindo-se da lavagem da biomassa de seus metabólitos e da transferência das células para o iogurte base. Contudo, estes autores ressaltaram que *L. acidophilus* adicionado após a fabricação ao iogurte perdeu rapidamente a viabilidade, sendo a taxa de sobrevivência após 4 dias de estocagem a 5°C de 1%.

Leite fermentado apenas com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. pode ser fabricado; contudo, o longo tempo de incubação e a qualidade (sabor, textura) do produto são dois dos principais fatores negligenciados quando há fermentação de leite apenas com bactérias “AB” (*L. acidophilus* e bifidobactéria), “ABC” (*L. acidophilus*, bifidobactéria e *L. casei*) ou com bifidobactérias apenas (22, 23). Assim, a prática comum é fazer produtos com bactérias probióticas e tradicionais do iogurte (23). Também OLIVEIRA *et al.* (20) colocaram que bactérias lácticas podem ser adicionadas durante a mistura final do produto, contudo, a solução mais barata é o uso de leite fermentado contendo probióticos.

É de extrema importância a seleção das linhagens de probióticos (8, 10, 15, 17) e bactérias lácticas que serão usadas em conjunto porque, segundo VINDEROLA *et al.* (24), há inibição de bactérias probióticas por fermentos tradicionais e vice-versa.

Para obter os efeitos terapêuticos desejados, as bactérias probióticas e do iogurte devem estar disponíveis em números suficientes. Os valores mínimos das concentrações de probióticos para efeitos terapêuticos citados na literatura variam entre 10^5 e 10^7 ufc/ml (8, 9, 10, 14, 15, 17, 23).

Segundo SHAH (23), os principais fatores para perda de viabilidade dos probióticos têm sido atribuídos ao decréscimo de pH do meio e acúmulo de ácidos orgânicos. De acordo com este autor, a viabilidade das bactérias probióticas nos iogurtes depende das linhagens usadas, interações entre as espécies, condições de cultivo, acidez final do produto, concentrações de ácidos láctico e acético e produção de peróxido de hidrogênio pelo metabolismo celular. A viabilidade também depende dos nutrientes, promotores ou inibidores de crescimento, concentração de açúcares, oxigênio dissolvido e permeação de oxigênio através da embalagem (23).

A pós-acidificação pode ser prevenida pelo controle de pH (> 5), aplicando tratamento térmico (58°C por 5 minutos) ao iogurte antes da adição de probióticos, abaixando a temperatura de estocagem para menos de $3-4^{\circ}\text{C}$ e melhorando a capacidade tampão do iogurte pela adição de concentrado de proteínas do soro (15). A fim de superar o problema da pós-acidificação, de acordo com DAVE e SHAH (4), a atual tendência é usar fermentos chamados ABT, que contém *L. acidophilus*, bifidobactéria e *Str. thermophilus*.

No presente estudo, teve-se como objetivo estudar os efeitos de diferentes temperaturas de estocagem (4, 7, 10 e 15°C), do tempo de estocagem, do pH, da acidez titulável e dos modos de incorporação de *L. acidophilus* e *Bif. longum* aos leites fermentados sobre a população bacteriana (*Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*) destes produtos, bem como suas características sensoriais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Tryptona, bacto bile, bacto peptona, ágar (Difco, Detroit, Mi, USA); sacarose, púrpura de bromo-cresol, extrato de levedura, cisteína (Merck, Darmstadt, Ge); KH_2PO_4 , propionato de sódio (SIGMA, St. Louis, MO, USA); cloreto de lítio (Synth, Diadema, SP, Brasil); Anaerobac® (Probac, São Paulo, SP, Brasil); ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, En); leite em pó desnatado (Molico, Nestle, Araçatuba, SP, Brasil), leite desnatado UAT (SHEFA, Amparo, SP, Brasil), culturas liofilizadas de *Str. thermophilus*, TA 559 (STr), *L. acidophilus*, LAC4 (LAC) e *Bif. longum*, BL (BL) da Ezal® - Texel fornecidos por Rhodia Food.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos inóculos para os leites fermentados

Todas as etapas de manipulação dos microrganismos, tanto na forma liofilizada para sua ativação, como sua propagação, foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Leite desnatado reconstituído a 11%, esterilizado a 115°C/10min foi utilizado para o preparo do fermento contendo STr.

Leite reconstituído a 11% adicionado de 0,5% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C/10min, foi utilizado para o preparo de fermento de LAC.

Leite reconstituído a 11%, adicionado de 0,5% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C/10min, e enriquecido a 0,05% com solução de cisteína esterilizada por filtração, foi utilizado para o fermento de BL.

2.2.2. Obtenção do leite fermentado por *Str.thermophilus* adicionado ou não de LAC e BL liofilizados

Na preparação de leite fermentado por STr, utilizou-se leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos. O leite foi inoculado com fermento constituído por STr a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento. O leite fermentado preparado deste modo foi codificado por C1, sendo também usado na elaboração do leite fermentado adicionado de probióticos liofilizados, codificado por C2.

Na produção do leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados, estes foram adicionados durante o batimento em quantidade calculada para ter-se, aproximadamente, 10^8 células de cada um por grama de leite fermentado. De acordo com fabricante cada 1,03g de BL liofilizado e cada 0,65g de LAC liofilizado contêm cerca de 10^{10} células.

2.2.3. Elaboração do leite fermentado elaborado pela mistura de leites fermentados por STr, LAC e BL em separado

2.2.3.1. Obtenção do leite fermentado por *Str. thermophilus*

Foi preparado leite desnatado reconstituído a 20% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos, que foi fermentado por *Str.thermophilus*. O leite foi inoculado com fermento constituído por *Str. thermophilus* a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3,5 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento. Este leite fermentado por STr constituiu 1/3 do volume do leite fermentado final (codificada por C3), sendo os outros 2/3 restantes leites fermentados, em separado, por LAC e BL.

2.2.3.2. Obtenção dos leites fermentados por *L.acidophilus* e *Bif.longum*

Leite UAT desnatado foi, assepticamente, aberto e acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e inoculou-se com fermento constituído por BL a 4%. A fermentação ocorreu a 37°C por 20 a 22 horas, ao término da qual o leite seguiu para batimento.

Leite UAT desnatado foi, assepticamente, aberto e acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e inoculou-se com fermento constituído por LAC a 4%. A fermentação ocorreu a 37°C por 16 a 18 horas, ao término da qual o produto seguiu para batimento.

2.2.3.3. Mistura final

Mil e quinhentos gramas de C3 foram elaborados pela mistura e batimento de 500g de leite fermentado por STTr a 20% de sólidos, 500g de leite UAT fermentado por LAC e 500g de leite UAT fermentado por BL. O referido volume foi batido por 2min em batedeira planetária, previamente higienizada (marca Walita).

2.2.4. Embalagem e estocagem dos leites fermentados

Após batimento, as formulações foram envasadas em garrafas plásticas termosseláveis, previamente higienizadas, sendo, então, levadas para as câmaras frias ou estufas, a 4, 7, 10 e 15°C. Foram realizados três processamentos.

2.2.5. Acompanhamento da vida de prateleira dos leites fermentados

Os leites fermentados foram avaliados nos dias 1, 7, 14 e 21 quanto a pH, acidez titulável, avaliação sensorial dos atributos de sabor e acidez, e determinação de células viáveis de STr, LAC e BL.

2.2.6. Determinações de pH e acidez

O pH foi determinado utilizando o potenciômetro PH320 da marca WTW. A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC (1995), em triplicata.

2.2.7. Quantificações dos microrganismos

O ágar ST (*Streptococcus thermophilus*) foi preparado de acordo com DAVE e SHAH (6), mas incubado a 30°C (30). O ágar Bile-MRS foi preparado de acordo com IDF (1995) citado em VINDEROLA e REINHEIMER (28). O ágar Cloreto de Lítio – Propionato de Sódio (LP-MRS) foi preparado de acordo com LAPIERRE *et al.* (13) usando o meio base sugerido em VINDEROLA e REINHEIMER (28), sendo as concentrações de agentes inibitórios 0,5g/l de LiCl e 0,75g/l de propionato de sódio (28). Os plaqueamentos foram realizados em duplicata.

2.2.8. Análise sensorial

Realizou-se avaliação do sabor e acidez de cada produto do 3º processamento, após 21 dias de estocagem a 4°C. Foi realizada utilizando-se equipe sensorial composta por 40 consumidores potenciais dos produtos,

selecionados em função da disponibilidade, interesse e hábito de consumir bebidas lácteas.

As análises sensoriais foram realizadas em amostras (25g) servidas a 7°C, codificadas e apresentadas aos provadores em seqüências aleatorizadas de acordo com MACFIE, BRATCHELL, GREENHOFF e VALLIS (1989). Os testes de aceitação foram realizados usando escala hedônica estruturada mista de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) de acordo com MEILGAARD, CIVILLE e CARR (1999).

2.2.9. Análise estatística

Os resultados dos testes de aceitação foram avaliados através de Análise de Variância e teste de Tukey, usando o programa “Statistical Analysis System” (SAS 8.02 TS level 02M0). O valor de $P < 0.05$ foi considerado como significativo.

3. Resultados e discussão

Nas Tabelas 1 a 4 estão apresentadas as médias dos valores de pH acidez titulável e contagens microbianas dos leites fermentados por ST_r apenas (C1), leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais de leites fermentados (C3) e leite fermentado por ST_r adicionado de LAC e BL na forma liofilizada (C2) medidos nos dias 1, 7, 14 e 21 de estocagem a 4°, 7°, 10° e 15° C.

Tabela 1. Valores médios¹ de pH, acidez titulável e contagens microbianas dos leites fermentados por *Str. thermophilus* apenas, leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* e leite fermentado por *Str.thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na forma liofilizada do dia 1 de estocagem a 4°, 7°, 10° e 15° C

Formulação ²	T(°C)	pH	acidez titulável ³	STr ⁴	LAC ⁵	BL ⁶
C1	4	4,52	97,7 ± 4,0	1,67x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	7	4,45	98,1 ± 2,4	1,57x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	10	4,37	99,5 ± 2,1	1,63x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	15	4,32	104,2 ± 2,6	1,40x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
C2	4	4,55	97,2 ± 1,3	1,70x10 ⁹	3,37x10 ⁷	4,03x10 ⁷
	7	4,47	100,9 ± 2,4	1,57x10 ⁹	4,80x10 ⁷	3,83x10 ⁷
	10	4,40	99,6 ± 6,4	1,33x10 ⁹	3,13x10 ⁷	2,43x10 ⁷
	15	4,35	107,7 ± 2,1	1,33x10 ⁹	4,30 x10 ⁷	3,47x10 ⁷
C3	4	4,77	91,3 ± 4,4	7,47x10 ⁸	2,53x10 ⁸	2,90x10 ⁸
	7	4,73	93,0 ± 3,6	7,73x10 ⁸	2,00x10 ⁸	2,70x10 ⁸
	10	4,66	96,1 ± 4,6	7,10x10 ⁸	1,77x10 ⁸	3,60x10 ⁸
	15	4,60	98,5 ± 5,1	6,30x10 ⁸	1,47x10 ⁸	3,33x10 ⁸

1. Os resultados expostos são médias de 3 valores de 3 experimentos realizados.

2. C1 é leite fermentado por STr; C2 é leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados e C3 é leite fermentado elaborado pela mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

3. valores das médias e desvios padrão

4, 5 e 6. STr, LAC e BL significam *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

7. leite fermentado apenas por STr

Tabela 2. Valores médios¹ de pH, acidez titulável e contagens microbianas dos leites fermentados por *Str. thermophilus* apenas, leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* e leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na forma liofilizada do dia 7 de estocagem a 4°, 7°, 10° e 15° C¹

Formulação ²	T(°C)	pH	acidez titulável ³	STr ⁴	LAC ⁵	BL ⁶
C1	4	4,25	109,5 ± 2,9	1,77x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	7	4,20	112,5 ± 1,6	1,73x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	10	4,16	112,6 ± 3,2	1,50x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	15	4,14	116,1 ± 1,5	1,50x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
C2	4	4,29	109,6 ± 3,1	1,87x10 ⁹	3,40x10 ⁷	4,17x10 ⁷
	7	4,22	111,2 ± 6,6	1,63x10 ⁹	3,83x10 ⁷	4,57x10 ⁷
	10	4,14	114,3 ± 6,3	1,77x10 ⁹	3,57x10 ⁷	3,53x10 ⁷
	15	4,11	114,6 ± 3,1	1,14x10 ⁹	4,20x10 ⁷	4,30x10 ⁷
C3	4	4,62	95,8 ± 2,5	6,70x10 ⁸	7,73x10 ⁸	2,93x10 ⁸
	7	4,49	98,1 ± 4,4	9,10x10 ⁸	5,77x10 ⁸	2,57x10 ⁸
	10	4,41	104,4 ± 1,8	4,70x10 ⁸	9,37x10 ⁷	3,13x10 ⁸
	15	4,38	111,1 ± 2,4	6,90x10 ⁸	2,45x10 ⁸	3,27x10 ⁸

1. Os resultados expostos são médias de 3 valores de 3 experimentos realizados.

2. C1 é leite fermentado por STr; C2 é leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados e C3 é leite fermentado elaborado pela mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

3. valores das médias e desvios padrão

4, 5 e 6. STr, LAC e BL significam *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

7. leite fermentado apenas por STr

Tabela 3. Valores médios¹ de pH, acidez titulável e contagens microbianas dos leites fermentados por *Str. thermophilus* apenas, leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* e leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na forma liofilizada do dia 14 de estocagem a 4°, 7°, 10° e 15° C¹

Formulação ²	T(°C)	pH	acidez titulável ³	STr ⁴	LAC ⁵	BL ⁶
C1	4	4,22	111,9 ± 2,9	1,53x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	7	4,12	115,1 ± 2,2	1,43x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	10	4,09	116,6 ± 1,6	1,48x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	15	4,09	123,7 ± 2,8	9,60 x10 ⁸	- ⁷	- ⁷
C2	4	4,21	110 ± 2,0	1,30x10 ⁹	3,10x10 ⁷	5,50x10 ⁷
	7	4,14	114,7 ± 2,6	1,47x10 ⁹	2,83x10 ⁷	4,43x10 ⁷
	10	4,08	116,6 ± 2,6	1,57x10 ⁹	3,10x10 ⁷	5,60x10 ⁷
	15	4,03	122,9 ± 5,3	1,43x10 ⁹	2,00x10 ⁷	3,90x10 ⁷
C3	4	4,50	97,4 ± 3,1	7,57x10 ⁸	9,17x10 ⁷	3,80x10 ⁸
	7	4,38	102,5 ± 2,5	7,73x10 ⁸	1,16x10 ⁸	4,07x10 ⁸
	10	4,30	111,8 ± 4,2	7,07x10 ⁸	1,23x10 ⁸	4,20x10 ⁸
	15	4,21	115,9 ± 4,3	7,83x10 ⁸	1,31x10 ⁸	3,57x10 ⁸

1. Os resultados expostos são médias de 3 valores de 3 experimentos realizados.

2. C1 é leite fermentado por STr; C2 é leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados e C3 é leite fermentado elaborado pela mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

3. valores das médias e desvios padrão

4, 5 e 6. STr, LAC e BL significam *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

7. leite fermentado apenas por STr

Tabela 4. Valores médios¹ de pH, acidez titulável e contagens microbianas dos leites fermentados por *Str. thermophilus* apenas, leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* e leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na forma liofilizada do dia 21 de estocagem a 4°, 7°, 10° e 15° C¹

Formulação ²	T(°C)	pH	acidez titulável ³	STr ⁴	LAC ⁵	BL ⁶
C1	4	4,16	121,3 ± 2,2	1,08x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	7	4,13	120,7 ± 1,0	1,30x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	10	4,07	126,4 ± 1,5	1,70x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
	15	4,00	138,3 ± 2,9	1,27x10 ⁹	- ⁷	- ⁷
C2	4	4,19	117,7 ± 1,9	1,30x10 ⁹	1,80x10 ⁷	4,13x10 ⁷
	7	4,13	121,2 ± 3,1	1,53x10 ⁹	8,87x10 ⁶	4,40x10 ⁷
	10	4,05	126,6 ± 3,1	1,38x10 ⁹	5,93x10 ⁶	4,10x10 ⁷
	15	4,01	132,0 ± 6,3	1,30x10 ⁹	4,57x10 ⁶	5,07x10 ⁷
C3	4	4,49	102,5 ± 4,6	7,53x10 ⁸	8,33x10 ⁷	3,47x10 ⁸
	7	4,34	110,1 ± 2,1	7,40x10 ⁸	6,70x10 ⁷	2,33x10 ⁸
	10	4,26	115,3 ± 3,2	5,77x10 ⁸	4,77x10 ⁷	2,20x10 ⁸
	15	4,25	120,4 ± 1,6	7,37x10 ⁸	5,73x10 ⁷	2,93x10 ⁸

1. Os resultados expostos são médias de 3 valores de 3 experimentos realizados.

2. C1 é leite fermentado por STr; C2 é leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados e C3 é leite fermentado elaborado pela mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

3. valores das médias e desvios padrão

4, 5 e 6. STr, LAC e BL significam *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum*, respectivamente

7. leite fermentado apenas por STr

3.1. pH e acidez titulável

O leite fermentado apenas por STr (*Str. thermophilus*) (C1) apresentou valor de pH variando do 1° ao 21° dias de estocagem a 4, 7, 10 e 15°C, respectivamente, de 4,52 para 4,16 (0,36 unidades), de 4,45 para 4,13 (0,32 unidades), de 4,37 para 4,07 (0,30 unidades) e de 4,32 para 4,00 (0,32 unidades). Por sua vez, os leites fermentados por STr adicionados de LAC (*L.*

acidophilus) e BL (*Bif. longum*) (C2) apresentaram valores de pH variando do 1º ao 21º dias de estocagem a 4, 7, 10 e 15°C, respectivamente, de 4,55 para 4,19 (0,36 unidades), de 4,47 para 4,13 (0,34 unidades), de 4,40 para 4,05 (0,35 unidades) e de 4,35 para 4,01 (0,34 unidades) (Tabelas 1 a 4). Os valores de pH das formulações estocadas a 4°C concordaram com os de ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (31), onde foram analisados os valores de pH e acidez titulável de leite fermentado por STr adicionado ou não de LAC e BL na forma liofilizada, também estocados a 4°C.

O leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais de leite fermentado por STr, LAC e BL (C3) apresentou valores de pH variando do 1º ao 21º dias de estocagem a 4, 7, 10 e 15°C, respectivamente, de 4,77 para 4,49 (0,28 unidades), de 4,73 para 4,34 (0,39 unidades), de 4,66 para 4,26 (0,40 unidades) e de 4,60 para 4,25 (0,35 unidades) (Tabelas 1 a 4). Os valores de pH das formulações estocadas a 4°C concordaram com os de ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (32), onde foram analisados os valores de pH e acidez titulável de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL e do leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais destes leites, também estocados a 4°C. Observaram-se maiores valores de pH e menores valores para acidez titulável em C3, porque na sua elaboração os valores de pH dos leites fermentados em separado por STr, LAC e BL eram, respectivamente, de 4,8, 4,5 e 5,0.

OLIVEIRA et al. (20) consideraram que variações de pH menores que 0,12 são decréscimos menores e, variações entre 0,14 e 0,32, decréscimos perceptíveis. Contudo, verificou-se maior controle da pós-acidificação em C3, a

4° C, quando se comparou os valores de pH (maiores), com menores decréscimos, aos de C2 (menores), com maiores decréscimos.

MEDINA e JORDANO (18), estudando valores de pH de leite fermentado contendo *Streptococci*, *Lactobacilli* e bifidobactéria, encontraram valores semelhantes aos medidos para C3 neste trabalho.

3.2. Quantidades de microrganismos presentes

As contagens de STr a 4, 7, 10 e 15°C mantiveram-se praticamente constantes ao redor de 10^9 ufc/ml para C1 e C2 e, ao redor de 10^8 ufc/ml para C3 (Tabelas 1 a 4). Os resultados de MEDINA e JORDANO (18) e OLIVEIRA et al. (20), estudando leites fermentados contendo STr e probióticos, mostraram que as contagens de STr mantiveram-se constantes como os deste trabalho até 24 a 28 dias de estocagem.

Também as contagens de BL a 4, 7, 10 e 15°C mantiveram-se praticamente constantes ao redor de 10^7 ufc/ml para C2 e, ao redor de 10^8 ufc/ml para C3 (Tabelas 1 a 4). Em C3, as contagens de BL após 21 dias de estocagem foram maiores que em C2, na qual adicionou-se, inicialmente, 10^8 células/g o que pode estar relacionado com os maiores valores de pH e menores valores para acidez titulável observados para esta formulação. Autores como SHAH (23) e LOURENS-HATTINGH e VILJOEN (15) colocaram a acidez do meio como fator de relevância na sobrevivência de *Bifidobacterium*.

As contagens de LAC de C3 igualmente a 4, 7, 10 e 15°C, após 21 dias de estocagem, reduziram-se de cerca de 10^8 para 10^7 ufc/ml. Já, ao final da estocagem, as contagens de LAC em C2 a 7, 10 e 15°C mostraram-se menores em um ciclo logarítmico (10^6 ufc/ml) em relação as contagens obtidas

dos leites fermentados estocados a 4°C (10^7 ufc/ml) (Tabelas 1 a 4). Assim, para este microrganismo adicionado na forma liofilizada estocar a 7, 10 e 15°C compromete sua viabilidade. OLIVEIRA et al. (20) estudando leite fermentado contendo STr e LAC, após 28 dias de estocagem a 4°C, apresentaram contagens de 10^6 ufc/ml para LAC com pH ao redor de 4,4. SHAH (23), indicou vários fatores responsáveis pela viabilidade de bactérias probióticas em iogurte, entre eles a temperatura de estocagem, as interações entre as espécies, a acidez final do produto e as concentrações de ácidos láctico e acético.

Comparando-se as contagens de BL e STr a 4, 7, 10 e 15°C em C2 e C3, a estocagem em temperatura acima da recomendação da legislação brasileira não afetou a viabilidade destes microrganismos, visto que suas populações mantiveram-se constantes. Esta afirmação só é válida para a população de células viáveis de LAC em C3, visto que a redução na quantidade de microrganismos viáveis foi de um ciclo logarítmico e igual nas bebidas estocadas a 4, 7 10 e 15°C. Em C2, a redução no número de células viáveis de LAC, após 21 dias de estocagem, foi maior nos leites fermentados estocados a 7, 10 e 15°C do que nos leites estocados a 4°C.

A legislação brasileira (2, 3) recomenda 10°C, como temperatura máxima para estocagem de leite fermentado e bebidas lácteas. Contudo, para produtos contendo LAC tal limite é alto. Embora tenham ocorrido reduções nas populações de LAC, os números de células viáveis após 21 dias de estocagem ainda são iguais ao mínimo recomendado para efeitos benéficos a saúde. Quanto a manutenção da população de STr, constituinte tradicional de

fermento láctico, estocar a 10°C não traz perda da viabilidade deste microrganismo até 21 dias de estocagem.

3.3. Análise sensorial

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias das pontuações recebidas dos provadores, para os atributos sabor e acidez, pelos leites fermentados por *Str. thermophilus*, leite fermentado elaborado pela mistura de volumes iguais de leites fermentados e leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de *L. acidophilus* e *Bif. longum* na forma liofilizada após 21 dias de estocagem a 4°C.

Tabela 5. Desempenho sensorial dos leites fermentados por *Str. thermophilus*, adicionados de *L. acidophilus* e *Bif. longum* após 21 dias de estocagem a 4°C¹

Formulação ²	Sabor ³	Acidez ³
C1	6,47 ^a	6,29 ^a
C2	5,65 ^{ab}	5,76 ^{ab}
C3	4,71 ^b	4,9 ^b

1. análise de produtos do 3º processamento

2. C1 é leite fermentado por STr; C2 é leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados e C3 é uma bebida láctea preparada pela mistura em partes iguais de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

3. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

Nas análises sensoriais das formulações estocadas a 4°C com relação aos atributos sabor e acidez C1 e C2 e C2 e C3 não diferiram entre si (p < 0,05), tendo C1 diferido de C3 (Tabela 5). As expressões usadas pelos provadores, correspondentes as notas apresentadas na Tabela 5, apontaram que os mesmos “nem gostaram/nem desgostaram” ou “gostaram ligeiramente”

de C2. Já o padrão C1 recebeu notas médias equivalentes as expressões “gostei ligeiramente” ou “gostei moderadamente”.

ZACARCHENCO & MASSAGUER (31) verificaram que leite fermentado apenas por STr e leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Painéis sensoriais comparando “frozen yogurts” contendo *Bifidobacterium* com os “frozen yogurts” tradicionais, nos estudos de DAVIDSON et al (5), não apontaram diferenças entre os produtos. Também neste estudo, o leite fermentado produzido pela mistura de leites fermentados contendo probióticos (C2) não diferiu do tradicional (C1) no atributo sabor e acidez.

A formulação C3 por constituir-se da mistura de leites fermentados em separado por BL, além dos leites fermentados por STr e LAC, deve conter maiores teores de ácido acético e outros ácidos orgânicos, além do ácido láctico, sintetizado por bifidobactérias. A formulação C3 recebeu notas equivalentes as expressões “desgostei ligeiramente” e “nem gostei/nem desgostei”. GOMES e MALCATA (8) relataram problemas de palatabilidade de leite fermentado por bifidobactérias devido a síntese de ácido acético por estes microrganismos.

4. CONCLUSÕES

As variações no pH dos leites fermentados estudados apresentaram-se entre 0,28 e 0,40 unidades de pH para as quatro temperaturas estudadas. A menor redução aconteceu para a mistura de leites fermentados em separado

por STr, LAC e BL estocada a 4°C (0,28 unidades). Esta mistura também apresentou a maior redução de pH a 10°C (0,40 unidades).

As contagens de *Str. thermophilus* e *Bif. longum* não foram afetadas pelas temperaturas de estocagem. As contagens de *Bif. longum*, após 21 dias de estocagem, foram maiores na mistura de leites fermentados em separado que no leite com probióticos liofilizados.

As contagens de *L. acidophilus* da mistura de leites fermentados em separado a 4, 7, 10 e 15°C, após 21 dias de estocagem, reduziram-se de cerca de 10^8 para 10^7 ufc/ml. Já, ao final da estocagem, as contagens deste microrganismo no leite fermentado com probióticos liofilizados a 7, 10 e 15°C mostraram-se menores em um ciclo logarítmico (10^6 ufc/ml) em relação as contagens obtidas dos leites fermentados estocados a 4°C (10^7 ufc/ml)

Para produtos contendo *L. acidophilus*, o limite máximo permitido pela legislação brasileira de 10°C afeta a viabilidade do microrganismo. Esta temperatura, contudo, não traz perda da viabilidade para *Str. thermophilus* até 21 dias de estocagem.

Nas análises sensoriais de aceitação para os atributos sabor e acidez, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite fermentado por *Str. thermophilus* e aquele adicionado de probióticos liofilizados. Também, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite fermentado adicionado de probióticos e aquele obtido por mistura de leites fermentados em separado. O leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* diferiu do leite fermentado elaborado por mistura de leites fermentados em separado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAIG, M.I.; PRASAD, V. Effect of incorporation of cottage cheese whey solids and *Bifidobacterium bifidum* in freshly made yoghurt. **Journal of Dairy Research**, v. 63, p. 467 – 473. 1996.
2. Brasil, M. A. A. Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no Diário Oficial da União de 02 de janeiro de 2001, Seção I, págs 19 à 22.
3. Brasil, M. A. A. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. Instrução Normativa nº 36, de 31 de outubro de 2000. Publicada no Diário Oficial da União de 08 de novembro de 2000, Seção I, págs 22 à 23.
4. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, n.11, 2804 – 2816, 1998.
5. DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**. v. 7, p. 537 – 545, 1997.
6. DAVE, R.I.; DAVE, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 9, 1529-1536, 1996.
7. DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**. v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.

8. FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin FIL-IDF** (Belgium) International Dairy Federation. n. 352, p. 5 – 30. 2000.
9. FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 1, p. 53-61, 1999.
10. GODWARD, G.; SULTANA, K.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; ARUMUGASWAMY, R.; REYNOLDS, N. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 8, p. 441 - 445, 2000.
11. 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, n. 4/5, p. 139-157, 1999.
12. KARAGÜL-YÜCEER, Y.; WILSON, J.C.; WHITE, C.H. Formulations and processing of yogurt affect the microbial quality of carbonated yogurt. **Journal Dairy Science**. v. 84, n.3, p. 543 – 550, 2001.
13. LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of Bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 5, p. 1192-1196, 1992.
14. LEE, Y-K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Handbook of Probiotics. Ed. Jonh Wiley and Sons, Inc., p. 1-22, 67-190 New York, 1999.
15. LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**. v. 11, n. 1, p. 1 – 17, 2001.

16. MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order presentation and first-order effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*. v. 4, n. 2, p. 129-148. 1989.
17. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.
18. MEDINA, L.M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. **Journal Food Protection**, v. 56, n. 8, p. 731-733, 1994.
19. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Controls for tests room, product, and panel; Attribute difference tests: How does attribute X differ between samples; Affective tests: consumer tests and in-house panel acceptance tests; Basic statistical methods; Guidelines for choice of technique. In M. Meilgaard, G.V. Civille, B.T. Carr, *Sensory evaluation techniques*. London: CRC Press Inc, 1999. p. 23 36, 99 122, 231 304, 337 344
20. 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.
21. RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Effect of freeze drying and storage on the microbiological and physical properties of AB-yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 52, n. 7, p. 390 – 394, 1997.

22. SAMONA, A.; ROBINSON, R.K.; MARAKIS, S. Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. **Food Microbiology**. v. 13, n. 4, p. 275-280. 1996.
23. SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal Food Science**, 83: 894-907. 2000
24. SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M.L.; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**. v. 5, n. 5, p. 515-521. 1995.
25. VINDEROLA, C.G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal Dairy Science**. v. 85, n. 4, p. 721-729, 2002.
26. VINDEROLA, C.G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**. v. 33, n. 2, p. 97-102. 2000a.
27. VINDEROLA, C.G.; GUEIMONDE, M.; DELAGADO, T.; REINHEIMER, J.A.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**. v. 10, n. 3, p. 213-220, 2000b.
28. VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.
29. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* in the presence of *Bifidobacterium longum*

- and *Lactobacillus acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. **Milchwissenschaft**, 2003a (aceito para publicação).
30. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft**, 2003b (aceito para publicação).
31. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Effect of different concentrations and combinations of lyophilized *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on pH, acidity and sensory scores during shelf-life of a *Streptococcus thermophilus* fermented milk. **International Dairy Journal** 2003c (submitted, july).
32. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SBCTA)* 2003d (submitted, september).

CAPÍTULO VII

LEITE FERMENTADO CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* E *Bifidobacterium longum*: AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FIBRA DE SOJA E AVEIA E TEORES DE CORANTE E AROMATIZANTE DE MORANGO

**LEITE FERMENTADO CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* E
Bifidobacterium longum: AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FIBRA DE SOJA E
AVEIA E TEORES DE CORANTE E AROMATIZANTE DE MORANGO¹**

Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* (STr), contendo ou não *Lactobacillus acidophilus* (LAC) e *Bifidobacterium longum* (BL) liofilizados ou na forma de leites fermentados em separado foram avaliados sensorialmente por testes de aceitação através de atributos de sabor, textura, cor e aroma. Aos leites fermentados adicionou-se, também, fibra de aveia tratada ou sem pré-tratamento, fibra de soja de diferentes graus de moagem e diferentes teores de corante e aromatizante de morango. Quanto ao tipo de fibra e grau de moagem, o leite fermentado por STr contendo fibra de aveia obteve as maiores notas para sabor e e não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) da bebida láctea comercial. A formulação com fibra de soja de maior grau de moagem foi preferida em relação a de menor intensidade de moagem. Na comparação de teores de corante e aromatizante a formulação com 0,015g/l de corante e com 0,2g/l de aromatizante foram as preferidas. O tipo de pré-tratamento da fibra de aveia com melhor desempenho sensorial foi aquele onde a fibra foi pré-tratada por hidratação, aquecimento, homogeneização e tratamento térmico final. O leite fermentado por STr contendo probióticos e a mistura de leites fermentados em separado não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si, sendo que entre as formulações com fibra de aveia e a bebida comercial não houve diferença significativa. As formulações elaboradas a partir de leite fermentado por STr adicionado dos probióticos liofilizados foram as menos preferidas. As formulações com leites fermentados em separado apresentaram contagens de células viáveis de probióticos maiores em um ciclo logarítmico que nas formulações com estes microrganismos liofilizados.

¹ Artigo redigido segundo normas da revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a qual será enviado

1. INTRODUÇÃO

O valor nutricional e potencial terapêutico dos alimentos são características principais no desenvolvimento de novos produtos fabricados para consumidores que valorizam os benefícios a saúde que os alimentos podem trazer. O uso integrado de fibras e probióticos em leites fermentados constitui alimento funcional, visto que se encaixa nas definições deste tipo de alimento. As definições de alimento funcionais reportadas por BERNER & O'DONNEL (3), BISTRÖM & NORDSTRÖM (4) e GOLDBERG (12) podem ser resumidas como aquele alimento que tem impacto positivo na saúde do indivíduo, na sua performance física ou estado mental, além de seu valor nutricional. Os japoneses têm grande variedade de produtos chamados funcionais e, segundo GOLDBERG (12), salientam três pré-requisitos para defini-los: (i) é um alimento (não uma cápsula, tablete ou pó) formulado com ingredientes naturais; (ii) pode e deve ser consumido como parte da dieta diária e (iii) o alimento tem função particular quando ingerido, servindo para regular um processo fisiológico particular, como os mecanismos de defesa biológicos, redução da velocidade do processo de envelhecimento, controle de condições físicas e mentais, prevenção de doenças específicas e recuperação de doenças específicas.

No entanto, deve-se verificar os aspectos tecnológicos da elaboração de tais produtos. Segundo FERNÁNDEZ-GARCIA et al. (10), os constituintes da fibra dietética podem interagir com componentes dos alimentos durante o processamento, levando a mudanças na biodisponibilidade de nutrientes e na textura e sabor final do produto.

Além do grande interesse de introduzir bactérias vivas probióticas no cólon através de suplementação pela dieta, sabe-se também que o aumento do número de bactérias benéficas como as bifidobactérias no intestino pode ser conseguido com o uso de prebióticos; que são componentes da dieta não digeríveis que passam através do cólon e, seletivamente, estimulam a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis *in situ*. Devido ao potencial sinérgico entre probióticos e prebióticos, alimentos contendo essas combinações são, freqüentemente, referidos como simbióticos. Os prebióticos podem afetar o crescimento e sobrevivência de probióticos, influenciando seu crescimento. A interação entre os probióticos e os prebióticos *in vivo* pode ser favorecida pela adaptação destes microrganismos ao substrato prebiótico antes do consumo. Isto pode resultar em vantagem competitiva para o probiótico se ele for consumido junto com o prebiótico (17).

Os prebióticos identificados até o presente são carboidratos não digeríveis incluindo lactulose, inulina, e vários tipos de oligossacarídeos que fornecem uma fonte de carboidrato fermentável às bactérias benéficas do cólon (17). Alguns amidos também escapam a digestão completa durante a passagem através do intestino grosso e chegam ao cólon como fontes de carboidratos fermentáveis para as bactérias intestinais. Amidos granulares sintetizados por várias plantas são exemplos destes amidos resistentes, sendo incompletamente digeridos devido ao seu tamanho e conformação molecular (17).

Há grande interesse na produção de oligômeros não digeríveis, que promovem o crescimento de bifidobactérias. Os oligômeros mais estudados são os galacto-oligômeros (rafinose, estaquiose) e os fruto-oligômeros

(sintetizados ou hidrolisados de inulina). A aveia contém altas quantidades de fibras dietéticas fermentáveis, referidas como β -glucanos e arabonoxilanos. De acordo com JASKARI et al. (14) já está devidamente estabelecido que estas substâncias da aveia tem efeitos benéficos sobre o metabolismo de lipídios e glicose no intestino.

Nutricionalmente, o termo fibra é restrito ao material filamentoso dos alimentos. Os termos fibra dietética ou glicídios não aproveitáveis, segundo FRANCO (11), são nomes dados a todas as estruturas celulares de paredes vegetais que não são digeridas pelos sucos digestivos humanos, mas são parcialmente atacadas pelas bactérias do cólon, incluem celulose, hemicelulose, ligninas, ceras, gomas e mucilagens. O termo fibra crua, por sua vez, significa o resíduo heterogêneo restante de tratamentos sucessivos de alimentos de origem vegetal com álcalis e ácidos diluídos, sob condições especiais. De acordo com o referido autor, a celulose e hemicelulose são encontradas nos vegetais variando em quantidade e digestibilidade, sendo a celulose de alguns vegetais folhosos e do milho doce resistentes ao ataque bacteriano no cólon, e responsáveis por ação irritante em algumas pessoas. As fibras dietéticas têm a propriedade de aumentar a gordura fecal, isto é, reduzir a absorção de gordura pelo trato intestinal. As substâncias indigeríveis de leguminosas, como a soja, são ricas em fibra crua, conferindo apreciável motilidade intestinal (8).

As fibras podem ser classificadas, ainda, quanto ao seu efeito fisiológico em solúveis em água (pectinas, gomas e algumas hemiceluloses) e insolúveis (celulose, lignina e certas hemiceluloses). Entre os alimentos mais ricos em fibras insolúveis estão as verduras e os cereais e, segundo FRANCO (11), a

aveia é um cereal rico em fibras solúveis, que retardam o esvaziamento gástrico e a velocidade do trânsito intestinal. As fibras insolúveis, por sua vez, aceleram o trânsito intestinal. Estes dois tipos de fibras sofrem ação fermentativa das bactérias do cólon, sendo as insolúveis menos utilizadas pelos microrganismos. As fibras insolúveis ocasionam maior perda de cátions pelas fezes, sendo que a celulose se liga ao cálcio e a lignina exerce ação quelante nos ácidos biliares. De modo geral, ambos os tipos atuam reduzindo a taxa glicêmica em diabéticos insulino-dependentes ou os tratados com sulfoniluréias (11).

De acordo com GOLDBERG (12), a dieta rica em fibras dietéticas é protetora contra doenças como câncer de cólon, arterosclerose e hipercolesterolemia associada, diabetes, diverticulose, hipertensão e obesidade. Os dois tipos mais avaliados nos estudos clínicos para redução de colesterol e das concentrações de glicose no sangue são a fibra de aveia e a de soja. Também as gomas guar e fisilium têm apresentado resultados positivos na redução dos níveis sanguíneos destes constituintes. FERNÁNDEZ-GARCIA et al. (10) recomendaram que a quantidade de fibra dietética recomendada para um adulto é de 25 a 30g.

FERNÁNDEZ-GARCIA et al. (10) estudaram o efeito da adição de fibras de aveia ao iogurte, e compararam seu desempenho com os não adicionados de fibras. Estes pesquisadores apontaram que houve aumento na produção de ácidos como o acético e propiônico pelos lactobacilos utilizados, no iogurte adicionado de fibras. Também no iogurte com fibras da referida pesquisa, a contagem dos microrganismos do fermento foi maior, enquanto das bactérias

totais foi menor. Por sua vez a viscosidade aparente aumentou no iogurte fortificado com fibras e a qualidade sensorial ficou prejudicada.

COLLINS et al. (5) desenvolveram uma mistura de leite, batata doce, sacarose e gelatina, que foi fermentada com bactérias típicas do iogurte. A adição da batata, na forma de purê e de farinha, fez o teor de fibras e de vitamina A aumentar, e o teor de gordura diminuir, quando comparados aos teores do iogurte não adicionado de batata. Além disto, a batata forneceu fibra dietética e amido a formulação, que funcionaram como espessantes e estabilizantes. A dificuldade na elaboração do produto relatada pelos pesquisadores foi a obtenção de mistura homogênea da batata com o leite.

TAMIME et al. (20) reportaram que a produção de produtos similares a iogurte utilizando leite de soja (extrato hidrossolúvel de soja) é interessante em países com deficiências de proteína animal, como o Brasil, ou para a produção de iogurtes “vegetarianos”. Alguns autores já publicaram sobre a produção de produtos similares a iogurte usando leite de soja, entre eles MASLOV et al. (1990) citado em TAMIME et al. (20), que elaboraram uma bebida de soja fermentada usando *Bifidobacterium* spp. e, em 16 horas de incubação a 37°C, havia 10^8 - 10^9 ufc/ml do microrganismo e 50g/l de ácido láctico. TAMIME et al. (20) também cita o trabalho de MURTI et al. (1993), que avaliaram as características de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e leite bovino, feitos com linhagens de iogurte, adicionados e não adicionados de *Bifidobacterium* spp. isolados de produtos comerciais. Estes pesquisadores relataram que o uso conjunto de bifidobactérias e linhagens típicas de iogurte, nesses iogurtes, reduziu o crescimento de *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e que a porcentagem de etanol e outros compostos voláteis foi maior nos

iogurtes contendo bifidobactérias. Eles também sugeriram o uso de bifidobactérias e *Str. salivarius* subsp. *thermophilus* como fermentos.

A mais de 60 anos atrás, cientistas da área de veterinária reportaram a presença, nos vegetais, de compostos estrogênicos que induziam a maturidade em animais imaturos ou interferiam nos processos reprodutivos normais. Nos nossos dias, segundo MAZUR et al. (18), já foram encontrados compostos com atividade de estrógeno em mais de 300 plantas. Estes compostos foram definidos como o nome genérico de fitoestrógenos. Poucas classes destes compostos estão hoje identificadas, estabelecidas e estudadas: fitoestrógenos bisfenólicos semelhantes a hormônios; os isoflavonóides genisteína e daidzeína; as coumestanas (coumestrol); as ligninas secoisolariciresinol (SECO) e matairesinol (MAT). Esses compostos são de grande interesse devido a sua atividade estrogênica, antiestrogênica, anticarcinogênica, anticancerígena, antiviral, antifúngica e antioxidante.

A família do reino vegetal mais abundante em fitoestrógenos é a *Leguminosae*. Das 13.000 espécies de legumes, apenas 20 são comumente consumidas pelos humanos. A soja e seus produtos têm atraído mais a atenção. Dela já foram isolados isoflavonóides, fitoesteróis, inibidores de protease, hexafosfato inositol e saponinas. De acordo com MAZUR et al. (18), grande número de estudos tem sido realizado procurando por ligações entre os fitoestrógenos da soja, o metabolismo de hormônios sexuais, a atividade biológica, enzimas intracelulares, síntese de proteínas, ação de fator de crescimento, proliferação de células malignas e angiogênese, ao nível molecular, ao nível dos tecidos e ao nível dos organismos.

A genisteína é uma isoflavona que inibe o aparecimento e crescimento de tumores, aumentando seu período de latência, embora não atue sobre sua formação. Sobre este mecanismo de ação, contudo, há controvérsias. Mesmo assim, as isoflavonas vêm atraindo a atenção. Nos grãos de soja e produtos derivados as isoflavonas estão em concentrações que variam de 0,1 a 5mg/g, com valor médio de 3mg/g (1, 2 e 13).

COWARD et al. (6) analisando os grãos e a farinha de soja, por cromatografia líquida de alta resolução, encontraram ser igual o teor de genisteína dos dois. ELDRIDGE (9) determinou que as formas sob as quais as isoflavonas aparecem nos grãos de soja são glicosídeos, acetilglicosídeos e agliconas.

Verificou-se que os índices de ocorrência de câncer de mama, próstata e cólon nas populações do sudeste da Ásia são menores do que entre americanos e europeus do oeste. Tal constatação atraiu a atenção de médicos, epidemiologistas e grupos interessados em políticas de saúde pública. Relacionou-se o fato com a dieta diferente destas populações, especificamente com as quantidades de soja ingeridas pelos asiáticos. Em alguns países do sudeste asiático o consumo varia de 35 a 54g de soja ou seus derivados (1, 6, 18).

No presente estudo, teve-se como objetivos avaliar o desempenho sensorial de leites fermentados por *Str. thermophilus*, contendo ou não *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* adicionados liofilizados ou como leites fermentados em separado. Aos leites fermentados foram adicionados, também, fibra de aveia tratada ou sem pré-tratamento, fibra de soja de diferentes graus de moagem e diferentes teores de corante e

aromatizante de morango. Todas estas formulações foram avaliadas sensorialmente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Extrato de levedura, cisteína (Merck, Darmstadt, Ge); leite em pó desnatado (Molico, Nestle, Araçatuba, SP, Brasil); leite desnatado UAT (SHEFA, Amparo, SP, Brasil); culturas liofilizadas de *Str. thermophilus*, TA 559 (STr), *L. acidophilus*, LAC4 (LAC) e *Bif. longum*, BL (BL) da Ezal® - Texel fornecidos pela Rhodia Food; fibra de aveia HF 600 VITACEL® (Clariant, Suíça); fibra de soja (FN 100 e FN 250, Bunge, Brasil); aroma idêntico natural de morango e corante vermelho ponceau 4R (Duas Rodas Industrial Ltda, Jaraguá do Sul, SC, Brasil); aspartame (Ajinomoto, Japão)

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos inóculos para os leites fermentados

Todas as etapas de manipulação dos microrganismos, tanto na forma liofilizada para sua ativação, como sua propagação, foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Leite desnatado reconstituído a 11%, esterilizado a 115°C/10min foi utilizado para o preparo do fermento contendo *Str.thermophilus*.

Leite reconstituído a 11% adicionado de 0,5% de extrato de levedura, esterilizado a 115°C/10min, foi utilizado para o preparo de fermento de *L. acidophilus*.

2.2.2. Leite fermentado por *Str.thermophilus* adicionados ou não de LAC e BL liofilizados

Na preparação de leite fermentado por STr, utilizou-se leite desnatado reconstituído a 12% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos. O leite foi inoculado com fermento constituído por STr a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento. O leite fermentado preparado deste modo foi codificado por C1, sendo também usado na elaboração do leite fermentado adicionado de probióticos liofilizados, codificado por C2.

Na produção do leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados, estes foram adicionados durante o batimento em quantidade calculada para ter-se, aproximadamente, 10^8 células de cada um por grama de leite fermentado. De acordo com fabricante cada 1,03g de BL liofilizado e cada 0,65g de LAC liofilizado contêm cerca de 10^{10} células.

2.2.3. Leite fermentado elaborado pela mistura de partes iguais de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL

2.2.3.1. Obtenção do leite fermentado por STr

Foi preparado leite desnatado reconstituído a 20% de sólidos, tratado termicamente a 95°C por 5 minutos, que foi fermentado por *Str.thermophilus*. O leite foi inoculado com fermento constituído por *Str. thermophilus* a 2%. A fermentação ocorreu a 43°C em, aproximadamente, 3,5 horas quando o produto foi resfriado a 38°C para batimento. Este leite fermentado por STr

constituiu 1/3 do volume do leite fermentado final, sendo os outros 2/3 restantes leites fermentados, em separado, por LAC e BL.

2.2.3.2. Obtenção dos leites fermentados por *L.acidophilus* e *Bif.longum*

Leite UAT desnatado foi, assepticamente, aberto e acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e inoculou-se com fermento constituído por BL a 4%. A fermentação ocorreu a 37°C por 20 a 22 horas, ao término da qual o leite seguiu para batimento.

Leite UAT desnatado foi, assepticamente, aberto e acondicionado em recipientes estéreis. Ajustou-se a temperatura do leite para 37°C, e inoculou-se com fermento constituído por LAC a 4%. A fermentação ocorreu a 37°C por 16 a 18 horas, ao término da qual o produto seguiu para batimento.

2.2.3.3. Mistura final

Mil e quinhentos gramas de leite fermentado foram elaborados pela mistura e batimento de 500g de leite fermentado por STr a 20% de sólidos, 500g de leite UAT fermentado por LAC e 500g de leite UAT fermentado por BL.

2.2.4. Seleção de tipo de fibra e grau de moagem mais aceito sensorialmente em leite fermentado por STr

Foram elaboradas 3 formulações de leite fermentado por STr apenas, adicionados de aroma, corante, aspartame e fibras de soja ou aveia previamente tratadas. As concentrações e tipos de ingredientes das formulações utilizadas estão na Tabela 1.

Tabela 1. Formulações de leite fermentado apenas por STr utilizadas na seleção de tipo de fibra e grau de moagem mais aceito sensorialmente

Formulação	tipo de fibra e grau de moagem (13g/kg)	aromatizante (g/l)	corante (g/l)	aspartame (ppm)
C1-1	soja (FN100)	0,2	0,005	600
C2-1	soja (FN250)	0,2	0,005	600
C3-1	Aveia	0,2	0,005	600
C4-1 ¹	não declarada	- ²	- ²	- ²

1. bebida láctea comercial

2. não informado pelo fabricante

Cada 13g de fibras foram previamente reidratadas em água (300ml) por 15 minutos, aquecidas a 70°C, homogeneizadas em homogenizador centrífugo por 3 minutos e tratadas termicamente a 95°C por 5 minutos. Estas condições de tratamento foram obtidas após ensaios relatados nos itens seguintes.

A fibra de soja FN100 apresentava tamanho maior de partículas que a FN250. Para a fibra de aveia, no mercado nacional, só foi obtido um único grau de moagem.

Foi medido pH ao final da fabricação e após 7 dias de estocagem a 4°C.

2.2.4.1. Análise sensorial e estatística

Realizou-se avaliação da cor, do aroma, do sabor e da textura das formulações após 7 dias de estocagem a 4°C. As avaliações foram realizadas utilizando-se equipe sensorial composta por 40 consumidores potenciais dos produtos, selecionados em função da disponibilidade, interesse e hábito de consumir leite fermentado com fibras e adoçado com edulcorante aspartame.

As análises sensoriais foram realizadas em amostras (25g) servidas a 7°C, codificadas e apresentadas aos provadores em seqüências aleatorizadas

de acordo com MACFIE, BRATCHELL, GREENHOFF e VALLIS (16). Os testes de aceitação foram realizados usando escala hedônica estruturada mista de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 5= nem gostei, nem desgostei; 9 = gostei muitíssimo) de acordo com MEILGAARD, CIVILLE e CARR (19).

Os resultados dos testes de aceitação foram avaliados através de Análise de Variância e teste de Tukey, usando o programa “Statistical Analysis System” (SAS 8.02 TS level 02M0). O valor de $P < 0.05$ foi considerado como significativo.

2.2.5. Comparação sensorial de formulações de leite fermentado por STr contendo fibra de aveia com diferentes teores de aromatizante e corante

Foram elaboradas 4 formulações de leite fermentado por STr apenas, adicionado de diferentes concentrações de aroma e corante, com aspartame e fibra de aveia previamente tratada (tratamento da fibra no item **2.2.4.**). As concentrações de aromatizante e corante das formulações comparadas, bem como as quantidades dos demais ingredientes estão na Tabela 2.

Tabela 2. Formulações de leite fermentado por STr apenas, contendo fibra de aveia, comparadas quanto a diferentes concentrações de corante e aromatizantes

Formulação	fibra de aveia (g/kg)	aromatizante (g/l)	corante (g/l)	aspartame (ppm)
C1-2	13	0,005	0,2	600
C2-2	13	0,010	0,4	600
C3-2	13	0,015	0,6	600
C4-2	13	0,020	0,8	600
C5-3 ¹	não declarada	- ²	- ²	- ²

1. bebida láctea comercial

2. não informado pelo fabricante

O tipo de fibra empregado neste estudo, para determinação da concentração de corante e aromatizantes preferidas pelos consumidores, foi definido com base nos resultados da avaliação sensorial do estudo anterior (item **2.2.4.**) de seleção do tipo de fibra e grau de moagem.

2.2.5.1. Análise sensorial e estatística

Realizadas do mesmo modo que no item 2.2.4.1.

2.2.6. Estudo do tipo de pré-tratamento da fibra de aveia antes de sua incorporação em leite fermentado por STr contendo aromatizante, corante e aspartame

Foram elaboradas 3 formulações de leite fermentado por STr apenas, adicionado de aromatizante, corante, aspartame e fibra de aveia sem tratamento ou previamente tratada de dois modos: (a) reidratada por 15min em 100g de água para cada 13g de fibra; (b) reidratadas em água (300ml) por 15 minutos, aquecidas a 70°C, homogeneizadas em homogenizador centrífugo por

3 minutos e tratadas termicamente a 95°C por 5 minutos (mesmo tratamento do item **2.2.4**).

As concentrações de aroma e aromatizantes adotadas aqui foram as de melhor desempenho sensorial do item **2.2.5**.

Os tipos de pré-tratamento da fibra de aveia de cada formulação estudada, bem como as quantidades dos demais ingredientes estão na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Formulações usadas no estudo do tipo de pré-tratamento da fibra de aveia antes de sua incorporação em leite fermentado por ST_r contendo aromatizante, corante e aspartame

Formulação	tipo de pré-tratamento da fibra de aveia (13g/kg)	aromatizante (g/l)	corante (g/l)	aspartame (ppm)
C1-3	sem pré-tratamento	0,015	0,2	600
C2-3	apenas hidratada	0,015	0,2	600
C3-3	hidratada, aquecida, homogeneizada e tratada termicamente	0,015	0,2	600
C4-3 ¹	-	_2	_2	_2

1. bebida láctea comercial

2. não informado pelo fabricante

O tipo de fibra empregado neste estudo, para determinação da concentração de corante e aromatizantes preferidas pelos consumidores, foi definido com base nos resultados da avaliação sensorial do estudo anterior (item **2.2.4**.) de seleção do tipo de fibra e grau de moagem.

2.2.6.1. Análise sensorial e estatística

Realizadas do mesmo modo que no item **2.2.4.1.**

2.2.7. Comparação de leites fermentados por STR, contendo fibra de aveia, corante, aspartame e aromatizante, adicionados de LAC e BL sob duas formas diferentes

Foram elaboradas 2 formulações de leites fermentados por STR adicionados de LAC e BL liofilizados e, 2 formulações de leites fermentados obtidos pela mistura de leites fermentados em separado por STR, LAC e BL. Maiores detalhes da fabricação destes leites nos itens **2.2.1.**, **2.2.2** e **2.2.3.**. Das formulações elaboradas a partir de leite fermentado por STR adicionados de LAC e BL liofilizados, uma continha fibra de aveia e a outra fibra de soja de menor tamanho de partículas (FN 250). O mesmo foi feito com as formulações de leite fermentado obtido pela mistura de leites fermentados em separado por STR, LAC e BL. As fibras forma previamente tratadas como descrito no item **2.2.4.** As concentrações dos ingredientes das formulações estão na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4. Formulações de leite fermentado por STr, contendo fibra de aveia, corante, aspartame e aromatizante, adicionado de LAC e BL sob duas formas diferentes

formulação	forma de adição de LAC e BL	tipo de fibra (13g/kg)	aromatizant e (g/l)	corant e (g/l)	aspartame (ppm)
C1-4	leites fermentados em separado	soja	0,015	0,2	600
C2-4	liofilizados	soja	0,015	0,2	600
C3-4	leites fermentados em separado	aveia	0,015	0,2	600
C4-4	liofilizados	aveia	0,015	0,2	600
C5-4 ¹	_2	_2	_2	_2	_2

1. bebida láctea comercial contendo *Bif. bifidum* e *L. acidophilus*

2. não informado pelo fabricante

2.2.7.1. Quantificações dos microrganismos

As formulações C1-4, C2-4, C3-4 e C4-4 tiveram suas contagens de STr, LAC e BL determinadas no 7º dia de estocagem. O ágar ST (*Streptococcus thermophilus*) foi preparado de acordo com DAVE & SHAH (7), mas incubado a 30°C (22). O ágar Bile-MRS foi preparado de acordo com IDF (1995) citado em VINDEROLA & REINHEIMER (21). O ágar Cloreto de Lítio – Propionato de Sódio (LP-MRS) foi preparado de acordo com LAPIERRE et al. (15) usando o meio base sugerido em VINDEROLA & REINHEIMER (21), sendo as concentrações de agentes inibitórios 0,5g/l de LiCl e 0,75g/l de propionato de sódio (23). Os plaqueamentos foram realizados em triplicata.

2.2.7.2. Análise sensorial e estatística

Realizadas do mesmo modo que no item **2.2.4.1**.

2.2.8. Embalagem, codificação e estocagem dos leites fermentados

Após batimento, as formulações foram embaladas em garrafas plásticas termosseláveis, previamente higienizadas, sendo, então, levadas para as câmaras frias a 4°C.

Os leites fermentados foram avaliados no 1º e 7º dias de estocagem quanto a pH e acidez titulável e, no 7º dia, quanto as características sensoriais dos atributos de cor, aroma, sabor e textura.

2.2.9. Determinações de pH

O pH foi determinado utilizando o potenciômetro PH320 da marca WTW.

3. Resultados e Discussão

Nas Tabelas 5 a 8 estão apresentadas as médias das notas recebidas pelas diferentes formulações nos 4 estudos realizados neste trabalho.

3.1. Seleção de tipo de fibra e grau de moagem mais aceito sensorialmente em leite fermentado por STr

Na Tabela 5 estão apresentadas as médias das pontuações recebidas dos provadores, para os atributos cor, aroma, sabor e textura, pelos leites fermentados apenas por *Str. thermophilus*, usados na seleção de tipo de fibra e grau de moagem mais aceito sensorialmente, após 7 dias de estocagem a 4°C.

Tabela 5 . Valores de pH e desempenho sensorial das formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus* na seleção de tipo de fibra e grau de moagem, após 7 dias de estocagem a 4°C

Formulações ¹	pH		Cor ⁴	Aroma ⁴	Sabor ⁴	Textura ⁴
	dia 1	dia 7				
C1-1	4,45	4,25	5,8 ^b	5,8 ^b	5,3 ^b	5,5 ^b
C2-1	4,47	4,19	5,7 ^{bc}	6,3 ^b	5,4 ^b	5,8 ^{bc}
C3-1	4,41	4,21	5,0 ^d	6,0 ^b	6,0 ^{ab}	6,0 ^b
C4-1 ²	-	4,12 ³	8,0 ^a	7,3 ^a	6,5 ^a	7,6 ^a

1. C1-1 é leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado de fibra de soja FN100; C2-1 é adicionado de fibra de soja FN250 e C3-1, de fibra de aveia

2. bebida láctea comercial

3. pH só foi medido no dia da análise sensorial, quando se adquiria a bebida.

4. letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

Quanto ao sabor, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite fermentado por STr contendo fibra de aveia (C3-1) e a bebida láctea comercial (C4-1). Não houve diferença significativa entre as formulações de leite fermentado por STr contendo fibra de soja FN100 (C1-1) e FN250 (C2-1) e C3-1. Contudo, as notas para sabor para as formulações com fibra de soja foram menores, em termos quantitativos, daquelas obtidas pela formulação com fibra de aveia. A média das notas apontadas pelos provadores, para o atributo sabor, na formulação contendo fibra de aveia corresponde a expressão “gostei ligeiramente”, enquanto que para as formulações com fibra de soja a expressão correspondente foi “nem gostei/nem desgostei”.

As formulações C1-1 e C2-1 foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes da bebida comercial. O leite fermentado contendo fibra de soja FN250 (C2-1) obteve notas para sabor maiores que aquele contendo fibra de soja FN100 (C1-1), que apresenta tamanhos de partículas maiores (Tabela 5).

Quanto a cor, aroma e textura todas as formulações diferiram da comercial. Vale ressaltar que, embora o teor de corante adicionado tenha sido igual para as formulações C1-1, C2-1 e C3-1, a cor mais aceita foi a de C1-1, que ficou estatisticamente ($p < 0,05$) igual a C2-1 e significativamente diferente de C3-1 (Tabela 5). Como reportaram FERNÁNDEZ-GARCIA et al. (10) os constituintes da fibra dietética podem interagir com componentes dos alimentos durante o processamento, levando a mudanças na biodisponibilidade de nutrientes, na textura e sabor final do produto.

3.2. Comparação sensorial de formulações de leite fermentado por *STr* contendo fibra de aveia com diferentes teores de aromatizante e corante

Na Tabela 6 estão apresentadas as médias das pontuações recebidas dos provadores, para os atributos cor, aroma, sabor e textura, pelas formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus*, usados na seleção da concentração de aroma e corante mais aceita sensorialmente, após 7 dias de estocagem a 4°C.

Tabela 6. Comparação sensorial de formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus* contendo fibra de aveia com diferentes teores de aromatizante e corante

Formulações ¹	pH		Cor ³	Aroma ³	Sabor ³	Textura ³
	dia 1	dia 7				
C1-2	4,62	4,38	4,2 ^c	6,2 ^b	6,1 ^{ab}	6,5 ^b
C2-2	4,58	4,35	6,6 ^{ab}	6,0 ^b	6,0 ^{ab}	6,2 ^b
C3-2	4,60	4,42	7,2 ^a	6,2 ^b	5,9 ^b	5,8 ^b
C4-2	4,63	4,37	6,1 ^b	6,1 ^b	4,5 ^c	5,7 ^b
C5-2 ²	-	4,09 ²	6,4 ^{ab}	7,3 ^a	6,9 ^a	7,5 ^a

1. C1-2, C2-2, C3-2 e C4-2 são leites fermentados por *Str. thermophilus*, são adicionados de corante e aromatizantes nas respectivas concentrações que seguem: 0,005 e 0,2g/l; 0,01 e 0,4g/l; 0,015 e 0,6g/l e 0,020 e 0,8g/l.

2. bebida láctea comercial, pH só foi medido no dia da análise sensorial, quando se adquiria a bebida.

3. letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as combinações de leites fermentados

Na avaliação do atributo textura, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações C2-1, C2-2, C3-3 e C4-2; contudo, todas diferiram da bebida láctea comercial, que foi a mais aceita. Os mesmos resultados foram encontrados para o atributo aroma, embora os teores de aromatizantes tenham variado de 0,2g/l (C1-2) até 0,8g/l (C4-2).

Na avaliação sensorial do atributo cor, a formulação com 0,015g/l (C3-2) de corante foi a mais aceita, mas não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre ela, a C5-2 (comercial) e a C2-2 (0,010g/l). A formulação menos aceita quanto a cor foi C1-2, com 0,005g/l de corante. Por sua vez, não houve diferença significativa entre C2-2, C4-2 e a formulação comercial (Tabela 6). A formulação C3-2 recebeu média de notas, para o atributo cor, equivalente a expressão “gostei moderadamente”.

Para o atributo sabor, a bebida comercial foi a mais aceita. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre C1-2, C2-2 e a bebida comercial. Também as amostras C3-2, C1-2 e C2-2 não apresentaram diferença significativa entre si. A formulação C4-2, contendo 0,8g/l de aromatizante foi a menos aceita, sendo significativamente ($p < 0,05$) diferente das demais. C1-2, C2-2 e C3-2 receberam média de notas, para o atributo sabor, equivalente a expressão “gostei ligeiramente”, enquanto que a bebida comercial foi a mais aceita e recebeu notas equivalentes a “gostei moderadamente”.

Em função do desempenho sensorial das 4 formulações com diferentes teores de corante e aromatizante de morango, verificou-se que a concentração mais aceita para cor e aroma foi, respectivamente, 0,015g/l e 0,2g/l. Contudo, por questão econômica e pelo igual desempenho estatístico, pode-se usar também a concentração de 0,010g/l de corante.

3.3. Estudo do tipo de pré-tratamento da fibra de aveia antes de sua incorporação em leite fermentado por STr contendo aromatizante, corante e aspartame

Na Tabela 7 estão apresentadas as médias das pontuações recebidas dos provadores, para os atributos cor, aroma, sabor e textura, pelas formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus*, usadas na seleção de pré-tratamento da fibra de aveia a ser incorporada, após 7 dias de estocagem a 4°C.

Tabela 7. Estudo do tipo de pré-tratamento da fibra de aveia antes de sua incorporação em leite fermentado por *Str. thermophilus* contendo aromatizante, corante e aspartame após 7 dias de estocagem a 4°C

Formulações ¹	pH		Cor ³	Aroma ³	Sabor ³	Textura ³
	dia 1	dia 7				
C1-3	4,39	4,25	7,8 ^a	6,9 ^a	6,0 ^b	5,8 ^b
C2-3	4,43	4,31	7,8 ^a	7,0 ^a	6,4 ^{ab}	6,1 ^{ab}
C3-3	4,37	4,28	7,5 ^a	6,9 ^a	6,8 ^a	6,6 ^a

1. C1-3, C2-3 e C3-3 são leites fermentados por *Str. thermophilus*. C1-2 é adicionado de fibra de aveia sem pré-tratamento, C2-2 contém a fibra hidratada e C3-2 a contém na forma hidratada, aquecida, homogeneizada e tratada termicamente.

2. bebida láctea comercial, pH só foi medido no dia da análise sensorial, quando se adquiria a bebida.

3. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0.05$) entre as combinações de leites fermentados

Os atributos cor e aroma das formulações não foram diferenciados. Quanto a textura e o sabor, a formulação mais aceita foi a C3-3, na qual adicionou-se fibra de aveia pré-tratada por hidratação, aquecimento, homogeneização e tratamento térmico. No entanto, C3-3 não diferiu significativamente ($p < 0,05$) de C2-3, que continha fibra apenas hidratada. A formulação C1-3, que continha fibra sem tratamento, foi a menos aceita mas entre ela e a C2-3 não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre elas (Tabela 7).

3.4. Comparação de leite fermentado por *STr*, contendo fibra de aveia, corante, aspartame e aromatizante, adicionados de LAC e BL sob duas formas diferentes

Na Tabela 8 estão apresentadas as médias das pontuações recebidas dos provadores, para os atributos cor, aroma, sabor e textura, pelas formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus*, usadas na seleção do

tipo de fibra e modo de incorporação de LAC e BL, após 7 dias de estocagem a 4°C.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores de contagens de células viáveis de ST_r, LAC e BL das formulações após 7 dias de estocagem a 4°C.

Tabela 8. Comparação de formulações de leite fermentado por *Str. thermophilus*, contendo fibra de aveia e de soja, corante, aspartame, aromatizante, *L. acidophilus* e *Bif. longum* sob duas formas diferentes após 7 dias de estocagem a 4°C

Formulações ¹	pH		Cor ³	Aroma ³	Sabor ³	Textura ³
	dia 1	dia 7				
C1-4	4,78	4,61	7,4 ^a	6,5 ^{bc}	5,8 ^b	5,7 ^b
C2-4	4,42	4,34	6,2 ^b	5,8 ^c	3,3 ^c	5,5 ^b
C3-4	4,75	4,58	7,3 ^a	6,9 ^{ab}	6,3 ^b	6,1 ^b
C4-4	4,39	4,29	6,3 ^b	6,0 ^c	4,0 ^c	5,2 ^b
C5-4 ²	-	4,12 ²	7,3 ^a	7,6 ^a	7,7 ^a	8,0 ^a

1. C1-4 e C3-4 são leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* contendo, respectivamente, fibra de soja e aveia. C2-4 e C4-4 são leites fermentados *Str. Thermophilus* com *L. acidophilus* e *Bif. longum* liofilizados contendo, respectivamente, fibra de soja e aveia.

2. bebida láctea comercial, pH só foi medido no dia da análise sensorial, quando se adquiria a bebida.

3. letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0.05) entre as combinações de leites fermentados

Tabela 9. Contagens de células viáveis de *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* nos leites fermentados por *Str. thermophilus*, contendo fibras de aveia e soja, corante, aspartame e aromatizante, adicionados de *L. acidophilus* e *Bif. longum* sob duas formas diferentes após 7 dias de estocagem a 4°C.

Formulações ¹	contagens microbianas (ufc/ml)		
	STr	LAC	BL
C1-4	5,9x10 ⁸	4,0x10 ⁸	6,2x10 ⁸
C2-4	2,8x10 ⁹	3,3x10 ⁷	2,2x10 ⁷
C3-4	7,1x10 ⁸	5,6x10 ⁸	3,5x10 ⁸
C4-4	1,2x10 ⁹	1,7x10 ⁷	3,7x10 ⁷

1. C1-4 e C3-4 são leites fermentados elaborados pela mistura de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* contendo, respectivamente, fibra de soja e aveia. C2-4 e C4-4 são leites fermentados *Str. Thermophilus* com *L. acidophilus* e *Bif. longum* liofilizados contendo, respectivamente, fibra de soja e aveia.

Para o atributo textura as 4 formulações não foram diferenciadas. Quanto a cor, as formulações mais aceitas foram C1-4, C3-4 e a bebida láctea comercial que não diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si, enquanto C2-4 e C4-4 diferiram significativamente destas. C1-4, C3-4 e a bebida comercial receberam médias de notas equivalentes a expressão “gostei moderadamente”.

Para o atributo aroma C1-4 e C3-4 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si. Contudo, apenas C3-4, que contém fibra de aveia e é elaborada pela mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) da bebida comercial. As formulações elaboradas a partir de leite fermentado por STr adicionado de LAC e BL liofilizados C2-4 e C4-4 contendo, respectivamente, fibra de soja e de

aveia foram as menos aceitas, não apresentando diferenças significativas entre si mas diferindo significativamente ($p<0,05$) das demais.

Quanto ao sabor, as formulações C1-4 e C3-4, elaboradas com leites fermentados em separado contendo, respectivamente, fibra de soja e de aveia não diferiram significativamente ($p<0,05$) entre si, diferindo da comercial, que obteve as maiores notas para sabor. C2-4 e C4-4 foram as menos aceitas, sendo iguais entre si estatisticamente e diferindo significativamente ($p<0,05$) das demais. As formulações mais aceitas, após a bebida comercial, foram C1-4 e C3-4 com a expressão correspondente a “gostei ligeiramente”.

Embora quantitativamente as notas para sabor e aroma das formulações contendo fibra de aveia tenham sido maiores, estatisticamente não diferiram daquelas contendo fibra de soja.

As formulações C1-4 e C3-4, elaboradas com leites fermentados em separado por STR, LAC e BL contendo, respectivamente, fibra de soja e de aveia apresentaram contagens de células viáveis de LAC ($4,0 \times 10^8$ e $5,6 \times 10^8$ ufc/ml) e BL ($6,2 \times 10^8$ e $3,5 \times 10^8$ ufc/ml) maiores em um ciclo logarítmico que nas formulações C2-4 e C4-4, elaboradas a partir de leite fermentado por STR adicionado de LAC ($3,3 \times 10^7$ e $1,7 \times 10^7$ ufc/ml) e BL ($2,2 \times 10^7$ e $3,7 \times 10^7$ ufc/ml) liofilizados contendo, respectivamente, fibra de soja e de aveia (Tabela 9).

4. Conclusões

Quanto ao sabor, no estudo sobre tipo de fibra e grau de moagem, o leite fermentado por STr contendo fibra de aveia obteve as maiores notas. A formulação com fibra de soja de maior grau de moagem foi mais aceita em relação a de menor intensidade de moagem.

Na avaliação sensorial da concentração de corante e aromatizante os valores mais aceitos foram, respectivamente, 0,015g/l e 0,2g/l. Contudo, por questão econômica e pelo igual desempenho estatístico, pode-se usar também a concentração de 0,010g/l de corante.

No estudo de tipos de pré-tratamento da fibra de aveia a formulação mais aceita foi aquela adicionada de fibra pré-tratada por hidratação, aquecimento, homogeneização e tratamento térmico. No entanto, esta formulação foi estatisticamente ($p < 0,05$) igual a que continha fibra apenas hidratada.

No estudo de comparação sensorial de leites fermentados por *Str. thermophilus* contendo fibra de aveia ou soja, adicionados de *L. acidophilus* e *Bif. longum* as formulações com leites fermentados em separado foram as mais aceitas e as que apresentaram contagens de células viáveis de probióticos maiores.

5. Referências bibliográficas

1. BARNES, S. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. **Journal of Nutrition**. v. 125, s/n., p. 777S-783S. 1995.

2. BARNES, S.; KIRK, M.; COWARD, L. Isoflavonas and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 42, n. 8, p. 2466-2474. 1994.
3. BERNER, L.A.; O'DONNELL, J.A. Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. **International Dairy Journal**. v. 8, s/ n., p. 355 – 362, 1998.
4. BISTRÖM, M.; NORDSTRÖM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, s/ n., p. 372 – 379, 2002
5. COLLINS, J.L.; EBAH, C.B.; MOUNT, J.R.; DRAUGHON, F.A.; DEMOTT, B.J. Proximate, nutritional and microbiological analyses of milk-sweet potato mixtures fermented with yogurt bacteria. **Journal of Food Science**. v. 56, n. 3, p. 682-684, 1991
6. COWARD, L.; BARNES, N.C.; SETCHELL, K.D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian Diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 41, n. 11, p.1961-1967. 1993.
7. DAVE, R.I.; DAVE, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 79, n. 9, 1529-1536, 1996.
8. DEETH, H.C. Handbook of dietary fiber: an applied approach. Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA. 1987, 472 pgs.

9. ELDRIDGE, A.C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 30, n. 2, p.353-355. 1982.
10. FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; MCGREGOR, J.U.; TRAYLOR, S. The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 81, s/n., p. 655-663. 1998.
11. FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro. 9ª edição. 1992
12. GOLDBERG, I. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. EditoraCahpman & Hall, New York. 1994. 571pgs.
13. GOODERHAM, M.J., ADLERCREUTZ, H., OJALA, S.T., WÄHÄLÄ, K. HOLUB, B.J. A soy protein isolate rich in genistein and daidzein and its effect on plasma isoflavone concentrations, platelet aggregation, blood lipids and fatty acid composition of plasma phospholipid in normal men. **Journal of nutrition**. v. 126, n.8, p.2000-2006. 1996.
14. JASKARI, J.; KONTULA, P.; SIITONEN, A.; JOUSIMIES-SOMER, H.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, s/ n., p. 175 – 181, 1998
15. LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L.J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of Bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 5, p. 1192-1196, 1992.

16. MACFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order presentation and first-order effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**. v. 4, n. 2, p. 129-148. 1989.
17. MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges or future probiotic foods. **International Dairy Journal**. v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.
18. MAZUR, W.M.; DUKE, J.A.; WÄHÄLÄ, K.; RASKU, S. ADLERCREUTZ, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in humans. **Nutritional Biochemistry**. v. 9, s/ n., p. 193-200. 1998.
19. MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Controls for tests room, product, and panel; Attribute difference tests: How does attribute X differ between samples; Affective tests: consumer tests and in-house panel acceptance tests; Basic statistical methods; Guidelines for choice of technique. In M. Meilgaard, G.V. Civille, B.T. Carr, Sensory evaluation techniques. London: CRC Press Inc, 1999. p. 23 36, 99 122, 231 304, 337 344
20. TAMIME, A. Y., MARSHALL, V.M.E., ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal of Dairy Research**. v. 62, s/n., p. 151-187. 1995.
21. VINDEROLA, C.G., REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999.

22. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* in the presence of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. **Milchwissenschaft**, 2003a aceito para publicação
23. ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft**, 2003b aceito para publicação

Conclusões Gerais

- Na enumeração conjunta de *L. acidophilus*, *Bif. longum* e *Str. thermophilus* foi possível inibir o crescimento da linhagem de *L. acidophilus* usada na incubação aeróbia e microaerofílica a 30 e 45°C, tanto em ágar Lee como ST. A inibição da linhagem de *Bif longum* estudada foi possível em aerobiose, a qualquer temperatura nos dois meios referidos e, a 30 e 45°C em microaerofilia no ágar Lee. A condição ágar ST com incubação a 30°C em aerobiose é mais prática e econômica.
- As contagens de *Str. thermophilus* obtidas a partir da suspensão em água peptonada do microrganismo liofilizado, usando ágar ST (aerobiose) e ágar Lee (aerobiose e microaerofilia), incubados a 30 e 45°C, não foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes daquelas obtidas a 37°C (temperatura recomendada na literatura), mantidas as demais condições. Os mesmos resultados foram obtidos com leite fermentado por *Str. thermophilus*.
- As contagens da suspensão em água peptonada de *Str. thermophilus* liofilizado e da suspensão obtida pela mistura de suspensões em água peptonada dos três microrganismos liofilizados em ágar Lee foram ligeiramente maiores, aerobicamente que sob microaerofilia.
- As contagens da suspensão obtida pela mistura de suspensões em água peptonada dos três microrganismos liofilizados foram menores que da suspensão em água peptonada de *Str. thermophilus* liofilizado. Este fato não foi observado no leite fermentado por *Str. thermophilus* e no leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado dos probióticos liofilizados.
- A linhagem de *Str. thermophilus* empregada não pode ser inibida, em aerobiose, usando M-MRS para enumerar *L. acidophilus*. Os ágares T e Bile-MRS foram capazes de enumerar diferencialmente o *L. acidophilus* na

presença de *Str. thermophilus* e *Bif. longum*, mas o Bile-MRS é menos dispendioso em termos econômicos e de tempo de preparo que o T-MRS.

- A linhagem de *Str. thermophilus* utilizada não pode ser inibida, em anaerobiose, no ágar LP-MRS com concentrações de LiCl e propionato de sódio de 2 e 3g/l, respectivamente. Contudo, com três vezes estas concentrações de agentes inibitórios *Str. thermophilus* não cresceu. A linhagem de *L. acidophilus* estudada foi inibida, em anaerobiose, no ágar LP-MRS com concentrações de LiCl e propionato de sódio de 2 e 3g/l, respectivamente.
- Com ágar LP-MRS a concentrações de LiCl e propionato de sódio de 6 e 9g/l, respectivamente, foi possível enumerar seletivamente *Bif. longum* na presença de *Str. thermophilus* e *L. acidophilus*. LiCl e propionato de sódio têm a vantagem de poderem ser adicionados antes da esterilização quando usados como agentes inibitórios
- No estudo de leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado dos probióticos liofilizados, os efeitos sensoriais foram significativamente ($p < 0,05$) percebidos a medida que o tempo de estocagem avançava.
- As combinações favoritas de leite fermentado por *Str. thermophilus* adicionado dos probióticos liofilizados foram as que continham: *Bif. longum* e *L. acidophilus* (10^8 and 10^7 ufc/ml, respectivamente) e *Bif. longum* apenas (10^8 ufc/ml) que diferiram significativamente do leite fermentado por *Str. thermophilus* (padrão). As notas mais baixas e os maiores valores de acidez titulável foram apresentados pela combinação contendo apenas *L. acidophilus* liofilizado (10^8 ufc/ml, concentração inicial) adicionado a leite fermentado por *Str. thermophilus*.
- No estudo de leites fermentados adicionados de probióticos liofilizados, durante 21 dias de estocagem a 4°C, as contagens de células viáveis de *Str. thermophilus* não mudaram, as de *Bif. longum* mantiveram-se

constantes ou reduziram em um ciclo logarítmico e, as de *L. acidophilus* reduziram de 1 a 2 ciclos logarítmicos. Não foi observada inibição da pós-acidificação pela bifidobactéria ou pelo *L. acidophilus*.

- Em todas as análises sensoriais para os atributos sabor e acidez (1, 7, 14 e 21 dias), o leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* e a bebida láctea elaborada pela mistura de volumes iguais de leites fermentados em separado por *Str. thermophilus*, *Bif. longum* e *L. acidophilus* não diferiram entre si ($P < 0,05$).
- Os menores valores de pH e os maiores de acidez titulável foram encontrados no leite fermentado apenas por *Str. thermophilus*. O leite fermentado apenas por *Bif. longum* apresentou a menor acidez titulável e maior pH.
- A bebida láctea, que apresentou o maior abaixamento de pH, manteve valores de células viáveis altos para *Bif. longum* (10^8 ufc/ml) e aceitáveis *L. acidophilus* (acima de 10^7 ufc/ml após 21 dias de estocagem). As contagens de *Str. thermophilus* mantiveram-se constantes.
- É possível elaborar a bebida láctea proposta, obtida pela mistura de volumes iguais de leites fermentados por *Str. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bif. longum* analisando-se a aceitação pelos provadores e a viabilidade de *Bif. longum* e *L. acidophilus* após 21 de estocagem a 4°C.
- As variações no pH dos leites fermentados estudados apresentaram-se entre 0,28 e 0,40 unidades de pH para as quatro temperaturas estudadas (4, 7, 10 e 15°C). A menor redução aconteceu para a mistura de leites fermentados em separado por STr, LAC e BL estocada a 4°C (0,28 unidades). Esta mistura também apresentou a maior redução de pH a 10°C (0,40 unidades).

- As contagens de *Str. thermophilus* e *Bif. longum* não foram afetadas pelas temperaturas de estocagem. As contagens de *Bif. longum*, após 21 dias de estocagem, foram maiores na mistura de leites fermentados em separado que no leite com probióticos liofilizados.
- As contagens de *L. acidophilus* da mistura de leites fermentados em separado a 4, 7, 10 e 15°C, após 21 dias de estocagem, reduziram-se de cerca de 10^8 para 10^7 ufc/ml. As contagens deste microrganismo no leite fermentado com probióticos liofilizados a 7, 10 e 15°C mostraram-se menores em um ciclo logarítmico (10^6 ufc/ml) em relação as contagens obtidas dos leites fermentados estocados a 4°C (10^7 ufc/ml).
- Para produtos contendo *L. acidophilus*, o limite máximo permitido pela legislação brasileira de 10°C afeta a viabilidade do microrganismo. Esta temperatura, contudo, não traz perda da viabilidade para *Str. thermophilus* até 21 dias de estocagem.
- Nas análises sensoriais de aceitação para os atributos sabor e acidez, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite fermentado por *Str. thermophilus* e aquele adicionado de probióticos liofilizados. Também, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o leite fermentado adicionado de probióticos e aquele obtido por mistura de leites fermentados em separado. O leite fermentado apenas por *Str. thermophilus* diferiu do leite fermentado elaborado por mistura de leites fermentados em separado.
- Quanto ao sabor, no estudo sobre tipo de fibra e grau de moagem, o leite fermentado por STr contendo fibra de aveia obteve as maiores notas. A formulação com fibra de soja de maior grau de moagem foi mais aceita em relação a de menor grau.
- Na avaliação sensorial da concentração de corante e aromatizante os valores mais aceitos foram, respectivamente, 0,015g/l e 0,2g/l. Contudo,

por questão econômica e pelo igual desempenho estatístico, pode-se usar também a concentração de 0,010g/l de corante.

- No estudo de tipos de pré-tratamento da fibra de aveia a formulação mais aceita foi aquela adicionada de fibra pré-tratada por hidratação, aquecimento, homogeneização e tratamento térmico. No entanto, esta formulação foi estatisticamente ($p < 0,05$) igual a que continha fibra apenas hidratada.
- No estudo de comparação sensorial de leites fermentados por *Str. thermophilus* contendo fibra de aveia ou soja, adicionados de *L. acidophilus* e *Bif. longum* as formulações com leites fermentados em separado foram as mais aceitas e as que apresentaram contagens de células viáveis de probióticos maiores.

Nome do arquivo: Patricia Blumer Zacarchenco.doc
Pasta: D:\TESES DIGITAIS\TDE2003
Modelo: C:\Documents and Settings\pesquisa\Dados de aplicativos\Microsoft\Modelos\Normal.dot
Título: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Assunto:
Autor: patylene
Palavras-chave:
Comentários:
Data de criação: 4/5/2005 09:20
Número de alterações:9
Última gravação: 12/9/2005 10:00
Gravado por: FEA
Tempo total de edição: 40 Minutos
Última impressão: 12/9/2005 10:26
Como a última impressão
Número de páginas: 203
Número de palavras: 46.715 (aprox.)
Número de caracteres: 266.281 (aprox.)