

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

**“EFEITO DO TEOR DE LACTOSE E DO TIPO DE CULTURA NA
ACIDIFICAÇÃO E PÓS-ACIDIFICAÇÃO DE IOGURTES”**

MARINA ALESSANDRA GIMENEZ PEREIRA

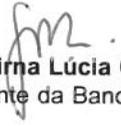
Engenheira de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. **MIRNA LÚCIA GIGANTE**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Marina Alessandra Gimenez Pereira**, aprovada pela Comissão Julgadora em 18 de Setembro de 2002.

Campinas, 18 de Setembro de 2002


Profa. Dra. **Mirna Lúcia Gigante**
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS - SP

2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE Bo
Nº CHAMADA T/UNICAMP
P414e
V _____ EX _____
TOMBO BCI 5-1346
PROC 16.837102
C _____ DX _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 25/10/02
Nº CPD _____

CM00175704-9

BIB 10 265426

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

P414e Pereira, Marina Alessandra Gimenez
Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e
pós-acidificação de iogurtes / Marina Alessandra Gimenez
Pereira. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1.Iogurte. 2.Lactose. 3.Cultura. 4.Fermentação. I.Gigante,
Mirna Lúcia. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos. III.Título.

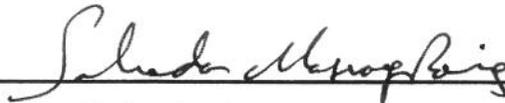
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
Universidade Estadual de Campinas
Orientadora



Profa. Dra. Alda Luiza S. Lerayer
Instituto de Tecnologia de Campinas
Membro



Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Universidade Estadual de Campinas
Membro

Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro
Instituto Mauá de Tecnologia
Suplente

DEDICO

Ao meu pai Egberto, como reconhecimento por todos os momentos de apoio, força, incentivo e ajuda essencial.

À minha mãe Jimena que, mesmo de longe, sempre torceu, incentivou e me apoiou em todas as etapas da minha vida.

OFEREÇO

À minha querida Vó Maria, por todo seu carinho e por sempre estar me esperando de braços abertos quando eu voltava nos fins de semana para casa.

Às minhas irmãs, Tina e Andréa, pelo carinho, amizade e incentivo.

Aos meus lindos sobrinhos, Valito e Petita.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante, pelos ensinamentos e valiosa orientação durante a realização deste trabalho;

À Dra. Alda Luiza Lerayer, por toda orientação concedida desde meu estágio realizado no TECNOLAT (ITAL) até os dias de hoje;

À Profa. Dra. Eliana Paula Ribeiro, por sua essencial colaboração e dicas durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig, por sua colaboração, ajuda e suporte durante todo este trabalho principalmente durante ausência da Profa. Dra. Mirna;

Ao Prof. Dr. Ademir J. Petenate, pela colaboração e participação fundamental na análise estatística deste trabalho;

À CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado;

À FAEP pela concessão do auxílio ponte para a finalização deste trabalho;

Ao Gel Kardel da Chr. Hansen pelo fornecimento das culturas lácticas utilizadas neste trabalho;

À Maria Lúcia Sabatino, da Kerry do Brasil, pelo apoio e dias livres concedidos para que eu pudesse resolver os “pepinos” da defesa da tese;

Às técnicas Bete e Ana Lourdes pelos valiosos ensinamentos, pelas dicas, paciência e ajuda durante a parte prática deste trabalho;

Ao Fernando Thiago Guimarães por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, pelos auxílios fundamentais com o meu computador, pelo apoio, compreensão, companhia e principalmente por seu amor incondicional;

Aos queridos amigos Vivi, Salles e Jorge pela essencial ajuda durante os processamentos realizados. Vocês são muito especiais para mim;

Aos amigos do laboratório de Leite e Derivados: Luciano, Fabinho Sorriso, Leila, Guida, Zé Raimundo, Paty Zarcachenco e Clarissa pela companhia no laboratório durante as madrugadas de trabalho, pela ajuda e especialmente pela amizade adquirida.

Às minhas inesquecíveis irmãs “campineiras” que ganhei durante essa jornada: Lú Omairi, Lulinha, Fúlvia e Gisele pelo carinho, amizade, alegrias, tristezas, cervejas, risadas e baladas que passamos e que ainda passaremos juntas;

Aos membros da minha equipe de análise sensorial que sempre tiveram paciência e disposição para provarem os meus iogurtes;

À toda minha família pelo apoio, carinho e incentivo, em especial à minha tia Hilda pelo computador que me presenteou. Sem ele, não sei onde digitaria esta tese;

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Iogurte.....	4
3.1.1. Introdução.....	4
3.1.2. Processo geral de fabricação.....	6
3.1.3. Processo de fermentação.....	12
3.1.3.1. Tipos de culturas utilizados na fermentação.....	12
3.1.3.1.1. Cultura tradicional.....	12
3.1.3.1.2. Cultura probiótica.....	14
3.1.3.1.2.1. Efeitos terapêuticos das bifidobactérias.....	16
3.1.4. Pós-acidificação.....	18
3.2. Ultrafiltração na produção de iogurte.....	20
3.2.1. Deficiência de lactase.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Material.....	28
4.1.1. Matéria-prima.....	28
4.1.2. Culturas Lácteas.....	28
4.1.3. Equipamento.....	28
4.2. Métodos.....	29
4.2.1. Recepção do leite.....	29

4.2.2. Ultrafiltração (UF) e Diafiltração (DF) do leite para a obtenção das matérias-primas (MP) para fabricação dos iogurtes.....	29
4.2.3. Limpeza do sistema de ultrafiltração.....	30
4.2.4. Cálculos do fator de concentração e da massa de água para diafiltração.....	30
4.2.4.1. Fator de concentração (Fc).....	30
4.2.4.2. Massa de água para diafiltração.....	31
4.2.5. Tratamento térmico.....	31
4.2.6. Processo de fabricação dos iogurtes.....	31
4.2.7. Análises físico-químicas.....	34
4.2.7.1. Leites e permeados.....	34
4.2.7.2. Iogurtes.....	34
4.2.8. Contagem de bactérias lácticas.....	35
4.2.8.1. Contagem de <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	35
4.2.8.2. Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	36
4.2.8.3. Contagem de <i>Bifidobacterium lactis</i>	37
4.2.9. Análise Sensorial.....	38
4.2.9.1. Seleção da equipe.....	38
4.2.9.2. Avaliação da pós-acidificação.....	39
4.2.9.3. Teste de aceitação.....	40
4.2.10. Planejamento experimental e análise estatística.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1. Composição físico-química das matérias-primas.....	43
5.2. Efeito do teor de lactose da matéria-prima e do tipo de cultura no tempo de fermentação.....	45
5.3. Composição físico-química dos produtos obtidos.....	48
5.4. Efeito do teor de lactose da matéria-prima, do tipo de cultura e do tempo de estocagem nas características de pós-acidificação.....	50
5.5. Efeito do teor de lactose da matéria-prima e do tempo de estocagem na contagem de bactérias lácticas.....	55
5.5.1. Iogurtes fabricados com cultura tradicional.....	55
5.5.2. Iogurtes fabricados com cultura probiótica.....	59

5.6. Análise sensorial.....	63
5.6.1. Avaliação da pós-acidificação.....	63
5.6.2. Avaliação da aceitabilidade.....	64
6. CONCLUSÕES.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	82
ANEXO III.....	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 3.1. Fluxograma geral do processamento de iogurte.....	7
FIGURA 4.1. Fluxograma do processamento do iogurte.....	33
FIGURA 4.2. Morfologia das colônias de <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> desenvolvidas em meio de cultura Agar Lee, após 48 horas de incubação.....	36
FIGURA 4.3. Morfologia das colônias de <i>L. acidophilus</i> desenvolvidas em meio de cultura MRS-maltose, após 72 horas de incubação.....	37
FIGURA 4.4. Morfologia das colônias de <i>B. lactis</i> desenvolvidas em meio de cultura MRS suplementado, após 72 horas de incubação.....	38
FIGURA 4.5. Ficha sensorial utilizada na seleção da equipe para o atributo acidez e para avaliação da pós-acidificação dos iogurtes obtidos.....	39
FIGURA 4.6. Ficha utilizada para avaliação de aceitabilidade de iogurte natural.....	41
FIGURA 5.1. Concentração dos constituintes no leite pasteurizado, leite ultrafiltrado e concentrado diafiltrado.....	45
FIGURA 5.2. Efeito do teor de lactose da matéria-prima no tempo de fermentação dos iogurtes.....	47
FIGURA 5.3. Efeito do tipo de cultura no tempo de fermentação dos iogurtes.....	48
FIGURA 5.4. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem no pH dos produtos obtidos.....	52
FIGURA 5.5. Efeito do teor de lactose da matéria-prima na acidez dos produtos obtidos.....	52

FIGURA 5.6. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem na acidez dos produtos obtidos.....	53
FIGURA 5.7. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem na % de lactose do produto.....	55
FIGURA 5.8. Efeito do teor de lactose da matéria-prima na manutenção do número de células viáveis de <i>S. thermophilus</i> nos iogurtes fabricados com cultura tradicional.....	57
FIGURA 5.9. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>S. thermophilus</i> nos iogurtes fabricados com cultura tradicional.....	58
FIGURA 5.10. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>L. bulgaricus</i> nos iogurtes fabricados com cultura tradicional.....	59
FIGURA 5.11. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>L. acidophilus</i> nos iogurtes fabricados com cultura probiótica.....	62
FIGURA 5.12. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de <i>B. lactis</i> nos iogurtes fabricados com cultura probiótica.....	62
FIGURA 5.13. Gráfico da correlação obtida entre a análise físico-química (% ácido láctico) e a análise sensorial (escala de 9 cm) dos produtos no 14º dia de estocagem refrigerada.....	64
FIGURA 5.14. Freqüência de notas na avaliação sensorial para o atributo “consistência” (4- Está do jeito que eu gosto; 1- Muito menos consistente do que eu gosto; 7- Muito mais consistente do que eu gosto).....	65
FIGURA 5.15. Freqüência de notas na avaliação sensorial para o atributo “acidez” (4- Está do jeito que eu gosto; 1- Muito menos ácido do que eu gosto; 7- Muito mais ácido do que eu gosto).....	66

FIGURA 5.16. Frequência de notas na avaliação sensorial para aceitação global dos produtos (1- Desgostei extremamente; 5- Nem gostei/Nem desgostei; 9- Gostei extremamente).....	68
FIGURA I. Curvas de desenvolvimento de pH durante os 3 processamentos de fabricação dos iogurtes: (a) MP1 Tradicional; (b) MP1 Probiótico; (c) MP2 Tradicional e; (d) MP2 Probiótico.....	80
FIGURA II. Curvas de desenvolvimento de acidez durante os 3 processamentos de fabricação dos iogurtes: (a) MP1 Tradicional; (b) MP1 Probiótico; (c) MP2 Tradicional e; (d) MP2 Probiótico.....	81
FIGURA III. Efeito do tempo de estocagem sobre o pH dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).....	83
FIGURA IV. Efeito do tempo de estocagem na acidez dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).....	83
FIGURA V. Efeito do tempo de estocagem no consumo de lactose dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).....	84
FIGURA VI. Média da contagem de <i>S. thermophilus</i> (St) e <i>L. bulgaricus</i> (Lb) em iogurtes fabricados com cultura tradicional durante o tempo de estocagem dos produtos obtidos nos 3 processamentos.....	86
FIGURA VII. Média da contagem de <i>S. thermophilus</i> (St), <i>L. acidophilus</i> (La) e <i>B. lactis</i> (Bb) em iogurtes fabricados com cultura probiótica durante o tempo de estocagem dos produtos obtidos nos 3 processamentos.....	86

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 3.1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas das bactérias probióticas em humanos.....	17
TABELA 5.1. Características físico-químicas dos leites, permeados e concentrado diafiltrado.....	43
TABELA 5.2. Características médias do processo de fermentação dos iogurtes obtidos.....	46
TABELA 5.3. Tempo médio de fermentação dos iogurtes obtidos.....	46
TABELA 5.4. Características físico-químicas médias dos iogurtes obtidos.....	48
TABELA 5.5. Porcentagem média dos 3 processamentos de lactose consumida durante a fermentação e resfriamento dos produtos.....	49
TABELA 5.6. pH e acidez média dos 3 processamentos dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem.....	50
TABELA 5.7. Porcentagem média do teor de lactose dos 3 processamentos dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem.....	54
TABELA 5.8. Contagem média dos 3 processamentos do número de células viáveis das bactérias lácticas dos iogurtes fabricados com cultura tradicional durante o tempo de estocagem (\log_{10} UFC/ml).....	56
TABELA 5.9. Contagem média dos 3 processamentos do número de células viáveis das bactérias lácticas dos iogurtes fabricados com cultura probiótica durante o tempo de estocagem (\log_{10} UFC/ml).....	60

TABELA 5.10. Média dos resultados obtidos na avaliação da acidez dos iogurtes dos 3 processamentos, após 14 dias de estocagem refrigerada (escala de 9 cm).....63

TABELA 5.11. Média dos resultados obtidos na avaliação da aceitação global dos iogurtes.....67

RESUMO

Atualmente, especial atenção tem sido dada ao uso de culturas probióticas, por promoverem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, e a produtos contendo baixo teor de lactose visando atender consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose, além dos indivíduos imunossuprimidos, como os portadores do vírus HIV. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do teor de lactose do leite e do tipo de cultura no tempo de fermentação, nas características de pós-acidificação e nas características sensoriais do iogurte e, avaliar o efeito do teor de lactose do leite e do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis das bactérias lácticas durante estocagem. Leite integral foi ultrafiltrado ($F_c = 1,25$), para obtenção de concentrado (MP1= 4,5% de lactose) e diafiltrado para obtenção de concentrado com teor de lactose reduzido (MP2= 1,7% de lactose). As matérias-primas 1 e 2 foram pasteurizadas (95°C/5minutos), resfriadas (45°C) e divididas em duas porções iguais que foram inoculadas com cultura tradicional (*L. bulgaricus* e *S. thermophilus*), ou com cultura probiótica (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* Bb12). Para avaliar o tempo de fermentação, que foi definido como o tempo necessário para que o produto atingisse pH $4,90 \pm 0,05$, uma sub-porção de cada matéria-prima, inoculada com cultura tradicional ou cultura probiótica, foi acondicionada em tubos que foram incubados em banho-maria (45°C), de onde amostras foram randomicamente escolhidas a cada 20 minutos para determinação de pH e acidez. A outra sub-porção de cada matéria-prima foi acondicionada em béquer e incubada em estufa a 45°C. Após resfriamento os produtos foram estocados a 4°C e randomicamente escolhidos após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de fabricação e avaliados quanto ao pH, acidez, lactose e contagem de bactérias lácticas. O estudo do tempo de fermentação e da contagem de bactérias

láticas foi realizado através de um design Split-Plot com três replicações. Para o estudo da pós-acidificação foi utilizado um design Split-Split-Plot com três replicações. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) para avaliar o efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no tempo de fermentação e nas características de pós-acidificação, bem como para avaliar o efeito do teor de lactose e do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis das bactérias láticas. O teor de lactose e o tipo de cultura afetaram significativamente o tempo de fermentação. A redução do teor de lactose do leite para 1,7% aumentou em 30 minutos o tempo de fermentação, entretanto, a utilização da cultura probiótica reduziu em 50% o tempo de fermentação dos iogurtes. Durante o período de estocagem, o pH diminuiu e a acidez aumentou significativamente, indicando que todos os iogurtes sofreram pós-acidificação. No entanto, os iogurtes obtidos com cultura probiótica apresentaram menor pós-acidificação. O teor de lactose da matéria-prima não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis dos microrganismos da cultura tradicional e probiótica. O tempo de estocagem diminuiu significativamente o número de células viáveis de *S. thermophilus* (~0,07 ciclo logarítmico) e *L. bulgaricus* (~0,19 ciclo logarítmico) para a cultura tradicional, e de *L. acidophilus* (0,4 ciclo logarítmico) e *B. lactis* (0,3 ciclo logarítmico) para a cultura probiótica. Entretanto, mantiveram-se dentro do padrão exigido pela legislação ($>10^6$ UFC/g). A análise sensorial mostrou que os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose foram os mais aceitos pelos consumidores, sendo que o iogurte fabricado com cultura probiótica teve melhor desempenho na avaliação dos atributos “consistência” e “acidez” e maior preferência (62,5%) entre os iogurtes. Os produtos obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose foram caracterizados pela baixa consistência e baixa acidez, sendo considerada uma acidez não característica de iogurte pelo consumidor. Os resultados obtidos demonstraram o grande potencial para a produção de iogurte com teor de lactose reduzido utilizando-se cultura probiótica, entretanto, estudos complementares devem ser conduzidos visando melhorar as características sensoriais desses produtos.

SUMMARY

Nowadays, special attention has been given to the utilization of probiotic cultures, as *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp., because they promote benefic effects to the health of the host and to products containing low lactose content aiming the consumers that present lactose malabsorption or lactose intolerance, as well as the immuno suppressed individuals, as the HIV infected people. The objectives of this study were the evaluation of the effect of lactose content and the type of culture on fermentation time, on post-acidification characteristics and on yogurt sensorial characteristics, and the evaluation of the effect of lactose content and storage time on the maintenance of viable cells of lactic bacteria. Whole milk was ultrafiltrated ($F_c = 1.25$) to obtain concentrate (MP1= 4.5% of lactose) and diafiltrated to obtain concentrate with reduced lactose content (MP2= 1.7% of lactose). The raw materials 1 and 2 were pasteurized (95°C/5 min.), cooled (45°C) and divided into 2 portions inoculated with traditional culture (*Lactobacillus delbrueckii* sbsp. *bulgaricus* and *Streptococcus Thermophilus*) or probiotic culture (*Streptococcus Thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* Bb12). To evaluate the fermentation time, which was defined as the necessary time for the product to reach $\text{pH } 4.90 \pm 0.05$, a sub-portion of each raw material, inoculated with either tradicional or probiotic culture, was placed in tubes which were incubated in water bath (45°C) and randomly chosen every 20 minutes and analyzed for pH and acidity. The other sub-portion of each raw material was placed in becker and incubated in na oven at 45°C. After cooling, the products were stored at 4°C and randomly chosen after 1, 7, 14, 21, 28 e 35 days of manufacture and analyzed for

pH, acidity, lactose content and counting of lactic bacteria. The study of fermentation time and counting of lactic bacteria was performed through a Split-Plot design with three replicates. For the post-acidification study a Split-Split-Plot design with three replicates was used. Variance analyses (ANOVA) was utilized to evaluate the effect of lactose content and the type of culture in fermentation time and in the characteristics of post-acidification, as well as to evaluate the effect of lactose content and storage time on the maintaining of viable cells of lactic bacteria. The lactose content and type of culture affected the fermentation time significantly. The reduction of milk lactose content to 1.7% increased the fermentation time in 30 minutes, however, the utilization of probiotic culture decreased the fermentation time in 50%. During storage the pH decreased and the acidity increased significantly, showing that all yogurts suffered post-acidification. However, the yogurts obtained with probiotic culture showed lower post acidification. The viability of the lactic bacteria was not affected by the milk lactose content. The viability of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* decreased significantly during storage time (~0,07 log cycles and ~0,19 log cycles, respectively), in yogurts inoculated with tradicional culture. The viability of *L. acidophilus* and *B. lactis* decreased significantly during storage time (~0,4 log cycles and ~0,3 log cycles, respectively) in yogurts inoculated with probiotic culture. However, the viability of all microorganisms was within the patterns required by the legislation ($>10^6$ UFC/g). The sensorial analysis showed that the yogurts made of milk with higher lactose content were more accepted by the consumers, and the yogurt inoculated with probiotic culture had the best performance on the evaluation of the attributes "consistency" and "acidity" and was the favorite (62,5%) among the yogurts. The yogurts made of reduced lactose content were characterized for its low consistency and low acidity, and their acidity was considered non-characteristics by the consumer. These results indicate the great potential of the production of yogurt with reduced lactose contents utilizing probiotic cultures, however, further studies have to be conducted improving the sensorial characteristics of the product.

1. INTRODUÇÃO

O iogurte é o derivado de leite que apresenta uma das melhores margens de rentabilidade para o fabricante de lácteos, devido ao fato de não passar por nenhum processo de concentração, ou seja, ele começa com um volume de matéria prima e termina com o mesmo volume ou até um pouco mais (já que se acrescentam alguns ingredientes, como polpas de frutas). Seu mercado, em suas diversas categorias, vem demonstrando grande potencial de crescimento nos últimos anos (SANTOS, 1998).

No Brasil, o aumento do consumo de iogurte começou em 1970, quando a produção era cerca de 100 g *per capita* por ano. Na década de 90, o mercado de iogurtes passou por um crescimento expressivo, especialmente de 94 para 95, quando o consumo praticamente duplicou. Nos anos seguintes, a ampliação do mercado foi contínua e essa tendência mantém-se até hoje onde consumo per capita brasileiro é de cerca de 2,7 kg por ano (NESTLÉ, 2002).

As bactérias lácticas tradicionalmente utilizadas para a fabricação de iogurtes são *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) e *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*). Atualmente, muita atenção tem sido dada ao uso de culturas probióticas, como *Bifidobacterium* sp. e algumas espécies de *Lactobacillus*, por promoverem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001) além de oferecerem a vantagem de uma menor pós-acidificação (KNEIFEL, JAROS & ERHARD, 1993).

No processo tradicional da fabricação de iogurte, visando-se o aumento da viscosidade/consistência, aumenta-se o teor de sólidos do leite, principalmente de sólidos desengordurados (RASIC & KURMANN, 1978; TAMIME & DEETH, 1980). O aumento do extrato seco da mistura destinada a elaboração de iogurte pode ser feito

por diversos métodos tais como, concentração por ultrafiltração ou evaporação, adição de leite em pó integral ou desnatado (3 a 4%), adição de soro de leite em pó (1 a 2%), adição de caseína em pó e adição de concentrado protéico de soro (TAMIME & ROBINSON, 1999).

A viscosidade e a estabilidade física do iogurte são propriedades importantes do produto e a ultrafiltração tem um efeito benéfico por aumentar o teor de proteínas sem aumentar o teor de lactose (RASIC & KURMANN, 1978; TAMIME & DEETH, 1980). Os iogurtes fabricados a partir de leite concentrado por ultrafiltração são mais firmes que os fabricados por evaporação ou adição de leite em pó desnatado para o mesmo nível de proteína (LUCEY & SINGH, 1998).

A produção de iogurte com baixo teor de lactose, utilizando ultrafiltração/diafiltração, foi estudada por KOSIKOWSKI (1979) que verificou que é possível a obtenção de iogurtes com características organolépticas adequadas, permanecendo com uma acidez estacionária durante o armazenamento. O consumo de iogurtes contendo baixo teor de lactose tem crescido nos últimos anos, principalmente pelos indivíduos que apresentam má absorção ou intolerância à lactose (ALVAREZ *et al.*, 1998).

Segundo RIBEIRO (1989), com a diminuição do teor de lactose do leite através da diafiltração, a taxa de produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas diminui durante o processo de fermentação, fornecendo uma maior vida de prateleira ao produto. A literatura disponível indica que estudos para obtenção de iogurtes com baixo teor de lactose utilizando culturas probióticas são ainda pouco explorados.

2. OBJETIVOS

1) Avaliar o efeito do teor de lactose do leite e do tipo de cultura:

- no tempo de fermentação do iogurte, que foi definido como o tempo necessário para o produto atingir $\text{pH } 4,90 \pm 0,05$;
- nas características de pós-acidificação (pH e acidez) do produto durante 35 dias de estocagem refrigerada;
- nos atributos sensoriais de consistência, acidez, aceitação global e preferência dos iogurtes pelos consumidores.

2) Avaliar o efeito do teor de lactose do leite e do tempo de estocagem:

- na manutenção do número de células viáveis das bactérias lácticas compostas pela cultura tradicional (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e probiótica (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis*) durante 35 dias de estocagem.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Iogurte

3.1.1. Introdução

A acidificação é um dos métodos mais antigos de preservação do leite e segundo KOSIKOWSKI (1978), o leite fermentado surgiu na Mesopotâmia em cerca de 5000 a. C. O iogurte é um alimento e bebida tradicional nos Bálcãs e na Ásia Mediterrânea e a palavra “iogurte” é derivada da palavra turca “jugurt”, sendo conhecida por uma variedade de nomes em diferentes países. (RASIC & KURMANN, 1978; TAMIME & DEETH, 1980).

No início do século XX, a teoria de Metchnikoff, denominada “Teoria da Longevidade”, atribuiu ao iogurte vários efeitos benéficos à saúde humana. Para Metchnikoff, a longevidade dos povos dos Bálcãs era resultado de uma dieta rica em leite fermentado, contendo um lactobacilo que por muito tempo foi considerado como *L. bulgaricus*. Posteriormente, verificou-se que o *L. acidophilus* deveria ser o microrganismo contido em tais produtos pela afinidade deste com o trato intestinal humano. Embora esta teoria tenha exagerado no valor do iogurte, influenciou de forma significativa na sua difusão em vários países da Europa (TAMIME & ROBINSON, 1999).

O iogurte apresenta uma das melhores margens de rentabilidade para o fabricante de lácteos e seu mercado, em suas diversas categorias, vem demonstrando nos últimos anos um grande potencial de crescimento (SANTOS, 1998). Diferentes leites fermentados e produtos contendo leite fermentado são atualmente produzidos em

muitos países, porém, o iogurte é provavelmente o leite fermentado mais popular (TAMIME & ROBINSON, 1999).

No Brasil o aumento do consumo de iogurte começou em 1970 e continuou com uma taxa excepcional de crescimento devido aos mais variados produtos disponíveis comercialmente, tais como o iogurte congelado, o líquido e em forma de bebidas (BRANDÃO, 1987). Até 1970 havia no país um pequeno mercado consumidor de iogurte natural, formado basicamente por jovens e adultos que gostavam de tomar o produto batido com açúcar. Naquela época, a produção global era estimada entre 40 e 50 milhões de potes de 200 g anuais, algo como 10 mil toneladas ou 100 g *per capita* por ano - 100 vezes menos que na Suíça. Na década de 90, o mercado de iogurtes passou por um crescimento expressivo, especialmente de 94 para 95, quando o consumo praticamente duplicou. Nos anos seguintes, a ampliação do mercado foi contínua e essa tendência mantém-se até hoje onde consumo per capita brasileiro é de cerca de 2,7 kg por ano (NESTLÉ, 2002).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa N° 36, de 31 de outubro de 2000, entende-se por Bebida Láctea o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea represente pelo menos 51% massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000).

O mesmo regulamento define Bebida Láctea Fermentada como o produto descrito na definição acima, fermentado mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos, e/ou adicionado de leite fermentado e/ou outros produtos lácteos fermentados, e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade.

Existem dois tipos principais de iogurtes, classificados conforme seu método de produção e da estrutura física do seu coágulo: o iogurte tradicional (*set yogurt*) e o iogurte batido (*stirred yogurt*). O iogurte tradicional é o produto formado quando a fermentação/coagulação é realizada na própria embalagem de comercialização e possui uma massa contínua semi-sólida. O coágulo do iogurte batido é produzido em tanques e a estrutura do gel é quebrada antes do resfriamento e embalagem. O iogurte líquido (*fluid yogurt*) pode ser considerado como um iogurte batido de baixa viscosidade (RASIC & KURMANN, 1978; KOSIKOWSKI, 1978; TAMIME & DEETH, 1980). Hoje, a indústria de iogurte está dominada pelo iogurte batido pois este permite aos produtores adicionar vários estabilizantes para prevenir a sinérese durante a vida de prateleira (LUCEY, 2002).

O iogurte se distingue dos outros leites fermentados por seu aroma típico e agradável, atribuído à presença de quantidades suficientes de acetaldeído, como principal componente do aroma. O sabor ácido refrescante é atribuído à presença de ácido láctico (RASIC & KURMANN, 1978).

3.1.2. Processo geral de fabricação

O leite a ser utilizado na fabricação de iogurtes deve ser de boa qualidade, higienicamente produzido e manipulado, devendo ser conservado ao abrigo da luz a fim de evitar sabor oxidado, de composição normal e isento de antibióticos e preservativos (RASIC & KURMANN, 1978). A Figura 3.1 apresenta o fluxograma geral das etapas de processamento dos iogurtes tradicional, batido e líquido.

No processo tradicional da fabricação de iogurte, visando-se o aumento da viscosidade/consistência, aumenta-se o teor de sólidos do leite, principalmente de sólidos desengordurados (TAMIME & DEETH, 1980). O aumento do extrato seco da mistura destinada a elaboração de iogurte pode ser feito por diversos métodos tais como, concentração por ultrafiltração ou evaporação, adição de leite em pó integral ou desnatado (3 a 4%), adição de soro de leite em pó (1 a 2%), adição de caseína em pó e adição de concentrado protéico de soro (TAMIME & ROBINSON, 1999).

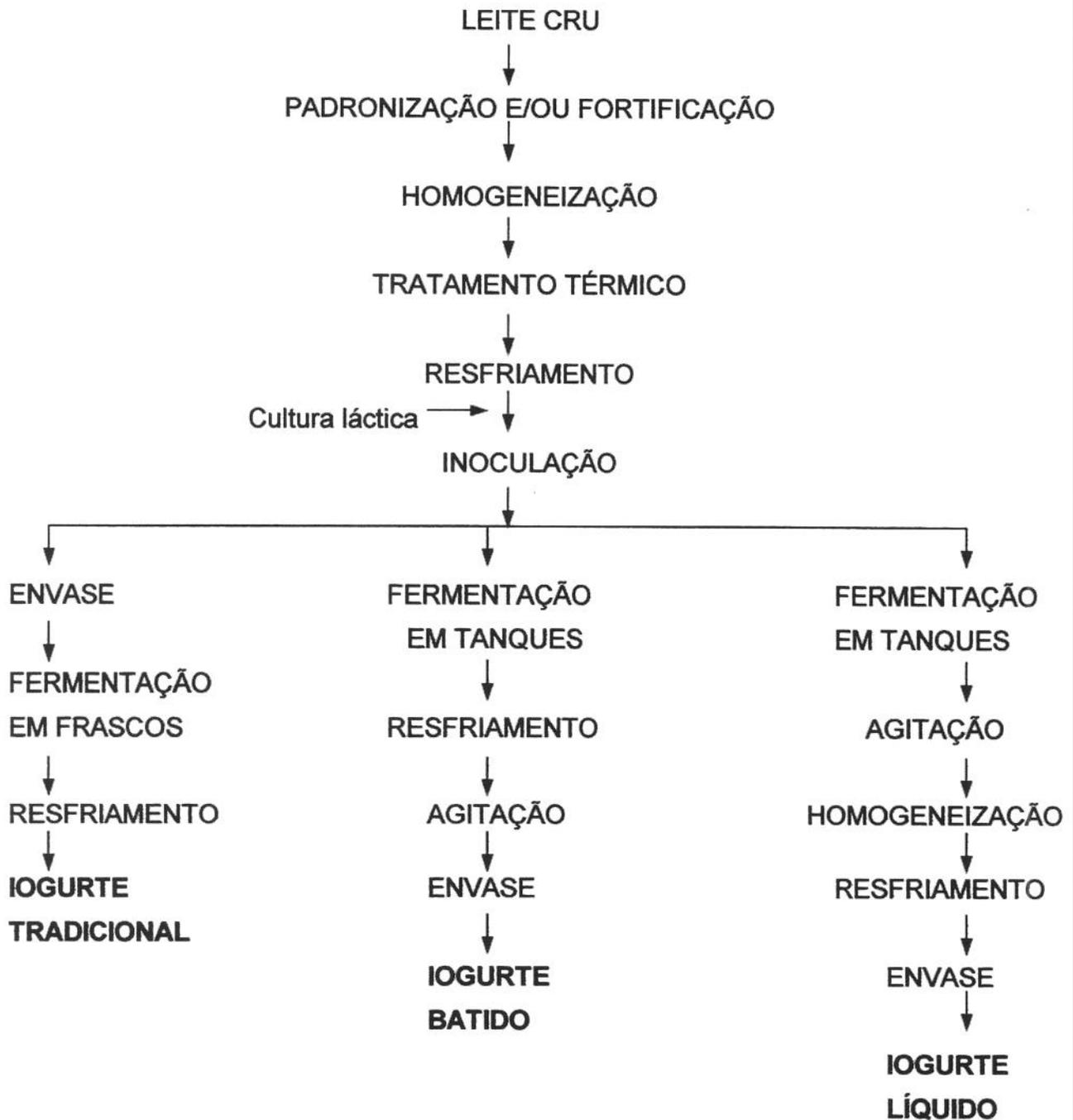


Figura 3.1. Fluxograma geral do processamento de iogurte (TAMIME & DEETH, 1980).

O nível de sólidos totais do leite para a fabricação de iogurte pode variar de 9% no iogurte desnatado a 20% em outros tipos de iogurtes (TAMIME & DEETH, 1980). TAMIME & ROBINSON (1999) estudaram a relação entre o nível de sólidos do leite e a consistência do iogurte quando o teor de sólidos foi elevado através da adição de leite em pó ao leite, de 12% para 14, 16, 18 e 20%, através de medidas de consistência do coágulo com penetrômetro e obtiveram um elevado acréscimo na consistência do iogurte com a elevação do nível de sólidos do leite, principalmente na faixa de 14 a 16%, diminuindo a razão de aumento do mesmo acima de 16% de sólidos totais.

PENNA (1994) estudou a substituição da adição de leite em pó desnatado pelo soro desmineralizado em pó para aumentar o teor de sólidos do leite na fabricação de iogurtes. O soro desmineralizado em pó foi adicionado em concentrações de 0,0, 1,5 e 3,0% e verificou-se que quanto maior a concentração do soro desmineralizado em pó menor foi a consistência do iogurte pois a incorporação de soro de leite para a fabricação de iogurte muda a relação de proteínas do soro/caseína e conseqüentemente requer modificações no processo tecnológico de fabricação de iogurte.

LIMA (2001) avaliou a influência do tipo de sólido (leite em pó desnatado ou concentrado protéico de soro) e do teor de sólidos (11, 13 e 15%) no perfil de textura e susceptibilidade à sinerese do iogurte firme. Os iogurtes adicionados de leite em pó desnatado apresentaram géis significativamente mais firmes que os adicionados de concentrado protéico de soro para o mesmo teor de sólidos. Por outro lado, a sinérese foi significativamente menor nos iogurtes adicionados de concentrado protéico de soro contendo 13% de sólidos totais, diferindo dos demais, os quais apresentaram aumento significativo da sinérese durante a estocagem.

O aumento do nível de sólidos totais resulta um aumento da acidez titulável da mistura e uma redução do tempo de coagulação devido ao efeito tampão das proteínas, fosfatos, citratos, lactatos e outros constituintes do leite (TAMIME & DEETH, 1980).

O teor de gordura do leite afeta favoravelmente a qualidade do iogurte e pode variar conforme o tipo de produto desejado. Nos iogurtes desnatados, o conteúdo de

gordura deve ser menor que 0,5%, para os parcialmente desnatados o conteúdo de gordura deve ser entre 0,5 a 3% e para os integrais deve ser maior que 3% de gordura. A gordura estabiliza a contração do gel protéico, previne a separação do soro no produto final e afeta a percepção sensorial do produto, que apresenta textura mais macia e cremosa com o aumento do teor de gordura (RASIC & KURMAN 1978). THOMOPOULOS; TZIA & MILKAS (1993) observaram que o aumento do conteúdo de gordura do leite causou um leve aumento do conteúdo de acetaldeído e contribuiu para a melhoria do sabor e aroma do iogurte.

Segundo RASIC & KURMAN (1978), leites fermentados com maior teor de proteínas possuem um maior tempo de vida útil que controles produzidos sem aumento do teor de sólidos. Os autores atribuem esses efeitos ao aumento da inibição da degradação da lactose combinado com um aumento da capacidade tamponante.

A homogeneização do leite destinado a fabricação de iogurtes ocorre antes do tratamento térmico e serve para homogeneizar a dispersão dos constituintes da mistura do leite e para aumentar a viscosidade e a estabilidade do coágulo do iogurte. O aumento da viscosidade causada pela homogeneização conduz a uma diminuição da sinérese devido à mudança na capacidade das proteínas em absorver água (TAMIME & ROBINSON, 1999).

Segundo LUCEY & SINGH (1998), durante a homogeneização do leite, a membrana dos glóbulos de gordura é amplamente substituída pela caseína e algumas proteínas do soro, ocasionando interações entre as superfícies das partículas de gordura com a matriz protéica, melhorando a consistência e reduzindo a sinérese do iogurte.

BECKER & PUHAN (1989) relataram que a homogeneização do leite integral conduz à formação de géis mais firmes que aqueles obtidos com leite desnatado, contendo o mesmo teor de proteínas e sólidos não gordurosos. PUHAN (1988) verificou que um aumento da pressão de homogeneização resulta em um aumento da viscosidade em iogurtes integrais. Em contradição, SCHMIDT & BLEDSOE (1995) relataram que não houve diferença significativa na firmeza ou viscosidade aparente dos

iogurtes fabricados a partir de leite parcialmente desnatado (1,5% de gordura) ou integral (3,5% de gordura) mesmo que essas amostras tenham sido produzidas sob pressões diferentes de homogeneização.

O tratamento térmico do leite tem como objetivo principal destruir os microrganismos patogênicos e outros organismos para melhorar a qualidade, inativar enzimas, melhorar a consistência e viscosidade do iogurte e diminuir a sinérese (RASIC & KURMAN, 1978). Durante o tratamento térmico acima de 70°C, as proteínas do soro sofrem desnaturação e algumas delas se associam à micela de caseína, envolvendo a kappa-caseína, através de interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto intermoleculares. Essa desnaturação e associação das proteínas do soro com a caseína auxiliam as ligações cruzadas entre as partículas de caseína na rede do gel do iogurte aumentando sua rigidez (LUCEY, 2002).

KOSIKOWSKI (1978) recomenda o aquecimento do leite a 88°C por 30 minutos ou 95°C por 38 segundos. RASIC & KURMAN (1978) sugerem 85°C por 30 segundos ou 90-95°C por 5-10 minutos. DUAME (1979) recomenda no mínimo 82°C e no máximo 88°C por no mínimo 30 minutos.

DAVIES *et al.* (1978) investigaram por microscopia eletrônica os resultados das mudanças que ocorreram no aquecimento a 95°C/10min. Os autores observaram a formação de apêndices filamentosos nas micelas de caseínas que pareciam ser constituídos de β -lactoglobulina desnaturada. Esses apêndices parecem inibir a coalescência, aumentando a firmeza do coágulo e diminuindo a tendência à sinérese. No entanto, um estudo recente (LUCEY; MUNRO & SINGH, 1998) verificou que o tratamento térmico severo do leite não previne a sinérese no iogurte como é acreditado e que, em alguns casos, o tratamento térmico pode até aumentar a tendência a sinérese.

THOMOPOULOS; TZIA & MILKAS (1993) avaliaram a influência do tratamento térmico do leite (65°C/15minutos e 95°C/5minutos), da temperatura de incubação (42 ou 45°C) e da quantidade de inóculo (1,5 e 2,5%) no tempo de fermentação, nas propriedades físicas e no conteúdo de acetaldeído do iogurte e compararam estes

tratamentos em leites integral e desnatado adicionados ou não de proteínas concentradas do leite e leite em pó desnatado. Entre as condições de processamento estudadas, o tratamento térmico teve um efeito significativo sobre o tempo de fermentação e a viscosidade aparente. Com o tratamento térmico de 95°C/5 minutos, uma temperatura de incubação de 45°C e 2,5% de inóculo os autores obtiveram um produto com consistência firme no menor tempo. O tempo de fermentação necessário para atingir o pH 4,3 foi maior para leite desnatado do que para leite integral, em ambos os casos, adicionados ou não de sólidos.

O resfriamento é uma etapa crítica na produção de iogurte e é realizado logo após o produto ter atingido o grau de acidez desejado na fermentação. O objetivo é a redução da atividade metabólica da cultura, controlando deste modo a acidez do iogurte. Deve ser realizado com cuidado, para evitar danos ao coágulo, pois o resfriamento muito rápido pode provocar a separação de soro no iogurte (RASIC & KURMAN, 1978; TAMIME & DEETH, 1980).

Ao contrário do iogurte tradicional, a estrutura do gel do iogurte batido é quebrada pela agitação e bombeamento durante o resfriamento (BEAL *et al.*, 1999). Os fatores que afetam a viscosidade do iogurte batido são: temperatura de agitação do gel, tempo de duração da agitação e a temperatura e tempo de estocagem do produto final (RASIC & KURMAN, 1978).

A agitação do gel deve ser realizada a baixas temperaturas. Segundo KURMAN (1969) como citado por RASIC & KURMAN (1978), a agitação deve ocorrer preferivelmente a temperaturas menores que 40°C para se obter um coágulo consistente durante seu armazenamento devido ao seu efeito tixotrópico. A agitação feita a altas temperaturas (ex: logo após o término da fermentação) resulta no aparecimento de partículas de coágulo e separação de soro devido a destruição irreversível da estrutura do gel.

3.1.3. Processo de fermentação

Durante o processo de fermentação ocorre a produção de ácido láctico como produto principal e a produção de pequenas quantidades de outros subprodutos que influenciam profundamente nas características organolépticas do iogurte. O acetaldeído é produzido em maiores quantidades seguido por acetona, 2 butanona, diacetil e acetoína. O ácido láctico resultante da fermentação contribui para a desestabilização da micela de caseína, provocando sua coagulação no ponto isoelétrico (pH 4,6-4,7) e conduzindo à formação de um gel, o iogurte. Além disso, a fermentação láctica beneficia o valor nutricional do produto final (RASIC & KURMAN, 1978).

A etapa de fermentação pode ser realizada na própria embalagem de comercialização para a produção do iogurte firme ou em tanques para a produção do iogurte batido. No entanto, independente do tipo de iogurte a ser fabricado, as reações bioquímicas responsáveis pela formação do gel/coágulo são exatamente as mesmas. As únicas diferenças existentes entre o iogurte firme e o batido são as propriedades reológicas do coágulo (TAMIME & ROBINSON, 1999).

3.1.3.1. Tipos de culturas utilizados na fermentação

3.1.3.1.1. Cultura tradicional

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes são *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ambos microrganismos são termofílicos e homofermentativos. O crescimento associado destas duas culturas resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior produção de ácido láctico e um maior desenvolvimento de sabor e aroma no iogurte (RASIC & KURMAN, 1978; TAMIME & DEETH, 1980).

A atividade proteolítica dos bacilos promove a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, especialmente valina, que favorecem o crescimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula o crescimento dos bacilos devido

à produção de ácido fórmico, gás carbônico e a redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (WALSTRA *et al.*, 1999).

A relação ótima entre cocos e bacilos para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto é dependente das propriedades das cepas utilizadas e é de aproximadamente 1:1. Este balanço adequado da cultura é importante para a obtenção de um iogurte com boas características organolépticas relativas ao sabor, aroma e textura (RASIC & KURMAN, 1978; KOSIKOWSKI, 1978; TAMIME & DEETH, 1980; TAMIME & ROBINSON, 1999).

A predominância de qualquer uma das espécies pode acarretar em defeitos para o produto final. Os principais fatores que podem afetar o balanço adequado entre os dois microrganismos são o tempo e a temperatura de incubação e a porcentagem de inóculo. Por exemplo, um tempo menor de incubação resultaria em um produto com maior proporção de cocos e com um sabor fraco. Por outro lado, um tempo maior de incubação ou um resfriamento inadequado favoreceria a predominância de bacilos resultando num produto com sabor amargo (WALSTRA *et al.*, 1999).

Segundo RASIC & KURMAN (1978), a temperatura ótima de crescimento do *S. thermophilus* situa-se entre 40-45°C, atingindo um mínimo a 20°C e um máximo a 50°C. Para o *L. bulgaricus*, a temperatura ótima de crescimento situa-se entre 40-43°C, atingindo um mínimo a 22°C e um máximo a 52,5°C. LUCEY & SINGH (1998) citam que quando ocorre uma associação entre o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* a temperatura ótima de crescimento fica entre 40-45°C e a coagulação pode demorar mais que 4 horas, dependendo da porcentagem de inóculo adicionada. Após o iogurte ter atingido o pH desejável (geralmente pH 4,6), o gel é resfriado a temperatura menor que 10°C. O pH final da maioria dos iogurtes varia entre 4,6-4,0.

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bile e conseqüentemente não sobrevivem a passagem através do trato gastrintestinal, portanto não são consideradas como probióticas. No entanto, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato

gastrintestinal e melhoramento da digestão da lactose devido a presença da enzima β -galactosidase nas células das bactérias tradicionais de iogurte (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

3.1.3.1.2. Cultura probiótica

Em 1910, Metchnikoff foi o primeiro a colocar a idéia de que o consumo regular de leites fermentados oferecia benefícios à saúde. Na mesma época, em 1899, Tissier isolou bifidobactérias a partir das fezes de um recém nascido e verificou que elas eram o componente predominante da flora intestinal de humanos (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). As possíveis propriedades terapêuticas dos iogurtes e seus derivados têm sido um assunto de muita especulação (ARUNACHALAM, 1999).

Segundo o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde da Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002, entende-se por probióticos os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002). Comumente, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium infantis* têm sido usados como probióticos em produtos para humanos (HELLER, 2001).

Recentemente, os iogurtes têm sido reformulados para incluir linhagens vivas de *L. acidophilus* e espécies de *Bifidobacterium* além dos organismos da cultura tradicional de iogurte *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Assim, bio-iogurte é o iogurte que contém microrganismos probióticos vivos que proporcionam o aumento dos efeitos benéficos a saúde do hospedeiro (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

As bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal. O trato digestivo de um recém nascido é rapidamente colonizado por bactérias oriundas da vagina durante o parto. Após 1 mês a microflora no intestino do bebê será ocupada por 80% de bifidobactérias e essa população parece ser relativamente estável até idade adulta, quando começa seu declínio. Sua população é influenciada pela dieta,

antibióticos, estresse e etc. As bifidobactérias são bastonetes, gram-positivas, anaeróbias, possuem formato de Y e requerem nutrientes especiais, o que dificulta o seu isolamento e crescimento em laboratórios. Todas as espécies de bifidus fermentam a lactose e crescem bem em leite. Sua temperatura de crescimento situa-se entre 20°C a 46°C e morrem a 60°C. O pH ótimo é 6,5-7,0 e não há crescimento em pH<5,1 ou pH>8,0 (ARUNACHALAM, 1999).

Para exercerem efeitos probióticos essas bactérias devem ser capazes de aderir à superfície da mucosa intestinal. Os mecanismos empregados na adesão em muitos casos não estão bem definidos mas, sabe-se que estão ligados a produção de proteínas, glicoproteínas e carboidratos especificamente para esse fim ou devido a componentes da própria membrana celular que ajudariam na aderência. Entretanto, bactérias em trânsito pelo intestino também podem exercer efeitos positivos sem a aderência propriamente dita, é o caso das bactérias da cultura tradicional de iogurte, por exemplo, que hidrolisam a lactose presente no produto lácteo e não aderem ao intestino (NAIDU; BIDLACK & CLEMENS, 1999).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa N° 36, de 31 de outubro de 2000, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) um ou mais cultivo(s) láctico(s) específico(s), estes também devem atender a esses requisitos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000). No caso dos probióticos, o produto deve constar a quantidade dos microrganismos viáveis que garanta a ação alegada dentro do prazo de validade do produto (Resolução RDC n° 2, de 7 de janeiro de 2002, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2002).

A sobrevivência e contagem de células viáveis das bactérias probióticas nos leites fermentados varia dependendo da linhagem e de seu fabricante. Para o leite fermentado ser considerado um produto probiótico é necessário que as bactérias probióticas sobrevivam no produto durante sua vida de prateleira (SAXELIN *et al.*, 1999).

Diversos fatores afetam o crescimento e a viabilidade das bactérias probióticas no produto. Entre eles pode-se destacar o aumento da acidez durante armazenamento, a composição, a temperatura de armazenamento, a presença de conservantes, a concentração de oxigênio e a disponibilidade de fatores de crescimento (DAVE & SHAH, 1998).

Do ponto de vista econômico/comercial, não é viável fermentar leite usando apenas organismos probióticos devido ao maior tempo de fermentação requerido para reduzir o pH do leite para 4,6 e também ao sabor desagradável provocado por algumas linhagens de bactérias probióticas. Atualmente, os organismos da cultura tradicional de iogurte (*S. thermophilus* e/ou *L. bulgaricus*) são empregados em combinação com as bactérias probióticas para reduzir o tempo de fermentação e melhorar o sabor, corpo e textura do produto final (DAVE & SHAH, 1997b).

O mecanismo pelo qual a bifidobactéria altera a microflora intestinal ainda não foi claramente determinado, provavelmente está relacionada à produção de ácido acético e láctico que devem restringir o crescimento de patogênicos potentes e bactérias putrefativas. O ácido acético é mais bacteriostático que o ácido láctico no mesmo pH o que deve explicar um melhor efeito da bifidobactéria quando comparado a outras bactérias como as tradicionais de iogurte que produzem somente ácido láctico (ARUNACHALAM, 1999).

3.1.3.1.2.1. Atividades terapêuticas das bifidobactérias

Os principais efeitos benéficos e as aplicações terapêuticas atribuídas as bactérias probióticas estão resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Efeitos benéficos e aplicações terapêuticas das bactérias probióticas em humanos.

Efeitos benéficos
Manutenção das microfloras normais do intestino e aparelhos urogenitais
Alívio da intolerância à lactose
Redução dos níveis de colesterol sérico
Atividade anticarcinogênica
Estimulo do sistema imunológico
Melhora do valor nutricional dos alimentos
Aplicações terapêuticas
Prevenir infecções urogenitais
Aliviar constipação
Proteção contra “diarréias de viagem”
Prevenção de diarréias infantis
Prevenção de diarréias causadas por antibióticos
Prevenção da hipercolesterolemia
Prevenção contra câncer de cólon
Redução dos efeitos da encefalopatia hepática
Auxílio em casos de hipo- e hiperacidez
Prevenção de osteoporose

Fonte: FULLER (1989).

Apesar de inúmeras evidências dos efeitos das bactérias probióticas, segundo SALMINEN *et al.* (1999) é necessário realizar mais pesquisas principalmente em humanos para melhor compreensão da relação entre o consumo do produto probiótico e a população da microflora intestinal. Os autores sugerem que mais métodos devem ser desenvolvidos para caracterizar a microflora intestinal.

Segundo SANDERS (1999), os estudos que documentam o efeito dos probióticos em humanos ainda são limitados, entretanto resultados de vários sistemas

biológicos são intrigantes e o uso comercial de probióticos procede porque essencialmente eles não causam nenhum risco à saúde e muitos benefícios são incontestáveis, como o controle de diarreias e a melhoria na intolerância à lactose.

Segundo ARUNACHALAM (1999), para o produto que contém bifidobactérias exercer suas vantagens benéficas, o indivíduo deve assumir um consumo regular do produto (ao nível de 400-500 g/semana). Além disso, o produto deve conter no mínimo $1,0 \times 10^6$ UFC/g na hora do consumo e a bifidobactéria deve ser de origem humana, pois tem que suportar o trânsito do trato intestinal. Se essas condições são seguidas, existe evidência clínica de que a bactéria vai estimular a população existente de bifidobactéria, atuar em conjunto com a flora nativa e substituir a microflora perturbada.

3.1.4. Pós-acidificação

Durante o armazenamento do iogurte, observam-se alterações na sua qualidade. A atividade metabólica das bactérias lácticas do iogurte é reduzida durante o resfriamento. No entanto, o produto final pode sofrer uma pós-acidificação que é o decréscimo de pH durante o armazenamento refrigerado devido à atividade metabólica persistente da bactéria láctica. A pós-acidificação é mais intensa nos primeiros 7 dias de fabricação do iogurte devido ao consumo de lactose e a produção de ácido láctico e a alta atividade metabólica da bactéria a pH mais elevados (BEAL *et al.* 1999).

A produção de ácido pelo *S. thermophilus* é inibida a pH 3,9-4,3 e pelo *L. bulgaricus* a pH 3,5-3,8. Portanto, os *L. bulgaricus* são os que mais contribuem para a acidificação a valores de pH menores que 4,0. Em valores de pH superiores a 4,0, tanto *S. thermophilus* quanto *L. bulgaricus* contribuem para a pós-acidificação do produto (RASIC & KURMAN, 1978).

A intensidade da pós-acidificação em iogurtes depende da capacidade de acidificação das culturas, da etapa de fermentação nos tanques, do resfriamento, da temperatura de armazenamento e do valor inicial de pH (RASIC & KURMAN, 1978). Uma pós-acidificação intensa pode afetar a viabilidade das bactérias lácticas,

principalmente das bactérias probióticas *Bifidobacterium* ssp. e *L. acidophilus* (SHAH & RAVULA, 2000).

SAXELIN (1999) verificou que não houve pós-acidificação nos iogurtes fermentados apenas com *S. thermophilus* após 14 dias de fabricação. Quando a cultura tradicional de iogurte foi usada, o pH diminuiu de 4,5-4,6 para 4,2-4,3 em 14 dias.

Segundo LOURENS-HATTINGH & VILJOEN (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e aos baixos valores de pH. A pós-acidificação pode ser prevenida através do controle do pH (>5), da aplicação de choque térmico (58°C/5min) no iogurte, da aplicação de boas práticas de fabricação (BPF) e da utilização de culturas que possuam um comportamento reduzido de pós-acidificação como a cultura probiótica composta por *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* sp. e *S. thermophilus*. Além disso, a diminuição da temperatura de armazenamento (<4°C) e o aumento da capacidade tamponante do iogurte obtido através da adição de concentrado protéico de soro também previne a pós-acidificação do iogurte (KAILASAPATHY & RYBKA, 1997). De acordo com DAVE & SHAH (1998) existe uma tendência de utilização de culturas desprovidas de *L. bulgaricus*, que são os que mais contribuem para a pós-acidificação.

KNEIFEL, JAROS & ERHARD (1993) analisaram a produção de iogurte com 44 tipos de culturas disponíveis comercialmente, levando em conta sua população bacteriana e o desenvolvimento de pós-acidificação no produto final. As culturas utilizadas eram probióticas, contendo *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp., além das culturas tradicionais, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Os iogurtes foram armazenados a 6°C/14dias. A pós-acidificação foi acompanhada através de medidas de pH e acidez e a contagem de bactérias foi realizada em meios de cultura propícios para o crescimento de cada tipo de cultura utilizada. Mudanças na contagem de bactérias durante o armazenamento foram dependentes da cultura. Foi observado pelos autores que a população de microrganismos viáveis do iogurte aumentou inicialmente após sua produção e diminuiu durante o armazenamento na maioria dos produtos. Houve uma redução na contagem de bifidobactérias após 2 semanas. A pós-acidificação foi mais

freqüente em iogurtes produzidos com culturas tradicionais onde a acidez aumentou em média de 22,3%, enquanto que para os iogurtes contendo as culturas probióticas esse aumento foi de 14,9% oferecendo a vantagem de uma menor pós-acidificação.

3.2. Ultrafiltração na produção de iogurte

Ultrafiltração (UF) pode ser definida como um processo de separação e concentração por membranas, dirigido por um gradiente de pressão, de substâncias que possuam peso molecular entre $10^3 - 10^6$ daltons. Como resultado do gradiente de pressão aplicado sobre a membrana, o solvente e alguns componentes dissolvidos passam através da membrana e são coletados como permeado ou ultrafiltrado. Dependendo das características da membrana utilizada, outros componentes da solução são retidos pela membrana e então concentrados, denominado de concentrado ou retentado (RENNER & ABD EL-SALAM, 1991).

Na ultrafiltração de leite, a fração protéica e a gordura são retidas, enquanto a lactose, sais minerais, nitrogênio não protéico e outros componentes menores são eliminados junto com a água no permeado (JEPSEN, 1977).

BECKER & PUHAN (1989) utilizaram leite integral concentrado por ultrafiltração a 3,61 e 4,09% de proteína com 5,17 e 5,28% de lactose, respectivamente, para a fabricação de iogurte batido, e estudaram sua pós-acidificação através de medidas de pH após 1 e 14 dias de armazenamento a 4°C. Os autores concluíram que há uma tendência evidente a menor pós-acidificação em iogurtes ultrafiltrados quando comparados ao método de concentração por evaporação e adição de leite em pó desnatado, devido ao maior conteúdo de proteínas que provocaram um efeito tampão no produto.

Como uma extensão do processo de ultrafiltração, a diafiltração (DF) é capaz de modificar as razões de proteína, lactose e sais. Na diafiltração, após a concentração por ultrafiltração, adiciona-se água ao concentrado e prossegue-se com o processo de

ultrafiltração. Desta forma, mais lactose e sais serão eliminados, e a proteína poderá ser concentrada e purificada. A diafiltração é mais eficiente se a adição de água for realizada na mesma taxa com que o permeado foi removido (GLOVER *et al.*, 1978).

A utilização da ultrafiltração do leite para a produção de iogurte proporciona um aumento do teor protéico, sem aumentar o teor de lactose, através da retenção das proteínas do soro, o que permite uma maior absorção de água e a obtenção de um produto mais viscoso (ABRAHAMSEN & HOLMEN, 1980). Os iogurtes fabricados a partir de leite concentrado por ultrafiltração são mais firmes que os fabricados por evaporação ou adição de leite em pó desnatado para o mesmo nível de proteína (LUCEY & SINGH, 1998).

LANKES; OZER & ROBINSON (1998) compararam a textura dos iogurtes firme e batido obtidos por 3 métodos diferentes de fortificação do leite até atingir 16% de sólidos totais: adição de leite em pó desnatado, concentração por ultrafiltração e concentração por evaporação. A fermentação foi realizada por cultura tradicional de iogurte até pH 4,3. Os iogurtes obtidos pela ultrafiltração apresentaram maior firmeza (iogurte firme) e viscosidade (iogurte batido) devido ao maior conteúdo de proteína para o mesmo nível de sólidos totais.

Os principais problemas de iogurtes com baixo teor de lactose, obtidos por ultrafiltração/diafiltração, estão relacionados às perdas de sais e vitaminas, que são dependentes do fator de concentração (Fc), do nível da diafiltração e do tipo de membrana utilizada. Em alguns casos, maltodextrina e sais de sódio e potássio têm sido adicionados aos iogurtes para compensar a doçura perdida com a diminuição da lactose e a perda dos sais que permearam através da membrana, respectivamente. Apesar dessas perdas, o consumo de iogurtes com baixo teor de lactose tem crescido nos últimos anos. Isso se deve ao fato do produto atender as necessidades dos indivíduos que apresentam má absorção de lactose ou sintomas de intolerância a lactose (ALVAREZ *et al.*, 1998). Além disso, leites fermentados com teor reduzido de lactose também são indicados para indivíduos imunossuprimidos, como os portadores do vírus HIV (YOLKEN *et al.*, 1991).

KOSIKOWSKI (1979) estudou a produção de iogurte com baixo teor de lactose a partir de concentrados de ultrafiltração de leite desnatado contendo 20% de proteínas, diluídos a 3,5-4,5% de proteína, ajustados a 1,4-2,6% de gordura e 1,1% de lactose. O iogurte obtido apresentou-se com firmeza satisfatória, viscosidade adequada e sem separação de soro a baixo conteúdo de sólidos. Segundo o autor, as propriedades organolépticas desses iogurtes naturais com baixo conteúdo de lactose foram próximas aos iogurtes comerciais, exceto pelo sabor e aroma fracos. A acidez obtida permaneceu entre 0,9 a 1,1% de ácido láctico durante 6 semanas de estocagem a 5°C.

RIBEIRO (1989) avaliou a aplicação da ultrafiltração de leite no processo de fabricação de iogurtes a partir de concentrados de leite integral, leite desnatado e de leite com baixo teor de lactose obtido por diafiltração. Os iogurtes produzidos a partir de leites diafiltrados, com teores de lactose ajustados à faixa de 0,52-2,44% apresentaram uma menor taxa de produção de ácido láctico durante o processo de fermentação, a qual diminuiu com a diminuição do teor de lactose, e apresentaram nível de acidez praticamente constante durante a estocagem quando o conteúdo de lactose foi de 0,52-0,67%. Os iogurtes produzidos a partir dos leites com conteúdo de lactose ajustado na faixa de 2,0-2,5% apresentaram comportamento semelhante aos leites controles.

ALVAREZ *et al.* (1998) concentraram leite desnatado por ultrafiltração seguido por diafiltração, obtendo leites concentrados com razões de proteína/lactose entre 1,7 e 9,5. Os iogurtes que apresentaram características organolépticas aceitáveis foram os leites concentrados com razões de 3,53 (6,5% proteína e 1,9% lactose) e 5,57 (7,8% proteína e 1,4% lactose) apesar deste último ter apresentado um aroma fraco. O iogurte obtido pela razão de 9,5 (7,6% proteína e 0,8% lactose) apresentou uma baixa acidez e por isso não houve a formação de um coágulo após 3 horas de fermentação.

O baixo desenvolvimento de aroma é também um defeito que pode ocorrer em iogurtes com baixo teor de lactose. A lactose e alguns aminoácidos (treonina e metionina) são os nutrientes mais importantes exigidos pelos microrganismos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* na produção de acetaldeído, que é considerado um dos principais componentes responsável pelo aroma em produtos fermentados (LEES & JAGO, 1976).

3.2.1. Deficiência de lactase

Lactases são enzimas intestinais que possuem um importante papel na digestão da lactose. Elas catalisam a hidrólise do dissacarídeo lactose em seus monossacarídeos glicose e galactose antes de sua absorção. O interesse de sua atividade em pessoas com doenças intestinais tem aumentado nos últimos anos (LIM *et al.*, 1995).

A deficiência de lactase significa que a concentração da enzima β -galactosidase, que é responsável pela quebra da lactose, é muito pequena na mucosa do intestino delgado. Como resultado, a lactose não é quebrada e o aumento de sua concentração dentro do intestino conduz a um aumento da pressão osmótica causando sintomas como pressão abdominal, flatulência, cólica e diarreia. A atividade da lactase é maior no recém nascido e diminui durante a infância e adolescência, atingindo baixos índices em adulto (RENNER, 1997). A média mundial de adultos que apresentam algum grau de deficiência de lactase é 70-100%. A porcentagem da população da África que apresenta deficiência de lactase é de 70-90%, do Leste da Ásia é de 90-100%, da América do Sul é de 65-75%, dos brancos da América do Norte é de 15% e dos pretos da América do Norte é de 80% (VRESE, 2001).

É necessário diferenciar a má absorção de lactose da intolerância a lactose. A má absorção da lactose é a incapacidade de digerir quantitativamente uma dose oral de lactose quebrando-a em seus constituintes simples (glicose e galactose) durante sua passagem pelo intestino delgado. O diagnóstico é realizado através de medidas da falha de absorção da lactose pelo intestino. A intolerância a lactose apresenta como resultados sintomas gastrintestinais desconfortáveis como dores abdominais, flatulência, cólica e diarreia (RENNER, 1997). A frequência desses sintomas depende primeiramente da quantidade de lactose ingerida, da sensibilidade do indivíduo, do tempo do trânsito gastrintestinal e da microflora contida no intestino grosso (VRESE, 2001).

O mecanismo pelo qual a lactose não digerida ou não absorvida causa os sintomas de intolerância à lactose ainda não está claro. A secreção de água no

intestino delgado, a dilatação e trânsito acelerado através do intestino delgado, a desordem dos movimentos peristálticos e a absorção de água no cólon causada por produtos fermentados da lactose devem ser a causa da diarreia. Flatulência e inchaço são provavelmente conseqüências da produção de ácidos, hidrogênio, dióxido de carbono e CH_4 a partir da fermentação da lactose (VRESE, 2001).

A má absorção da lactose é geralmente encontrada em adultos na fase final de crescimento. Existem diferenças consideráveis entre os vários grupos étnicos. A habilidade em manter a alta atividade da lactase durante toda a vida parece ser resultado de uma mutação que ocorreu há muitos anos atrás. A deficiência em lactase é geneticamente determinada. Apenas alguns mamíferos continuam a produzir lactase após a infância e durante a vida adulta, diferente dos humanos (RENNER, 1997).

O teste mais comum utilizado para medir a digestão da lactose é através da concentração de hidrogênio eliminado pela respiração. Este teste é baseado no fato de que a lactose que não é absorvida pelo intestino delgado (devido à deficiência de lactase), atinge o cólon onde há produção de gás hidrogênio como um dos produtos da fermentação bacteriana. O hidrogênio é parcialmente absorvido pela corrente sanguínea e eliminado pela respiração. No teste do hidrogênio eliminado pela respiração a concentração de hidrogênio eliminada no ar é determinada em intervalos fixos (RENNER, 1997).

Outra técnica utilizada para determinar a atividade dessa enzima é medir a quantidade de lactose excretada pela urina após ingestão conjunta com uma referência não hidrolisada que é a lactulose. A lactulose não é hidrolisada no intestino delgado e sua presença numa amostra de urina representa a permeação intacta do dissacarídeo através da mucosa do intestino delgado. Similarmente, a excreção urinária de dissacarídeos hidrolisáveis como a lactose também reflete a permeabilidade intestinal, portanto, a quantidade recuperada na urina será inversamente relacionada com a eficiência da hidrólise no intestino delgado. Assim, uma baixa razão lactose/lactulose na urina indica uma hidrólise eficiente da lactose (alta atividade da lactase). Uma baixa atividade da lactase conduz a um aumento da concentração de lactose em relação a

lactulose correspondendo assim, a um aumento na taxa de excreção urinária da razão lactose/lactulose (LIM *et al.*, 1995).

Quando se discute a dieta necessária para aliviar a má digestão da lactose deve-se enfatizar que absolutamente não é necessário excluir a lactose da dieta já que muitos indivíduos com má absorção primária de lactose podem consumir quantidades significantes de leite sem desenvolver sintomas da intolerância. A eliminação total do leite e produtos lácteos da dieta desses indivíduos pode comprometer sua situação nutricional. Em torno de 250 ml de leite por dia podem ser ingeridos sem ter nenhuma reação contrária. Se necessário, o leite pode ser consumido em várias porções pequenas durante todo o dia (RENNER, 1997). Pessoas com intolerância a lactose também podem ingerir uma certa quantidade de lactose sem apresentar sintomas adversos. VESA; KORPELA & SAHI (1996) concluíram que a maioria tolera a ingestão de 0,5-7,0 gramas de lactose sem apresentar os sintomas de intolerância.

Leite com baixo teor de lactose pode ser obtido através da hidrólise da lactose ou por ultrafiltração e sua remoção completa não é necessária para ser consumido por indivíduos com intolerância a lactose. BRAND MILLER & MUNRO (1992) verificaram que a redução de 50% do teor de lactose do leite foi adequada para aliviar os sinais e sintomas de intolerância a lactose na maioria dos adultos.

LYBECK SORENSEN *et al.* (1983) reduziram o teor de lactose do leite desnatado em 86% por ultrafiltração. A tolerância desse leite foi comparado com o leite desnatado regular em adultos latino-americanos com má absorção de lactose. A ingestão de 500 ml de leite reduzido de lactose diminuiu significativamente os sintomas gastrintestinais quando comparado ao leite desnatado regular.

Uma melhor digestão da lactose foi observada em pessoas com má absorção de lactose quando estas consumiram leites fermentados, como iogurte, em vez de leite ou iogurte pasteurizado (VRESE, 2001). KOLARS *et al.* (1984) realizaram medidas através do teste de hidrogênio eliminado pela respiração para determinar se indivíduos com deficiência em lactase absorvem melhor a lactose em iogurtes do que em leite. A ingestão de 18 gramas de lactose contida no iogurte eliminou menos de um terço de

hidrogênio do que a mesma quantidade ingerida de lactose contida no leite ou em solução aquosa indicando assim, uma melhor absorção da lactose em iogurtes. A ingestão de iogurtes também resultou em poucas ocorrências de diarreia e flatulência quando comparado com a mesma quantidade ingerida de lactose em leite ou solução aquosa. Além disso, os autores nomearam o iogurte como uma “fonte autodigerível” tornando-o um produto bem tolerado por pessoas com deficiência em lactase e justificando seu elevado consumo mundial por essa população.

Uma explicação geral para isto é que a enzima responsável pela hidrólise da lactose (β -galactosidase) contida nas células das bactérias lácticas do iogurte substitui a escassez de β -galactosidase na mucosa do intestino delgado em indivíduos intolerantes a lactose (BURTON & TANNOCK, 1997). As bactérias probióticas melhoram a digestão da lactose num menor grau que as culturas tradicionais de iogurte. A falta de uma relação entre a má digestão da lactose com a incidência dos sintomas da intolerância indicam que a bactéria probiótica atua através da prevenção dos sintomas causados pela intolerância no intestino grosso e/ou melhora a digestão da lactose no intestino delgado (VRESE, 2001).

Segundo ARUNACHALAM (1999), o iogurte é uma excelente alternativa para o tratamento de intolerância a lactose e bilhões de pessoas em todo mundo, que não digerem lactose, podem se beneficiar com o consumo desse simples alimento tradicional.

A infecção por HIV (Human Immunodeficiency Virus) resulta em uma disfunção dos órgãos do sistema imunológico que contribui para o estado da doença. Um desses órgãos é o trato gastrointestinal. Diarreia crônica e aguda, perda de peso, dores abdominais e outros sintomas gastrointestinais tem sido detectados em indivíduos com HIV (YOLKEN *et al.*, 1991). A frequência e gravidade desses sintomas gastrointestinais aumentam com a progressão da doença (TAYLOR *et al.*, 2000).

LIM *et al.* (1995) investigaram a relação entre o avanço da doença do HIV e mudanças na atividade da lactase. O estudo mostrou que existe uma relação significativa ($p < 0,05$) entre o decréscimo da atividade da lactase e o avanço da doença

do HIV pelos estágios clínicos. Os autores afirmam que ainda não está claro como o HIV afeta essa atividade. Uma possibilidade é o decréscimo da área superficial do intestino e assim a disponibilidade da lactase total no intestino. YOLKEN *et al.* (1991) e MILLER *et al.* (1991) também demonstraram o decréscimo da atividade da lactase associado com a intolerância a lactose em pacientes com AIDS, principalmente aqueles com diarreia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matéria-prima

Leite integral pasteurizado e homogeneizado Tipo B, obtido na Cooperativa dos Produtores de Leite de Campinas (CLC), em Jaguariúna-SP.

4.1.2. Culturas Lácteas

Foram utilizadas as seguintes culturas lácteas comerciais (Chr. Hansen):

- Cultura Tradicional: cultura tradicional para iogurte composta de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*;
- Cultura Probiótica: cultura probiótica para iogurte composta de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* Bb-12.

4.1.3. Equipamento

Unidade Piloto de Ultrafiltração, dotado de duas membranas minerais com “cut-off” de 20.000 Daltons , marca CARBOSEP.

4.2. Métodos

Foram realizados três experimentos de concentração de leite integral por ultrafiltração ($F_c = 1,25$), seguida por diafiltração para a redução do teor de lactose do leite e posterior fabricação de iogurtes.

Os iogurtes foram produzidos a partir do concentrado da ultrafiltração e do leite com baixo teor de lactose, inoculados com culturas tradicionais ou probióticas, totalizando 4 amostras/experimento.

4.2.1. Recepção do leite

O latão de leite integral pasteurizado e homogeneizado, procedente da CLC, quando de sua chegada, no dia do processo, foi misturado com agitador de aço inox de placa perfurada e filtrado com filtro de tela de nylon. Após a retirada de uma amostra, o leite pasteurizado foi pesado na planta piloto do Laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA).

4.2.2. Ultrafiltração (UF) e Diafiltração (DF) do leite para obtenção das matérias-primas (MP) para fabricação dos iogurtes.

O leite integral pasteurizado foi aquecido a 55°C e concentrado por ultrafiltração, sob pressões de entrada de $2,4 \text{ Kgf/cm}^2$ e saída de $1,9 \text{ Kgf/cm}^2$, até atingir o fator de concentração (F_c) de 1,25. O grau de concentração foi determinado através do peso do permeado retirado em função do peso inicial de leite. Quando se atingiu o grau de concentração desejado ($F_c 1,25$) parte do concentrado foi retirado do tanque de alimentação, caracterizando a amostra de leite controle, que foi denominada de matéria-prima 1 (MP1).

Para obtenção de leite com baixo teor de lactose, após a retirada da MP1, adicionou-se água deionizada a 55°C e conduziu-se a diafiltração para obtenção da matéria-prima com teor de lactose reduzido ($\sim 1,7\%$ de lactose). Quando o mesmo peso

de água adicionado foi retirado como permeado, o sistema de ultrafiltração foi rapidamente desligado e coletou-se a amostra de leite com teor reduzido de lactose, denominada de matéria-prima 2 (MP2).

4.2.3. Limpeza do sistema de ultrafiltração

A limpeza da membrana de ultrafiltração foi realizada no dia anterior e após o processamento com leite, seguindo as seguintes etapas:

- Enxágüe com água deionizada à temperatura ambiente;
- Circulação de solução de hidróxido de sódio 1% por 30 minutos a 80°C;
- Enxágüe do equipamento com água deionizada à temperatura ambiente até obtenção de pH neutro;
- Circulação de solução de ácido nítrico 1% por 30 minutos a 50°C;
- Enxágüe do equipamento com água deionizada à temperatura ambiente até obtenção de pH neutro;
- Medida do fluxo de permeado com água deionizada a 55°C;
- Circulação de solução de hipoclorito de sódio 200 ppm durante 15 minutos à temperatura ambiente;
- Circulação de solução de hipoclorito de sódio 20 ppm à temperatura ambiente.

Quando o fluxo de permeado com água deionizada a 55°C não retornou ao valor inicial, a operação de limpeza foi repetida. Quando necessário, efetuou-se a limpeza com solução de 1% de detergente enzimático (P3 Ultrasil 50, ECOLAB).

4.2.4. Cálculos do fator de concentração e da massa de água para diafiltração.

4.2.4.1. Fator de concentração (Fc):

O fator de concentração foi determinado através da redução do peso obtido durante o processo de ultrafiltração, conforme descrito no FIL-IDF (1981):

$$F_c = \frac{\text{Peso inicial} \times F_c \text{ inicial}}{\text{Peso inicial} - \text{Peso permeado}}$$

4.2.4.2. Massa de água para diafiltração:

A determinação do peso de água a ser adicionado foi calculada conforme descrito por ILHA (1992).

$$M_{L+A} = \frac{M_L \times C_L}{C_1} \quad M_A = M_{L+A} - M_L$$

Onde,

- M_{L+A} = Massa de leite e água adicionada para a diafiltração (Kg);
- M_L = Massa de leite integral no sistema de ultrafiltração (Kg);
- C_L = Concentração de lactose inicial no leite integral (g/L);
- C_1 = Concentração de lactose desejada no leite diafiltrado (g/L);
- M_A = Massa de água deionizada a ser adicionada para obter leite diafiltrado (Kg).

4.2.5. Tratamento térmico

Após a ultrafiltração (MP1) e diafiltração (MP2), as matérias-primas obtidas foram aquecidas a 95°C/5 minutos, resfriadas a 4°C e estocadas em câmara fria a ~ 4°C até o dia seguinte, quando foram utilizadas para a fabricação dos iogurtes.

4.2.6. Processo de fabricação dos iogurtes

O fluxograma de processamento dos iogurtes utilizado nos experimentos está apresentado na Figura 4.1. Em cada processamento foram fabricados 4 iogurtes diferentes. No dia da fabricação dos iogurtes, as matérias-primas MP1 e MP2 foram retiradas da câmara fria e aquecidas a 45°C. Cada matéria-prima foi dividida em duas partes iguais, onde uma parte foi diretamente inoculada, segundo as técnicas

recomendadas pelo fabricante, com a cultura tradicional e a outra com a cultura probiótica, denominadas de MP1Trad. e MP1Prob., respectivamente, no caso do leite concentrado (MP1) e, MP2Trad. e MP2Prob., respectivamente, no caso do concentrado diafiltrado (MP2). Após a inoculação, as amostras foram homogeneizadas para promover uma perfeita distribuição da cultura láctica.

Em seguida, uma porção de cada mistura foi acondicionada em vários tubos de rosca de 70 ml que foram colocados em banho-maria a 45°C. Foram retiradas amostras a cada 20 minutos para medidas de pH e de acidez titulável para avaliação do tempo de fermentação. A outra porção foi acondicionada em béquer de vidro de 2,0 litros e incubada em estufa a 45°C. O tempo de fermentação dos iogurtes foi considerado o necessário para que o produto atingisse $\text{pH } 4,90 \pm 0,05$.

Após terem atingido $\text{pH } 4,90 \pm 0,05$, os produtos foram retirados da estufa e imediatamente resfriados em banho de gelo até 10°C, batidos em batedeira em velocidade baixa por 10 segundos e acondicionados em copos plásticos que foram fechados com tampas de alumínio termossoldável e armazenados a 4°C.

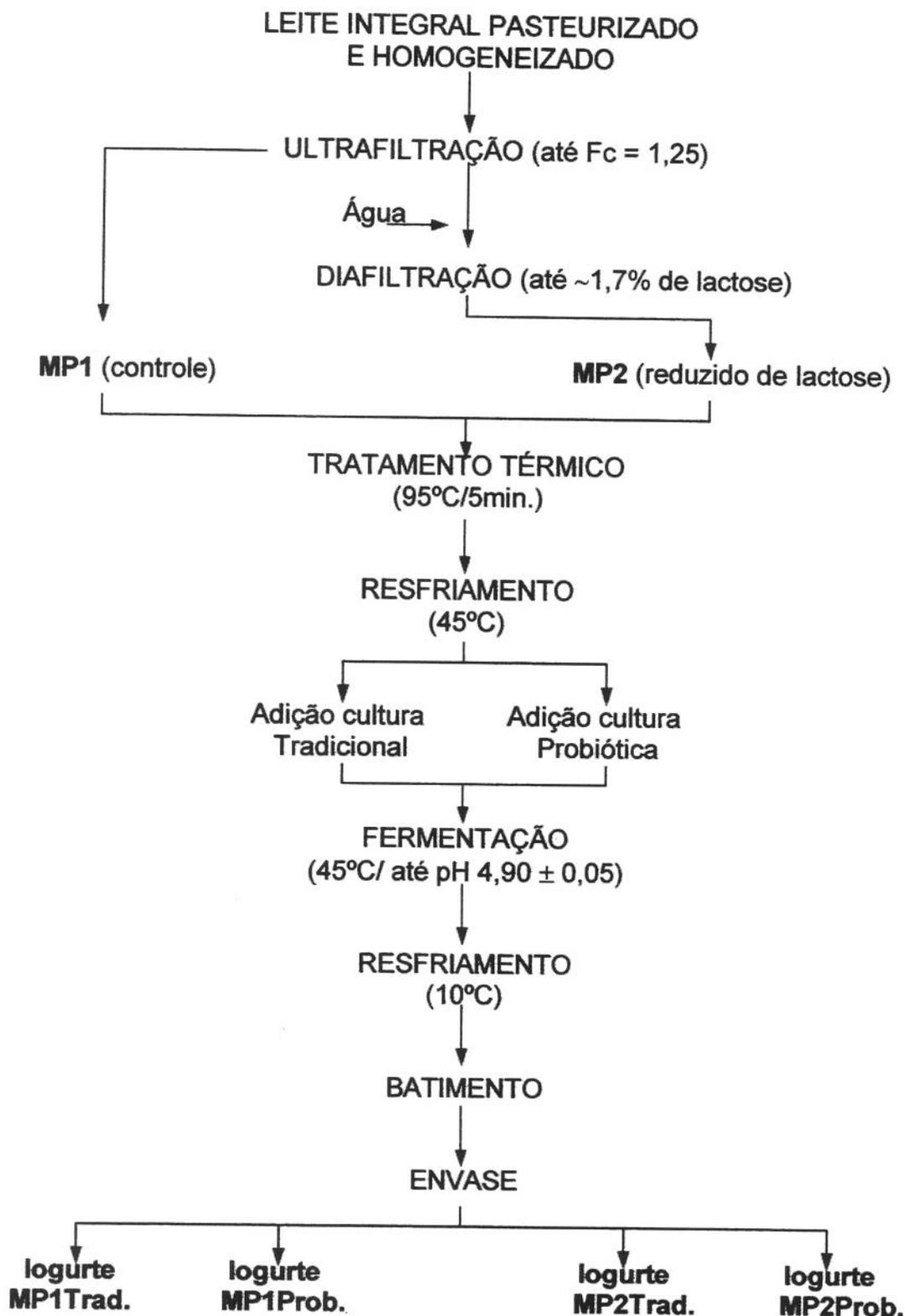


Figura 4.1. Fluxograma do processamento do iogurte.

4.2.7. Análises físico-químicas

4.2.7.1. Leites e permeados

Todas as determinações foram feitas em triplicata. As amostras de leite pasteurizado e homogeneizado, leite ultrafiltrado, concentrado diafiltrado e permeados foram avaliadas quanto a:

- **pH:** foi determinado utilizando-se o potenciômetro Accumet, modelo 15, devidamente calibrado antes de realizar a determinação, introduzindo-se o eletrodo na amostra.
- **Acidez titulável:** foi determinada através da titulação da amostra com NaOH N/9 em presença do indicador fenolftaleína (AOAC, 1995).
- **Gordura:** foi determinada gravimetricamente após extração em frascos de Mojonnier segundo AOAC (1995).
- **Extrato seco total:** foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995).
- **Cinzas:** foi determinada pelo método de incineração em forno mufla a 550°C (AOAC, 1995).
- **Nitrogênio total (NT):** foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1995).
- **Proteína total:** foi calculado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38.
- **Lactose:** foi determinada pelo método de Felhing de acordo com LANARA (1981).

4.2.7.2. Iogurtes

Os iogurtes obtidos foram avaliados no 1º dia após a fabricação, quanto ao pH, acidez, gordura, proteína total, lactose, cinzas e extrato seco total.

O estudo da pós-acidificação dos iogurtes foi realizado em intervalos de 7 dias até o 35° dia de vida de prateleira com análises de pH, acidez, lactose e contagem de bactérias lácticas.

4.2.8. Contagem de bactérias lácticas

As contagens de bactérias lácticas dos iogurtes foram realizadas no 1°, 7°, 14°, 21°, 28° e 35° dia de estocagem. A abertura das embalagens dos iogurtes foi feita no interior de câmaras de fluxo laminar para prevenir qualquer contaminação ambiente da amostra. Uma alíquota de 1 ml de amostra foi transferida para um tubo de rosca contendo 9 ml de solução de água peptonada estéril 0,1%. A partir desta diluição foram feitas as diluições subseqüentes necessárias à análise do produto. Após o tempo de incubação necessário para cada meio de cultura, a contagem só foi realizada nas placas que apresentaram entre 25 e 250 colônias.

4.2.8.1. Contagem de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*

O número total de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foi determinado através da inoculação em superfície, contendo o meio de cultura Agar Lee (LEE, 1974). Após inoculação, as placas foram incubadas invertidas, dentro de jarras contendo gerador de microaerofilia Microaerobac (PROBAC), a 37°C por 48 horas.

A Figura 4.2 apresenta a morfologia das colônias de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* desenvolvidas em meio de cultura Agar Lee, após 48 horas de incubação a 37°C, as quais se diferenciam entre si por meio da cor de cada colônia. *S. thermophilus* apresentou colônia amarela brilhante, enquanto que o *L. bulgaricus* apresentou colônia de coloração creme, a qual está destacada com um círculo em volta.

Quando a contagem de *L. bulgaricus* foi superior a 25 colônias, não foi possível observar a olho nu a diferença de cor existente entre as colônias de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* e portanto, sua contagem foi realizada com o auxílio de um microscópico.

Para melhor visualização da diferença de cor entre as colônias, a foto apresentada na Figura 4.2 possui apenas uma colônia característica de *L. bulgaricus*.

Para a contagem de *S. thermophilus* na cultura probiótica, também foi utilizado o meio de cultura Agar Lee onde, devido à ausência do *L. bulgaricus*, as placas apresentaram somente colônias amarelas brilhantes, características de *S. thermophilus*.

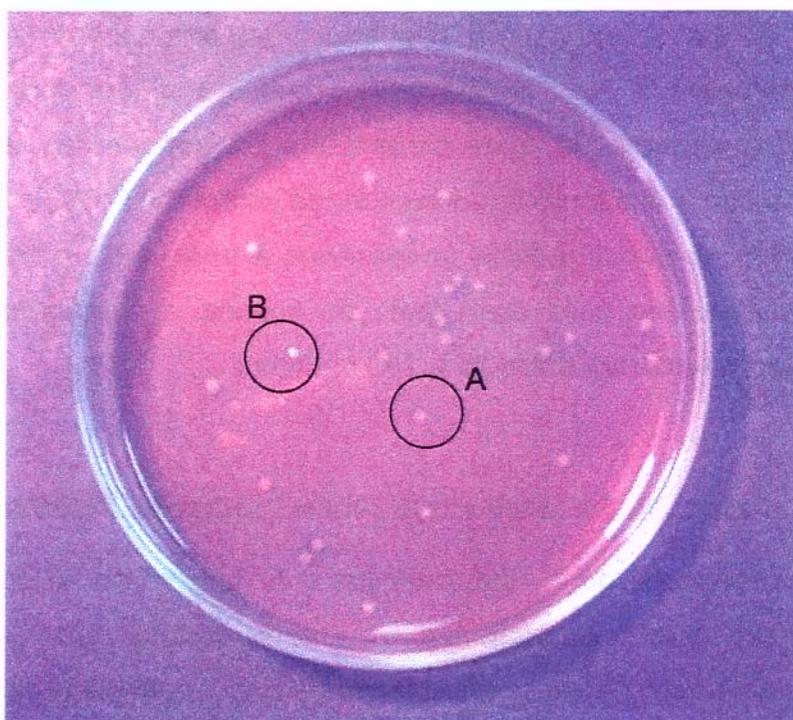


Figura 4.2. Morfologia das colônias de *S. thermophilus* (A) e *L. bulgaricus* (B) desenvolvidas em meio de cultura Agar Lee, após 48 horas de incubação.

4.2.8.2. Contagem de *Lactobacillus acidophilus*

Para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado o meio MRS-maltose, conforme descrito por HULL & ROBERTS (1984), através da inoculação em profundidade. Após inoculação, as placas foram incubadas invertidas, dentro de jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC), a 37°C por 72 horas.

A Figura 4.3 apresenta a morfologia das colônias de *L. acidophilus* após 72 horas de incubação a 37°C no meio de cultura MRS-maltose, a qual foi caracterizada por formar colônias brancas com bordas irregulares.

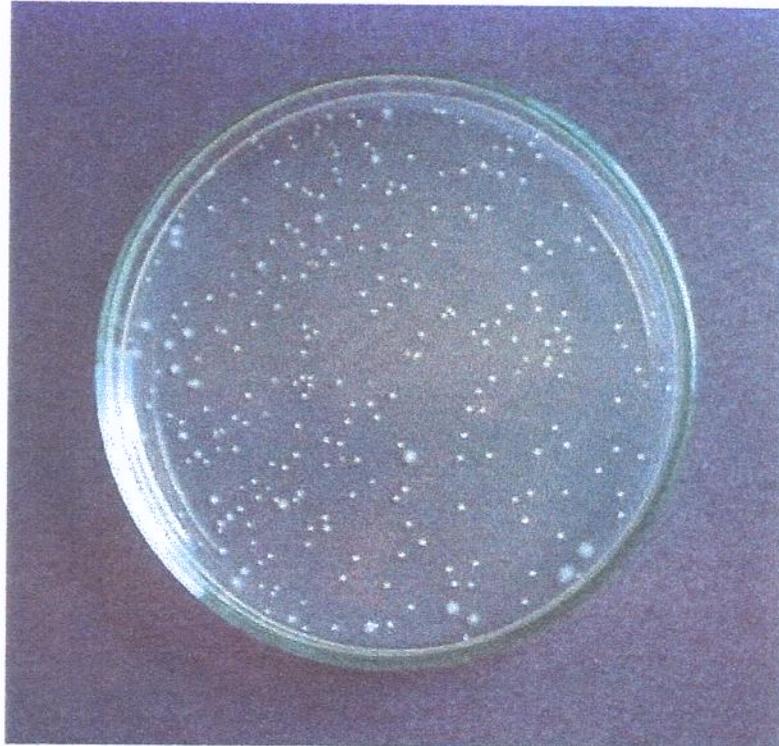


Figura 4.3. Morfologia das colônias de *L. acidophilus* desenvolvidas em meio de cultura MRS-maltose, após 72 horas de incubação.

4.2.8.3. Contagem de *Bifidobacterium lactis*

Para a enumeração de *Bifidobacterium lactis* foi utilizado o meio MRS Agar – deMan, Rogosa e Sharpe (OXOID), suplementado com: 0,5% de uma solução de L-cisteína 10% (SYNTH), 0,5% de uma solução de Dicloxacilina 0,1% (SIGMA), 1% de uma solução de Cloreto de Lítio 10% (VETEC) e 0,01% de Azul de Anilina (NUCLEAR), segundo FÁVARO-TRINDADE (2001). Após a inoculação em profundidade, as placas foram incubadas invertidas, dentro de jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC), a 37°C por 72 horas.

A Figura 4.4 apresenta a morfologia das colônias de *B. lactis* após 72 horas de incubação a 37°C no meio de cultura MRS suplementado, a qual foi caracterizada por formar colônias com centro azul claro e extremidade azul brilhante.



Figura 4.4. Morfologia das colônias de *B. lactis* desenvolvidas meio de cultura MRS suplementado, após 72 horas de incubação.

4.2.9. Análise Sensorial

4.2.9.1. Seleção da equipe

Para a seleção da equipe de julgadores, a cada um dos 12 provadores escolhidos inicialmente, foi solicitado avaliar, em três repetições, amostras de iogurte natural quanto ao atributo acidez. Foram obtidos 3 copos de iogurte natural, de um mesmo lote e mesma marca comercial, e determinou-se sua acidez titulável. Solução de ácido láctico 10% foi adicionado em dois copos de iogurte com o intuito de aumentar a acidez e assim obtermos 3 intensidades diferentes de acidez. Os provadores

avaliaram a intensidade da acidez dos 3 iogurtes em escalas não estruturadas de 9 cm, ancoradas nos extremos com os termos de intensidade “pouco” e “muito”. Os resultados individuais de cada provador foram analisados e foram selecionados 10 julgadores que apresentaram 100% de acerto na habilidade de reconhecer a acidez das amostras apresentadas, atribuindo a maior nota ao produto mais ácido e a menor nota ao produto menos ácido. O modelo de ficha utilizado nesta seleção é mostrado na Figura 4.5.

Nome: _____ Data: _____
 Email: _____ Fone: _____

Por favor, prove as amostras de iogurte natural da esquerda para a direita e avalie na escala apropriada a acidez de cada amostra.

Amostra	Pouco ácido	Muito ácido

Figura 4.5. Ficha sensorial utilizada na seleção da equipe para o atributo acidez e para avaliação da pós-acidificação dos iogurtes obtidos.

4.2.9.2. Avaliação da pós-acidificação

Com base na literatura (BEAL *et al.*, 1999; LIMA, 2001), observa-se que a pós-acidificação de iogurte é mais intensa nos primeiros 14 dias de estocagem refrigerada, e nossos resultados encontram-se de acordo com a literatura. Com isso, o 14° dia de estocagem refrigerada foi escolhido para avaliar a pós-acidificação dos produtos obtidos nos 3 processamentos, onde foi solicitado à equipe treinada, composta por 10 provadores, avaliar a acidez dos iogurtes. A equipe avaliou a intensidade da acidez dos 4 iogurtes em escalas não estruturadas de 9 cm, ancoradas nos extremos com os termos de intensidade “pouco” e “muito”.

As amostras de aproximadamente 25 g de cada iogurte foram servidas a 7°C em copos plásticos de 50 ml codificados com números aleatórios de 3 dígitos. A ordem de apresentação das amostras foi sorteada entre os provadores seguindo delineamento de MACFIE *et al.* (1989) para 4 amostras.

O modelo de ficha utilizado na avaliação sensorial da pós-acidificação dos iogurtes foi o mesmo ao modelo utilizado na seleção da equipe, apresentada na Figura 4.5, porém com uma amostra a mais. Os resultados das avaliações de acidez foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores (amostra e provador) e teste de média Tukey (ao nível de 5% de significância).

4.2.9.3. Teste de Aceitação

Para avaliar a aceitabilidade dos iogurtes produzidos aplicou-se um teste de aceitação com 40 provadores não treinados no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos. Foram avaliados atributos considerados importantes para a aceitação do iogurte natural batido: “consistência” e “acidez” usando-se escala do ideal de 7 pontos, “aceitação global” usando-se escala hedônica de 9 pontos e preferência pela indicação do produto escolhido entre as 4 amostras. O modelo de ficha utilizado para avaliar a aceitabilidade dos produtos é apresentado na Figura 4.6.

As amostras de aproximadamente 25 g, foram servidas a 7°C em copos plásticos de 50 ml, codificados com números aleatórios de 3 dígitos. A ordem de apresentação das amostras foi sorteada entre os provadores seguindo delineamento de MACFIE *et al.* (1989) para 4 amostras. O teste foi realizado em cabines individuais.

Os resultados das avaliações dos atributos foram analisados por histogramas de porcentagem de notas na escala do ideal. Os dados de aceitação global foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) de 2 fatores (amostra e provador) e teste de média Tukey (ao nível de 5% de significância). Para os resultados de preferência, obtidos em %, foram computados o número de vezes em que o produto foi escolhido.

4.2.10. Planejamento Experimental e Análise Estatística

Para o estudo do tempo de fermentação dos iogurtes foi utilizado um design Split-Plot com três replicações, onde a parcela foi o teor de lactose (2 níveis de variação) e a sub parcela foi a adição do tipo de cultura (2 níveis de variação).

Para o estudo da pós-acidificação (pH e acidez) dos iogurtes foi utilizado um design Split-Split-Plot com três replicações, onde a parcela foi o teor de lactose (2 níveis de variação), a sub parcela foi a adição do tipo de cultura (2 níveis de variação) e a sub sub parcela foi o tempo de estocagem (6 níveis de variação).

O estudo da contagem de bactérias lácticas foi realizado separadamente para as culturas tradicional e probiótica através de um design Split-Plot com três replicações, onde a parcela foi o teor de lactose (2 níveis de variação) e a sub parcela foi o tempo de estocagem (6 níveis de variação).

A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar o efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no tempo de fermentação dos produtos, bem como para avaliar o efeito do teor de lactose, tipo de cultura e do tempo de armazenamento sobre as características de pós-acidificação e contagem de bactérias lácticas dos iogurtes obtidos e teste de média Tukey (ao nível de 5% de significância) usando-se o programa SAS®, versão 8e (SAS Institute, Inc., Cary, NC.).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Composição físico-química das matérias-primas

A Tabela 5.1 apresenta a composição físico-química média dos 3 processamentos e desvio padrão do leite pasteurizado utilizado, leite ultrafiltrado, concentrado diafiltrado e permeados da ultrafiltração (UF) e diafiltração (DF).

Tabela 5.1. Características físico-químicas média dos leites, permeados e concentrado diafiltrado.

Análise	Leite Pasteurizado	Leite UF (MP1)	Permeado UF	Concentrado DF (MP2)	Permeado DF
pH	6,70 ± 0,02	6,70 ± 0,00	4,3 ± 0,4	6,93 ± 0,05	5,6 ± 0,2
Acidez*	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,05 ± 0,00
EST (%)	11,1 ± 0,2	12,3 ± 0,3	2,5 ± 0,2	9,8 ± 0,4	2,38 ± 0,05
Gordura (%)	3,24 ± 0,08	3,92 ± 0,09	0,00 ± 0,00	4,10 ± 0,06	0,00 ± 0,01
Proteína (%)	2,8 ± 0,1	3,3 ± 0,2	0,09 ± 0,03	3,3 ± 0,2	0,10 ± 0,02
Cinzas (%)	0,65 ± 0,08	0,68 ± 0,09	0,16 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0,19 ± 0,05
Lactose (%)	4,62 ± 0,09	4,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,73 ± 0,04	2,16 ± 0,06

* % ác. láctico

Observa-se na Tabela 5.1 que o leite pasteurizado utilizado nos 3 processamentos apresentou valores de pH e acidez normalmente encontrados para leite em boas condições de higiene. O leite pasteurizado utilizado nos processamentos foi proveniente de uma mesma Cooperativa e sua composição sofreu poucas variações

entre os 3 processos que foram realizados de novembro/01 a fevereiro/02. Os baixos desvios padrões obtidos das médias da composição físico-química dos componentes do leite ultrafiltrado e concentrado diafiltrado mostram que houve repetibilidade nos 3 processos realizados. Isso garante que não houve variação nas características da matéria-prima que pudessem comprometer a avaliação do efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no tempo de fermentação e na pós-acidificação dos produtos obtidos.

O Fc atingido nos 3 processamentos foi 1,25 e observa-se na Figura 5.1 que a ultrafiltração possibilitou o aumento do conteúdo de proteínas, cinzas, gordura e conseqüentemente de extrato seco total. Por outro lado, verifica-se uma redução de aproximadamente 2,8% do teor de lactose quando comparamos leite pasteurizado com leite ultrafiltrado. Após a diafiltração do concentrado, observa-se a manutenção do teor protéico, um ligeiro aumento do teor de gordura e uma redução do teor de cinzas e lactose, neste caso aproximadamente 62%, que resultou na redução do extrato seco total. O ligeiro aumento do teor de gordura no concentrado diafiltrado também foi observado por RIBEIRO (1989) que atribuiu este fato a uma dispersão incompleta da gordura quando da adição de água ao concentrado durante o processo de ultrafiltração.

Com a utilização da UF obteve-se uma matéria-prima (MP1) para fabricação do iogurte com maior teor de sólidos totais que o leite pasteurizado, porém com menor teor de lactose o que é considerado uma vantagem do processo uma vez que o alto teor de lactose proporciona uma maior pós-acidificação (TAMIME & DEETH, 1980). O ligeiro aumento da acidez titulável observada no leite ultrafiltrado (Tabela 5.1) quando comparado ao leite pasteurizado pode ser atribuído ao aumento do teor de proteínas, resultando em aumento do poder tamponante no concentrado, conforme citado por BECKER & PUHAN (1989).

A utilização da DF possibilitou a obtenção de uma matéria-prima (MP2) com o mesmo teor protéico, que é o principal constituinte responsável pela formação do gel do iogurte, porém com teor de lactose reduzido. Além disso, observa-se que após a DF (Tabela 5.1) houve um aumento do pH e uma redução da acidez titulável devido a permeação de uma parte dos ácidos solúveis junto com a lactose e cinzas, conforme citado na literatura por ALVAREZ *et al.* (1998).

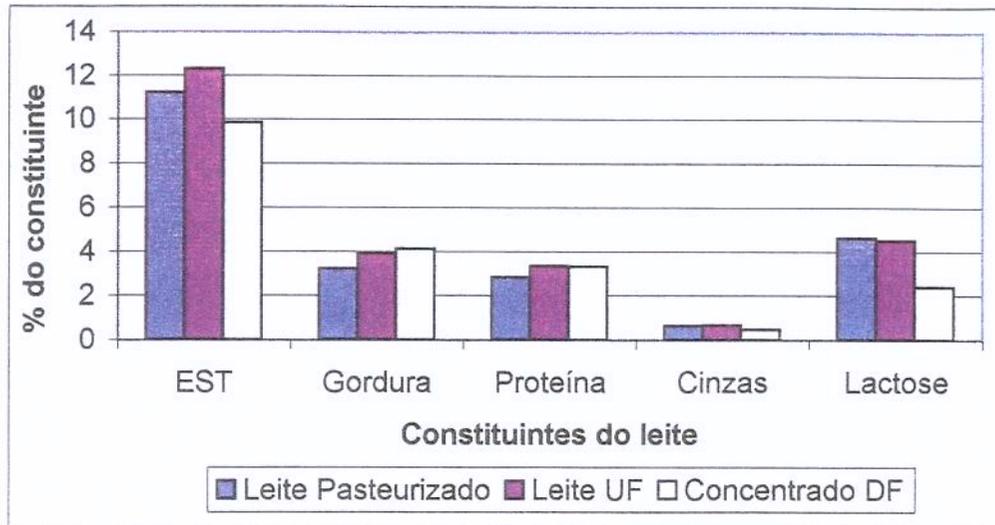


Figura 5.1. Concentração dos constituintes no leite no leite pasteurizado, leite ultrafiltrado e concentrado diafiltrado.

5.2. Efeito do teor de lactose da matéria-prima e do tipo de cultura no tempo de fermentação.

A Tabela 5.2 apresenta as médias dos 3 processamentos e desvio padrão das características do processo de fermentação dos iogurtes MP1Trad. e MP1Prob. obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose e fabricados com cultura tradicional ou probiótica, respectivamente, e dos iogurtes MP2 Trad. e MP2 Prob. obtidos a partir da matéria-prima com teor de lactose reduzido e fabricados com cultura tradicional e probiótica, respectivamente. As curvas individuais de desenvolvimento de pH e acidez para cada produto, nos 3 processamentos estão apresentadas no Anexo I.

Observa-se na Tabela 5.2 que os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose (MP2 Trad. e MP2 Prob.) apresentaram uma menor acidez inicial, devido a etapa de diafiltração, conforme discutido no item 5.1, e conseqüentemente uma menor acidez final após o processo de fermentação. Esses resultados concordam com os obtidos por RIBEIRO (1989) e ALVAREZ *et al.* (1998) que obtiveram uma

menor acidez final nos iogurtes produzidos a partir de leite com baixo teor de lactose obtidos por diafiltração.

Tabela 5.2. Característica média do processo de fermentação dos iogurtes obtidos.

Características	MP1Trad.	MP1Prob.	MP2Trad.	MP2Prob.
pH inicial	6,70 ± 0,00	6,70 ± 0,00	6,93 ± 0,05	6,93 ± 0,05
pH final	4,88 ± 0,03	4,90 ± 0,03	4,89 ± 0,03	4,90 ± 0,04
Acidez Inicial (% ac. Láctico)	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Acidez Final (% ac. Láctico)	0,57 ± 0,05	0,55 ± 0,02	0,437 ± 0,005	0,46 ± 0,05

Tabela 5.3. Tempo médio de fermentação dos iogurtes obtidos.

Produto	Tempo médio de fermentação (min)*
MP1 (4,5 ± 0,1% lactose) (Cultura Tradicional + Cultura Probiótica)	206
MP2 (1,73 ± 0,04% lactose) (Cultura Tradicional + Cultura Probiótica)	233
Cultura Tradicional (MP1 + MP2)	280
Cultura Probiótica (MP1 + MP2)	160

* Tempo necessário para o produto atingir pH 4,90 ± 0,05.

O teor de lactose da matéria-prima afetou significativamente ($p=0,0474$) o tempo de fermentação das amostras, o qual é apresentado na Figura 5.2. Observa-se na Tabela 5.3 que, independente do tipo de cultura utilizada, as amostras com maior teor de lactose (MP1= 4,5% ± 0,1) apresentaram menor tempo de fermentação (em média 206 minutos) e as amostras com teor reduzido de lactose (MP2= 1,73% ± 0,04) apresentaram maior tempo de fermentação (em média 233 minutos). O efeito significativo do teor de lactose da matéria-prima sobre o tempo de fermentação se deve

principalmente ao comportamento da cultura tradicional durante a fermentação frente aos 2 teores de lactose, uma vez que a cultura probiótica apresentou o mesmo tempo de fermentação (em média 160 minutos) nos 2 teores de lactose. Esses resultados são diferentes dos obtidos por FERNÁNDEZ-GARCIA; MCGREGOR & TRAYLOR (1998) que observaram que o tempo de fermentação necessário para o produto atingir pH 4,4 foi o mesmo (475 minutos) tanto para o leite controle quanto para o leite 85% de lactose reduzido por hidrólise enzimática.

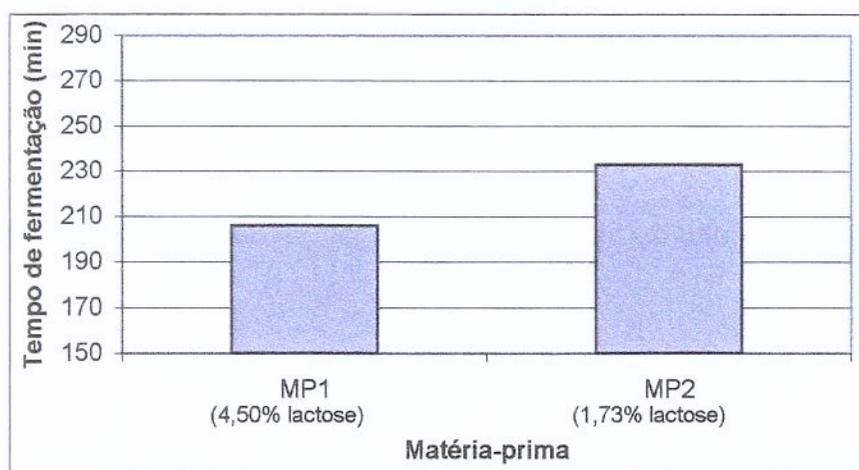


Figura 5.2. Efeito do teor de lactose da matéria-prima no tempo de fermentação dos iogurtes.

O tipo de cultura afetou significativamente ($p=0,0056$) o tempo de fermentação das amostras e a Figura 5.3 apresenta o efeito do tipo de cultura (tradicional ou probiótica) no tempo de fermentação dos iogurtes. A Tabela 5.3 mostra que, independente do teor de lactose da matéria-prima, as amostras inoculadas com cultura tradicional apresentaram maior tempo de fermentação (em média 280 minutos) e as amostras inoculadas com cultura probiótica apresentaram menor tempo de fermentação (em média 160 minutos). SAXELIN *et al.* (1999) também obtiveram um menor tempo de fermentação quando a cultura probiótica foi utilizada comparando com a cultura tradicional. Os iogurtes foram fermentados até pH 4,5 e a cultura probiótica reduziu em 30 minutos o tempo de fermentação. Nos nossos experimentos, quando a cultura

probiótica foi utilizada, a redução do tempo de fermentação foi de 160 minutos (pH 4,90 \pm 0,05), o que corresponde a uma redução de 57% do tempo de fermentação.

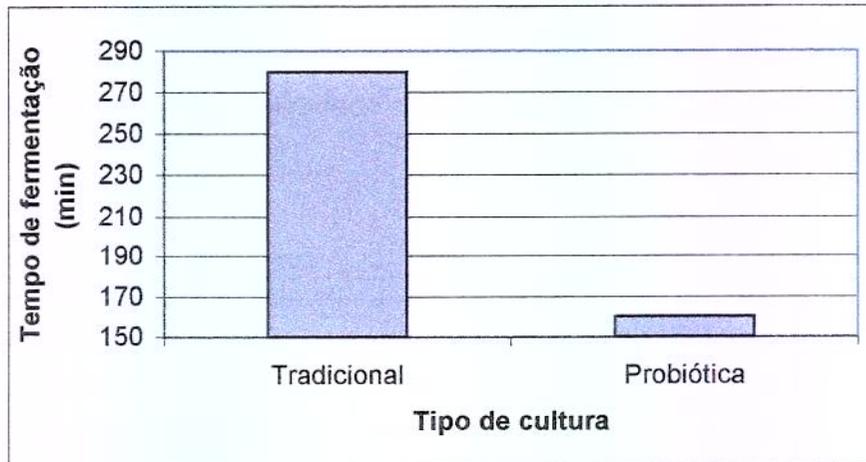


Figura 5.3. Efeito do tipo de cultura no tempo de fermentação dos iogurtes.

5.3. Composição físico-química dos produtos obtidos

A Tabela 5.4 apresenta a composição físico-química média dos 3 processamentos e desvio padrão dos iogurtes obtidos.

Tabela 5.4. Características físico-químicas médias dos iogurtes obtidos.

Análise	MP1 Trad.	MP1 Prob.	MP2 Trad.	MP2 Prob.
PH*	4,50 \pm 0,05	4,57 \pm 0,02	4,62 \pm 0,06	4,66 \pm 0,06
Acidez **	0,73 \pm 0,03	0,69 \pm 0,01	0,53 \pm 0,04	0,52 \pm 0,05
EST (%)	11,6 \pm 0,2	11,6 \pm 0,2	9,2 \pm 0,5	9,2 \pm 0,5
Gordura (%)	3,92 \pm 0,07	3,92 \pm 0,06	4,07 \pm 0,07	4,06 \pm 0,08
Proteína (%)	3,3 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2
Cinzas (%)	0,67 \pm 0,06	0,66 \pm 0,05	0,45 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03
Lactose (%)	3,5 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2	1,31 \pm 0,05	1,31 \pm 0,07

* pH após 24 horas do final da fermentação.

** % de ac. láctico

Ao comparar os valores de pH e acidez apresentados na Tabela 5.2 (obtidos no final da fermentação) e na Tabela 5.4 (obtidos no 1º dia de estocagem dos produtos) verifica-se que houve um decréscimo do pH e aumento da acidez durante o resfriamento devido contínua produção de ácido pelas bactérias lácticas.

Observou-se ainda que praticamente não houve nenhuma diferença na composição dos iogurtes fabricados com cultura tradicional e cultura probiótica obtidos a partir da mesma matéria-prima (MP1 e MP2). Entretanto, a acidez dos iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose (MP2 Trad. e MP2 Prob.) foi ligeiramente menor do que a permitida pela legislação. Segundo a Resolução GMC 47/97, aprovado no Subgrupo 3 do Mercosul, o iogurte deve apresentar uma acidez mínima de 0,6 g de ácido láctico/100 g de produto e máxima de 1,5 g de ácido láctico/100 g de produto (NOVA LEGISLAÇÃO..., 1998).

A porcentagem média de lactose consumida durante a fermentação e resfriamento está apresentada na Tabela 5.5. Os dados apresentados foram calculados com base na diferença do teor de lactose da matéria-prima (Tabela 5.1) e do teor de lactose do produto (Tabela 5.4).

Tabela 5.5. Porcentagem média dos 3 processamentos de lactose consumida durante a fermentação e o resfriamento dos produtos.

Produto	Lactose consumida (%)
MP1 Trad.	22 ± 3
MP1 Prob.	21 ± 3
MP2 Trad.	24 ± 2
MP2 Prob.	24 ± 3

Os dados de consumo de lactose apresentados na Tabela 5.5 estão de acordo com a literatura que cita um consumo entre 10 e 30% de lactose durante a fermentação e resfriamento dos iogurtes (GALVÃO; FERNANDES & SAWAMURA, 1995).

5.4. Efeito do teor de lactose da matéria-prima, do tipo de cultura e do tempo de estocagem nas características de pós-acidificação.

A Tabela 5.6 apresenta a média dos 3 processamentos e desvio padrão do desenvolvimento de pH e acidez no produto durante o tempo de estocagem. As curvas médias dos 3 processamentos de pH e acidez no produto durante o tempo de estocagem estão apresentadas no ANEXO II.

Tabela 5.6. pH e acidez média dos 3 processamentos dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem.

Tempo de estocagem (dia)	Análise	MP1 Trad.	MP1 Prob.	MP2 Trad.	MP2 Prob.
1	pH	4,50 ± 0,05	4,57 ± 0,02	4,62 ± 0,06	4,66 ± 0,06
	Acidez *	0,73 ± 0,03	0,69 ± 0,01	0,53 ± 0,04	0,52 ± 0,05
7	pH	4,25 ± 0,05	4,30 ± 0,02	4,28 ± 0,04	4,41 ± 0,07
	Acidez*	0,85 ± 0,04	0,79 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,58 ± 0,03
14	pH	4,14 ± 0,06	4,24 ± 0,04	4,18 ± 0,05	4,4 ± 0,1
	Acidez*	0,89 ± 0,07	0,80 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,59 ± 0,03
21	pH	4,09 ± 0,06	4,19 ± 0,04	4,11 ± 0,05	4,3 ± 0,1
	Acidez*	0,92 ± 0,07	0,83 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,60 ± 0,03
28	pH	4,05 ± 0,06	4,16 ± 0,03	4,07 ± 0,05	4,3 ± 0,1
	Acidez*	0,94 ± 0,06	0,84 ± 0,00	0,77 ± 0,02	0,61 ± 0,03
35	pH	4,05 ± 0,06	4,17 ± 0,04	4,07 ± 0,05	4,3 ± 0,1
	Acidez*	0,95 ± 0,07	0,85 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,61 ± 0,02

* % de ácido láctico

Observa-se na Tabela 5.6 que, independente do teor de lactose da matéria-prima e do tipo de cultura utilizada, os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e

aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, conhecida como pós-acidificação. Isso se deve à persistente atividade metabólica das bactérias lácticas durante a estocagem do produto a 4°C (BEAL *et al.*, 1999).

O tempo de estocagem diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) o pH dos produtos. O tipo de cultura ($p = 0,0016$) e a interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem ($p < 0,0001$) afetaram significativamente os valores de pH dos iogurtes obtidos. Observa-se na Figura 5.4, que apresenta o efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem no pH dos produtos que, independente do teor de lactose da matéria-prima, a cultura tradicional sofreu uma maior queda de pH nos primeiros 14 dias, portanto, uma maior pós-acidificação em comparação com a cultura probiótica. Com base na Tabela 5.6, podemos calcular que quando se utilizou a cultura tradicional houve uma queda de 8,77% no valor do pH, enquanto que para a cultura probiótica essa queda foi de 6,71% após 14 dias de estocagem. Segundo BEAL *et al.* (1999) uma maior queda de pH nos primeiros dias deve-se a alta atividade metabólica das bactérias lácticas em pH mais elevados. Após o 14º dia, as culturas apresentaram quedas semelhantes de pH até o 35º dia de estocagem, sendo de 2,63% para a cultura tradicional e 1,51% para a cultura probiótica. Na última semana de estocagem, todos os iogurtes apresentaram pH constantes.

O teor de lactose da matéria-prima ($p = 0,1122$) e as interações entre o Teor de Lactose da Matéria-Prima*Tempo de Estocagem ($p = 0,7914$) e o Teor de Lactose da Matéria-Prima*Tipo de Cultura ($p = 0,0744$) não afetaram significativamente os valores de pH dos produtos.

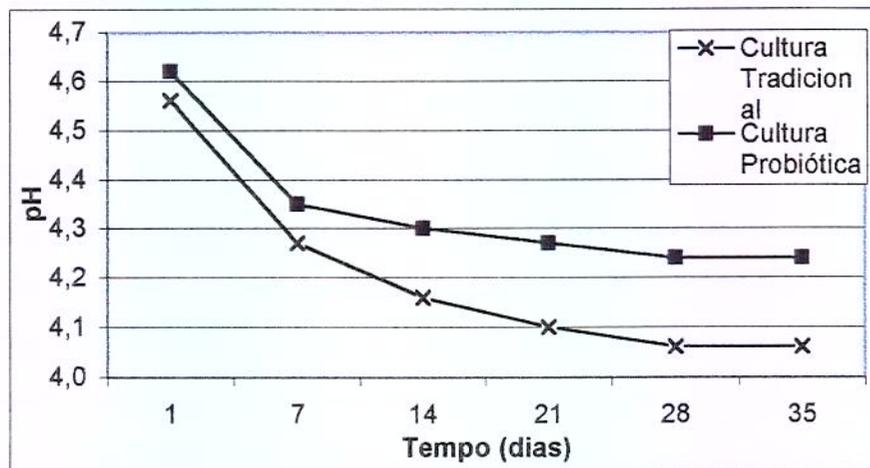


Figura 5.4. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem no pH dos produtos obtidos.

O teor de lactose da matéria-prima afetou significativamente ($p=0,0006$) a acidez dos produtos. Observa-se na Figura 5.5, que apresenta o efeito do teor de lactose da matéria-prima na acidez dos produtos obtidos que, independente do tipo de cultura e do tempo de estocagem, uma menor acidez foi desenvolvida quando o teor de lactose da matéria-prima foi reduzido.

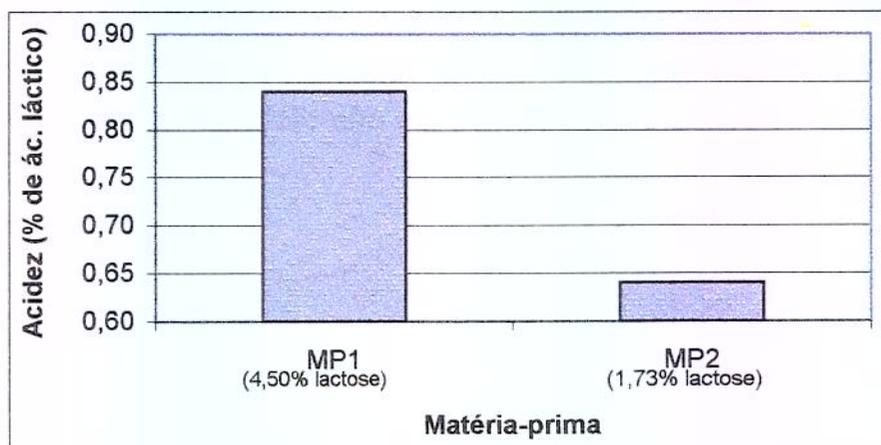


Figura 5.5. Efeito do teor de lactose da matéria-prima na acidez dos produtos obtidos.

O tipo de cultura ($p= 0,0035$), tempo de estocagem ($p< 0,0001$) e a interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de estocagem ($p< 0,0001$) afetaram significativamente a acidez dos iogurtes obtidos. A Figura 5.6 apresenta o efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem na acidez dos produtos obtidos. Em consonância com as curvas de desenvolvimento de pH, os iogurtes tradicionais apresentaram um maior aumento da acidez nos primeiros 14 dias de estocagem. A cultura tradicional apresentou significativamente maior pós-acidificação ao longo da vida de prateleira dos produtos. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por KNEIFEL, JAROS & ERHARD (1993) que observaram, após 14 dias de estocagem, uma maior pós-acidificação nos iogurtes produzidos com cultura tradicional, onde a acidez aumentou em média 22,3%, enquanto que para os iogurtes produzidos com cultura probiótica esse aumento foi de 14,9%. Nos nossos experimentos, após 14 dias, a acidez aumentou em média 27,0% e 14,7% para os iogurtes tradicionais e probióticos, respectivamente. Além disso, do 14° ao 35° dia de estocagem o aumento da acidez foi de aproximadamente 9,1% para a cultura tradicional e 4,8% para a cultura probiótica.

As interações entre o Teor de Lactose da Matéria-Prima*Tipo de Cultura ($p= 0,3432$) e o Teor de Lactose da Matéria-Prima*Tempo de Estocagem ($p= 0,7956$) não afetaram significativamente a acidez dos produtos obtidos

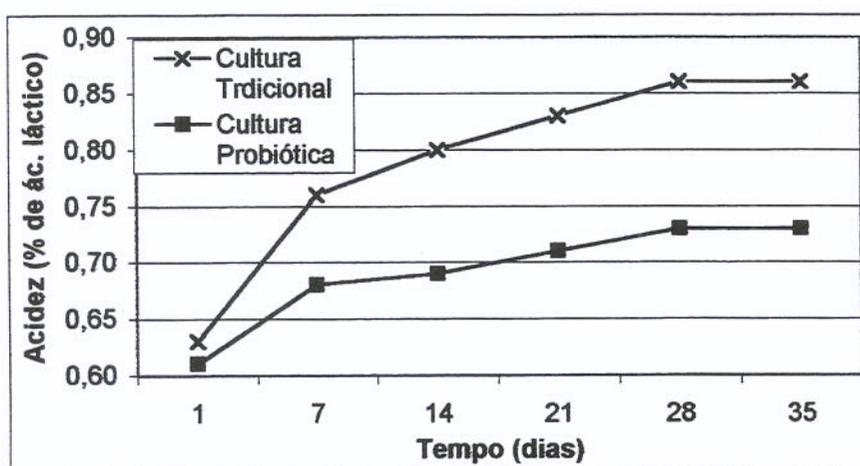


Figura 5.6. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem na acidez dos produtos obtidos.

Paralelamente às determinações das características de pós-acidificação (pH e acidez), os iogurtes também foram analisados quanto ao teor de lactose durante o tempo de estocagem e as médias dos 3 processamentos e desvio padrão estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Porcentagem média do teor de lactose dos 3 processamentos dos produtos obtidos durante o tempo de estocagem.

Tempo de estocagem (dia)	MP1 Trad.	MP1 Prob.	MP2 Trad.	MP2 Prob.
1	3,5 ± 0,2	3,5 ± 0,2	1,31 ± 0,05	1,31 ± 0,07
7	3,3 ± 0,2	3,3 ± 0,3	1,14 ± 0,08	1,25 ± 0,09
14	3,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2	1,10 ± 0,06	1,23 ± 0,08
21	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,3	1,07 ± 0,06	1,21 ± 0,08
28	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,3	1,03 ± 0,07	1,19 ± 0,09
35	3,1 ± 0,2	3,2 ± 0,3	1,02 ± 0,07	1,19 ± 0,09

A interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem diminuiu significativamente ($p < 0,0001$) a porcentagem de lactose dos iogurtes. Observa-se que, independente do teor de lactose na matéria-prima, um maior consumo de lactose foi observado nos iogurtes fabricados com cultura tradicional. A redução da % de lactose nos iogurtes durante os 35 dias de estocagem foi de aproximadamente 17,6% e 9,0% para os iogurtes inoculados com cultura tradicional e probiótica, respectivamente. GALVÃO; FERNANDES & SAWAMURA (1995) avaliaram o teor de lactose em iogurtes comerciais fabricados com cultura tradicional durante 30 dias de estocagem refrigerada e observaram uma redução de aproximadamente 6,0% no teor de lactose, a qual não foi significativa em relação ao tempo de estocagem.

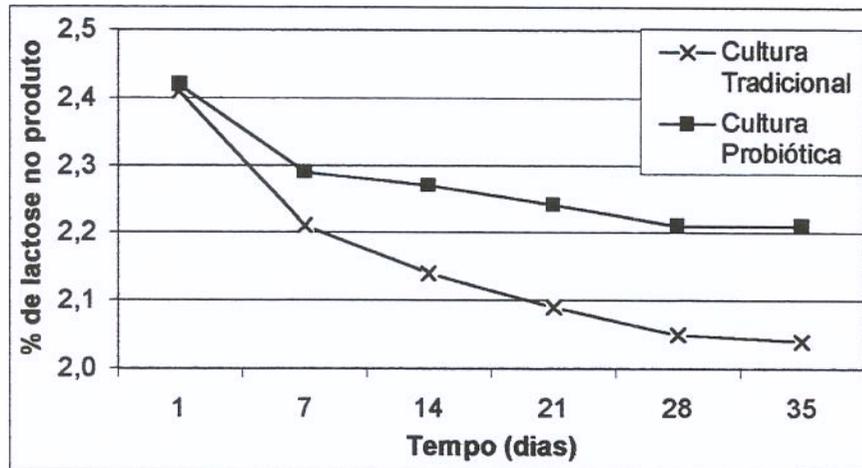


Figura 5.7. Efeito da interação entre o Tipo de Cultura*Tempo de Estocagem na % de lactose do produto.

5.5. Efeito do teor de lactose da matéria-prima e do tempo de estocagem na contagem de bactérias lácticas.

5.5.1. Iogurtes fabricados com cultura tradicional

A Tabela 5.8 apresenta os valores de \log_{10} UFC/g das contagens das bactérias lácticas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* dos iogurtes obtidos a partir das matérias-primas MP1 (4,50% lactose) e MP2 (1,73% lactose) e fabricados com cultura tradicional, durante o tempo de estocagem. As curvas médias da contagem dos 3 processamentos de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* nos produtos obtidos durante o tempo de estocagem estão apresentadas no ANEXO III.

Tabela 5.8. Contagem média dos 3 processamentos do número de células viáveis das bactérias lácticas dos iogurtes fabricados com cultura tradicional durante o tempo de estocagem (\log_{10} UFC/g).

Tempo de Estocagem (dia)	MP1 Trad.		MP2 Trad.	
	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
1	8,86 ± 0,06	7,3 ± 0,2	8,5 ± 0,2	7,3 ± 0,2
7	8,81 ± 0,07	7,2 ± 0,2	8,5 ± 0,3	7,1 ± 0,2
14	8,83 ± 0,00	7,3 ± 0,1	8,6 ± 0,2	7,3 ± 0,1
21	8,86 ± 0,01	7,27 ± 0,04	8,5 ± 0,2	7,21 ± 0,08
28	8,78 ± 0,07	7,2 ± 0,1	8,5 ± 0,1	7,18 ± 0,06
35	8,77 ± 0,06	7,12 ± 0,07	8,4 ± 0,2	7,1 ± 0,1

Observa-se na Tabela 5.8 uma boa manutenção do número de células viáveis das bactérias lácticas compostas pela cultura tradicional de iogurte durante os 35 dias de estocagem. De um modo geral, a contagem do número de células viáveis de *S. thermophilus* foi de aproximadamente 1,5 ciclo logarítmico maior que a contagem do número de células viáveis de *L. bulgaricus*. Segundo LOURENS-HATTINGH & VILJOEN (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e a baixos valores de pH. Portanto, as indústrias fabricantes de culturas lácteas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*.

O teor da lactose da matéria-prima afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* ($p= 0,0356$) porém não afetou a manutenção do número de células viáveis de *L. bulgaricus* ($p= 0,6005$), que, por sua vez, toleram um meio mais ácido. Observa-se na Figura 5.8 que os iogurtes obtidos da matéria-prima com maior teor de lactose (MP1= 4,50% lactose) apresentaram maior

contagem do número de células viáveis de *S. thermophilus* quando comparado ao iogurte obtido da matéria-prima com menor teor de lactose (MP2= 1,73% lactose).

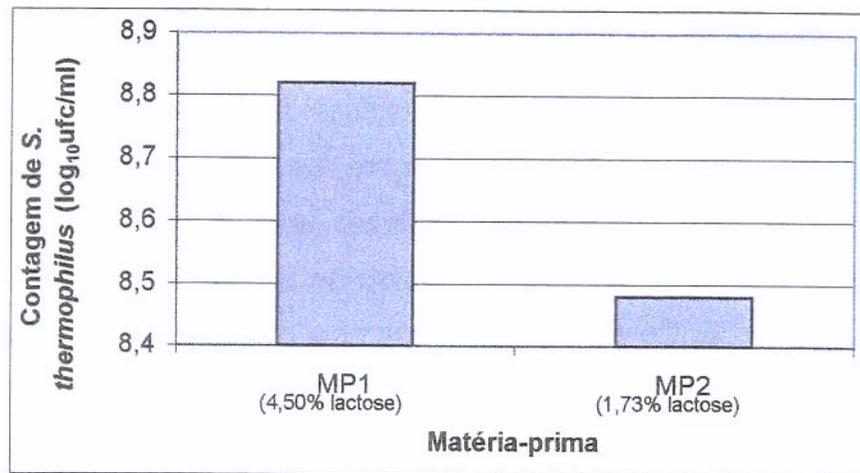


Figura 5.8. Efeito do teor de lactose da matéria-prima na manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes fabricados com cultura tradicional.

O tempo de estocagem afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* ($p= 0,0367$) e *L. bulgaricus* ($p= 0,0056$), o qual diminuiu significativamente ao longo do tempo, conforme observa-se nas Figuras 5.9 e 5.10. Embora estatisticamente significante, a redução na contagem do número de células viáveis de *S. thermophilus* (~0,07 ciclo logarítmico) e *L. bulgaricus* (~0,19 ciclo logarítmico) foi muito pequena, o que provavelmente não se traduz como uma redução importante do ponto de vista tecnológico. A manutenção do número de células viáveis das bactérias lácticas *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* dos iogurtes obtidos com cultura tradicional atende aos critérios exigidos pela legislação que, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa N° 36, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g no produto final durante todo o prazo de validade (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000). Nos nossos experimentos a contagem média do número de células viáveis realizada nos 3 processamentos após 35 dias de

estocagem foi de $4,4 \times 10^8$ UFC/g e $1,3 \times 10^7$ UFC/g para o *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, respectivamente.

FERNANDEZ-GARCIA; MCGREGOR & TRAYLOR (1998) compararam a manutenção do número de células viáveis de *L. bulgaricus* em iogurtes fabricados a partir de leite controle e leite 85% de lactose reduzida por hidrólise enzimática e verificaram que, após 28 dias de estocagem, as contagens dos números de células viáveis nos iogurtes controles apresentaram uma queda de 2 ciclos logarítmicos enquanto que os iogurtes com teor reduzido de lactose apresentaram uma queda de 0,75 ciclo logarítmico. No nosso experimento, a redução na contagem do número de células viáveis de *L. bulgaricus* foi de aproximadamente 0,2 ciclo logarítmico tanto para o iogurte fabricado a partir do leite com teor controle de lactose quanto para o iogurte fabricado a partir do leite com teor reduzido de lactose.

A pequena oscilação, que passa por redução e posterior aumento na manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente) ao longo do tempo de estocagem também foi observada por outros autores (SAXELIN *et al.*, 1999) que atribuíram o efeito devido a quebra da cadeia da bactéria láctica em células isoladas.

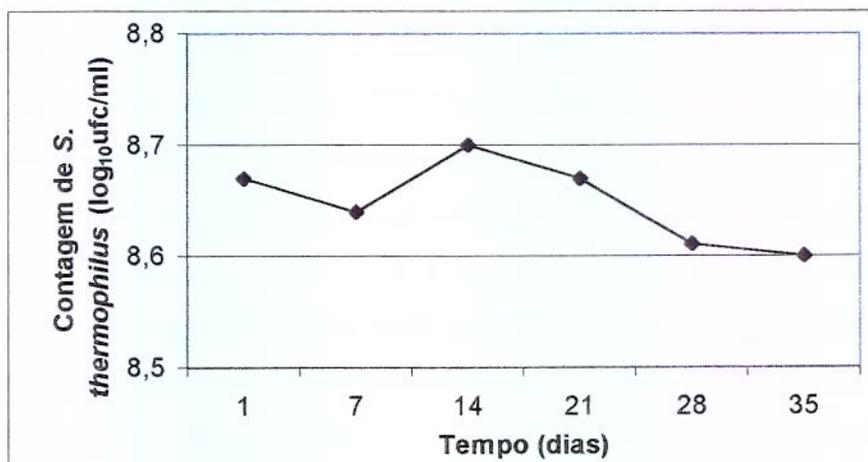


Figura 5.9. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes fabricados com cultura tradicional.

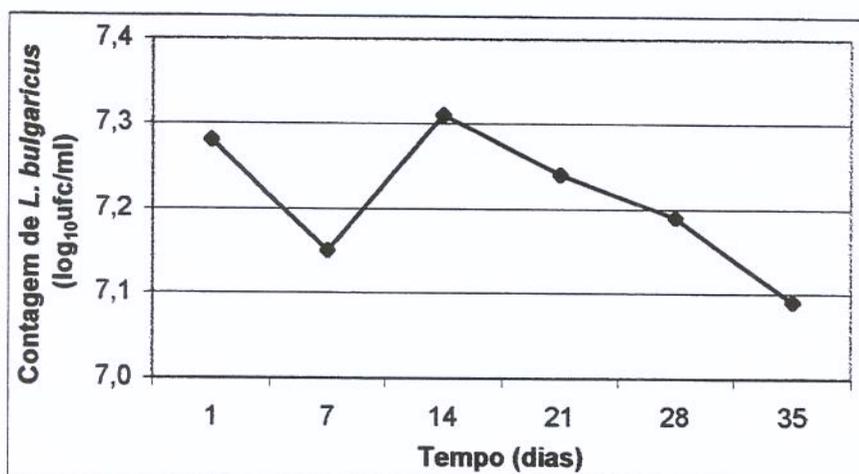


Figura 5.10. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *L. bulgaricus* nos iogurtes tradicionais obtidos.

A interação entre o Teor de Lactose da Matéria-Prima*Tempo de Estocagem não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* ($p= 0,4795$) e *L. bulgaricus* ($p= 0,9932$) nos iogurtes obtidos da fabricação com cultura tradicional.

Os resultados obtidos mostraram que com a redução do teor de lactose da matéria-prima, o número de células viáveis de *S. thermophilus* diminuiu significativamente, porém não diminuiu o número de células viáveis de *L. bulgaricus*. Além disso, apesar do número de células viáveis dos microrganismos da cultura tradicional ter diminuído significativamente durante o tempo de estocagem, as contagens realizadas não foram menores que o permitido (10^6 UFC/g), tanto para o *S. thermophilus* quanto para o *L. bulgaricus*.

5.5.2. Iogurtes fabricados com cultura probiótica

A Tabela 5.9 apresenta os valores de log₁₀ UFC/g das contagens dos números de células viáveis das bactérias lácticas *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. lactis* dos iogurtes probióticos obtidos (MP1 Prob. e MP2 Prob.) durante o tempo de estocagem.

Tabela 5.9. Contagem média dos 3 processamentos do número de células viáveis das bactérias lácticas dos iogurtes fabricados com cultura probiótica durante o tempo de estocagem (\log_{10} UFC/g).

Tempo de estocagem (dia)	MP1 Prob.			MP2 Prob.		
	St*	La**	Bb***	St*	La**	Bb***
1	9,02 ± 0,07	6,3 ± 0,3	7,00 ± 0,2	8,87 ± 0,09	6,1 ± 0,3	6,8 ± 0,2
7	8,96 ± 0,05	6,3 ± 0,2	7,1 ± 0,2	8,74 ± 0,07	6,0 ± 0,2	6,9 ± 0,3
14	9,02 ± 0,09	6,2 ± 0,3	6,8 ± 0,3	8,5 ± 0,1	5,8 ± 0,4	6,7 ± 0,1
21	9,00 ± 0,1	6,1 ± 0,2	6,8 ± 0,5	8,8 ± 0,3	5,7 ± 0,5	6,6 ± 0,3
28	8,9 ± 0,2	6,0 ± 0,4	6,7 ± 0,3	8,8 ± 0,3	5,6 ± 0,6	6,6 ± 0,1
35	8,9 ± 0,2	6,0 ± 0,4	6,6 ± 0,4	8,8 ± 0,1	5,6 ± 0,6	6,6 ± 0,2

* *S. thermophilus*; ** *L. acidophilus*; *** *B. lactis*

Observa-se na Tabela 5.9 uma boa manutenção do número de células viáveis das bactérias probióticas *L. acidophilus* e *B. lactis* durante os 35 dias de estocagem. Observou-se uma redução de aproximadamente 0,4 e 0,3 ciclos logarítmicos para o *L. acidophilus* e *B. lactis*, respectivamente. Mesmo com a pós-acidificação os produtos não atingiram $\text{pH} < 4,0$ (Tabela 5.6), que é considerado ser prejudicial à sobrevivência das bactérias probióticas (SHAH & RAVULA, 2000). A manutenção do número de células viáveis de *B. lactis* foi quase constante e manteve-se dentro do padrão estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa N° 36 que a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) um ou mais cultivo(s) láctico(s) específico(s), estes também devem atender a esses requisitos (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000). Na manutenção do número de células viáveis de *L. acidophilus*, observa-se que apenas para o iogurte obtido a partir da matéria-prima com menor teor de lactose não apresentou contagem superior a 10^6 UFC/g no último dia de estocagem. Também pode-se observar (Tabela 5.9) uma predominância na contagem

do número de células viáveis de *S. thermophilus*, quando comparado com o *L. acidophilus* e *B. lactis*, para os iogurtes fabricados com ambos teores de lactose e cultura probiótica (MP1 Prob. e MP2 Prob.) durante os 35 dias de estocagem. RYBKA & KAILASAPATHY (1995) também observaram uma maior contagem do número de células viáveis de *S. thermophilus* nos iogurtes inoculados com cultura probiótica, a qual variou entre 10^9 - 10^7 UFC/g durante os 36 dias de estocagem. Nos nossos experimentos, a contagem do número de células viáveis de *S. thermophilus* variou entre 10^9 - 10^8 UFC/g.

O tempo de estocagem afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *L. acidophilus* ($p= 0,0011$) e de *B. lactis* ($p< 0,0001$), no entanto não afetou a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* ($p= 0,4292$). Observa-se na Figura 5.11 que a contagem do número de células viáveis de *L. acidophilus* permaneceu entre 2×10^6 e 6×10^5 UFC/g e apresentou uma redução de aproximadamente 0,4 ciclo logarítmico após 35 dias de estocagem. DAVE & SHAH (1997a) obtiveram uma contagem do número de células viáveis de *L. acidophilus*, variando entre $3,9 \times 10^7$ e $1,2 \times 10^6$ UFC/g, apresentando uma maior redução em relação aos nossos experimentos, sendo de aproximadamente 1,5 ciclo logarítmico.

Observa-se na Figura 5.12 que, a despeito do teor de lactose da matéria-prima, a manutenção do número de células viáveis de *B. lactis* variou entre $3,9 \times 10^6$ e $7,6 \times 10^6$ UFC/g e sua redução foi de aproximadamente 0,3 ciclo logarítmico. SAXELIN *et al.* (1999) também observaram uma boa manutenção do número de células viáveis de *B. lactis* durante 14 dias de estocagem refrigerada do iogurte e sua redução não foi maior que 0,5 ciclo logarítmico. No entanto, RYBKA & KAILASAPATHY (1995) observaram uma contagem do número de células viáveis de *Bifidobacterium* ssp. variando entre $1,6 \times 10^7$ e $4,9 \times 10^5$ UFC/g e uma maior redução, sendo de 1,5 ciclo logarítmico.

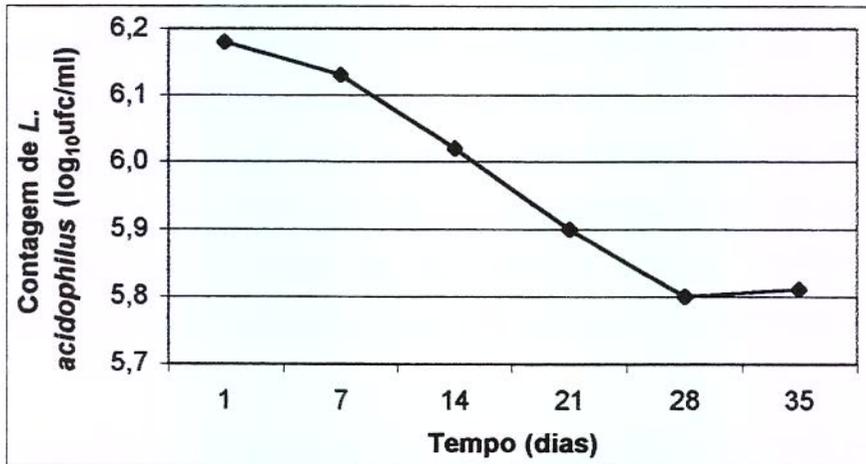


Figura 5.11. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *L. acidophilus* nos iogurtes probióticos obtidos.

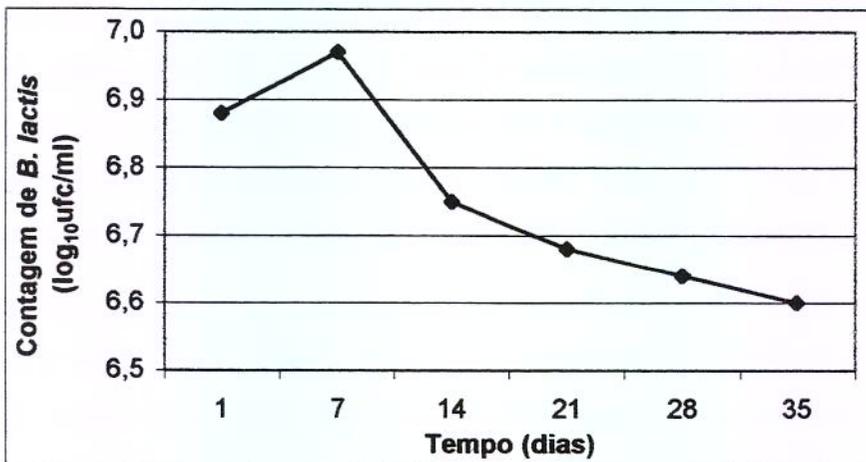


Figura 5.12. Efeito do tempo de estocagem na manutenção do número de células viáveis de *B. lactis* nos iogurtes probióticos obtidos.

O teor de lactose da matéria-prima não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus* ($p= 0,0827$), *L. acidophilus* ($p= 0,2769$) e *B. lactis* ($p= 0,5579$). De forma semelhante, a interação entre o Teor de Lactose da Matéria Prima*Tempo de Estocagem também não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis de *S. thermophilus*. ($p= 0,1281$), *L.*

acidophilus ($p= 0,9145$) e *B. lactis* ($p= 0,7087$) nos iogurtes fabricados com cultura probiótica.

Os resultados obtidos mostraram que o teor de lactose da matéria prima não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis dos microrganismos da cultura probiótica. Além disso, o número de células viáveis dos microrganismos diminuiu significativamente durante o período de estocagem, porém manteve-se dentro do padrão estabelecido pela legislação.

5.6. Análise Sensorial

5.6.1. Avaliação da pós-acidificação

As médias obtidas para a acidez dos iogurtes nos 3 processamentos estão apresentadas na Tabela 5.10 e pode-se observar que os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose e cultura tradicional (MP1 Trad.) apresentaram maior acidez, que diferiu significativamente ($p < 0,05$) da acidez dos demais iogurtes, exceto para o 1º processamento, onde não se observou diferença significativa ($p < 0,05$) na acidez entre os iogurtes obtidos da mesma matéria-prima (MP1), com culturas diferentes. Cabe ainda destacar os baixos valores atribuídos na escala para os produtos obtidos a partir da matéria-prima com teor reduzido de lactose (MP2).

Tabela 5.10. Média dos resultados obtidos na avaliação da acidez dos iogurtes dos 3 processamentos, após 14 dias de estocagem refrigerada (escala de 9 cm).

Produto	1º Processamento	2º Processamento	3º Processamento
	Média*	Média*	Média*
MP1 Trad.	6,35 ^a	6,78 ^a	6,88 ^a
MP1 Prob.	5,33 ^a	5,43 ^b	5,39 ^b
MP2 Trad.	2,98 ^b	3,07 ^c	3,02 ^c
MP2 Prob.	1,05 ^c	1,19 ^d	1,07 ^d

*Os valores com a mesma letra, não diferiram significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância).

Correlacionando a determinação da acidez (% ácido láctico) no 14° dia de estocagem refrigerada com a avaliação sensorial da acidez, observou-se um alto grau de correlação ($R^2 = 0,9482$) entre as análises físico-químicas e sensorial que pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 5.13.

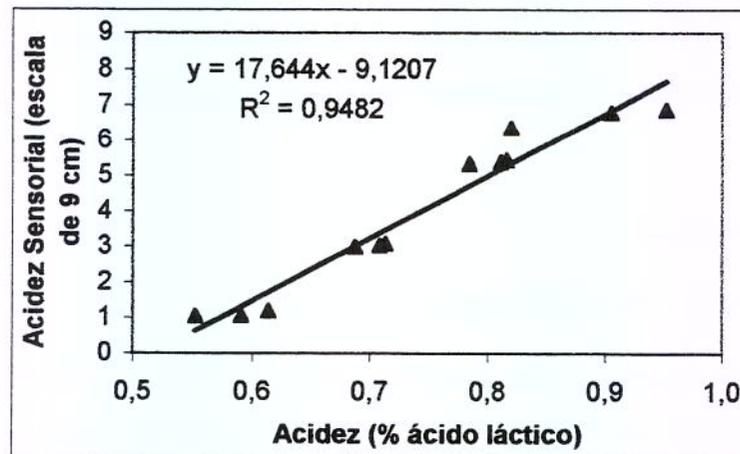
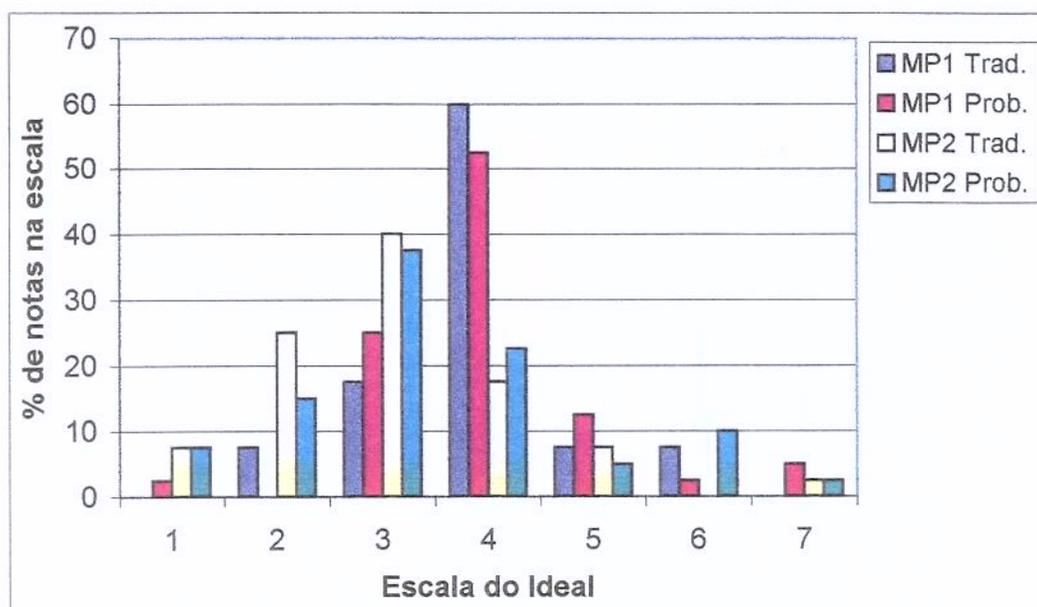


Figura 5.13. Gráfico da correlação obtida entre a análise físico-química (% ácido láctico) e a análise sensorial (escala de 9 cm) dos produtos no 14° dia de estocagem refrigerada.

5.6.2. Avaliação da Aceitabilidade

Dos 40 provadores que realizaram o teste, a frequência de consumo de iogurte natural foi: 15% consomem todos os dias, 37,5% uma vez por semana, 20% a cada 15 dias e 27,5% uma vez por mês.

Os resultados da avaliação dos atributos sensoriais “consistência” e “acidez” dos iogurtes obtidos nos processamentos estão apresentados nas Figuras 5.14 e 5.15.



Figuras 5.14. Frequência de notas na avaliação sensorial para o atributo “consistência” (4- Está do jeito que eu gosto; 1- Muito menos consistente do que eu gosto; 7- Muito mais consistente do que eu gosto).

Pelo histograma apresentado na Figura 5.14 observamos que, com relação ao atributo “consistência”, os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose (MP1 Trad. e MP1 Prob.) apresentaram uma maior porcentagem de notas 4 (está do jeito que eu gosto) na escala do ideal que os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com teor reduzido de lactose (MP2 Trad. e MP2 Prob.), que apresentaram maior frequência de notas menores que 4 na escala do ideal, indicando um produto menos consistente do que o consumidor gosta.

Os resultados sensoriais de consistência dos iogurtes eram esperados em função da % de sólidos totais das matérias-primas. Os iogurtes que apresentaram uma menor consistência do que o consumidor gosta (MP2 Trad. e MP2 Prob.) foram fabricados a partir do leite com teor reduzido de lactose contendo aproximadamente 9,8% de sólidos totais, e os iogurtes com consistência mais preferida foram fabricados a partir do leite com maior teor de lactose contendo aproximadamente 12,3% de sólidos totais.

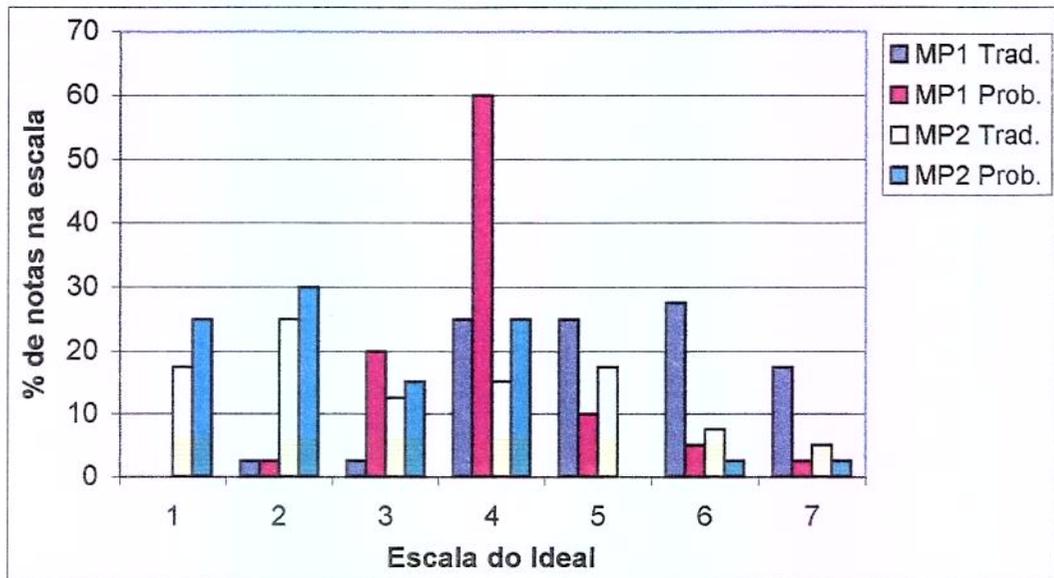


Figura 5.15. Frequência de notas na avaliação sensorial para o atributo “acidez” (4- Está do jeito que eu gosto; 1- Muito menos ácido do que eu gosto; 7- Muito mais ácido do que eu gosto).

Com relação a acidez dos produtos observamos no histograma da Figura 5.15 que o iogurte obtido a partir da matéria-prima com maior teor de lactose e cultura probiótica (0,80% de ácido láctico) recebeu maior porcentagem de notas 4 pelos consumidores, indicando uma preferência do consumidor pela acidez desse produto. O iogurte obtido a partir da matéria-prima com maior teor de lactose e cultura tradicional (0,9% de ácido láctico) mostrou uma tendência do consumidor a achá-lo mais ácido do que gostam.

O iogurte obtido a partir da matéria-prima com menor teor de lactose e cultura tradicional (0,7% de ácido láctico) apresentou uma maior porcentagem de notas tendendo para menos ácido do que o consumidor gosta, sendo o iogurte obtido a partir da matéria-prima com menor teor de lactose e cultura probiótica (0,6% de ácido láctico) considerado o menos ácido pelos consumidores. A menor acidez desenvolvida nos iogurtes fabricados a partir da matéria-prima com menor teor de lactose deve-se a

menor acidez obtida na matéria-prima devido a permeação de uma parte dos ácidos solúveis junto com a lactose e cinzas durante a diafiltração.

A Tabela 5.11 apresenta as médias obtidas para aceitação global dos iogurtes, onde observa-se que o iogurte com maior média de aceitação foi obtido a partir da matéria-prima com maior teor de lactose e cultura probiótica (MP1 Prob.) que diferiu significativamente ($p < 0,05$) de todos os outros iogurtes, os quais não diferiram entre si. A distribuição das notas da avaliação sensorial para aceitação global dos iogurtes utilizando-se escala hedônica de 9 pontos pode ser observada pelo histograma da Figura 5.16.

Tabela 5.11. Média dos resultados obtidos na avaliação da aceitação global dos iogurtes.

Produto	Média*
MP1 Prob.	6,65 ^a
MP1 Trad.	5,33 ^b
MP2 Trad.	4,35 ^{c,b}
MP2 Prob.	4,18 ^{d,b}

*Os valores com a mesma letra, não diferiram significativamente entre si (Teste de Tukey ao nível de 5% de significância).

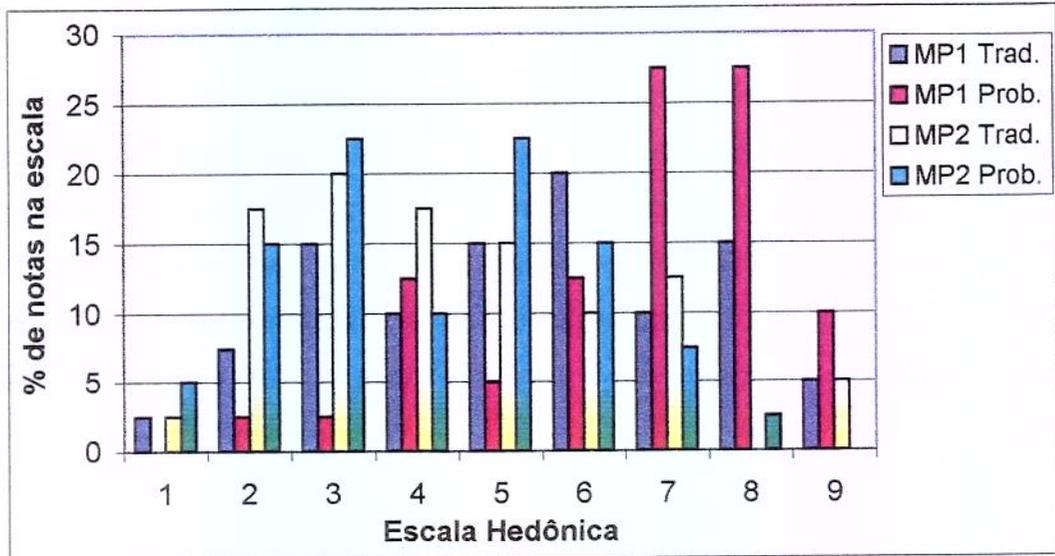


Figura 5.16. Freqüência e notas da avaliação sensorial para aceitação global do produto (1- desgostei extremamente; 5- nem gostei/nem desgostei; 9- gostei extremamente).

A Tabela 5.12 apresenta o resultado da preferência dos iogurtes pelos consumidores. Os resultados mostraram que os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose (MP1 Trad. e MP1 Prob.) obtiveram uma maior % de preferência (82,5%), enquanto os iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose (MP2 Trad. e MP2 Prob.) tiveram uma pequena % de preferência entre os consumidores (17,5%).

Tabela 5.12. % de preferência dos produtos pelos consumidores.

Produto	MP1 Prob.	MP1 Trad.	MP2 Trad.	MP2 Prob.
Preferência	62,5%	20%	10%	7,5%
Total da preferência	82,5%		17,5%	

De uma forma geral os comentários relativos aos iogurtes obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose (MP2 Trad. e MP2 Prob.) foram do tipo “amostras aguadas” e “amostras com pouca acidez” justificando a baixa % de preferência pelos consumidores. Para as amostras preferidas obtidas a partir da matéria-prima com maior teor de lactose (MP1 Trad. e MP1 Prob.), houveram comentários do tipo “acidez agradável” e “boa consistência”.

Como pode ser observado pelos resultados acima conclui-se que os iogurtes produzidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose obtiveram um melhor desempenho que os produzidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose tanto em relação aos atributos sensoriais de consistência e acidez quanto a aceitação global e preferência dos produtos.

Com o objetivo de atender consumidores que apresentam má absorção ou intolerância a lactose, outros estudos podem ser conduzidos visando a melhoria das características sensoriais do produto com baixo teor de lactose, tais como melhoria da consistência através do uso de estabilizantes ou adição de açúcar e/ou polpa de fruta e, melhoria da acidez através da adição de solução de ácido láctico ao produto para promover um ligeiro aumento da acidez.

6. CONCLUSÕES

- O teor de lactose influenciou significativamente o tempo de fermentação. A redução do teor de lactose do leite para 1,7% aumentou em 30 minutos o tempo de fermentação;
- O tipo de cultura influenciou significativamente o tempo de fermentação. Quando a cultura probiótica foi utilizada, o tempo de fermentação foi reduzido em 57%;
- O pH diminuiu e a acidez aumentou significativamente durante o período de estocagem para todos os produtos obtidos. Entretanto produtos obtidos com cultura tradicional apresentaram maior queda de pH e maior aumento de acidez, indicando que o uso de cultura probiótica oferece a vantagem de uma menor pós-acidificação dos produtos;
- O teor de lactose da matéria prima afetou significativamente, porém levemente, a contagem de *S. thermophilus* nos iogurtes fabricados com cultura tradicional e não afetou a contagem de *L. bulgaricus*. O iogurte obtido a partir da matéria-prima com maior teor de lactose apresentou uma maior contagem de *S. thermophilus*;
- Durante o tempo de estocagem, o número de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* diminuiu significativamente nos iogurtes fabricados com cultura tradicional. Entretanto, manteve-se dentro do padrão exigido pela legislação;
- O teor de lactose da matéria prima não afetou significativamente a manutenção do número de células viáveis dos microrganismos da cultura probiótica;
- O número de células viáveis dos microrganismos da cultura probiótica *L. acidophilus* e *B. lactis* diminuiu significativamente durante o período de estocagem, porém manteve-se dentro do padrão estabelecido pela legislação;

- Os produtos obtidos a partir da matéria-prima com maior teor de lactose foram os mais aceitos pelos consumidores, sendo que o iogurte fabricado com cultura probiótica teve melhor desempenho na avaliação dos atributos “consistência” e “acidez” e maior preferência (62,5%) entre os iogurtes;
- Os produtos obtidos a partir da matéria-prima com menor teor de lactose foram caracterizados pela baixa consistência e baixa acidez, sendo considerada uma acidez não característica de iogurte pelos consumidores;
- Observou-se um alto grau de correlação ($R^2 = 0,9482$) entre as análises físico-químicas e sensorial de pós-acidificação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSEN, R. K; HOLMEN, T. B. Yoghurt from hyperfiltrated, ultrafiltrated and evaporated milk and from milk with added milk powder. **Milchwissenschaft**, v.35, n.7, p. 399-402, 1980.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**, Resolução RDC n° 2, 7 de janeiro de 2002.

ALVAREZ, F; ARGÜELLO, M; CABERO, M; RIERA, F. A; ALVAREZ, R; IGLESIAS, J. R; GRANDA, J. Fermentation of concentrated skim-milk. Effects of different protein/lactose ratios obtained by ultrafiltration-diafiltration. **Journal of the Science of the Food and Agriculture**, v.76, n.1, p. 10-16, 1998.

ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v.19, n.10, p.1559-1597, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Washington, 1995. v.1-2.

BEAL, C; SKOKANOVA, J; LATRILLE, E; MARTIN, N; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.4, p. 673-681, 1999.

BECKER, T; PUHAN, Z. Effect of different processes to increase the milk solids non-fat content on the rheological properties of yoghurt. **Milchwissenschaft**, v.44, n.10, p. 626-629, 1989.

BRAND MILLER, J. B.; MUNRO, V. The effectiveness of 50% lactose-reduced milk in alleviating milk intolerance. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.1, n.2, p. 245-248, 1992.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora, v.42, n.250, p. 3-8, 1987.

BURTON, J. P.; TANNOCK, G. W. Properties of porcine and yogurt lactobacilli in relation to lactose intolerance. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.10, p. 2318-2324, 1997.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, n.1, p. 31-41, 1997a.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yughurt made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, n.8, p. 537-545, 1997b.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p. 2804-2816, 1998.

DAVIES, F.L; SHANKAR, P.A; BROOKER, B.E; HOBBS, D.G. A heat-induced change in the ultrastructure of milk and its effects on gel formation in yoghurt. **Journal of Dairy Research**, v.45, n.1, p. 53-58, 1978.

DUAME, H. E. Making marketable yogurts. **Dairy Fields**, v.162, n.12, p. 53-58, 1979.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. **Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* e avaliação da sua tolerância às secreções gastrintestinais**. Campinas, 2001. 104p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FERNÁNDEZ-GARCIA; E.; MCGREGOR, J. U.; TRAYLOR, S. The addition of oat fiber and natural alternative sweeteners in the manufacture of plain yogurt. **Journal Dairy Science**, v.81, n.3, p. 655-663, 1998.

FIL-IDF. Membrane processes guidelines for testing of equipment: terms and definitions. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 134, p. 1-11, 1981.

FULLER, R. Probiotics in man and animals: a review. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

GALVÃO; L. C.; FERNANDES, M. I. M.; SAWAMURA, R. Conteúdo de lactose e atividade de β -galactosidade em iogurtes, queijos e coalhadas produzidos no Brasil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.32, n.1, p. 8-14, 1995.

GLOVER, F. A; SKUDDER, P. J; STOTHART, P. H; EVANS, E. W. Reviews of the progress of dairy science: reverse osmosis and ultrafiltration in dairying. **Journal of Dairy Research**, v.45, n.2, p. 291-318, 1978.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2 (Supplement), p. 374S-379S, 2001.

HULL, R. R.; ROBERTS, A. V. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.39, n.4, p. 164-166, 1984.

ILHA, J. C. G. **Contribuição ao estudo da hidrólise da lactose em leite**. Campinas, 1992. 143p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

JEPSEN, S. Membrane filtration in the manufacture of cultured milk products: yogurt, ymer, camembert cheese. **Cultured Dairy Products Journal**, v.12, n.3, p. 14-17, 1977.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp.: their therapeutic potencial and survival in yogurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.52, n.1, p. 28-35, 1997.

KNEIFEL, W; JAROS, D; ERHARD, F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, n.3, p. 179-189, 1993.

KOLARS, J. C.; LEVITT, M. D.; AOUJI, M.; SAVAIANO, D. A. Yogurt – an autodigesting source of lactose. **New England Journal of Medicine**, v.310, p. 1-3, 1984.

KOSIKOWSKI, F. V. **Cheese and fermented milk foods**. Kosikowski and Associates, 2ed. New York, USA, 711p., 1978.

KOSIKOWSKI, F. V. Low lactose yogurts and milk beverages by ultrafiltration. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.1, p. 41-46, 1979.

LANARA. **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Ministério da Agricultura, Brasília, 1981.

LANKES, H.; OZER, H. B.; ROBINSON, R. K. The effect of elevated milk solids and incubation temperature on the physical properties of natural yoghurt. **Milchwissenschaft**, v.53, n.9, p. 510-513, 1998.

LEE, S. Y; VEDAMUTHU, E. R; WASHAM, C. J; REINBOLD, G. W. An agar medium for the differential enumeration of yogurt bacteria. **Journal of milk and food technology**, v.37, n.5, p. 272-276, may. 1974.

LEES, G. J; JAGO, G. R. Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Research**, v.43, n.1, p. 63-73, 1976.

LIM, S. G.; MENZIES, S.; NUKAJAM, W. S.; LEE, C. A.; JOHNSON, M. A. Intestinal disaccharidase activity in human immunodeficiency virus disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.30, n.3, p. 235-241, 1995.

LIMA, S. C. G. **Efeito da adição de concentrado protéico de soro e leite em pó desnatado na fabricação de iogurte firme**. Campinas, 2001. 74p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

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

LUCEY, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels. **Journal of Dairy Science**, v.85, n.2, p. 281-294, 2002.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Whey separation in acid milk gels made with glucoco- δ -lactone: effects of heat treatment and gelation temperature. **Journal of Textures Studies**, v.29, n.4, p.413-426, 1998.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**, v.30, n.7, p. 529-539, 1998.

LYBECK SORENSEN, K.; VERGARA MEERSOHN, M.; SONNE, J.; LARSEN, L.; EDELSTEN, D.; GUDMAND-HOYER, E. A new type of low-lactose milk. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.18, n.5, p. 1063-1068, 1983.

MACFIE, H. J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order-carry-over effects in hall tests. **Journal of Sensory Studies**, n.4, p.129-148, 1989.

MILLER, T. L.; ORAV, E. J.; MARTIN, S. R.; COOPER, E. R.; McINTOSH, K.; WINTER, H. S. Malnutrition and carbohydrate malabsorption in children with vertically transmitted human immunodeficiency virus 1 infection. **Gastroenterology**, v.100, n.5, p. 1296-1302, 1991.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas**, Instrução Normativa N° 36, 31 de outubro de 2000.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A.. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.1, p. 13-126, 1999.

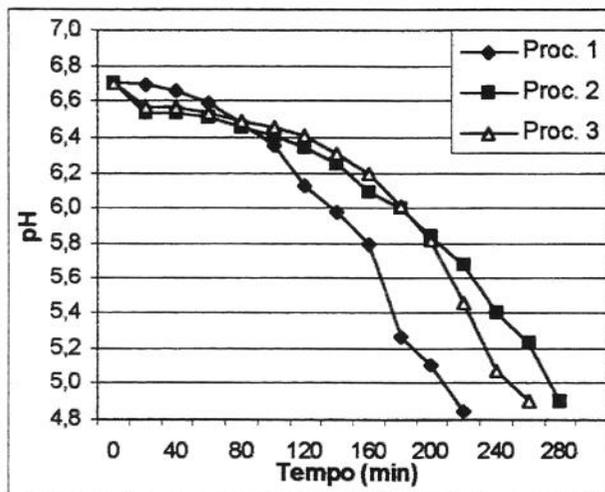
NESTLÉ. **Os iogurtes no Brasil**. Disponível na internet em: <<http://www.nestle.com.br>>. Acesso em: 5 maio 2002.

NOVA LEGISLAÇÃO de produtos lácteos e de alimentos para fins especiais – diet, light e enriquecidos. Fonte Comunicações e Editora, São Paulo, 1998, 212p.

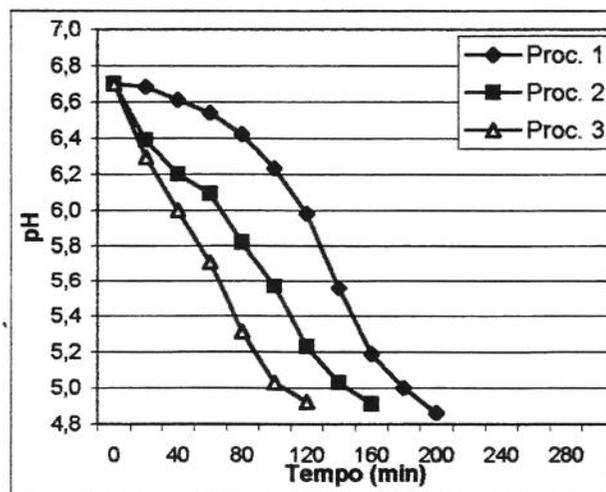
- PENNA, A. L. B. **Uso de soro desmineralizado em pó na fabricação de iogurte.** São Paulo, 1994. 154p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- PUHAN, Z. Treatment of milk prior to fermentation. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.227, p. 66-74, 1988.
- RASIC, J. L; KURMANN, J. A. **Yoghurt: Scientific grounds technology, manufacture & preparation.** Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. 427p.
- RENNER, E. Dietary approaches to alleviation of lactose maldigestion. **Food Science and Technology International**, v.3, n.2, p. 71-79, 1997.
- RENNER, E; ABD EL-SALAM, M. H. **Application of ultrafiltration in the dairy industry.** London and New York: Elsevier Applied Science, 1991. 371p.
- RIBEIRO, E. P. **Aplicação de ultrafiltração de leite no processo de fabricação de iogurte.** Campinas, 1989. 187p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB cultures. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.50, n.1, p. 51-57, (1995).
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.3, p. 107-110, 1999.
- SANDERS, M. E. Probiotics. **Food Technology**, v.53, n.11, p. 67-77, 1999.
- SANTOS, J. A. Iogurte: um bom negócio se feito com profissionalismo. **Indústria de Laticínios**, n.18, p. 20-27, 1998.
- SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.12, p. 387-392, 1999.

- SCHMIDT, K.; BLEDSOE, K. Effects of homogenization pressure on physical and sensory characteristics of low fat yogurt. **Culture Dairy Products Journal**, v.30, n.4, p.4-10, 1995.
- SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v.55, n.3, p. 127-131, 2000.
- TAMIME, A. Y; DEETH, H. C. Yoghurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v.43, n.12, p. 939-977, 1980.
- TAMIME, A. Y; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 3ed. England: Woodhead Publishing Limited, 619p., 1999.
- TAYLOR, C.; HODGSON, K.; SHARPSTONE, D.; SIGTHORSSON, G.; COUTTS, M.; SHERWOOD, R.; MENZIES, I.; GAZZARD, B.; BJARNASON, I. The prevalence and severity of intestinal disaccharidase deficiency in human immunodeficiency virus-infected subjects. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.35, n.6, p. 599-606, 2000.
- THOMOPOULOS, C.; TZIA, C.; MILKAS, D. Influence of processing of solids-fortified milk on coagulation time and quality properties of yogurt. **Milchwissenschaft**, v.48, n.8, p. 426-430, 1993.
- VESA, T. H.; KORPELA, R. A.; SAHI, T. Tolerance to small amounts of lactose in lactose maldigesters. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.1, p. 197-201, 1996.
- VRESE, M. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73. n.2 (Supplement), p. 421S-429S, 2001.
- WALSTRA, P; GEURTS, T. J; NOOMEN, A; JELLEMA, A; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy technology: principles of milk properties and processes**, New York, 1999.
- YOLKEN, R. H.; HART, W.; OUNG, I.; SHIFF, C.; GREENSON, J.; PERMAN, J. A. Gastrointestinal dysfunction and disaccharide intolerance in children infected with human immunodeficiency virus. **The Journal of Pediatrics**, v.118, n.3, p. 359-363, 1991.

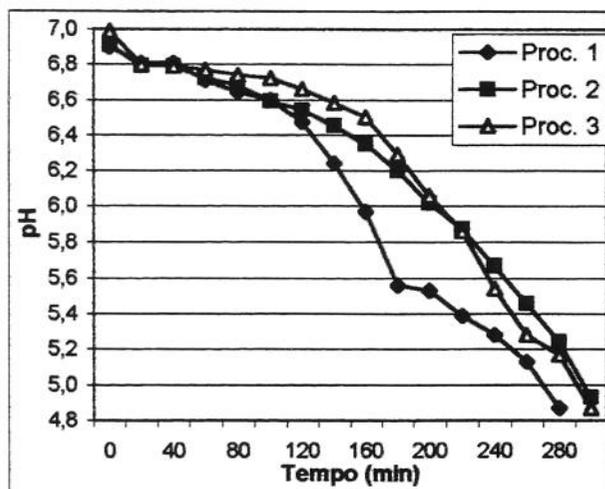
ANEXO I



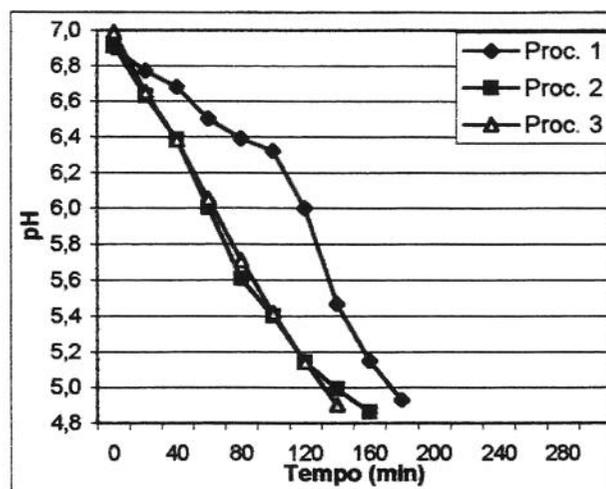
(a)



(b)

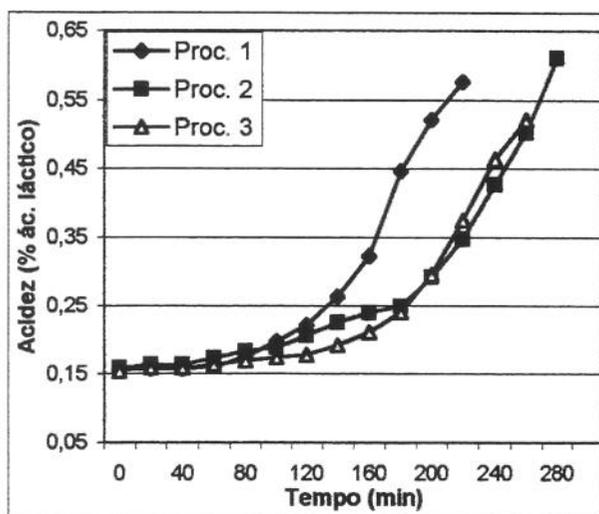


(c)

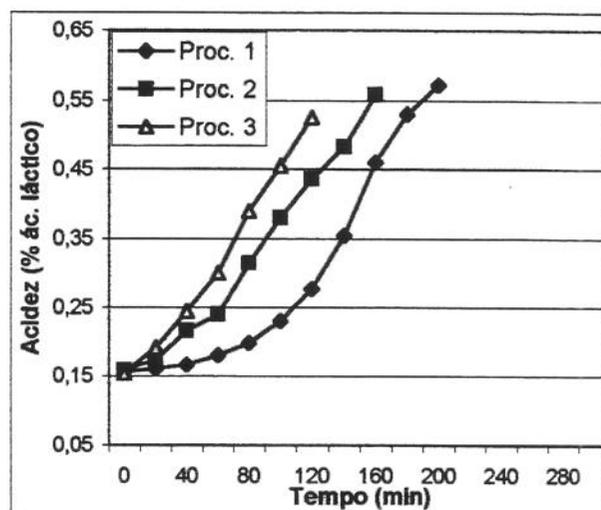


(d)

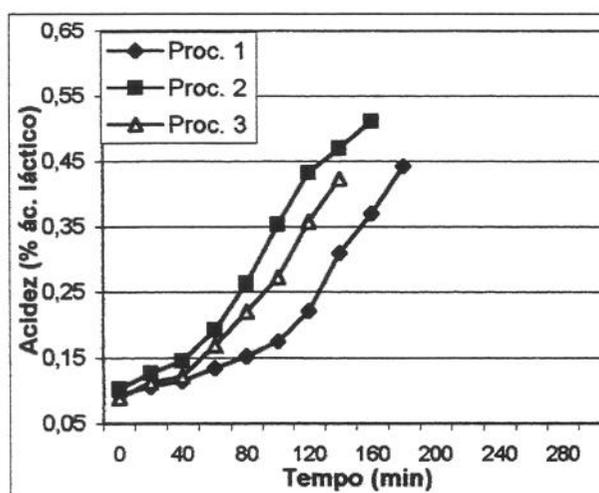
Figura I. Curvas de desenvolvimento de pH durante os 3 processamentos de fabricação dos iogurtes: (a) MP1 Tradicional; (b) MP1 Probiótico; (c) MP2 Tradicional e; (d) MP2 Probiótico.



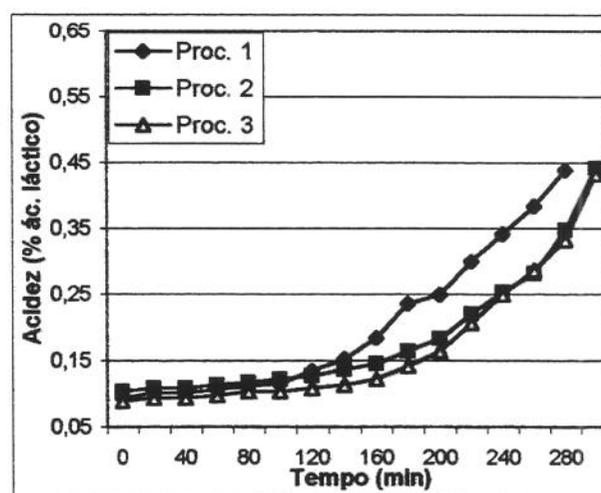
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura II. Curvas de desenvolvimento de acidez durante os 3 processamentos de fabricação dos iogurtes: (a) MP1 Tradicional; (b) MP1 Probiótico; (c) MP2 Tradicional e; (d) MP2 Probiótico.

ANEXO II

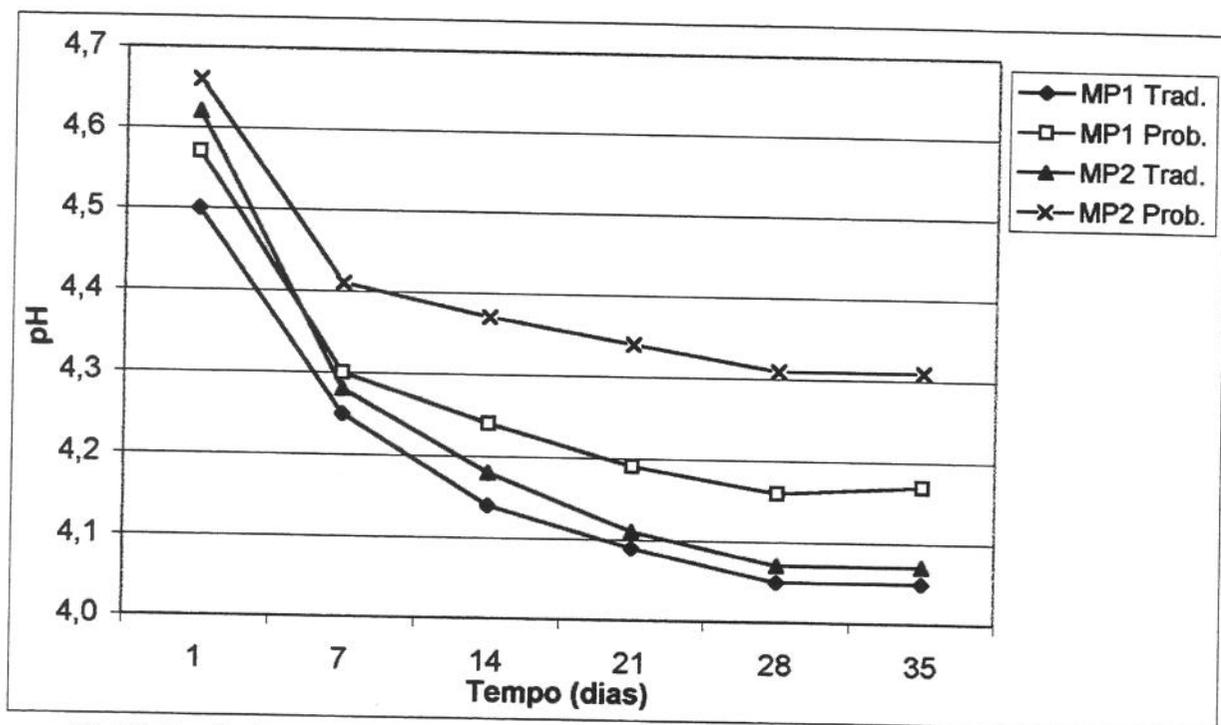


Figura III. Efeito do tempo de estocagem sobre o pH dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).

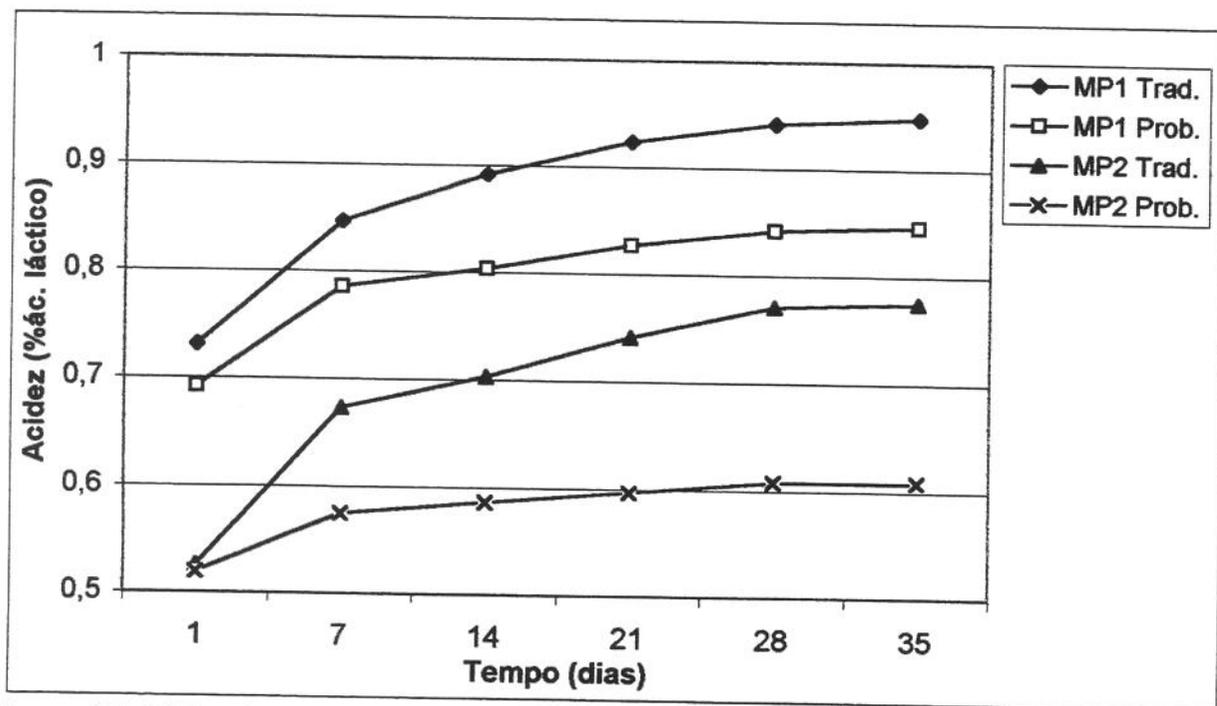


Figura IV. Efeito do tempo de estocagem na acidez dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).

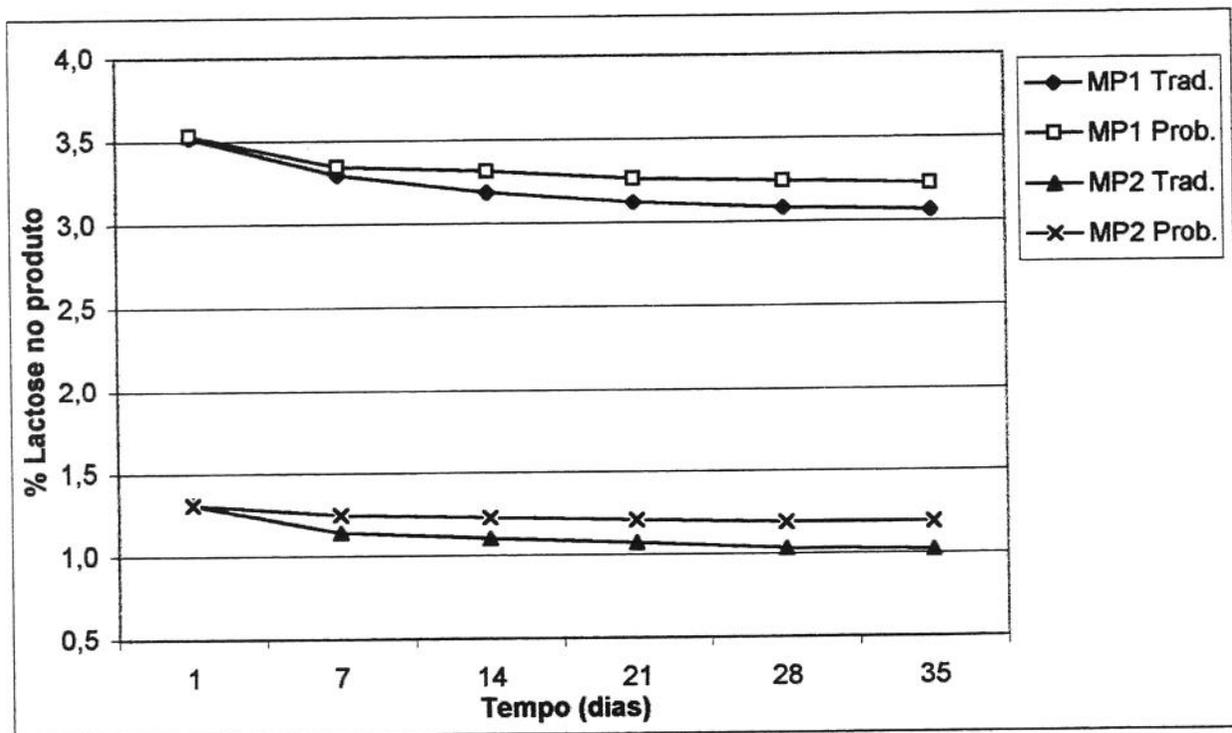


Figura V. Efeito do tempo de estocagem no consumo de lactose dos produtos obtidos (média dos 3 processamentos).

ANEXO III

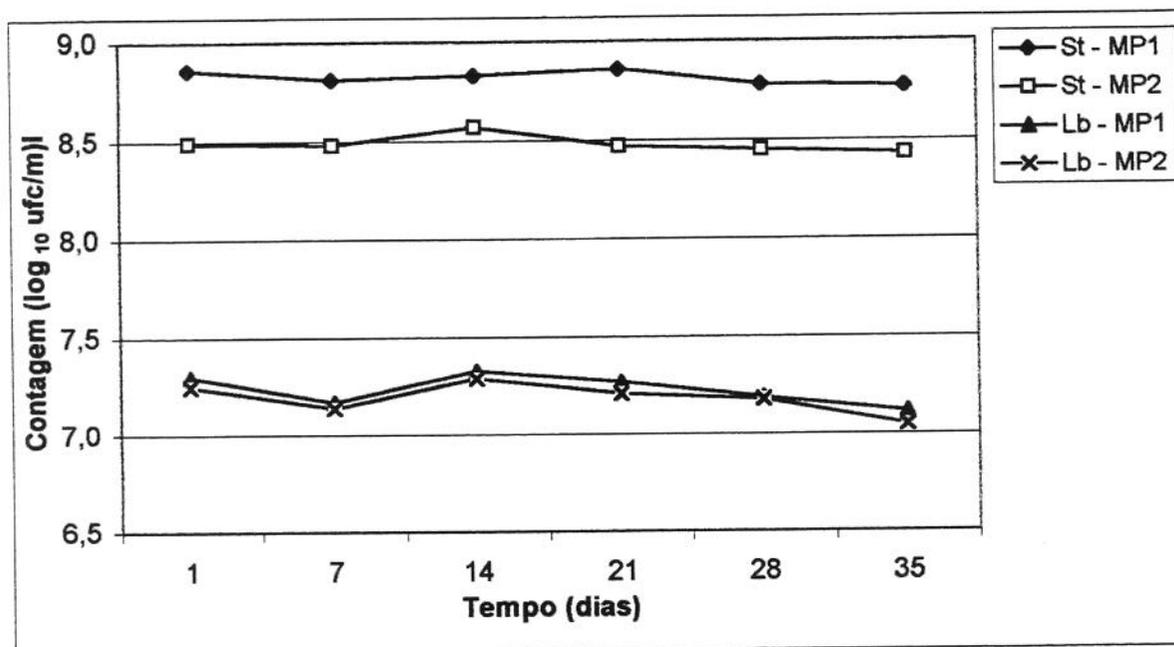


Figura VI. Média da contagem de *S. thermophilus* (St) e *L. bulgaricus* (Lb) em iogurtes fabricados com cultura tradicional durante o tempo de estocagem dos produtos obtidos nos 3 processamentos.

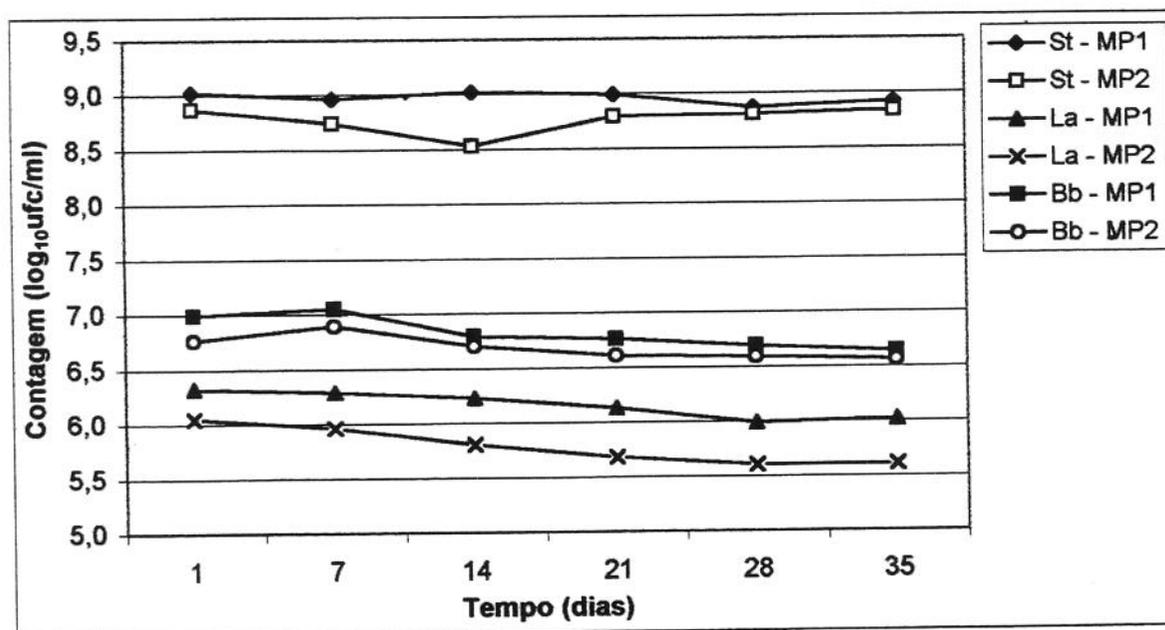


Figura VII. Média da contagem de *S. thermophilus* (St), *L. acidophilus* (La) e *B. lactis* (Bb) em iogurtes fabricados com cultura probiótica durante o tempo de estocagem dos produtos obtidos nos 3 processamentos.