

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos

Sabrina Neves Casarotti

**EFEITO DE EDULCORANTES SOBRE A QUALIDADE
DE LEITES FERMENTADOS**

São José do Rio Preto
2009

SABRINA NEVES CASAROTTI

**EFEITO DE EDULCORANTES SOBRE A QUALIDADE
DE LEITES FERMENTADOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Ambiental, Industrial e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto
2009

Casarotti, Sabrina Neves

Efeito de edulcorantes sobre a qualidade de leites fermentados/
Sabrina Neves Casarotti. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.
84 f. : 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Produtos lácteos. 3. Microbiologia.
4. Leite fermentado. 5. Probióticos. 6. Edulcorantes. I. Penna, Ana
Lúcia Barretto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579.67

SABRINA NEVES CASAROTTI

**EFEITO DE EDULCORANTES SOBRE A QUALIDADE
DE LEITES FERMENTADOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Ambiental, Industrial e de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Barretto Penna
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Susana Marta Isay Saad
Professor Associado
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
Professor Adjunto
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 18 de fevereiro de 2009.

“Você pode sonhar, criar e construir a idéia mais maravilhosa do mundo, mas são necessárias pessoas para fazer o sonho virar realidade”.

Walt Disney

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Ana Lúcia Barreto Penna, pelo apoio, confiança e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Às companheiras de laboratório, Bruna, Raquel, Grazielle, Jupys e Analice, pela amizade e valiosas contribuições.

Às minhas amigas de Rio Preto, por terem sido minha segunda família em todos os momentos.

Ao técnico Ginaldo, pelo auxílio prestado.

À Chr. Hansen, pelo fornecimento das culturas lácticas.

À Ajinomoto, Clariant e Doremus, pelo fornecimento dos adoçantes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos meus pais, Antônio e Solange, e à minha irmã, Marília, pelo incentivo e amor incondicional.

Ao meu namorado, Bruno, pelas grandes ajudas, amor e companheirismo.

E principalmente a Deus, por me dar força para buscar e alcançar meus objetivos.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE ABREVIações

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Leites fermentados	4
3.1.1. Definição, legislação e características	4
3.1.2. Histórico	6
3.2. Bactérias lácticas	7
3.2.1. Cultura tradicional de iogurtes	9
3.2.2. Cultura probiótica	12
3.2.2.1. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	16
3.2.3. Interações entre as espécies de bactérias do leite fermentado	18
3.3. Efeitos terapêuticos de bactérias probióticas	21
3.4. Processo de fabricação dos leites fermentados	23
3.5. Pós-acidificação	25

3.6. Edulcorantes	26
3.6.1. Sacarina	27
3.6.2. Ciclamato	28
3.6.3. Aspartame	29
3.6.4. Acesulfame-K	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Material	31
4.1.1. Matérias-primas e ingredientes	31
4.2. Métodos	31
4.2.1. Preparo das culturas lácticas	31
4.2.2. Preparo dos leites fermentados e planejamento experimental	32
4.3. Análises físico-químicas do leite em pó reconstituído usado para a fabricação dos leites fermentados	36
4.4. Análises físico-químicas da base obtida para a produção dos leites fermentados	36
4.5. Caracterização dos leites fermentados	37
4.5.1. Tempo de fermentação	37
4.5.2. Viabilidade dos microrganismos	37
4.5.3. Análises físico-químicas dos leites fermentados	38
4.6. Análise estatística dos resultados experimentais	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Caracterização físico-química do leite em pó reconstituído	39
5.2. Caracterização físico-química da base obtida para a produção dos leites fermentados	40

5.2.1.	Teor de sólidos totais	40
5.2.2.	Teor de proteínas	43
5.2.3.	Teor de cinzas	44
5.2.4.	Teor de gordura	45
5.2.5.	Acidez titulável	45
5.2.6.	Valor calórico	45
5.3.	Caracterização dos leites fermentados	48
5.3.1.	Tempo de fermentação	48
5.3.2.	Viabilidade de bactérias lácticas	52
5.3.3.	Análises físico-químicas dos leites fermentados	58
5.3.3.1.	Acidez titulável	58
5.3.3.2.	Sinérese	62
5.3.3.3.	Capacidade de retenção de água (CRA)	66
6.	CONCLUSÕES	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

RESUMO

Os leites fermentados probióticos são líderes no mercado de alimentos funcionais e prioridade de pesquisa em diversos países. A presença de bactérias probióticas viáveis e em alto número no produto durante sua vida de prateleira é condição essencial para assegurar o efeito probiótico. As qualidades tecnológica e funcional de leites fermentados são importantes para sua aceitação pelo consumidor e podem ser afetadas pelos aditivos adicionados antes da fermentação dos produtos. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito da adição de edulcorantes, em diferentes concentrações, na produção de leites fermentados por uma cultura mista composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (Rich) e uma cultura pura composta por *Lactobacillus acidophilus* (La-5). As bases lácteas para preparação dos leites fermentados obtidas antes da fermentação foram submetidas às determinações dos teores de sólidos totais, proteínas, cinzas, gordura, acidez titulável e valor calórico. Nos leites fermentados foram avaliados: a viabilidade das bactérias lácticas, a pós-acidificação, a sinérese e a capacidade de retenção de água (CRA), durante 28 dias de estocagem refrigerada. As características físico-químicas dos leites fermentados atenderam aos requisitos legais e apresentaram diferenças somente nos teores de sólidos totais, cinzas e valor calórico nos produtos elaborados com sacarose. O tipo e a concentração de edulcorante afetaram a fermentação da cultura La-5 e a acidez titulável. No entanto, não influenciaram o tempo de fermentação da cultura Rich, a viabilidade de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, a sinérese e a CRA dos leites fermentados elaborados. O tipo de cultura influenciou o tempo de fermentação do leite, sendo superiores os tempos obtidos para La-5 e a acidez titulável, com valores superiores para a cultura Rich, no entanto, não influenciou a sinérese e a CRA dos leites fermentados elaborados. Os diferentes tipos e concentrações de edulcorantes utilizados não tiveram influência sobre a qualidade dos produtos, portanto, todos podem ser empregados na fabricação de leites fermentados de baixa caloria.

Palavras-chave: leites fermentados, produtos lácteos, probióticos, edulcorantes.

ABSTRACT

Fermented probiotic dairy products are leaders in the functional food markets and priority for researching worldwide. The presence of probiotic bacteria viable at high level during shelf-life of the product is essential to ensure the probiotic effect. The technological and functional qualities of fermented milks are important for their acceptance by the consumers and they can be affected by the addition of ingredients before fermentation. The aim of this research was to evaluate the use of sweeteners, in different concentrations, in the production of fermented milks using a mixed culture composed of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* (Rich), or a pure culture composed of *Lactobacillus acidophilus* (La-5). The milk bases obtained before fermentation were submitted to determinations of total solids, protein, ash, fat, acidity contents and caloric value. The viability of lactic bacteria, post-acidification, syneresis and water-holding capacity (WHC) of fermented milks were examined during 28 days of cold storage. The physicochemical characteristics of fermented milks were according to legal requirements and showed differences only on the contents of total solids, ash and caloric value in the products formulated with sucrose. The type and concentration of sweeteners affected the fermentation of La-5 culture and titratable acidity. However they did not influence fermentation time of Rich culture, viability of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus*, syneresis and WHC of fermented milks. The culture type affected the fermentation time, which was higher for La-5 culture, and acidity, which was higher for Rich culture, however, they did not influence the syneresis and WHC of fermented milks. All kinds and concentrations of sweeteners did not influence the technological quality of products, so all of them can be used to produce low-calorie fermented milks.

Key words: fermented milks, dairy products, probiotics, sweeteners.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema de protocooperação entre <i>S. thermophilus</i> e <i>L. bulgaricus</i> durante o processo de fermentação	9
Figura 2 - Diagrama de blocos do processo de obtenção dos leites fermentados produzidos com diferentes concentrações e tipos de edulcorantes e culturas lácticas	33
Figura 3 - Banho termostaticado contendo os frascos com a base para a produção dos leites fermentados	35
Figura 4 - Aparelho <i>Datta Logger</i> acoplado a um pHmetro digital para registro do pH do leite durante a fermentação	35
Figura 5 - Curvas de acidificação dos leites fermentados pela cultura Rich.	51
Figura 6 - Curvas de acidificação dos leites fermentados pela cultura La-5	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
Quadro 1 - Cepas comumente empregadas em produtos probióticos	15
Quadro 2 - Efeitos cientificamente estabelecidos e potencialmente benéficos à saúde atribuídos às bactérias probióticas	22
Tabela 1 - Planejamento dos experimentos contendo as variáveis e os níveis de variação	32
Tabela 2 - Características físico-químicas do leite em pó reconstituído	39
Tabela 3 - Características físico-químicas das bases para a preparação dos leites fermentados pela cultura Rich	41
Tabela 4 - Características físico-químicas das bases para a preparação dos leites fermentados pela cultura La-5	42
Tabela 5- Valor calórico (Kcal e KJ) e porcentagem do valor diário	47
Tabela 6- Tempos de fermentação dos leites fermentados	48
Tabela 7 - População de <i>S. thermophilus</i> (Log UFC/mL) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada	53
Tabela 8 - População de <i>L. bulgaricus</i> (Log UFC/mL) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada	53

Tabela 9 -	População de <i>L. acidophilus</i> (Log UFC/mL) dos leites fermentados durante a estocagem refrigerada.	55
Tabela 10 -	Acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada	59
Tabela 11 -	Acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada	59
Tabela 12 -	Comparação dos valores de acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante a estocagem refrigerada	61
Tabela 13 -	Sinérese (%) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada	63
Tabela 14 -	Sinérese (%) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada	63
Tabela 15 -	Comparação dos valores de sinérese (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante a estocagem refrigerada	65
Tabela 16 -	CRA (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich durante a estocagem refrigerada	67
Tabela 17 -	CRA (%) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada	67
Tabela 18 -	Comparação dos valores de CRA (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante a estocagem refrigerada	69

LISTA DE ABREVIATÖES

µm	Micrômetro
ABT	Cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ssp., <i>Streptococcus thermophilus</i>
ASA	Aspartame + Acesulfame-K
ASP	Aspartame
C	Controle
CRA	Capacidade de retenção de água
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
G	Força da gravidade
g	Gramas
HHD	<i>Homofermentative Heterofermentative Differential Medium</i>
HTST	<i>High Temperature Short Time</i>
IDF	<i>International Dairy Federation</i>
Kcal	Quilocalorias
KJ	Quilojoule
La-5	Cultura de <i>Lactobacillus acidophilus</i>
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
log	Logarítmo
MRS	<i>De Man Rogosa Sharp</i>
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
SAC	Sacarose
SCI	Sacarina + Ciclamato
s.d.	Sem data
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, observa-se uma mudança nos hábitos alimentares da população. Devido aos avanços da ciência e ao fácil acesso à informação, os consumidores modernos passaram a se preocupar mais com as questões de saúde e, por isso, buscam por alimentos que contribuam para uma vida mais saudável. O alimento, anteriormente considerado apenas fonte de nutrientes essenciais à manutenção da vida, tornou-se objeto de estudos que o relacionam à prevenção de doenças e melhora da função de órgãos e tecidos.

Com a maior expectativa de vida da população, são grandes os desafios para prevenir o aumento da obesidade, problemas cardiovasculares e diabetes. Os consumidores, além de buscarem por alimentos com propriedades funcionais, estão modificando seus hábitos alimentares, com redução de quantidade de gordura, açúcar, sal, colesterol e de certos aditivos. As indústrias de alimentos, comprometidas com a promoção da saúde e prevenção de doenças, desenvolveram tecnologias para a produção de alimentos funcionais e de baixa caloria.

O equilíbrio da microbiota intestinal tem importância fundamental no estado de saúde das pessoas, e por isso, os alimentos contendo probióticos, que atuam benéficamente sobre a saúde do indivíduo, ganharam mais destaque.

A indústria de laticínios está entre as que apresentam maior possibilidade de crescimento na disponibilização de produtos probióticos. Esses produtos são estimados como responsáveis por 65% do volume de alimentos funcionais comercializados em todo o mundo e acredita-se que esse mercado chegue a US\$ 250 bilhões em 2010, números que indicam que produtos lácteos funcionais possuem excelente aceitação pelos consumidores. No ano de 2006, o Brasil registrou uma produção média de 400 mil toneladas e movimentou cerca de R\$ 1,3 bilhão. No entanto, o consumo de leites fermentados no Brasil, que é de 3 kg por ano, apresenta-se pequeno quando comparado a países como França e Uruguai, onde o consumo per capita é de, respectivamente, 19 kg e 7 kg por ano.

Dentre os produtos lácteos, os leites fermentados são as melhores opções do ponto de vista tecnológico para carrear os probióticos e são

reconhecidos como produtos saudáveis. No entanto, para serem capazes de promover os efeitos benéficos na saúde das pessoas, os probióticos devem estar presentes num número mínimo, pois apresentam crescimento lento no leite e baixa viabilidade no produto final, o que dificulta o processo de fabricação dos produtos e a manutenção de bactérias viáveis durante sua vida de prateleira.

Vários fatores, como a qualidade do leite, o conteúdo de sólidos totais os ingredientes adicionados, o tratamento térmico, o valor de pH do produto final e a viabilidade das bactérias ácido lácticas, já foram apontados como responsáveis por afetarem a qualidade tecnológica de leites fermentados. No entanto, na literatura, são raros os estudos que avaliaram o efeito dos edulcorantes sobre a viabilidade das bactérias lácticas e a formação do coágulo, e conseqüentemente, suas propriedades tecnológicas e funcionais.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral e os objetivos específicos do presente trabalho são:

2.1. Objetivo geral

Desenvolver leites fermentados de baixa caloria.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar as características físico-químicas (teor de sólidos totais, teor de cinzas, teor de proteínas, teor de gordura e acidez titulável) das bases para preparação dos leites fermentados obtidas antes da incubação dos produtos e calcular o valor calórico dos leites fermentados elaborados;
- Avaliar o efeito do tipo e da concentração de edulcorantes (aspartame, sacarina + ciclamato, aspartame + acesulfame-K) e do açúcar (sacarose) sobre o processo de fermentação, microbiota e qualidade tecnológica dos leites fermentados durante 28 dias de armazenamento;
- Avaliar o efeito do tipo de cultura (Rich e La-5) sobre o processo de fermentação e qualidade tecnológica dos leites fermentados durante 28 dias de armazenamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Leites fermentados

3.1.1. Definição, legislação e características

Leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, acidificado por bactérias lácticas, resultando em consistência e textura típicas. Os cultivos de microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade (BRASIL, 2000). Todos os leites acidificados têm uma característica em comum, que é a presença de ácido láctico, formado pela fermentação da lactose, por várias combinações de bactérias termofílicas e mesofílicas, resultando na coagulação da proteína do leite (SPREER; MIXA, 1998).

Segundo o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal – DIPOA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, os Padrões de Identidade e Qualidade de leites fermentados apresentam uma classificação geral para esses produtos. O tipo de microrganismo empregado, a temperatura de fermentação e os compostos resultantes desta fermentação diferenciam esses produtos. Dentro da categoria leite fermentado têm-se os seguintes produtos: iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada. As definições propostas para iogurtes e leites fermentados são:

- Leites fermentados são os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, sendo que estes fermentos lácticos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final e durante seu prazo de validade.
- Iogurte é o produto incluído na definição anterior cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbióticos de *S. thermophilus* e *Lactococcus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aos quais podem-se acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas.
- Leite fermentado ou cultivado é o produto incluído na definição genérica de leites fermentados cuja fermentação se realiza com um ou vários dos

seguintes cultivos: *L. acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium* sp, *Streptococcus thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-láticas.

Os leites fermentados deverão apresentar contagem mínima de microrganismos específicos de acordo com o tipo de produto durante seu prazo de validade (BRASIL, 2000):

- Mínimo de 10^7 UFC de bactérias lácticas/g de produto para iogurte, leite acidófilo, kefir e kumys.
- Mínimo de 10^6 UFC de bactérias lácticas/g de produto para leite cultivado e coalhada.

De acordo com o conteúdo de matéria gorda, os leites fermentados se classificam em (BRASIL, 2000):

- Com creme: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo mínimo de 6,0 g/100g de matéria gorda.
- Integrais: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo mínimo de 3,0 g/100g de matéria gorda.
- Parcialmente desnatados: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo máximo de 2,9 g/100g de matéria gorda.
- Desnatados: aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo máximo de 0,5 g/100g de matéria gorda.

Entre os tipos de leites fermentados, o iogurte é o mais conhecido e difundido no mundo. Os tipos de iogurtes são classificados de acordo com seu estado físico na embalagem, com o teor de gordura e valor calórico e, se são adicionados ou não de frutas e aromas. Segundo Varnam e Sutherland (1994) e Spreer e Mixa (1998), as propriedades estruturais características definem os tipos de iogurtes como:

- Iogurte firme: a fermentação ocorre no interior da embalagem;
- Iogurte batido: o gel é quebrado, resfriado e embalado após a coagulação, sendo que o produto solidifica-se novamente, ocorrendo um aumento da viscosidade após a embalagem;
- Iogurte para beber: o gel é quebrado como no produto batido, mas é homogeneizado e mantém a consistência líquida.

3.1.2. Histórico

A acidificação é um dos métodos mais antigos de conservação do leite. A produção de leite fermentado data de milhares de anos e, possivelmente, iniciou-se quando o ser humano domesticou vacas, ovelhas e cabras. O leite fermentado surgiu na Mesopotâmia aproximadamente em 5000 a. C. (TAMIME; DEETH, 1980).

Embora o termo e a definição precisa de probiótico tenham origem nos anos 90, o interesse por microrganismos potencialmente benéficos à saúde é de tempos remotos (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001). A história registra as propriedades benéficas do consumo de leites fermentados contendo microrganismos vivos há muitos séculos. Seu uso no tratamento de doenças é mencionado em escrituras bíblicas e o pai da medicina, Hipócrates, recomendava: “*Faça do alimento o seu medicamento*”. No início do século XX, o bacteriologista russo Ilya Metchnikoff, foi o primeiro a investigar os efeitos benéficos das bactérias lácticas presentes no leite fermentado (HUGHES; HOOVER, 1995). Ele atribuiu a longevidade dos povos dos Bálcãs a uma dieta rica em leite fermentado (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

Pesquisas feitas desde o período de Metchnikoff mostraram que *L. bulgaricus* não sobrevive e não coloniza o trato gastrointestinal. Entretanto, outras espécies de lactobacilos foram documentadas como tendo efeito benéfico através do crescimento e ação no trato gastrointestinal. Esse grupo de bactérias e outras são denominados hoje de probióticos. As culturas mais freqüentemente mencionadas como probióticas incluem, principalmente, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Provavelmente o termo probiótico foi introduzido por Vergio em 1954, quando comparou, em seu manuscrito *Anti-und Probiotika*, o efeito de antibióticos e outras substâncias antimicrobianas sobre a população microbiana intestinal (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001), e considerou probióticos como o oposto de antibiótico (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Atualmente, há consenso de que a palavra probiótico se refere aos microrganismos originados do trato intestinal humano, se o alimento for destinado ao consumo humano, ou originado do trato intestinal de uma determinada espécie animal, quando destinado ao consumo animal (FERREIRA, 2008). Em 2002, a Organização

Mundial da Saúde definiu probióticos como microrganismos vivos, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Ainda que o iogurte tenha ocupado durante muito tempo um papel importante na dieta dos habitantes do Oriente Médio e da Europa Central, no Ocidente era somente consumido ocasionalmente. Nos Estados Unidos a produção industrial do iogurte foi introduzida em 1942, e após a II Guerra Mundial, particularmente a partir de 1950, a tecnologia de fabricação do iogurte e a compreensão dos fatores que afetam suas propriedades sensoriais avançaram rapidamente. A escolha desse produto se impõe por seu sabor e suas qualidades refrescantes (BRANDÃO, 1995).

O grande aumento da popularidade dos leites fermentados se deve em princípio ao interesse das supostas propriedades benéficas à saúde e de prolongar a vida. Além disso, esse tipo de alimento possui um alto valor nutritivo e é considerado equilibrado e adequado a qualquer dieta. O iogurte constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, e carboidratos e tem várias ações benéficas sobre o organismo, tais como: facilita a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, facilita a absorção de cálcio, fósforo e ferro, é fonte de galactose – importante na síntese de tecidos nervosos e cerebrosídeos em crianças, bem como é uma forma indireta de se consumir leite (TAMIME; ROBINSON, 1999).

3.2. Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (LAB – *lactic acid bacteria*) são os principais agentes envolvidos na produção de leites fermentados. Os microrganismos aplicados em culturas lácticas pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Baseando-se em sua morfologia são classificadas como cocos e bacilos. De acordo com a temperatura ótima de crescimento são classificadas como mesofílicas (25-40°C) e termofílicas (45-65°C). Durante o crescimento das bactérias no leite, o metabolismo inicial da lactose resulta na formação de glicose e galactose. A lactose não é completamente convertida e permanece no leite fermentado em níveis de 2,5-4,0 g por 100g do produto (SPREER; MIXA, 1998). A etapa

seguinte do processo metabólico varia com as espécies e resulta em diferentes produtos finais. Assim, as bactérias lácticas são classificadas em homofermentativas e heterofermentativas. As primeiras produzem quase que exclusivamente ácido láctico, as heterofermentativas produzem ácido láctico e outros compostos, como CO₂ e etanol (WALSTRA et al., 1999).

Estas culturas são fornecidas nas formas líquidas, ultracongeladas ou desidratadas. A cultura líquida é fornecida em leite desnatado reconstituído esterilizado, podendo ser armazenada em temperatura inferior a 8°C por período de uma a duas semanas. A cultura ultracongelada (-30°C a -40°C ou em nitrogênio líquido a -196°C) pode ser armazenada por 3-6 meses e as culturas desidratadas (vácuo, *spray*, liofilizada ou liofilizada concentrada) por mais de 6 meses (STAFF, 1998).

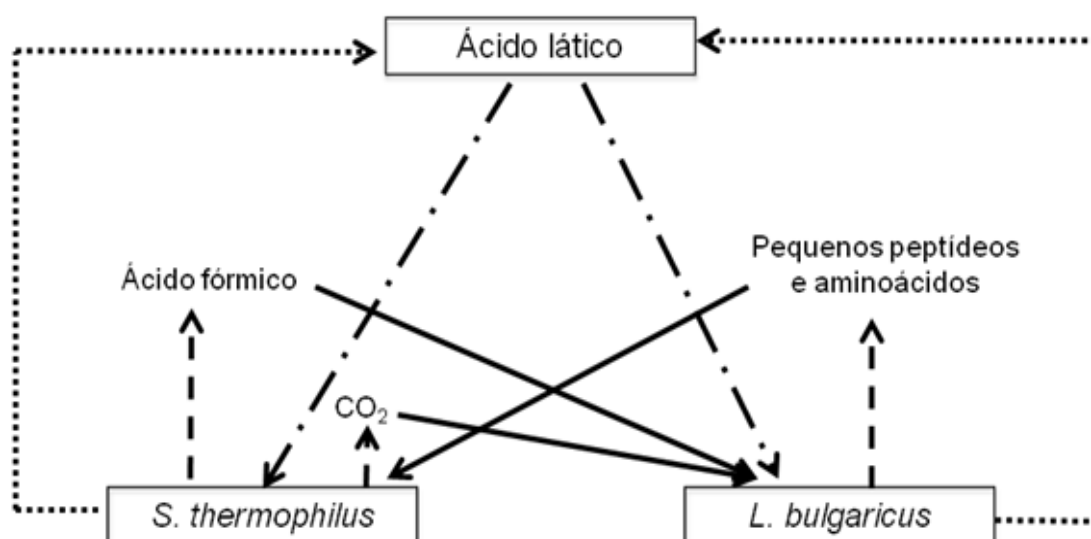
A função geral da cultura láctica é produzir ácido láctico suficiente em um período de tempo tão curto quanto possível para fermentar o leite do pH 6,4-6,7 ao pH 3,8-4,6. Além de fornecer textura, viscosidade, odor e sabor característicos ao produto final (STAFF, 1998), Stanley (1998) atribuiu três funções principais às culturas lácticas: acidificação, textura e realce de sabor e odor. A acidificação é resultante do metabolismo de conversão da lactose em ácido láctico para a produção de energia (ATP). As bactérias lácticas alteram as condições do leite de tal maneira que impede o crescimento da maioria dos microrganismos indesejáveis. Essas condições incluem baixo pH (4,6 a 4,0), baixo potencial redox, produção de ácidos (ácido láctico) e outros metabólitos, como H₂O₂ com atividade antagonista (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Uma cultura *starter* pode ser definida como 'uma preparação microbiana contendo um grande número de células de pelo menos um microrganismo a ser adicionado à matéria-prima para produzir um produto alimentício fermentado'. O grupo das bactérias lácticas ocupa um papel central na produção de alimentos fermentados, acelerando e conduzindo o processo fermentativo. A adição direta de culturas selecionadas tem representado um avanço na elaboração dos produtos, resultando em um alto grau de controle sobre o processo fermentativo e de padronização do produto final (Leroy, De Vuyst, 2004).

3.2.1. Cultura tradicional de iogurtes

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes são *Streptococcus thermophilus*, cocos unidos, geralmente em cadeias curtas, e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, bastonetes unidos em cadeias longas. Elas utilizam a lactose como substrato energético com liberação de ácido láctico. Ambos os 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. O *S. thermophilus* é muito menos acidificante que o *L. bulgaricus*, que pode produzir até 2,7% de ácido láctico no leite (TAMIME; DEETH, 1980; SABOYA, OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

O *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* crescem melhor em conjunto do que separadamente, efeito denominado de protocooperação (Figura 1).



(Adaptado de WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Figura 1 – Esquema de protocooperação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante o processo de fermentação.

No começo da fermentação o *L. bulgaricus*, espécie proteolítica, hidrolisa as proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos (principalmente a

valina) aumentando o crescimento do *S. thermophilus*, que é pouco proteolítico. Este inicia o desenvolvimento de ácido láctico ao fermentar a lactose e cresce rapidamente até atingir pH 5,5. Ocorre o consumo do oxigênio dissolvido e a formação de ácido fórmico, resultando no abaixamento do pH, o que estimula o crescimento do *L. bulgaricus*. Devido a essa estimulação mútua, o ácido láctico é produzido mais rapidamente do que se houvesse somente uma espécie participando do processo de fermentação (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

Segundo Walstra, Wouters e Geurts (2006), o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* formam metabólitos que contribuem para o sabor, estrutura e consistência do iogurte. Os principais compostos são:

- Ácido láctico: ambas as espécies formam ácido láctico a partir da glicose, sendo a maioria da glicose decomposta na via homofermentativa. O *S. thermophilus* forma L(+) e o *L. bulgaricus*, o D(-) ácido láctico. A galactose, formada durante a decomposição da lactose não é convertida em ácido láctico. O CO₂ e etanol são produzidos em pequenas quantidades.
- Acetaldeído: principal composto volátil produzido pelas bactérias do iogurte. É essencial para as características de aroma do produto. A maioria é produzida pelos bacilos.
- Outros compostos voláteis: o diacetil e o ácido acético são produzidos em pequenas quantidades.
- Polissacarídeos: as bactérias do iogurte formam o glicocálix, que é predominantemente composto por cadeias de polissacarídeos constituídas de galactose e outros glicídeos. Eles são parcialmente secretados para o meio e, assim, são chamados de exopolissacarídeos. Os polissacarídeos desempenham uma importante função na consistência do iogurte, especialmente no iogurte tipo batido.

De acordo com Tamime e Deeth (1980) e Tamime e Robinson (1999), as relações ótimas entre cocos e bacilos para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto são de aproximadamente 1:1, 2:1, 3:2 de *S. thermophilus* para *L. bulgaricus*, e depende das propriedades das cepas utilizadas. Este balanço adequado da cultura é importante para a obtenção de um iogurte com boas características organolépticas relativas ao sabor, aroma e textura. 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, 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 gosto amargo (SPREER; MIXA, 1998; WALSTRA et al., 1999).

A concentração do inóculo utilizada geralmente era de 2 a 3% variando de 1 a 5%. Entretanto, Kurmann (1977) já recomendava inoculações mínimas para impedir uma acidificação intensa, como por exemplo, 0,5 a 1% de cultura, pois afirmava ser a porcentagem de semente dependente de vários fatores, tais como: o poder acidificante das culturas; o tempo de incubação desejado; a riqueza em células bacterianas; a fase de desenvolvimento na qual se encontra a cultura; a relação lactobacilos/estreptococos e o extrato seco do leite. Dave e Shah (1997a) estudaram o efeito da concentração das culturas lácticas na viabilidade das bactérias lácticas e probióticas e observaram que o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus* tiveram multiplicação mais intensa no menor nível de inóculo utilizado (0,5%) do que no maior nível (2,0%).

A temperatura ótima de crescimento do *S. thermophilus* situa-se entre 40 - 45°C, com 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, com um mínimo a 22°C e um máximo a 52,5°C. Quando ocorre uma associação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* a temperatura ótima de crescimento fica entre 40 - 45°C e a coagulação pode demorar mais que quatro horas, dependendo da porcentagem de inóculo adicionada (COGAN; ACCOLAS, 1995). Após o iogurte ter atingido o pH desejável (geralmente pH 4,6), o gel é resfriado a uma temperatura menor que 10°C. O pH final da maioria dos iogurtes varia entre 4,6 - 4,0 (LUCY; SINGH, 1998).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não pertencem à microbiota intestinal e não são resistentes à bile (FERREIRA, 2008; SHAH, 2007; LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001). No entanto, essas bactérias possuem efeitos positivos e funcionais, como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e melhoramento da digestão da lactose devido à presença de

enzima β -galactosidase em suas células (FERREIRA, 2008; LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

3.2.2. Cultura probiótica

Os iogurtes têm sido reformulados para incluir linhagens vivas de *Lactobacillus* e espécies de *Bifidobacterium*, além dos microrganismos da cultura tradicional de iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*). Assim, o bioiogurte é o iogurte que contém microrganismos probióticos vivos que proporcionam o aumento dos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

O termo probiótico, derivado do grego, significa “para a vida” (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001). Segundo o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticas Isolados com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde da Resolução RDC n° 2 de janeiro de 2002, os probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

A produção de leites fermentados probióticos exige uma série de cuidados. Entre as dificuldades, podem ser citadas: baixo ritmo de multiplicação em leite não-suplementado; falta de desenvolvimento das propriedades sensoriais tradicionais; metabólitos dos probióticos que podem ser indesejáveis e causar sabor estranho; difícil manutenção da viabilidade (GOMES; MALCATA, 1999). Algumas culturas probióticas podem exigir períodos superiores a 24 horas para que o leite atinja o valor de pH final de 4,5, quando são os únicos microrganismos empregados na fermentação do leite (TAMIME, ROBINSON; LATRILLE, 2001).

Segundo Arunachalam (1999) e Lourens-Hatting e Viljoen (2001), 400 a 500g por semana de leite fermentado probiótico contendo no mínimo 10^6 UFC/mL devem ser consumidos regularmente para promover o efeito terapêutico.

No Brasil, a Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos

(BRASIL, 1999) tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país. Anteriormente, a referida Comissão recomendou que um alimento funcional probiótico deveria apresentar uma concentração mínima de 10^6 UFC/g dentro do prazo de validade do produto (BRASIL, 2001). Atualmente, a recomendação é com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC/g dia (BRASIL, 2008).

Diversos fatores afetam a cinética da acidificação do meio e a viabilidade das bactérias probióticas no produto. Entre eles pode-se destacar o teor de sólidos do leite, a presença de conservantes e de outros microrganismos, a disponibilidade de nutrientes, a concentração de açúcares (pressão osmótica), o nível de inóculo, a temperatura de incubação, o valor de pH, os teores de ácido e de peróxido de hidrogênio produzidos pelas bactérias do iogurte, o aumento da acidez e a temperatura durante o armazenamento, a concentração de oxigênio contida no produto e permeabilidade do oxigênio através da embalagem (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; DAVE; SHAH, 1998; OLIVEIRA et al., 2001; LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001; OLIVEIRA; DAMIN, 2003; GUEIMONDE et al., 2004; MORTAZAVIAN et al., 2007).

O estudo da influência das condições da cultura sobre as cinéticas de crescimento e de acidificação e sobre os rendimentos da produção (em biomassa ou em ácido láctico) permite a obtenção de informações interessantes sobre a fisiologia de cepas bacterianas utilizadas industrialmente (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

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

Apesar da importância da viabilidade das bactérias em produtos probióticos, alguns produtos comerciais apresentam problemas quanto a esse aspecto. Em um estudo realizado por Rodas et al. (2001), apenas 4 dentre 8 marcas de iogurte comerciais analisadas apresentaram população de bactérias lácticas superior a 10^6 UFC/mL. Barreto et al. (2003) relataram que nas três amostras de iogurtes analisados as populações de *L. acidophilus* e bifidobactérias foram inferiores a 10^6 UFC/g. No entanto, os leites fermentados

que declararam somente a presença de *L. casei* apresentaram contagem de bactérias viáveis acima de 10^8 /g em todas as amostras analisadas. Segundo estes autores, *L. casei* realmente é uma espécie probiótica adequada para o uso em produtos fermentados, porque sua estabilidade durante a estocagem refrigerada é melhor do que a de *L. acidophilus*.

É importante ressaltar que a perda de viabilidade de *L. acidophilus* e bifidobactérias em produtos lácteos fermentados não é restrita aos produtos brasileiros nem está relacionada exclusivamente ao tempo de estocagem (BARRETO et al., 2003). Esse é um problema decorrente das condições de processo e vários estudos já demonstraram que a resistência de probióticos em iogurtes e leites fermentados é baixa. Levantamentos feitos com produtos comercializados em várias partes do mundo têm apresentado resultados com contagens muito baixas de *L. acidophilus* e bifidobactérias (SHAH et al., 1995; GESLEWITS, 2001).

Além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde que proporcionam, as culturas probióticas podem também contribuir para melhorar o sabor do produto final, uma vez que possuem a vantagem de promover acidificação reduzida do iogurte e dos leites fermentados durante a armazenagem pós-processamento, além de produzir maior quantidade de ácido L(+) láctico quando comparado ao ácido D(-) láctico (GOMES; MALCATA, 1999).

Alguns dos critérios usados na seleção de uma boa cepa de probiótico incluem os requisitos: ter tolerância à acidez do estômago e à bile, ter habilidade de sobreviver ao trânsito pelo trato gastrointestinal, aderir e colonizar a mucosa intestinal, produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos, equilibrar a microbiota intestinal, ter propriedades antígenotóxicas, possuir curto tempo de geração, apresentar boa estabilidade e viabilidade nos alimentos ou preparações em pó, durante e após o processamento, e não ser patogênico ao ser humano (LEE; NOMOTO, SALMINEN, 1999; COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; PARVEZ et al., 2006; KAPITULA; KLEBUKOWSKA; KORNACKI, 2008).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* atuam no intestino delgado, enquanto que as *Bifidobacterium* atuam no intestino grosso. Essas bactérias lançam ao meio seus produtos de metabolismo, principalmente ácidos

orgânicos, como láctico e acético, além de outras substâncias, como peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que apresentam efeito antagonista a patógenos, tais como *Salmonella*, *E. coli* e *Listeria* e outros microrganismos indesejáveis (SILVA; STAMFORD, 2000). O Quadro 1 apresenta um resumo das cepas mais empregadas em produtos probióticos.

Quadro 1 – Cepas comumente empregadas em produtos probióticos.

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp	Outras
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. delbruekii</i> subsp.	<i>B. adolescentis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.
<i>bulgaricus</i>		<i>Dextranum</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Pediococcus acidilacti</i>
<i>L. casei</i>		
<i>L. reuteri</i>		

Adaptado de Ferreira, 2008.

A produção de leites fermentados de alta qualidade contendo probióticos é um grande desafio encontrado pela indústria láctea devido ao caráter sensível desses microrganismos. As bifidobactérias tendem a exibir crescimento fraco e baixa produção de ácido, necessitando maior tempo de fermentação, condições de anaerobiose, baixo potencial redox e adição de fatores de crescimento ao meio. Além disso, esses microrganismos produzem durante a fermentação os ácidos acético e láctico na proporção de 3:2, e por isso, o crescimento excessivo pode originar produtos com gosto e aroma de vinagre, que não serão aceitáveis pelos consumidores. A utilização de outras culturas, como as tradicionais do iogurte e as probióticas do gênero *Lactobacillus*, juntamente com o *B. bifidum* podem minimizar esses problemas (GOMES; MALCATA, 1999).

Gardini et al. (1999) demonstraram que a composição do produto em termos de conteúdo de sólidos totais afeta a viabilidade dos probióticos.

Oliveira e Damin (2003) observaram que a adição de sacarose e a padronização do leite afetam significativamente o tempo para atingir o pH 4,5 quando se emprega a co-cultura *S. thermophilus* e *L. acidophilus*.

A quantidade de adoçante também pode influenciar o tempo de fermentação. Barrantes, Tamime e Sword (1994) demonstraram que a adição de 0,5% de aspartame aumentou o tempo para se atingir o pH 4,4, aumentando, portanto, o tempo de fermentação. Isso pode influenciar nas características do iogurte. Segundo Tamime e Deeth (1980), a fermentação lenta não é desejável, pois aumenta a sinérese.

O sucesso do mercado de alimentos funcionais do ponto de vista da saúde do consumidor e da indústria de alimentos depende da validação científica dos apelos de funcionalidade dos produtos. O desafio, no caso dos probióticos, é o monitoramento efetivo da viabilidade dos microrganismos através de toda a cadeia do alimento (SILVA, 2007).

3.2.2.1. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus foi isolado a partir de fezes de crianças lactentes em 1900 pelos pesquisadores Tissier e Moro e nomeado *Bacillus acidophilus*. Posteriormente, foi denominado *Lactobacillus*, e anos depois, devido às vantagens de ingestão, a indústria de alimentos iniciou a produção de leites fermentados com elevadas contagens deste microrganismo (ITSARANUWAT; HAL HADDAD; ROBINSON, 2003; VASILJEVIC, SHAH, 2008).

Lactobacillus acidophilus é descrito como bacilo circular, Gram-positivo, catalase-negativo, anaeróbio a microaerófilo, não móvel, não esporulante, geralmente de 0,6-0,9 µm, ocorrendo só, aos pares ou formando pequenas cadeias e as colônias são geralmente brancas. *L. acidophilus* são fracos formadores de ácidos e, por esta razão, são especialmente utilizados em iogurtes suaves. Crescem em temperatura entre 20 a 48°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C (FRANCO; LANDGRAF; DESTRO, 1996). Os lactobacilos contribuem com o sabor e aroma em alimentos fermentados, produzindo vários compostos voláteis, como o diacetil e seus derivados (SILVA; STAMFORD, 2000). São bactérias homofermentativas que

produzem nos leites fermentados e iogurtes elevada proporção de ácido láctico na configuração L (BOTTAZZI, 1987).

Encontrado naturalmente na microbiota intestinal e no trato urogenital humano, *L. acidophilus* apresenta como principais funções: proteção contra patógenos, auxílio na digestão da lactose, elevação no padrão nutricional dos alimentos, estimulação da resposta imune intestinal e regulação dos níveis de colesterol no organismo (SACCARO, 2008).

Alguns pesquisadores sugeriram que *L. acidophilus* poderia substituir o *L. bulgaricus* na produção dos leites fermentados. Porém, *L. acidophilus* apresenta baixo crescimento no leite, mesmo quando suplementado com nutrientes, além de produzir um leite fermentado menos saboroso do que o tradicional. Seu tempo de coagulação do leite é de 24 a 28 horas (BOTTAZZI, 1987). Contudo, *L. acidophilus* começou a ser incorporado no iogurte tradicional, a fim de aumentar a popularidade deste alimento, por meio da perspectiva de que apenas esta cultura poderia sobreviver no trato gastrointestinal (TRAMER, 1973).

Gilliland, Staley e Bush (1984) relataram que *L. acidophilus* pode crescer em concentrações fisiológicas de elevada acidez (sais biliares) e estabelecer-se no trato gastrointestinal, promovendo efeitos terapêuticos. Outro estudo demonstrou os efeitos benéficos desses microrganismos na estimulação da resposta imune intestinal, em experimentos com ratos, e na redução dos níveis de colesterol em porcos (LIN et al., 1989).

Diversos autores relataram os efeitos terapêuticos e benéficos de cepas probióticas de *L. acidophilus*, tais como, a redução da diarreia, pólipos e adenomas (MARTEAU et al., 2001) e a prevenção de infecção urogenital com subsequente exposição a três patógenos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

Estudos clínicos comprovaram que a estirpe NCFB 1748 diminui a atividade enzimática fecal, reduz a mutagenicidade fecal, previne a diarreia relacionada à radioterapia e evita a constipação intestinal (FONDEN et al., 2000; SALMINEN et al., 1998). Já a cepa *L. acidophilus* La-5 promove o balanço da microbiota intestinal, protege contra a diarreia do viajante e aumenta a imunidade (FONDEN et al., 2000).

L. acidophilus apresenta necessidades nutricionais complexas para seu crescimento: requer baixa tensão de oxigênio, carboidratos fermentáveis, proteínas e aminoácidos, vitaminas do complexo B, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina, minerais como magnésio, manganês e ferro, e ácidos graxos livres. A presença de aminoácidos do grupo tiol, presentes no soro do leite, peptona e tripsina estimulam seu crescimento (GOMES; MALCATA, 1999).

3.2.3. Interações entre as espécies de bactérias no leite fermentado

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

Variadas espécies de LAB podem conferir distintas características aos leites fermentados. Os compostos metabólicos finais de determinadas culturas podem resultar em produtos organolepticamente indesejáveis (HELLER, 2001).

Diferentes combinações de bactérias iniciadoras e probióticas podem acrescentar ao leite fermentado características tecnológicas, nutricionais e terapêuticas. Contudo, as interações microbianas podem ser benéficas (protocooperação) ou desfavoráveis (antagonismo), ou seja, podem ocorrer mudanças indesejáveis na composição da microbiota bacteriana durante a produção e/ou estocagem refrigerada do produto (BELLENGIER; RICHARD; FOCAUD, 1997).

O leite fermentado contém substâncias secretadas pelas bactérias lácticas tradicionais que influenciam no crescimento de lactobacilos e bifidobactérias. Por isso, a composição das espécies que participam da fermentação influencia na sobrevivência de *L. acidophilus* e de bifidobactérias. *L. bulgaricus* produz substâncias que fazem com que a viabilidade do *L. acidophilus* diminua durante a estocagem refrigerada. O peróxido de hidrogênio é a principal substância responsável por este efeito (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001). Dave e Shah (1997a) observaram que a inibição das

bifidobactérias não era devida aos ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio, mas sim aos efeitos antagônicos das bactérias da cultura tradicional. Dave e Shah (1997c) relataram que a bacteriocina acidofilicina LA-1, produzida por *L. acidophilus* La-1, era ativa contra sete cepas de *L. bulgaricus* e uma cepa de *L. casei*.

Em outros estudos, *L. acidophilus* não permaneceu viável em iogurtes comerciais quando altas populações de *L. bulgaricus* estavam presentes. A presença de *L. bulgaricus* foi apontada como a responsável pela baixa viabilidade dos probióticos, pois na ausência do microrganismo, o abaixamento de pH durante a estocagem era significativamente reduzido. Esta pós-acidificação durante a estocagem pode ser atenuada usando culturas contendo *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. e *S. thermophilus* (culturas ABT) (HULL; ROBERTS, 1984; SHAH, 2000; KOMATSU; BURITI, SAAD, 2008).

B. bifidum depende de outras bactérias lácticas para assegurar seu crescimento. De dezessete cepas de bifidobactérias cultivadas em leite puro, apenas duas sobreviveram. Uma vez que essa espécie não apresenta atividade proteolítica, é importante adicionar hidrolisados de caseína ou co-culturas proteolíticas, como *L. acidophilus*, que produzam os fatores estimulantes de crescimento para as bifidobactérias. Estas duas espécies possuem excelente simbiose (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

A toxicidade causada pelo oxigênio às espécies do gênero *Bifidobacterium*, que são aneróbias estritas, é um problema crítico na produção de leites fermentados. Isso ocorre porque nos probióticos anaeróbios os sistemas de absorção do oxigênio são mínimos ou inexistentes (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007). Durante a fermentação, o oxigênio facilmente penetra e dissolve-se no leite, e também penetra pela embalagem durante a estocagem. Para evitar este problema, foi sugerida a adição de *S. thermophilus*, pois este microrganismo tem alta capacidade de utilização de oxigênio, o que resulta na depleção de oxigênio dissolvido no iogurte, aumentando assim, a viabilidade de *B. bifidum* (ISHIBASHI; SHIMAMURA, 1993).

Diversos estudos já foram realizados para criar alternativas que minimizem os efeitos deletérios do oxigênio sobre tais microrganismos, como por exemplo: a adição de antioxidantes, como o ácido ascórbico e a eliminação

de cepas produtoras de peróxido de hidrogênio (CHAMPAGNE; GARDNER, 2005).

A incorporação dos probióticos nos leites fermentados e sua viabilidade durante a estocagem são desafios constantes para a indústria de alimentos e requerem compreensão dos fatores intrínsecos e extrínsecos associados ao processamento destes alimentos, incluindo a seleção do tipo do material da embalagem. Segundo Matilla-Sandholm et. al. (2002), o material das embalagens e as condições de estocagem são fatores importantes para a qualidade dos leites fermentados probióticos.

A intolerância dos probióticos frente ao oxigênio é um sério problema à indústria de laticínios, pois praticamente todos os produtos probióticos disponíveis no mercado são acondicionados em embalagens plásticas, material muito permeável ao oxigênio (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007)

O uso de embalagens de vidro para o acondicionamento de leites fermentados probióticos também pode contribuir para reduzir a perda da viabilidade celular durante a estocagem (SHAH, 2000), devida à sua baixa permeabilidade ao oxigênio. No entanto, devido ao alto custo e aos perigos inerentes ao seu manuseio, este material torna-se uma escolha inapropriada para os produtos lácteos (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007) Dave e Shah (1997b) estudaram a sobrevivência de bactérias probióticas de iogurtes armazenados em embalagens de plástico e em embalagens de vidro. Houve maior permeabilidade do oxigênio nas embalagens plásticas e as populações de *L. acidophilus* e de bifidobactérias foram diretamente afetadas pelo tipo de embalagem, permanecendo mais elevadas nos iogurtes nas embalagens de vidro.

Outros tipos de materiais, tais como: poliestireno de alto impacto, NUPAK (apresenta estrutura complexa e atua como barreira aos gases) e NUPAK-ZERO (absorve o oxigênio), já foram estudados para avaliar sua permeabilidade ao oxigênio (MILLER et. al. 2003; TALWALKAR et. al., 2004). As quantidades de oxigênio encontradas nos leites fermentados foram: 20 a 40 ppm, 10 ppm, 1,4 a 0,4 ppm, nas embalagens compostas por poliestireno, NUPAK e NUPAK-ZERO, respectivamente.

Estudos adicionais são necessários para selecionar e desenvolver o tipo de embalagem mais apropriado, dos pontos de vista tecnológico e econômico.

3.3. Efeitos terapêuticos de bactérias probióticas

Durante as últimas décadas, as propriedades nutritivas e terapêuticas de alimentos funcionais incorporando bactérias probióticas têm sido alvo de atenção considerável. No entanto, alguns dos resultados obtidos são altamente variáveis e por vezes inconsistentes, o que dificulta o estabelecimento, de forma clara e inequívoca, de um determinado benefício para a saúde. Têm-se verificado grandes progressos e considerável empenho na organização de estudos sobre bactérias probióticas, por meio de ensaios cuidadosamente planejados, randomizados e controlados por placebo para assim poder converter pretensões em fatos cientificamente comprovados (SAXELIN; PESSI; SALMINEN, 1995).

Os principais efeitos terapêuticos e nutritivos atribuídos ao consumo de probióticos, por diversos autores (LEE; SALMINEN, 1995; GOMES; MALCATA, 1999; HOLZAPFEL et al., 1998; MATTILA-SANDHOLM; MATTO; SAARELA, 1999; PARVEZ et al., 2006; SAAD, 2006; HUSSAIN, RAHMAN; ATKINSON, 2009) incluem:

- Equilíbrio da microbiota intestinal e controle de infecções intestinais: mecanismo de “exclusão competitiva”, através da produção de substâncias antimicrobianas ou inibidoras (H_2O_2 , bacteriocinas e sais biliares), competição por sítios de adesão e por nutrientes; diminuição do pH intestinal que reduz a atividade dos microrganismos patogênicos.
- Melhor digestibilidade: degradação parcial de proteínas, lipídeos e hidratos de carbono.
- Melhor valor nutritivo: níveis elevados de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos, como metionina, lisina e triptofano.
- Redução da intolerância à lactose: por meio da produção de β -galactosidase pelas bactérias em leites fermentados; que hidrolisam a lactose em glicose e galactose, resultando em menor teor de lactose nos produtos fermentados.

- Redução do nível de colesterol sérico: inibidores da síntese do colesterol, utilização do colesterol por assimilação e precipitação com sais biliares não-conjugados.
- Atividade anticarcinogênica: inibição dos pró-carcinógenos.
- Modulação da resposta imunológica: ativação do sistema imune, melhor produção de macrófagos, estimulação da produção de células supressoras e interferon γ .

A lista de efeitos benéficos atribuídos ao uso de probióticos e de apelos à saúde está em expansão. A tendência do mercado global é baseada nas expectativas de efeito profilático e, em muitos casos, como alternativa a preparados farmacêuticos convencionais. A lista dos principais benefícios terapêuticos atribuídos ao consumo de probióticos está indicada no Quadro 2.

Quadro 2 – Efeitos cientificamente estabelecidos e potencialmente benéficos à saúde atribuídos às bactérias probióticas

Efeitos benéficos cientificamente estabelecidos
Alívio da intolerância à lactose Prevenção e redução dos sintomas do rotavírus Prevenção e redução dos sintomas associados à diarreia causada por antibióticos Equilíbrio da microbiota intestinal
Efeitos potencialmente benéficos
Tratamento e prevenção de alergias Redução de risco associado à mutagenicidade e carcinogenicidade Redução do nível de colesterol Inibição de <i>Helicobacter pylori</i> e outros patógenos intestinais Estimulação do sistema imune Prevenção de doenças ósseas inflamatórias

Adaptado de Vasiljevic & Shah (2008).

3.4. Processo de fabricação dos leites fermentados

O leite fermentado pode ser obtido do leite de várias espécies de animais, sendo que as comumente utilizadas são de vaca, de cabra e de ovelha. O leite utilizado para fabricação de leite fermentado deve ser de boa procedência e qualidade, pois é responsável pelo seu valor nutricional e qualidade microbiológica. Deve apresentar ausência total ou presença mínima de substâncias estranhas, ausência de microrganismos patogênicos, ser isento de antibióticos, acidez máxima de 20 a 24°D, sabor e odor normais, extrato seco o mais elevado possível e ser proveniente de úberes sãos (PINHEIRO, 2003).

A padronização do leite pode ser feita por adição de leite desnatado ou utilizando-se centrífugas separadoras, até obter-se 15% de sólidos totais, o que melhora a consistência final do iogurte, diminuindo a sinérese no produto, reduzindo ligeiramente a produção de ácido durante a fermentação (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Em seguida, são adicionados os estabilizantes, açúcares e/ou edulcorantes e então, o leite é homogeneizado com os objetivos de melhorar o sabor, o corpo e a consistência do produto final (SPREER; MIXA, 1998). Essa etapa reduz o tamanho dos glóbulos de gordura e impede a formação de uma camada de lipídeos sobre a superfície do leite durante a fermentação, permitindo maior integração da gordura com as micelas de caseína durante a coagulação, resultando no aumento da viscosidade do leite e, conseqüentemente, estabilidade do leite fermentado durante a estocagem (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

O leite para a fabricação do leite fermentado é sempre submetido a um tratamento térmico. Esse tratamento tem como objetivos destruir os microrganismos patogênicos produtores de toxinfecções, como *Salmonella* e *Campylobacter*, e outros que podem competir com as bactérias lácticas, dificultando seu crescimento. O tratamento térmico estimula, também, o início do crescimento da cultura por redução do conteúdo de oxigênio no leite (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Além disso, esta etapa resulta em um produto final com melhor textura, pois promove a desnaturação das proteínas do soro, que reduzem a contração do coágulo da caseína, diminuindo, conseqüentemente, a sinérese (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001).

O tratamento térmico varia desde a pasteurização rápida até um processo de *Ultra High Temperature* (UHT) (VARNAM; SUTHERLAND, 1994). Mantendo-se o leite a 85°C por 20-30 minutos mais de 85% das proteínas do soro são desnaturadas (BRANDÃO, 1995). Schmidt et al. (1980) relataram que iogurtes elaborados com leites aquecidos a 90°C por 30 minutos apresentavam-se com aparência granulosa, enquanto iogurtes preparados com leites aquecidos a 80 ou 85°C por 30 minutos foram descritos como suaves e de corpo firme.

Após o tratamento térmico, o leite para a produção do leite fermentado é resfriado até 42°C para a inoculação das culturas tradicionais e/ou probióticas (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001). A temperatura ótima de incubação para o crescimento das culturas é de 40-45°C. É desejável que a fermentação se complete em 4-5 horas (TAMIME; ROBINSON, 1999).

Durante o processo de fermentação, a caseína sofre modificações de acordo com a variação de pH: (a) pH 5,5-5,2: ocorrem desintegrações parciais, formando espaços vazios entre as micelas; (b) pH 5,2-4,8: ocorre contração do agregado de caseína, formando partículas maiores que as micelas originais; (c) pH \leq 4,5: ponto isoelétrico da caseína, quando ocorre agregação das partículas de caseína, formando uma rede de proteínas que retém os constituintes do leite e a fase aquosa (TAMIME; ROBINSON, 1999).

Ao final da fermentação o coágulo deve apresentar pH entre 4,5 e 4,7 e uma concentração de ácido láctico de 0,9%; o gel deve ser liso, brilhante, sem desprendimento de soro ou gases (TAMIME; ROBINSON, 1999). O controle do pH é importante no processo de fermentação, pois a separação do soro está diretamente relacionada com este parâmetro. Em produtos com pH maior que 4,6 a coalhada não é suficientemente formada, favorecendo a sinérese. Por outro lado, em produtos com pH menor do que 4,0, ocorre a separação do soro devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo (BRANDÃO, 1995).

Após a fermentação, é feito o resfriamento, seguido do envase. Como a elaboração do leite fermentado é um processo biológico, é necessário o uso da refrigeração para controlar a atividade metabólica dos microrganismos e suas enzimas. Além de reduzir a atividade metabólica da cultura, o

resfriamento tem as funções de controlar a acidez do produto final e de prevenir a pós-acidificação (TAMIME, ROBINSON; LATRILLE, 2001).

Para evitar o choque térmico, que provoca um encolhimento da massa e danos ao coágulo, é recomendado que se faça o resfriamento em duas etapas, uma vez que o resfriamento muito rápido pode provocar a separação de soro no iogurte (TAMIME; DEETH, 1980; VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

Na primeira etapa deve-se reduzir a temperatura a 18 a 20°C em, no máximo, 90 minutos. O próximo passo é a quebra do coágulo com agitação, visando obter uma massa de textura homogênea. Na segunda etapa do resfriamento, a redução da temperatura da massa deve atingir a temperatura de 10°C (SPREER; MIXA, 1998). Esta quebra do coágulo reduz parcialmente o problema da sinérese, pois o soro liberado é novamente incorporado (TAMIME; ROBINSON; LATRILLE, 2001).

O aparecimento do sabor característico do iogurte ocorre durante as 12 horas posteriores ao resfriamento, proporcionando as características finais de um bom iogurte (TAMIME; DEETH, 1980).

3.5. 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 do pH durante o armazenamento refrigerado devido à atividade metabólica persistente das bactérias lácticas. A pós-acidificação é mais intensa nos primeiros sete dias de fabricação do iogurte devido ao consumo de lactose, produção de ácido láctico e a alta atividade metabólica das bactérias em pH mais elevados (BEAL et al., 1999).

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 do pH. Uma pós-acidificação intensa pode afetar a viabilidade das bactérias lácticas, principalmente das bactérias probióticas *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001).

A excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontável 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 tratamento térmico (85°C/5 minutos) 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* e *Bifidobacterium* spp. em cocultura com *S. thermophilus* (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2001). 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).

3.6. Edulcorantes

A história de uso de açúcar provém da afinidade dos seres humanos por substâncias doces; estudos fisiológicos e psicológicos ressaltam a importância do uso de substâncias doces em alimentos e bebidas. Os açúcares funcionam como combustíveis do metabolismo humano, e suas características sensoriais são indicativas desta capacidade (BARTOSHUK, 1991).

Porém, o incremento do uso de sacarose na dieta recebeu grande atenção nos Estados Unidos em meados dos anos sessenta, época em que alguns efeitos adversos foram observados em certos segmentos da população, como doenças coronárias crônicas, obesidade, diabetes e hipertensão, as quais foram atribuídas ao consumo excessivo de açúcar. Desde então, alternativas para substituição da sacarose por outros adoçantes tornaram-se uma imposição e, a pesquisa sobre edulcorantes passou a receber especial atenção (BARTOSHUK, 1991). Os indivíduos que, por diversas razões, precisam substituir a sacarose por adoçantes não calóricos procuram por produtos que sejam dotados de gosto e características próximas às da sacarose.

Integrado às novas tendências, vem crescendo o número de edulcorantes de baixo ou nenhum valor calórico, disponíveis para aplicações em alimentos e bebidas, vindo a constituir uma das áreas mais dinâmicas no

campo dos aditivos. Existem alguns aspectos principais sob os quais os edulcorantes são avaliados. Estes incluem a segurança, solubilidade, estabilidade, sabor e custo (GIESE, 1993; GRICE; GOLDSMITH, 2000).

A RDC nº3, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), classifica os edulcorantes que tem o uso permitido no Brasil em:

- Naturais: sorbitol, manitol, isomalte, esteviosídeo, maltitol, lactitol, xilitol.
- Artificiais: acesulfame de potássio, aspartame, ácido ciclâmico e seus sais de cálcio, potássio e sódio, sacarina e seus sais de cálcio, potássio e sódio, sucralose.

O *Codex Alimentarius* classifica os edulcorantes em:

- Edulcorantes intensos: fornecem somente doçura acentuada, não desempenham nenhuma outra função tecnológica no produto final, são pouco calóricos ou efetivamente não calóricos e são utilizados em pequenas quantidades.
- Adoçantes de corpo: fornecem textura e energia ao alimento, geralmente contém o mesmo valor calórico do açúcar e são utilizados em quantidades maiores.

Adoçantes são combinações de edulcorantes, formulados para serem adicionados a alguns alimentos. A quantidade adicionada aos leites fermentados pode aumentar o tempo de fermentação e levar a um baixo desenvolvimento de acidez. Isto se deve aos efeitos osmóticos dos solutos no leite e à baixa atividade de água (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

3.6.1. Sacarina

A sacarina foi descoberta em 1878 por Ira Remesen e Constantine Fahlberg na Universidade John Hopkins - NY. Pode ser comercializada na forma ácida ou de sais de sódio, cálcio ou amônia (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996). É um pó branco, cristalino e estável, e possui dulçor de 240 a 350 vezes mais doce que a sacarose. Apresenta características que a tornam muito próxima do adoçante ideal: alta solubilidade, alta estabilidade, não higroscópica, não cariogênica, poder calórico nulo e baixo custo, considerando a relação custo/poder edulcorante (NABORS, 2001). É conhecida por seu gosto amargo e sabor residual metálico ou adstringente que tende a

intensificar-se com o aumento da concentração. Esse sabor pode ser mascarado pela mistura com outros adoçantes, tais como ciclamato, aspartame, acesulfame-k e sucralose (PINHEIRO et al., 2005).

A sacarina e seus sais não apresentam decomposição quando submetidos a longos períodos de estocagem. Outra grande vantagem deste adoçante é sua estabilidade em uma ampla faixa de pH (2,0 a 8,0) e de temperatura (1 a 150°C). Em meios onde o pH é menor do que 2,0 e em temperaturas extremamente altas pode ocorrer a decomposição hidrolítica da sacarina com formação de dois ácidos, sendo que nenhum destes compostos possui gosto doce. Quando é exposta a temperaturas superiores a 380°C, ou a exposição prolongada a condições extremas de pH e de temperatura, ocorre a decomposição com a liberação de substâncias tóxicas como o óxido de nitrogênio e o enxofre (NELSON, 2000).

3.6.2. Ciclamato

O ciclamato foi descoberto acidentalmente por Michael Sveda, da Universidade de Illinois, em 1937. A *Food and Drugs Administration* (FDA) dos Estados Unidos reconheceu o ciclamato, em 1958, como um adoçante seguro para o consumo e uma mistura de ciclamato e sacarina foi introduzida no mercado de adoçantes (NABORS, 2001). Em 1969, estudos científicos relataram que o ciclamato causava tumores malignos em ratos e, por isso, ele foi banido dos Estados Unidos (NIKOLELIS; PANTOULIAS, 2001; SPILLANE et al., 1996). Outros países não aderiram a esta medida e estudos subseqüentes realizados mostraram que o ciclamato não é carcinogênico (NELSON, 2000).

O ciclamato é um pó branco e cristalino, não carcinogênico, não higroscópico, não calórico e 30 vezes mais doce do que a sacarose. Apesar de ter um poder adoçante relativamente menor que os outros adoçantes, seu dulçor é adequado principalmente quando usado em combinação com outros edulcorantes mais potentes. A doçura relativa deste adoçante tende a decrescer em maiores concentrações. Em altas concentrações, o ciclamato apresenta gosto amargo e residual. O seu poder adoçante também varia com o meio e deve ser determinado para cada produto (NABORS, 2001). O ciclamato é mais freqüentemente misturado com a sacarina na proporção de 10:1. Em

média 10-20% de sinergismo é observado quando estes dois adoçantes são usados juntos (PORTMANN; KILCAST, 1998).

3.6.3. Aspartame

O aspartame pode ser sintetizado de uma mistura de compostos por reação química ou ação de enzimas com alta especificidade. Consiste de ácido L-aspartico (39,5%), éster metílico (10,5%) e da L-fenilalanina (50%). O aspartame é um pó branco cristalino com poder adoçante de 160-220 vezes superior ao da sacarose. Possui o perfil de doçura que mais se aproxima da sacarose, apesar de se desenvolver mais lentamente e persistir por mais tempo. É mais potente em baixas concentrações e em produtos à temperatura ambiente, acentuando o aroma e prolongando a percepção do sabor das frutas, principalmente das frutas ácidas (NUTRASWEET, 1996).

Este adoçante não deixa gosto residual amargo ou metálico. É pouco solúvel em água, sendo que a solubilidade aumenta à medida que o pH diminui ou que a temperatura aumenta. A estabilidade do aspartame é afetada pela umidade, pH (neutro ou alcalino) ou por temperaturas elevadas. Em geral, é estável em sistemas líquidos acidificados em pH entre 3-5 e é menos estável em pH maior que 5,0, sendo que o pH ótimo é 4,3 (NABORS, 2001). Apesar da instabilidade frente a temperaturas elevadas, vários processamentos como *Ultra High Temperature* (UHT) ou *High Temperature Short Time* (HTST) promovem perdas inferiores a 3% na doçura do produto adoçado com aspartame (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

3.6.4. Acesulfame-K

O acesulfame-K é um pó cristalino, branco e não higroscópico. O seu poder adoçante é cerca de 200 vezes superior ao da sacarose. Normalmente, considera-se que seu poder edulcorante equivale à metade do poder da sacarina, é similar ao do aspartame e de quatro a cinco vezes maior do que o do ciclamato. O seu gosto é percebido rapidamente e não deixa gosto residual. Em soluções aquosas com altas concentrações deste adoçante, um gosto amargo pode ser percebido (PINHEIRO et al., 2005).

A estabilidade em solução depende do pH e da temperatura. É altamente estável em solução na faixa de pH de 3 ao neutro. Não é afetado por processos como pasteurização, esterilização, e processos UHT. Não é higroscópico e é rapidamente solúvel em água (CÂNDIDO; CAMPOS, 1996).

Um forte efeito sinérgico é obtido quando se mistura acesulfame-K e aspartame, resultando em poder edulcorante 300 vezes superior ao da sacarose. A proporção empregada geralmente é de 1:1. Com a mistura de acesulfame-K e aspartame obtêm-se gosto mais próximo ao da sacarose do que quando os dois são utilizados separadamente. O acesulfame-K apresenta boa estabilidade em água, em ampla faixa de pH (2,6-7,0) e é resistente à pasteurização e à esterilização (NABORS, 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias-primas e ingredientes

- Leite desnatado em pó Molico[®] (Nestlé)
- Cultura láctica mista Rich[®], contendo *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, fornecida pela Chr. Hansen, Valinhos, Brasil.
- Cultura láctica pura La-5, contendo *L. acidophilus*, fornecida pela Chr. Hansen, Valinhos, Brasil.
- Aspartame (Ajinomoto, Valinhos, Brasil)
- Sacarina (Doremus, Guarulhos, Brasil)
- Ciclamato (Clariant, São Paulo, Brasil)
- Adoçante comercial Gold[®] (aspartame + acesulfame-K)
- Sacarose: usada como referência para comparar os leites fermentados elaborados com edulcorantes.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das culturas lácticas

A cultura pura La-5, para processamento industrial (25 gramas), liofilizada e de uso direto, foi dissolvida assepticamente em 1000 mL de leite em pó reconstituído a 14%, previamente submetido ao processo de tindalização e resfriado a 5°C. Em seguida, foi distribuída em tubos de ensaio esterilizados que foram mantidos em congelador a -18°C. Na ocasião do uso das culturas, as mesmas foram descongeladas e inoculadas diretamente em leite em pó desnatado reconstituído e demais ingredientes para a fabricação do leite fermentado. A cultura mista Rich é comercializada para uso direto no leite a ser usado na fermentação em pequena escala, sem a necessidade de preparo.

4.2.2. Preparo dos leites fermentados e planejamento experimental

Para o estudo do efeito das variáveis: teor de ingrediente (2), tipo de ingrediente (4 + controle) e composição da cultura láctica (2) sobre as características físico-químicas e microbiológicas de leites fermentados foram efetuadas 18 formulações, em duplicata, de forma aleatorizada, distribuídas em 2 processamentos, de acordo com a cultura utilizada, Rich ou La-5, totalizando 36 experimentos (Tabela 1). O planejamento experimental foi feito por meio de delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os leites fermentados foram elaborados de acordo com o diagrama apresentado na Figura 2.

Tabela 1 – Planejamento dos experimentos contendo as variáveis e os níveis de variação.

Tratamentos	C	SAC	ASP	SCI	ASA
1	Sem adição				
2		5%			
3			0,025%		
4				0,025%	
5					0,014%
6		7%			
7			0,035%		
8				0,035%	
9					0,020%

C – controle; SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K. Foram considerados valores de doçura superiores ao da sacarose: ASP (200 vezes mais doce do que a SAC), SCI (200 vezes mais doce do que a SAC), ASA (350 vezes mais doce do que a sacarose).

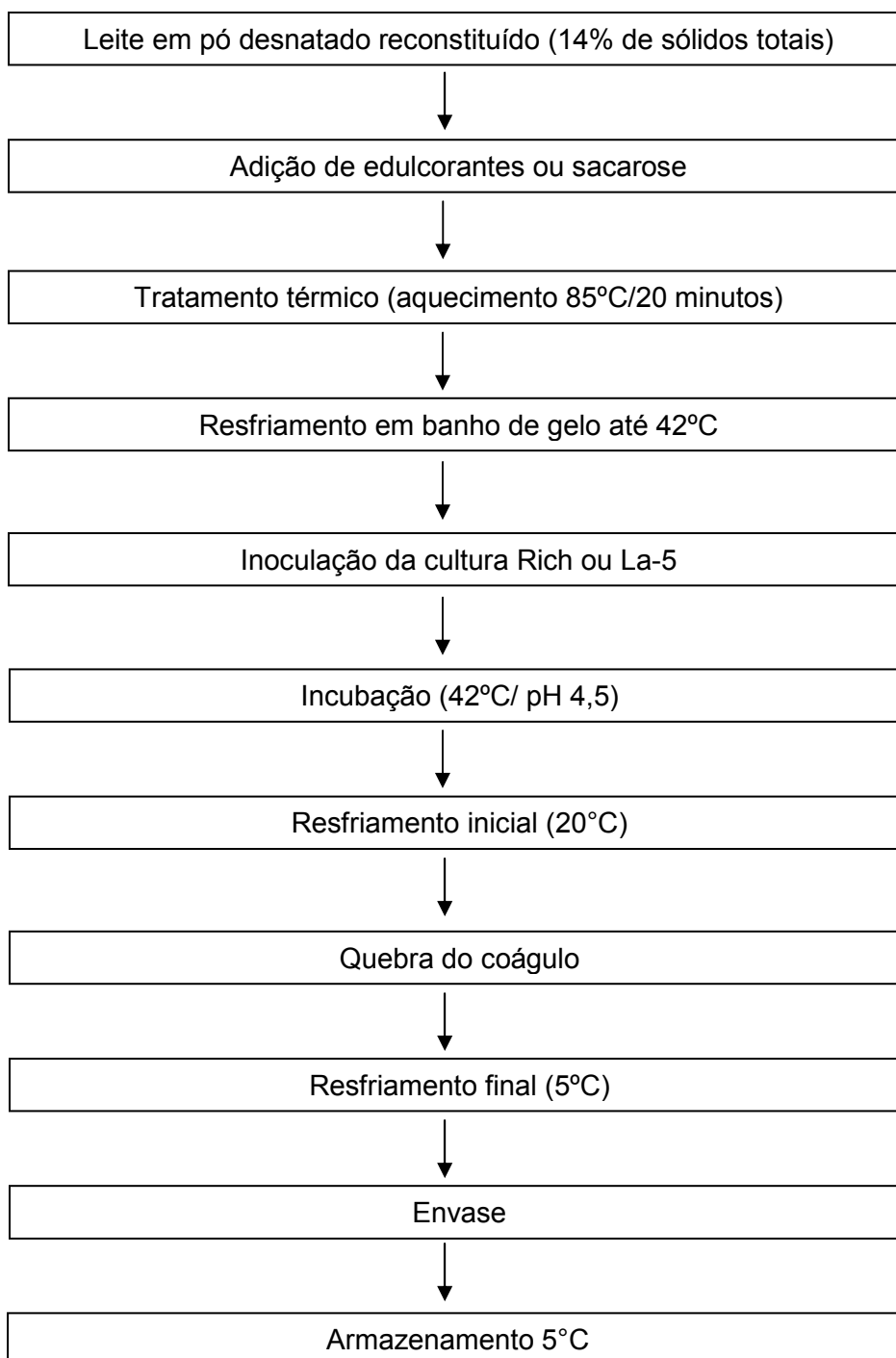


Figura 2 – Diagrama de blocos do processo de obtenção dos leites fermentados produzidos com diferentes tipos e concentrações de edulcorantes, fermentados por diferentes culturas lácticas.

Para os tratamentos, 2000 mL de leite reconstituído foram aquecidos a 60°C para obter 14% de sólidos totais. Uma das misturas não recebeu nenhum tipo de ingrediente (controle) e as demais foram acrescidas de aspartame, sacarose, sacarina + ciclamato, ou aspartame + acesulfame-K, conforme o experimento, em quantidades correspondentes a 5 e 7% de sacarose. A seguir, a mistura foi aquecida a 85°C e mantida por 20 minutos em banho-maria para ocorrer apasteurização do leite e a desnaturação das proteínas do soro. Passado esse tempo, foi resfriada em banho de água e gelo até atingir 42°C, para receber a cultura láctica em condições assépticas. Para a produção de leite fermentado com a cultura Rich, foi dissolvido 1 g da cultura diretamente no leite após o tratamento térmico, seguindo recomendações do fabricante. Para a produção de leite fermentado com cultura La-5, foram utilizados 10 mL do inóculo previamente preparado.

Separou-se aproximadamente 200 mL dessa base para a produção dos leites fermentados para as análises físico-químicas. O produto foi distribuído em frascos estéreis e incubado em banho termostaticado com circulação de água (Figura 3), até obter-se o pH 4,5. Foi feito o controle do pH durante o tempo de incubação, utilizando-se o registrador automático (Data Logger, Instrutherm Ltda, São Paulo, Brasil) (Figura 4).

Terminada a fermentação, foi feito um resfriamento inicial em banho de água e gelo até aproximadamente 20°C, e a quebra do coágulo por agitação manual por 2 minutos de forma padronizada para todos os tratamentos, seguida de resfriamento final até aproximadamente 5°C. Os leites fermentados foram embalados em copos transparentes com tampas termossoldáveis e armazenados à temperatura de 5°C.



Figura 3 – Banho termostatzado contendo os frascos com a base para a produção dos leites fermentados.

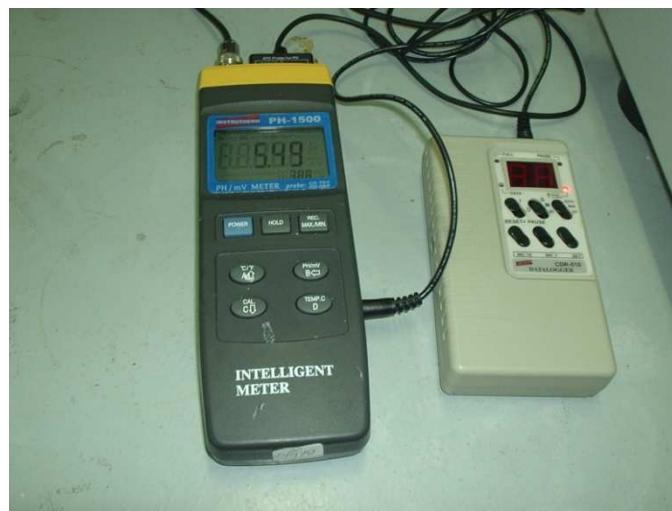


Figura 4 – Aparelho Data Logger acoplado a um pHmetro digital para registro do pH do leite durante a fermentação.

Análises físico-químicas do leite em pó reconstituído usado para a para a fabricação dos leites fermentados

Para a análise do leite em pó reconstituído foi utilizado o equipamento Ekomilk (EON Trading & Bulteh, Stara Zagora, Bulgária) que utiliza o princípio de ultrassom e correlaciona os dados obtidos com a composição do leite. O equipamento fornece os teores de gordura, proteínas e sólidos totais. Além destas análises, foi quantificada a acidez titulável por titulação ácido-alcalimétrica usando-se a solução de NaOH 1/9 N e fenolftaleína como indicador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.4. Análises físico-químicas da base obtida para a produção dos leites fermentados

O leite reconstituído adicionado ou não de ingredientes, logo após a inoculação da cultura láctica, foi submetido às análises físico-químicas em triplicata, descritas a seguir.

- Sólidos totais: determinados a partir da secagem da amostra em estufa a vácuo por 24h a 70°C (CASE; BRADLEY JUNIOR.; WILLIAMS, 1985).
- Proteínas: as análises foram realizadas baseando-se na determinação de nitrogênio, pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1980). Para a conversão do teor de nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,38, específico para a conversão da relação nitrogênio/proteína para leite.
- Cinzas: determinada por incineração em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- Gordura: determinada utilizando-se o método de Gerber (CASE; BRADLEY JUNIOR.; WILLIAMS, 1985).
- Acidez titulável: foi quantificada por titulação ácido-alcalimétrica usando-se a solução de NaOH 1/9 N e fenolftaleína como indicador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- Carboidratos: calculado pela diferença entre sólidos totais e o somatório dos teores de gordura, proteína e cinzas.

- Cálculo do valor calórico: por meio dos resultados das análises de carboidratos, proteínas, gordura, estimou-se os valores calóricos dos produtos, considerando-se proteínas, gorduras e carboidratos como aportando 4, 9 e 4 Kcal/g, respectivamente. Os resultados foram expressos em Kcal/100g de amostra.

4.5. Caracterização dos leites fermentados

4.5.1. Tempo de fermentação

O tempo de fermentação dos iogurtes foi calculado a partir da inoculação até atingir o pH de 4,5. O valor de pH dos iogurtes foi determinado continuamente em potenciômetro digital com registro automático para a construção da curva de pH em função do tempo.

4.5.2. Viabilidade dos microrganismos

A avaliação da viabilidade dos microrganismos componentes da cultura láctica nas amostras de leites fermentados preparados foi feita após 1, 14 e 28 dias de fabricação, a partir de diluições decimais seriadas. Foram transferidos 10 mL da amostra de forma asséptica para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de água peptonada 0,1%. Esta solução foi agitada vigorosamente e, em seguida, foram feitas as diluições subseqüentes utilizando-se o mesmo diluente e inoculações por profundidade em meios seletivos para a contagem dos microrganismos. O resultado foi multiplicado pela recíproca da diluição e valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro – UFC/mL. As populações obtidas foram transformadas em logaritmo de base 10. Os meios seletivos utilizados para cada tipo de microrganismo foram:

- *Streptococcus thermophilus*: foi utilizado o ágar M17. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em aerobiose a 37°C por 48 horas (IDF, 1997).
- *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: foi utilizado o ágar *De Man Rogosa Sharp* (MRS) glicose acidificado até pH 5,4. Após a inoculação,

as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) a 37°C por 72 horas (IDF, 1997).

- *Lactobacillus acidophilus*: foi utilizado o ágar *Homofermentative Heterofermentative Differential Medium* (HHD), incubado a 37°C por 72 horas em anaerobiose em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (PROBAC) (BARRETO et al., 2003).

4.5.3. Análises físico-químicas dos leites fermentados

O leite fermentado foi submetido às seguintes análises físico-químicas, após 1, 14 e 28 dias de fabricação, em triplicata:

- Acidez final: as determinações dos teores de acidez foram realizadas por meio de titulação ácido-alcalimétrica, usando-se NaOH 1/9 N e fenolftaleína como indicador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- Sinérese: a susceptibilidade dos leites fermentados à sinérese foi determinada transferindo 100 mL de amostra para uma peneira de aço inox (mesh 120 – ABNT 120) acoplada a um funil, medindo o volume de soro coletado após 2 horas a 5°C, em uma proveta graduada de 50 mL (HASSAN et al., 1996).
- Capacidade de retenção de água (CRA): a capacidade de retenção de água foi determinada submetendo-se 10 g de uma amostra em teste à centrifugação a 15000 x G por 15 minutos a 20°C (HARTE et al., 2003). A CRA é expressa como:

$$CRA(\%) = \left[1 - \frac{\text{Peso do soro após centrifugação}}{\text{Peso do iogurte}} \right] \times 100$$

4.6. Análise estatística dos resultados experimentais

Foi feita a Análise de Variância (ANOVA) e a comparação entre as médias pelo Teste de Tukey, considerando-se um nível de significância $p < 0,05$, utilizando o programa computacional ESTAT (BANZATO E KRONKA, 1995).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química do leite em pó reconstituído

A caracterização físico-química do leite reconstituído foi feita com o objetivo de determinar o teor de gordura, de sólidos totais, de acidez titulável e de proteínas e avaliar se o leite em pó poderia ser utilizado como matéria-prima para a fabricação dos leites fermentados.

Os valores médios das avaliações do leite reconstituído a 14% de sólidos totais (lotes 1 e 2) encontram-se na Tabela 2. Apesar de alguns valores serem diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), os resultados mostraram diferenças mínimas entre os dois lotes de leite em pó utilizados para a elaboração dos leites fermentados dos diferentes tratamentos. Estes valores estão de acordo com o Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (RISPOA) pelo artigo 476, onde define que para o leite desnatado em pó reconstituído ser considerado normal deve apresentar teor de acidez entre 15 e 20°D, teor de gordura máximo de 1,5% e umidade máxima de 4% (BRASIL, 1997). Segundo Neirotti e Oliveira (1988), a composição do leite deve apresentar em média 3,7% de proteínas.

A acidez do leite deve-se a presença de caseína, fosfatos, albumina, dióxido de carbono e citratos. A transformação da lactose por enzimas microbianas, com formação de ácido láctico, pode elevar a acidez do leite, indicando alta atividade microbiana e tornando o produto impróprio ao consumo (VELOZO et al., s.d.). O leite apresenta conteúdo médio de extrato seco total de 13,1% (AMIOT, 1991). No entanto, é comum se efetuar a correção do teor de sólidos do leite de 14 a 16% para a fabricação de leites fermentados.

Tabela 2 – Características físico-químicas do leite em pó reconstituído.

Lotes	Gordura (%)	Sólidos totais (%)	Proteínas (%)	Acidez (°D)
Lote 1	0,13 ^a	14,37 ^a	5,30 ^a	24,34 ^b
Lote 2	0,05 ^b	14,30 ^a	5,26 ^b	24,78 ^a

^{a, b} Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$)

5.2. Caracterização físico-química da base obtida para a produção dos leites fermentados

As análises físico-químicas foram realizadas nas bases obtidas para a produção dos leites fermentados, pois segundo Tamime e Deeth (1980), a composição do iogurte é similar à do leite, embora se reconheça que há diferenças devido às mudanças promovidas pela fermentação. Analisando-se as bases, portanto, foi possível avaliar as características físico-químicas do produto final produzido pelas culturas Rich e La-5 (Tabelas 3 e 4, respectivamente).

5.2.1. Teor de sólidos totais

A análise de variância do teor de sólidos totais indica que todos os tratamentos, com exceção daqueles elaborados com sacarose, foram estatisticamente iguais entre si ($p < 0,05$), para ambas as culturas analisadas.

Os teores de sólidos totais apresentaram valores entre 14,47 e 19,95% para a cultura Rich e 14,40 e 19,79% para a cultura La-5 (Tabelas 3 e 4). Os diferentes tipos de edulcorantes e suas concentrações não tiveram efeitos significativos no teor de sólidos totais das bases para os leites fermentados, uma vez que foram adicionados em concentrações muito baixas. Os produtos que apresentaram os maiores teores foram elaborados com 7% de sacarose, para ambas as culturas testadas.

Os teores de sólidos obtidos em todos os tratamentos foram considerados normais, pois segundo Tamime e Deeth (1980), o leite usado para fabricação de iogurtes pode apresentar de 9 a 30% sólidos totais, porém, teores acima de 25% afetam a disponibilidade da umidade e retardam a atividade da cultura. A firmeza e a consistência do iogurte são atributos tecnológicos importantes na aceitação do produto pelo consumidor. Segundo Tamime e Robinson (1999), quanto maior o extrato seco do leite utilizado para a fabricação do iogurte, maiores serão estes atributos tecnológicos.

Tabela 3 - Características físico-químicas das bases para a preparação dos leites fermentados pela cultura Rich.

Tratamentos	Sólidos Totais %	Proteínas %	Cinzas %	Gordura %	Acidez % ac. láctico
Controle	14,64 ^c ± 0,03	5,09 ^a ± 0,16	1,24 ^{ab} ± 0,02	0,10 ^a ± 0,00	0,26 ^a ± 0,03
SAC 5%	18,53 ^b ± 0,11	4,96 ^a ± 0,35	1,17 ^{ab} ± 0,04	0,08 ^a ± 0,04	0,25 ^a ± 0,01
ASP 0,025%	14,83 ^c ± 0,18	5,09 ^a ± 0,04	1,29 ^a ± 0,04	0,10 ^a ± 0,00	0,27 ^a ± 0,04
SCI 0,025%	14,69 ^c ± 0,02	5,07 ^a ± 0,16	1,30 ^a ± 0,03	0,10 ^a ± 0,00	0,26 ^a ± 0,04
ASA 0,014%	14,50 ^c ± 0,13	5,05 ^a ± 0,26	1,23 ^{ab} ± 0,00	0,10 ^a ± 0,00	0,25 ^a ± 0,03
SAC 7%	19,95 ^a ± 0,14	4,81 ^a ± 0,35	1,13 ^b ± 0,03	0,08 ^a ± 0,04	0,26 ^a ± 0,01
ASP 0,035%	14,81 ^c ± 0,11	5,10 ^a ± 0,09	1,22 ^{ab} ± 0,04	0,10 ^a ± 0,00	0,27 ^a ± 0,04
SCI 0,035%	14,70 ^c ± 0,05	5,19 ^a ± 0,01	1,30 ^a ± 0,02	0,10 ^a ± 0,00	0,26 ^a ± 0,03
ASA 0,020%	14,47 ^c ± 0,04	5,00 ^a ± 0,06	1,22 ^{ab} ± 0,01	0,12 ^a ± 0,02	0,27 ^a ± 0,06

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c} Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Tabela 4 - Características físico-químicas das bases para a preparação dos leites fermentados pela cultura La-5.

Tratamentos	Sólidos Totais %	Proteínas %	Cinzas %	Gordura %	Acidez % ac. láctico
Controle	14,61 ^c ± 0,21	5,05 ^a ± 0,06	1,21 ^a ± 0,05	0,11 ^b ± 0,01	0,26 ^a ± 0,03
SAC 5%	18,37 ^b ± 0,01	4,78 ^a ± 0,17	1,17 ^a ± 0,08	0,11 ^b ± 0,01	0,25 ^a ± 0,01
ASP 0,025%	14,30 ^c ± 0,18	4,94 ^a ± 0,08	1,17 ^a ± 0,06	0,10 ^b ± 0,00	0,26 ^a ± 0,00
SCI 0,025%	14,58 ^c ± 0,00	5,05 ^a ± 0,04	1,18 ^a ± 0,06	0,12 ^b ± 0,02	0,24 ^a ± 0,00
ASA 0,014%	14,54 ^c ± 0,30	5,04 ^a ± 0,25	1,21 ^a ± 0,01	0,12 ^b ± 0,02	0,26 ^a ± 0,02
SAC 7%	19,79 ^a ± 0,24	4,71 ^a ± 0,16	1,17 ^a ± 0,02	0,10 ^b ± 0,00	0,25 ^a ± 0,02
ASP 0,035%	14,40 ^c ± 0,01	4,95 ^a ± 0,08	1,20 ^a ± 0,04	0,10 ^b ± 0,00	0,26 ^a ± 0,00
SCI 0,035%	14,65 ^c ± 0,03	5,00 ^a ± 0,01	1,29 ^a ± 0,09	0,10 ^b ± 0,00	0,25 ^a ± 0,01
ASA 0,020%	14,49 ^c ± 0,23	5,01 ^a ± 0,25	1,26 ^a ± 0,05	0,15 ^a ± 0,00	0,26 ^a ± 0,02

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c} Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Thamer e Penna (2006) encontraram sólidos totais entre 15,68 e 18,97% em bebidas lácteas probióticas acrescidas de prebióticos. Pinheiro (2003) obteve teores de sólidos totais variando de 13,38 a 20,37% em iogurtes probióticos de baixa caloria. Dave e Shah (1997b) elaboraram iogurtes com culturas comerciais e determinaram teores de sólidos totais entre 15,99 e 16,24%.

Segundo Tamime e Deeth (1980), o iogurte natural com extrato seco total entre 9,5 e 12,0% requer maior desnaturação das soroproteínas do que o iogurte com sólidos totais acima de 14%, para aumentar a capacidade de retenção de água e evitar o dessoramento.

5.2.2. Teor de proteínas

A análise de variância indica que não houve diferença significativa entre os teores de proteínas para os tratamentos, para ambas as culturas ($p < 0,05$). As quantidades de cada ingrediente adicionadas para a preparação dos leites fermentados tiveram diferenças muito pequenas entre si e, além disso, nenhum dos ingredientes utilizados é fonte de proteínas.

Os teores de proteínas variaram entre 4,81 e 5,10 % para a cultura Rich e entre 4,71 e 5,05% para a cultura La-5 (Tabelas 3 e 4) e estão compreendidos na faixa estabelecida pela legislação brasileira para iogurtes desnatados, que deve ser de no mínimo 2,9% de proteínas (BRASIL, 2000).

Alguns aspectos da qualidade dos iogurtes são afetados pelo teor de proteínas e, por isso, é comum utilizar produtos com alto teor protéico para a padronização do leite antes da fermentação (TAMIME; ROBINSON, 1999).

Tamime e Robinson (1999) afirmam que durante o processo de elaboração de leites fermentados há um aumento do teor de aminoácidos livres e peptídeos. As proteínas possuem importantes características tecnológicas e desempenham um papel importante na formação do coágulo e, portanto, a consistência e a viscosidade do produto são diretamente proporcionais à concentração das mesmas. Além disso, contribuem com a redução da sinérese em produtos lácteos.

Segundo Rasic e Kurman (1978), leites fermentados com maior teor de proteínas possuem maior tempo de vida útil do que controles produzidos sem

aumento do teor de sólidos, devido ao aumento da inibição da degradação da lactose combinado com o aumento da capacidade tamponante.

Os valores obtidos estão próximos aos encontrados por Barrantes, Tamime e Sword (1994), que relataram teores entre 5,40 e 5,65% estudando a qualidade de iogurtes usando leite em pó desnatado e substitutos de gordura. Pinheiro (2003) obteve teores de proteínas entre 4,91 e 5,95% em iogurtes probióticos elaborados com edulcorantes com 14% de sólidos totais. Dave e Shah (1997b) encontraram teores de proteínas entre 3,55 e 3,65% em iogurtes elaborados com culturas comerciais. Torres et al. (2000) relataram teor de proteína de 4,29% em iogurtes. Saccaro (2008) obteve teores de proteínas de 4,12% em leite fermentados no dia de sua fabricação.

O teor de proteínas pode ser muito variável conforme o produtor. Em um estudo realizado por Venturoso et al. (2007) leites fermentados preparados em laboratório mostraram teores de proteína de 4,87 a 5,57%, enquanto leites fermentados comerciais tiveram de 1,75 a 2,95% de proteínas.

5.2.3. Teor de cinzas

As bases para a preparação dos leites fermentados apresentaram uma variação de 1,13 a 1,30% de cinzas para a cultura Rich (Tabela 3) e de 1,17 a 1,29% para a cultura La-5 (Tabela 4), relacionada à variação das formulações das misturas. O teor de cinzas dos produtos elaborados com açúcar foi ligeiramente inferior aos demais, provavelmente pelo acréscimo de sólidos totais proporcionados pelo açúcar. A análise de variância indica que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos da cultura Rich. Para a cultura La-5, os resultados nos teores de cinzas não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Rodas et al. (2001) analisaram 136 amostras de iogurtes com frutas e encontraram teores de cinzas que variaram de 0,64 a 0,77%. Gomes (2005) obteve de 0,60 a 0,83% de cinzas em bebidas lácteas probióticas. Em outro estudo realizado por Lima, Almeida e Gigante (2006), o valor de cinzas de iogurtes do tipo firme variou de 0,75 a 1,17%. Thamer e Penna (2006) elaboraram bebidas lácteas funcionais e os maiores teores de cinzas foram de 0,61%.

5.2.4. Teor de gordura

O teor de gordura nas bases manteve-se na faixa de 0,08 a 0,12% para a cultura Rich (Tabela 3) e de 0,10 a 0,15% para a cultura La-5 (Tabela 4). De acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2000), os leites fermentados produzidos com leite desnatado devem apresentar conteúdo de matéria gorda de no máximo 0,5%. Dessa forma, pode-se dizer que todos os leites fermentados elaborados atendem ao padrão estabelecido pela legislação brasileira.

O teor de gordura afeta favoravelmente a qualidade tecnológica de leites fermentados. 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 (THOMOPOULOS; TZIZ; MILKAS, 1993).

Embora os tratamentos da cultura La-5 tenham apresentado diferenças significativas ($p < 0,05$), os resultados dos teores de gordura foram bem próximos entre si porque os ingredientes foram usados em quantidades mínimas e não apresentam gordura em sua composição. Estas diferenças podem ser devido à variações nos teores de gordura dos dois lotes de leite desnatado em pó usados para a fabricação dos leites fermentados.

5.2.5. Acidez titulável

A variação na acidez titulável das bases foi de 0,25 a 0,27% de ácido láctico para a cultura Rich (Tabela 3) e de 0,24 a 0,26% de ácido láctico para a cultura La-5 (Tabela 4) e não foi significativamente diferente ($p < 0,05$).

5.2.6. Valor calórico

Os valores calóricos das bases obtidas para a preparação dos leites fermentados de ambas as culturas foram comparados com os valores diários recomendados (*Recommended Dietary Allowances* - RDA) para uma dieta de 2700 Kcal/dia (homem) e 2000 kcal/dia (mulher) de acordo com *The National Research Council* (NRC, 1989) para adultos (Tabela 5). A análise estatística

indica que os leites fermentados elaborados com edulcorantes e o produto controle apresentam valor calórico sem diferenças significativas, mas foram diferentes estatisticamente dos produtos elaborados com sacarose, devido à alta quantidade de calorias encontradas no açúcar ($p < 0,05$).

Os produtos elaborados com 5 e 7% de sacarose fornecem 69,48 Kcal e 75,61 Kcal, para os produtos fermentados pela cultura Rich, e 69,23 Kcal e 75,02 Kcal para os produtos fermentados com a cultura La-5, respectivamente.

O valor médio do valor calórico de 100 mL dos leites fermentados elaborados com edulcorantes para a cultura Rich representa 2,01 e 2,71% das necessidades diárias para homens e mulheres, respectivamente. Para os tratamentos da cultura La-5, o valor médio do conteúdo energético de 100 mL dos produtos com edulcorantes foi de 1,98 e 2,68% das necessidades diárias de homens e mulheres, respectivamente. Portanto, os leites fermentados formulados podem ser considerados de baixo valor calórico, contribuindo para uma alimentação com reduzida quantidade de calorias.

Tabela 5 – Valor calórico (Kcal e KJ) e porcentagem do valor diário.

Tratamentos	Rich			La-5		
	Valor calórico Kcal	Valor calórico KJ	% Valor diário	Valor calórico Kcal	Valor calórico KJ	% Valor diário
Controle	54,12 ^c ± 0,28	13,05	2,00/2,70	54,08 ^c ± 0,59	13,04	2,00/2,70
SAC 5%	69,48 ^b ± 0,47	16,75	2,57/3,47	69,23 ^b ± 0,42	16,69	2,56/3,46
ASP 0,025%	54,73 ^c ± 0,91	13,19	2,03/2,74	52,68 ^c ± 0,94	12,70	1,95/2,63
SCI 0,025%	54,10 ^c ± 0,06	13,04	2,00/2,70	54,21 ^c ± 0,40	13,07	2,01/2,71
ASA 0,014%	53,58 ^c ± 0,55	12,92	1,98/2,68	53,72 ^c ± 1,23	12,95	1,99/2,69
SAC 7%	75,61 ^a ± 0,71	18,23	2,80/3,78	75,02 ^a ± 1,02	18,09	2,78/3,75
ASP 0,035%	54,86 ^c ± 0,14	13,23	2,03/2,74	53,58 ^c ± 0,20	12,92	1,98/2,68
SCI 0,035%	54,09 ^c ± 0,17	13,04	2,00/2,70	53,30 ^c ± 0,57	12,85	1,97/2,67
ASA 0,020%	53,71 ^c ± 0,04	12,95	1,99/2,69	53,61 ^c ± 1,14	12,92	1,99/2,68

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c} Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

5.3. Caracterização dos leites fermentados

5.3.1. Tempo de fermentação

O tempo de fermentação variou de 4 horas e 42 minutos a 5 horas e 22 minutos para os tratamentos com a cultura Rich e de 20 horas e 42 minutos a 25 horas e 12 minutos para os tratamentos da cultura La-5 (Tabela 6), havendo uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para a cultura La-5, o que demonstra que o tempo de fermentação da cultura La-5 foi afetado pelos tipos e concentrações de edulcorantes estudados. No entanto, para a cultura Rich os resultados não são estatisticamente distintos ($p < 0,05$). De maneira geral, para a cultura La-5, com o aumento da concentração de edulcorante, não houve aumento no tempo de fermentação, com exceção do leite fermentado adicionado de aspartame + acesulfame-K.

Tabela 6 – Tempos de fermentação dos leites fermentados.

Tratamentos	Rich	La-5
Controle	5h 19m ^a ±21,21m	20h 42m ^{def} ±28,28m
SAC 5%	5h 16m ^a ±36,77m	22h 14m ^{bcd} ±5,66m
ASP 0,025%	5h 01m ^a ±7,07m	22h ^{cde} ±28,28m
SCI 0,025%	4h 47m ^a ±18,38m	24 h 25m ^{ab} ±49,50m
ASA 0,014%	5h 02m ^a ±2,83m	21h 57m ^f ±3,53m
SAC 7%	5h 22m ^a ±16,97m	23h 35m ^{abc} ±28,28m
ASP 0,035%	4h 54m ^a ±16,97m	23h 10m ^{ef} ±45,96m
SCI 0,035%	4h 42m ^a ±16,97m	22h 32m ^{bcd} ±38,89m
ASA 0,020%	5h 06m ^a ±11,31m	25h 12m ^a ±53,03m

Média de dois processamentos.

a, b, c, d, e, f Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K; h – horas; m – minutos.

Os tempos de fermentação da cultura Rich foram inferiores aos observados por Dave e Shah (1997b), que obtiveram de 3 horas e 50 minutos a 10 horas de fermentação, utilizando culturas mistas compostas de *S.*

thermophilus, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* na fabricação de iogurtes. Quando foi empregado somente *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* na fabricação dos produtos os tempos de fermentação foram maiores, variando entre 6 horas e 50 minutos a 11 horas. neste estudo, a ausência de *L. bulgaricus* acarretou no aumento do tempo de fermentação, uma vez que a relação simbiótica com *S. thermophilus* e a alta atividade proteolítica são importantes durante a fermentação.

Pinheiro (2003) também obteve maiores tempos de fermentação, que variaram de 285 a 500 minutos na fabricação de iogurtes com edulcorantes. Pereira (2002) utilizando culturas tradicionais (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) e probióticas (*L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp.) observou que os produtos fermentados apenas pelas culturas tradicionais apresentaram maior tempo de fermentação.

A cultura Rich utilizada no presente estudo fermentou em um menor tempo o substrato, provavelmente por apresentar maior viabilidade dos microrganismos presentes na cultura utilizada. Os microrganismos que compõem a cultura Rich apresentam protocooperação, o que potencializa a produção de ácido láctico durante a fermentação.

Por outro lado, foram elevados os tempos de fermentação para a cultura La-5, pois o *L. acidophilus* é uma espécie que apresenta crescimento lento no leite e é exigente nutricionalmente. Esta espécie requer baixa tensão de oxigênio; carboidratos fermentáveis; proteínas e aminoácidos; vitaminas do complexo B, pantotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina; minerais como magnésio, manganês e ferro; e ácidos graxos livres. Além disso, as espécies probióticas têm atividade proteolítica reduzida (OLIVEIRA et al, 2001).

Quando o *L. acidophilus* participa isoladamente da fermentação, a velocidade de produção do ácido láctico é lenta fazendo com que o tempo necessário para se atingir o pH desejado seja maior. Para se evitar esse inconveniente é importante incorporar os micronutrientes (peptídeos e aminoácidos), por meio do uso de hidrolisados de caseína, para obter menores tempos de fermentação e melhorar a viabilidade do probiótico no produto durante a vida de prateleira (SHAH, 2000).

Shihata e Shah (2002) adicionaram cepas proteolíticas de *L. bulgaricus* a iogurtes com culturas comerciais contendo *L. acidophilus*,

Bifidobacterium spp. e *S. thermophilus* (ABT). O tempo de fermentação com duas cepas diferentes, ABT1 e ABT2, foi de 10 horas e 7 minutos e de 6 horas, respectivamente. A adição de *L. bulgaricus* (LB 2501) resultou em menores tempos de fermentação, de 5 horas e 33 minutos para ABT1 e de 5 horas e 8 minutos para ABT2. A adição de *L. bulgaricus* proteolítico ajudou a reduzir o tempo de fermentação por liberar peptídeos e aminoácidos necessários às culturas menos proteolíticas.

Sodini et al. (2002) utilizaram a cultura pura de *L. acidophilus* e obtiveram 13,2 horas de fermentação no produto controle; quando foi empregada a cultura probiótica em co-cultura com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, o tempo foi reduzido para 5,1 horas. Tempos de fermentação de 7 horas foram relatados ao se adicionar hidrolisados de caseína à base de produção dos leites fermentados.

Damin (2008) afirma que foram necessárias 22,1 horas para acidificação do leite fermentado por cultura pura de *L. acidophilus* e que poucos pesquisadores estudaram o perfil de acidificação de leites fermentados por culturas puras, embora publicações sobre o crescimento das bactérias em meios de cultura enriquecidos com hidrolisados, peptona, aminoácidos, vitaminas e sais sejam encontrados.

Longo tempo de fermentação não é desejável pela indústria de alimentos. Por isso, a prática comum é realizar o processo fermentativo utilizando, além da espécie probiótica, as espécies tradicionais de bactérias do iogurte, o *S. thermophilus* e o *L. bulgaricus*, que exibem o comportamento de protocooperação. Outra alternativa para reduzir o tempo de acidificação do produto é adicionar a cultura probiótica somente após o término da fermentação pela cultura tradicional (LOURENS-HATTING; VILJOEN, 2000).

As Figuras 5 e 6 mostram os gráficos de acidificação para os leites fermentados pelas culturas Rich e La-5.

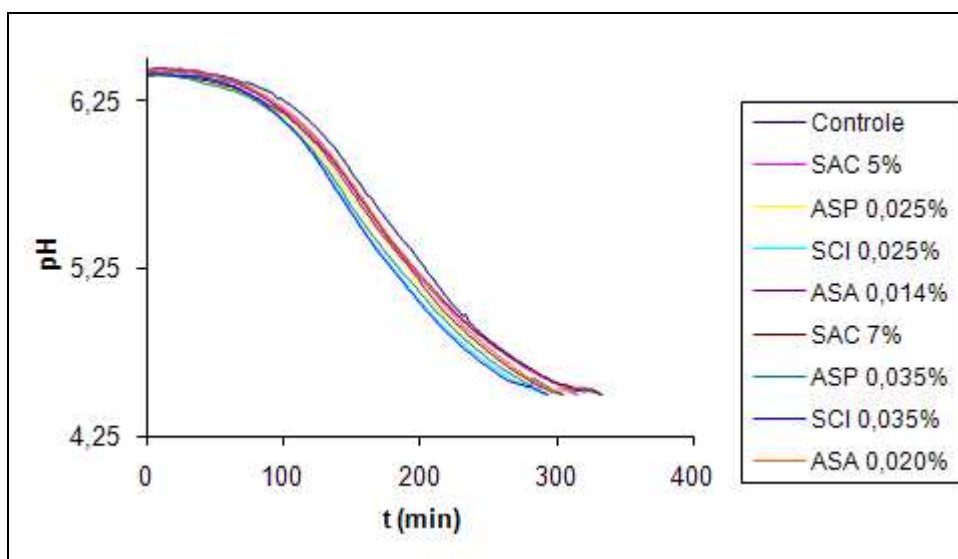


Figura 5 – Curvas de acidificação dos leites fermentados pela cultura Rich.

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-k.

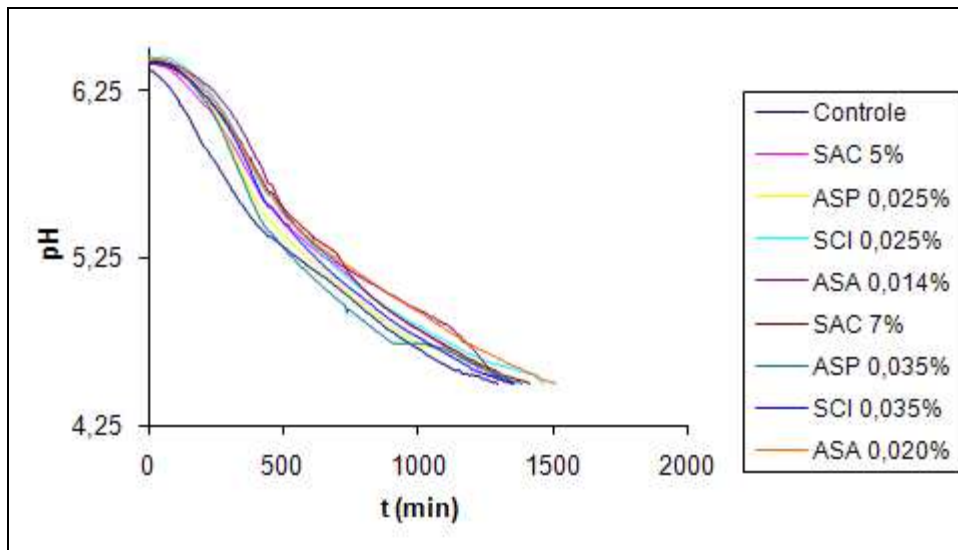


Figura 6 – Curvas de acidificação dos leites fermentados pela cultura La-5.

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

5.3.2. Viabilidade de bactérias lácticas

As populações de *S. thermophilus* variaram de 12,32 a 9,94 log UFC/mL e a de *L. bulgaricus* permaneceu entre 12,14 e 8,91 log UFC/mL (Tabelas 7 e 8), sendo que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a viabilidade do *S. thermophilus* durante o período de estocagem dos produtos, para os diferentes tipos de edulcorantes, com exceção dos tratamentos elaborados com 0,014% de aspartame + acesulfame-K e 0,035% de sacarina + ciclamato. O tempo de estocagem não afetou a população de *L. bulgaricus*, em todos os tratamentos ($p < 0,05$). O tipo e a concentração de ingrediente adicionado aos leites fermentados não influenciou a viabilidade celular de ambos os microrganismos utilizados ($p < 0,05$).

A análise microbiológica durante os 28 dias de fabricação dos leites fermentados pela cultura Rich mostrou que houve predominância de *S. thermophilus* em relação a *L. bulgaricus*, em todos os dias estudados. A estirpe com o melhor desempenho foi o *S. thermophilus*, contendo mais de 10log UFC/mL de células viáveis durante todo o período de análise.

O número de células viáveis de *L. bulgaricus* manteve-se acima de 9 log UFC/mL, com exceção do tratamento elaborado com 0,025 e 0,035% de aspartame no 1º e 28º dias de análise, respectivamente. Apesar das populações de *L. bulgaricus* terem sido inferiores a de *S. thermophilus*, pode-se dizer que esta cultura também apresentou grande estabilidade durante os 28 dias de estocagem.

Tabela 7 – População de *S. thermophilus* (log UFC/mL) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	12,18 ^{aA} ±0,06	11,98 ^{aA} ±0,30	10,81 ^{aA} ±1,48
SAC 5%	12,12 ^{aA} ±0,54	11,82 ^{aA} ±0,14	10,84 ^{aA} ±0,88
ASP 0,025%	12,18 ^{aA} ±0,07	12,13 ^{aA} ±0,06	10,72 ^{aA} ±1,31
SCI 0,025%	12,32 ^{aA} ±0,10	11,15 ^{aA} ±1,51	11,74 ^{aA} ±0,06
ASA 0,014%	12,22 ^{aA} ±0,37	11,88 ^{aA} ±0,06	9,94 ^{aB} ±0,13
SAC 7%	11,47 ^{aA} ±1,44	11,89 ^{aA} ±0,06	11,73 ^{aA} ±0,01
ASP 0,035%	10,84 ^{aA} ±2,02	10,94 ^{aA} ±1,20	10,86 ^{aA} ±1,27
SCI 0,035%	12,24 ^{aA} ±0,02	11,82 ^{aB} ±0,14	11,56 ^{aB} ±0,09
ASA 0,020%	12,28 ^{aA} ±0,16	12,00 ^{aA} ±0,01	11,84 ^{aA} ±0,16

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Tabela 8 – População de *L. bulgaricus* (log UFC/mL) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	9,53 ^{aA} ±1,87	9,71 ^{aA} ±0,48	9,69 ^{aA} ±0,18
SAC 5%	9,11 ^{aA} ±0,86	9,84 ^{aA} ±0,45	9,47 ^{aA} ±0,02
ASP 0,025%	10,70 ^{aA} ±1,22	10,86 ^{aA} ±1,22	8,92 ^{aA} ±0,86
SCI 0,025%	10,92 ^{aA} ±1,10	10,40 ^{aA} ±1,97	9,24 ^{aA} ±0,74
ASA 0,014%	12,14 ^{aA} ±0,35	10,92 ^{aA} ±1,29	9,64 ^{aA} ±0,14
SAC 7%	10,01 ^{aA} ±0,57	11,06 ^{aA} ±0,91	9,57 ^{aA} ±0,0
ASP 0,035%	10,73 ^{aA} ±1,40	10,58 ^{aA} ±1,16	8,91 ^{aA} ±0,45
SCI 0,035%	10,05 ^{aA} ±0,08	10,41 ^{aA} ±1,02	9,82 ^{aA} ±0,35
ASA 0,020%	12,07 ^{aA} ±0,37	11,08 ^{aA} ±1,21	10,61 ^{aA} ±1,28

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^A Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

O acompanhamento da viabilidade de *S. thermophilus* e de *L. bulgaricus* ao longo a vida de prateleira dos leites fermentados permitiu verificar que houve maior crescimento do primeiro em relação ao segundo, o que é vantajoso do ponto de vista tecnológico. Segundo Pereira (2002), altas contagens de *L. bulgaricus* no produto final aumentam a pós-acidificação do iogurte durante a vida de prateleira, podendo levar à rejeição do produto pelo consumidor. Portanto, as indústrias fabricantes de culturas lácteas fornecem culturas tradicionais do iogurte com maior concentração de *S. thermophilus* e menor concentração de *L. bulgaricus*. Por outro lado, o *L. bulgaricus* contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico do iogurte.

A presença de carboidratos na mistura base pode inibir o crescimento dos microrganismos do iogurte. Em um estudo realizado por Tamime e Robinson (1999), um exame microscópico dos diferentes tipos de iogurte mostrou que o *S. thermophilus* apresentou maior tolerância a altas concentrações de açúcar que o *L. bulgaricus*, além de mostrar redução na velocidade de produção de ácido pelo *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* quando se aumenta a concentração de açúcar de 6 para 12%. Esta tolerância das culturas depende da linhagem utilizada, sendo aconselhável uma cuidadosa seleção. Os adoçantes acesulfame e aspartame nas concentrações normalmente usadas em leites fermentados (0,03%) não inibem as bactérias ácido-láticas ou as probióticas (VINDEROLA et al., 2002).

Estudos foram realizados e mostraram que as bactérias do iogurte sobrevivem bem no produto durante a vida de prateleira. Rybka e Fleet (1997) examinaram quinze iogurtes e leites fermentados de dezesseis fabricantes australianos. As populações viáveis de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* excederam 7 log UFC/mL do produto em 54 e 68% das amostras, respectivamente. Dave e Shah (1997b) elaboraram iogurtes a partir de culturas comerciais e investigaram a viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a vida de prateleira. *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* se multiplicaram consideravelmente no primeiro dia de estocagem, e após cinco dias as populações apresentaram declínio.

Donkor e colaboradores (2006) estudaram a viabilidade das LAB e de bactérias probióticas em leites fermentados durante 28 dias. No experimento

controle (que incluía somente *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) as populações de *L. bulgaricus* aumentaram durante a estocagem dos produtos que tiveram a fermentação encerrada no pH 4,5.

As populações de *L. acidophilus* variaram de 14,91 a 11,15 log UFC/mL (Tabela 9), sendo que não houve redução significativa ($p < 0,05$) da população para os produtos elaborados com a cultura La-5 durante o período de estocagem, com exceção dos tratamentos elaborados com sacarose e 0,025 % de aspartame e de sacarina + ciclamato. O tipo e a concentração de ingrediente adicionado aos leites fermentados não influenciou a viabilidade celular do *L. acidophilus* ($p < 0,05$).

Normalmente, o *L. acidophilus* não é empregado como cultura pura na fabricação de leites fermentados, devido ao longo tempo de fermentação requerido por esta espécie, e são poucos os estudos da viabilidade desta bactéria quando está presente isoladamente no leite fermentado.

Tabela 9 – População de *L. acidophilus* (log UFC/mL) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	14,37 ^{aA} ±0,28	13,04 ^{aA} ±1,88	11,16 ^{aA} ±4,04
SAC 5%	14,50 ^{aA} ±0,09	12,48 ^{aA} ±0,08	12,32 ^{aB} ±0,25
ASP 0,025%	14,42 ^{aA} ±0,01	12,39 ^{aAB} ±0,08	12,20 ^{aB} ±0,03
SCI 0,025%	14,26 ^{aA} ±0,06	14,18 ^{aA} ±0,11	11,61 ^{aB} ±0,25
ASA 0,014%	14,53 ^{aA} ±0,04	13,25 ^{aA} ±1,16	12,17 ^{aA} ±0,19
SAC 7%	14,91 ^{aA} ±0,83	14,36 ^{aAB} ±0,11	12,61 ^{aB} ±1,25
ASP 0,035%	14,43 ^{aA} ±0,13	13,14 ^{aA} ±1,22	11,15 ^{aA} ±1,39
SCI 0,035%	14,29 ^{aA} ±0,25	14,35 ^{aA} ±0,04	12,95 ^{aA} ±1,17
ASA 0,020%	14,28 ^{aA} ±1,29	12,10 ^{aA} ±2,76	12,32 ^{aA} ±0,35

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

É comum encontrar a associação de *L. acidophilus* com as bactérias tradicionais do iogurte. No entanto, a atividade metabólica de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* durante a armazenagem resulta na produção de ácidos orgânicos que futuramente podem afetar a viabilidade das células probióticas (DONKOR et al., 2006). Além disso, o *L. bulgaricus* produz peróxido de hidrogênio, principal agente responsável pela redução da viabilidade de *L. acidophilus* em cultura mista no leite fermentado (OLIVEIRA et al., 2001). Nighswonger, Brashears e Gilliland (1996) consideraram que a produção peróxido de hidrogênio e também de bacteriocinas por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* inibiu a estabilidade dos probióticos *L. casei* e *L. acidophilus* associados no iogurte durante 28 dias de estocagem refrigerada.

A população de *L. acidophilus* apresentou declínio de 1 a 3 ciclos logarítmicos ao longo do armazenamento dos leites fermentados. Esse resultado é comparável a outros estudos já realizados. Saxelin et al. (1999), Vinderola, Bailo e Reinheimer (2000) e Sodini et al. (2002) usando as cepas *L. salivarius* UCC118, *L. acidophilus* La-1 e La-5, respectivamente, relataram um decréscimo de 3 ciclos log em 2 semanas, 2,7 a 4,6 ciclos log em 4 semanas e 2 a 4,5 ciclos log em 6 semanas.

As populações de *L. acidophilus* encontrados neste trabalho foram bastante superiores àquelas relatadas por Dave e Shah (1997b), que obtiveram contagem de células viáveis que variaram de 7,59 a 6,08 log UFC/mL. Zacarchenco e Massaguer-Roir (2004) constataram a redução de dois ciclos logarítmicos nas populações de *L. acidophilus*, quando associado a *S. thermophilus* e *B. longum*, ao final da estocagem do leite fermentado. Vinderola, Mocchiutti e Reinheimer (2002) consideraram o *L. acidophilus* a estirpe mais inibida no leite fermentado em cultura mista em relação às demais bactérias ácido-láticas avaliadas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *L. casei* e *Bifidobacterium* spp).

A variação da viabilidade probiótica nas amostras utilizadas por diferentes autores pode ser provavelmente atribuída a diferenças comportamentais dos microrganismos e a influência de fatores como a composição do meio, a disponibilidade de nutrientes, acidez, pH, outras bactérias iniciadoras e oxigênio dissolvido no leite (GUEIMONDE et al., 2004; SHAH, 2000). As principais substâncias inibidoras do seu crescimento são os

ácidos láctico, acético e benzóico, além do peróxido de hidrogênio (COLLINS; ARAMAKI, 1980).

No presente estudo, nos leites fermentados pela cultura La-5, o uso de cultura pura de *L. acidophilus* e ausência de produção de substâncias inibidoras por outras bactérias, como as bacteriocinas e ácidos orgânicos, justificam as elevadas populações obtidas para *L. acidophilus*. As contagens obtidas para o *L. acidophilus* estão acima do relatado por diversos estudos já realizados previamente (VINDEROLA, REINHEIMER, 2000; SHAH, 2000; OLIVEIRA et al., 2001; SODINI et al., 2002).

O uso do meio HHD, recomendado e descrito pelo Grupo E-104 da *International Dairy Federation, International Standards Organization e Association of Official Analytical Chemists* (IDF, 1995), pode ter proporcionado uma recuperação excessiva das células bacterianas presentes nos leites fermentados. Além disso, o meio HHD apresenta o inconveniente de não estar disponível comercialmente e, por isso, requer a preparação minuciosa em laboratório.

As metodologias de contagem de LAB não devem ser complexas ou demandar muito tempo de preparo (LIM; HUH; BAEK, 1995). O meio oficial para enumeração de *L. acidophilus* é o MRS-Bile Ágar (IDF, 1995). No entanto, vários outros meios seletivos já foram propostos na literatura para a contagem deste microrganismo, principalmente quando ele está presente em produtos que contenham mais de uma espécie de LAB (DAVE; SHAH, 1996; RYBKA; KAILASAPATHY, 1996). Barreto et al. (2003) compararam os meios MRS, HHD e LA (*Modified Bifidus Blood Agar*) para a contagem diferencial de *L. acidophilus* em três iogurtes comerciais. A identificação das culturas isoladas desse meio demonstrou que a contagem foi superestimada, sendo contadas como *L. acidophilus* também colônias de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* e *S. thermophilus*.

Os valores encontrados para as populações de LAB em todos os leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante o período de estocagem estão de acordo com o padrão estabelecido pelo Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, onde a população de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo 7 log UFC/g no produto final durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2000). Os resultados mostram que com a

utilização de cultura contendo microrganismo probiótico, os leites fermentados apresentaram contagens suficientes para promover efeitos terapêuticos à saúde do consumidor, além de contribuir para os aspectos tecnológicos do produto, como a redução da pós-acidificação (ANTUNES, 2001).

5.3.3. Análises físico-químicas dos leites fermentados

5.3.3.1. Acidez titulável

Os teores de acidez titulável obtidos nos leites fermentados variaram de 1,22 a 1,75% para a cultura Rich (Tabela 10) e de 1,11 a 1,56% para a cultura La-5 (Tabela 11) durante o período de estocagem refrigerada. Para a cultura Rich, o tipo e a concentração de edulcorantes não influenciaram a acidez titulável dos leites fermentados, nos períodos de 1 e 28º dias de estocagem, no entanto, houve diferença significativa na acidez titulável, em relação ao tipo e concentração de ingrediente utilizado, no 14º dia ($p < 0,05$). Para a cultura La-5, os tipos e concentrações de edulcorantes não influenciaram ($p < 0,05$) a acidez titulável dos produtos em nenhum dos dias de análise.

Quando se comparou o aumento da acidez titulável ao longo do tempo de armazenagem para cada tratamento da cultura Rich, individualmente, houve variação significativa para todos os produtos ($p < 0,05$), independentemente da concentração de edulcorante utilizada, com exceção do tratamento elaborado com 5% de sacarose (Tabela 10). Quanto maior o tempo de armazenagem, maior foi o teor de acidez encontrado. Esse comportamento indica que ocorreu a pós-acidificação dos leites fermentados. O principal responsável por esse fenômeno é o *L. bulgaricus* (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Os leites fermentados pela cultura La-5 não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos valores de acidez titulável ao longo do tempo, com exceção do produto com 7% de sacarose, provavelmente pela fraca produção de ácido por *L. acidophilus* durante o pós-processamento dos produtos (Tabela 11), por esta razão, são especialmente utilizados em iogurtes suaves (FRANCO; LANDGRAF; DESTRO, 1996).

Tabela 10 – Acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	1,35 ^{ab} ±0,07	1,59 ^{abA} ±0,04	1,71 ^{aA} ±0,04
SAC 5%	1,22 ^{aA} ±0,12	1,49 ^{bcA} ±0,08	1,57 ^{aA} ±0,03
ASP 0,025%	1,27 ^{aB} ±0,06	1,62 ^{abA} ±0,01	1,68 ^{aA} ±0,04
SCI 0,025%	1,29 ^{aB} ±0,12	1,62 ^{abA} ±0,03	1,68 ^{aA} ±0,04
ASA 0,014%	1,37 ^{aB} ±0,01	1,60 ^{cAB} ±0,04	1,71 ^{aA} ±0,11
SAC 7%	1,23 ^{aB} ±0,010	1,51 ^{bcAB} ±0,06	1,58 ^{aA} ±0,05
ASP 0,035%	1,26 ^{aB} ±0,08	1,58 ^{abA} ±0,00	1,66 ^{aA} ±0,03
SCI 0,035%	1,28 ^{aB} ±0,09	1,59 ^{abA} ±0,00	1,65 ^{aA} ±0,00
ASA 0,020%	1,37 ^{aC} ±0,01	1,67 ^{aB} ±0,01	1,75 ^{aA} ±0,02

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b, c} Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B, C} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Tabela 11 – Acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	1,32 ^{aA} ±0,09	1,36 ^{aA} ±0,09	1,43 ^{aA} ±0,13
SAC 5%	1,17 ^{aA} ±0,08	1,21 ^{aA} ±0,17	1,22 ^{aA} ±0,13
ASP 0,025%	1,18 ^{aA} ±0,02	1,29 ^{aA} ±0,13	1,29 ^{aA} ±0,06
SCI 0,025%	1,32 ^{aA} ±0,13	1,41 ^{aA} ±0,09	1,36 ^{aA} ±0,01
ASA 0,014%	1,24 ^{aA} ±0,07	1,44 ^{aA} ±0,08	1,43 ^{aA} ±0,16
SAC 7%	1,11 ^{aC} ±0,00	1,31 ^{aB} ±0,01	1,34 ^{aA} ±0,01
ASP 0,035%	1,19 ^{aA} ±0,11	1,30 ^{aA} ±0,15	1,33 ^{aA} ±0,13
SCI 0,035%	1,30 ^{aA} ±0,12	1,36 ^{aA} ±0,05	1,34 ^{aA} ±0,04
ASA 0,020%	1,40 ^{aA} ±0,14	1,52 ^{aA} ±0,11	1,56 ^{aA} ±0,08

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B, C} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Estudos realizados por Salji e Ismail (1983) e Donkor et. al. (2006) mostraram que em iogurtes armazenados sob refrigeração, a acidez pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da mesma, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenagem e do poder de pós-acidificação das culturas. No presente estudo, foi possível observar que para os tratamentos com a cultura Rich, houve uma produção mais acentuada de ácido láctico do 1º ao 14º dia e, após este período, a acidificação continuou de forma menos intensa. Segundo Beal et al. (1999), o aumento da acidez nos sete primeiros dias de armazenamento está relacionado ao consumo de lactose e produção de ácido láctico e galactose, mostrando a existência da atividade metabólica da bactéria láctica.

O tipo de cultura empregada para a fabricação dos leites fermentados não influenciou na acidez titulável ($p < 0,05$) comparando-se os produtos elaborados com o mesmo ingrediente, com exceção dos tratamentos que utilizaram 0,025% de aspartame, 7% de sacarose e sacarina + ciclamato, em ambas as concentrações (Tabela 12). A cultura La-5 produziu leites fermentados com menor acidez, com valor máximo de 1,56% no dia 28, enquanto a cultura mista de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* resultou em produtos com maior acidez, com valor máximo de 1,75% no dia 28, uma vez que o pH final de fermentação foi 4,50 para as duas culturas.

Durante a estocagem refrigerada, o valor médio de acidez titulável do produto fermentado pela cultura Rich foi de 1,51%, diferente estatisticamente ($p < 0,05$) do produzido pela cultura La-5, que teve valor médio de acidez titulável de 1,32%. Isso pode ser explicado pela capacidade do *L. acidophilus* em promover acidificação reduzida do iogurte e dos leites fermentados durante a armazenagem pós-processamento (GOMES; MALCATA, 1999).

Em um estudo conduzido por Saccaro (2008), o leite fermentado produzido por *B. lactis* e *L. rhamnosus* foi considerada a composição de menor acidez, com o valor de 1,25% de ácido láctico no 21º dia de armazenamento, enquanto o produto controle, elaborado somente com *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, apresentou 1,40% de ácido láctico no mesmo período.

Tabela 12 – Comparação dos valores de acidez titulável (% ácido láctico) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	Dias	Rich	La-5
Controle	1	1,35 ^a ±0,07	1,32 ^a ±0,09
	14	1,59 ^a ±0,04	1,36 ^a ±0,09
	28	1,71 ^a ±0,04	1,43 ^a ±0,13
SAC 5%	1	1,22 ^a ±0,12	1,17 ^a ±0,08
	14	1,49 ^a ±0,08	1,21 ^a ±0,17
	28	1,57 ^a ±0,03	1,22 ^a ±0,13
ASP 0,025%	1	1,27 ^a ±0,06	1,18 ^a ±0,02
	14	1,62 ^a ±0,01	1,29 ^a ±0,13
	28	1,68 ^a ±0,04	1,29 ^b ±0,06
SCI 0,025%	1	1,29 ^a ±0,12	1,32 ^a ±0,13
	14	1,62 ^a ±0,03	1,41 ^a ±0,09
	28	1,68 ^a ±0,04	1,36 ^b ±0,01
ASA 0,014%	1	1,37 ^a ±0,01	1,24 ^a ±0,07
	14	1,60 ^a ±0,04	1,44 ^a ±0,08
	28	1,71 ^a ±0,11	1,43 ^a ±0,16
SAC 7%	1	1,23 ^a ±0,01	1,11 ^a ±0,00
	14	1,51 ^a ±0,06	1,31 ^b ±0,01
	28	1,58 ^a ±0,05	1,34 ^b ±0,01
ASP 0,035%	1	1,26 ^a ±0,08	1,19 ^a ±0,11
	14	1,58 ^a ±0,00	1,30 ^a ±0,15
	28	1,66 ^a ±0,03	1,33 ^a ±0,13
SCI 0,035%	1	1,28 ^a ±0,09	1,30 ^a ±0,12
	14	1,59 ^a ±0,00	1,36 ^b ±0,05
	28	1,65 ^a ±0,00	1,34 ^b ±0,04
ASA 0,020%	1	1,37 ^a ±0,01	1,40 ^a ±0,14
	14	1,67 ^a ±0,01	1,52 ^a ±0,11
	28	1,75 ^a ±0,02	1,56 ^a ±0,08

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Dave e Shah (1997a) também observaram aumento na acidez durante 35 dias de estocagem de um iogurte elaborado com culturas tradicionais e probióticas. Segundo Beal et al. (1999), os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e aumento de acidez durante a estocagem refrigerada, devido à persistente atividade das bactérias durante o armazenamento do produto. Em iogurtes probióticos adicionados de edulcorantes, Pinheiro (2003) também detectou pós-acidificação ao longo de 30 dias de armazenamento.

Thamer e Penna (2006) obtiveram menores teores de acidez em bebidas lácteas formuladas com maiores quantidades de sólidos totais, e maior acidez em bebidas contendo menor teor de sólidos totais. A acidez pode ser afetada pelo conteúdo e tipo de sólido adicionado, lácteo ou não, e com a atividade da cultura responsável pela fermentação (THAMER; PENNA, 2006). No caso de sólidos lácteos há o efeito tampão de proteínas, fosfatos, citratos e lactatos (TAMIME; DEETH, 1980).

De acordo com a legislação brasileira, a acidez dos leites fermentados deve estar entre 0,6 e 2,0g de ácido láctico/100g de produto final (BRASIL, 2000). Como os teores de acidez dos leites fermentados analisados variaram entre 1,11 e 1,75% de ácido láctico, todos os tratamentos atendem a este requisito da legislação.

5.3.3.2. Sinérese

A sinérese dos leites fermentados com as culturas Rich e La-5 variou de 15,42 a 18,50% e de 16,50 a 19,50%, respectivamente, durante os 28 dias de estocagem refrigerada (Tabelas 13 e 14). Este fenômeno é altamente indesejável e ocorre devido ao rearranjo da rede formada pelo coágulo do iogurte, levando a um aumento no número de junções partícula-partícula, fazendo com que o coágulo se retraia, expelindo um líquido intersticial (ANTUNES, 2004). A tendência à sinérese depende da temperatura de incubação, do tratamento térmico do leite por tempo prolongado, do baixo teor de sólidos totais, da temperatura de envase do produto final e do pH do iogurte (WALSTRA et al., 1999).

Tabela 13 – Sinérese (%) dos leites fermentados pela cultura Rich durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	15,42 ^{aa} ±0,59	16,25 ^{aa} ±0,82	17,50 ^{aa} ±0,71
SAC 5%	15,59 ^{aa} ±2,24	16,25 ^{aa} ±2,01	17,09 ^{aa} ±1,54
ASP 0,025%	16,00 ^{aa} ±1,41	16,67 ^{aa} ±1,65	16,84 ^{aa} ±1,65
SCI 0,025%	16,83 ^{aa} ±2,12	17,00 ^{aa} ±2,36	17,59 ^{aa} ±2,95
ASA 0,014%	17,75 ^{aa} ±1,77	18,00 ^{aa} ±1,41	18,50 ^{aa} ±0,71
SAC 7%	15,42 ^{aa} ±1,06	15,92 ^{aa} ±1,53	16,67 ^{aa} ±1,65
ASP 0,035%	16,50 ^{aa} ±2,12	17,00 ^{aa} ±2,83	17,17 ^{aa} ±1,65
SCI 0,035%	17,25 ^{aa} ±2,01	17,25 ^{aa} ±2,01	17,92 ^{aa} ±1,29
ASA 0,020%	17,09 ^{aa} ±1,29	17,50 ^{aa} ±0,94	17,84 ^{aa} ±0,71

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^A Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Tabela 14 – Sinérese (%) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	18,75 ^{aa} ±0,35	18,84 ^{aa} ±1,65	19,00 ^{aa} ±2,83
SAC 5%	17,58 ^{aa} ±1,77	18,17 ^{aa} ±1,89	18,42 ^{aa} ±1,29
ASP 0,025%	18,42 ^{aa} ±2,24	18,00 ^{aa} ±1,17	18,42 ^{aa} ±0,59
SCI 0,025%	17,34 ^{aa} ±1,65	17,92 ^{aa} ±1,29	17,67 ^{aa} ±0,23
ASA 0,014%	16,50 ^{aa} ±0,95	17,00 ^{aa} ±1,41	17,92 ^{aa} ±0,83
SAC 7%	18,09 ^{aa} ±3,42	19,17 ^{aa} ±2,60	19,50 ^{aa} ±2,12
ASP 0,035%	18,34 ^{aa} ±2,60	18,59 ^{aa} ±1,53	18,75 ^{aa} ±0,11
SCI 0,035%	16,84 ^{aa} ±0,23	17,08 ^{aa} ±0,35	18,17 ^{aa} ±0,71
ASA 0,020%	16,92 ^{aa} ±2,00	17,75 ^{aa} ±1,53	17,67 ^{aa} ±1,41

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^A Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

O tipo e a concentração de edulcorantes não afetaram a sinérese dos leites fermentados no período estudado ($p < 0,05$). Além disso, não houve aumento da sinérese nos produtos ao longo da estocagem refrigerada ($p < 0,05$). No presente estudo, os géis permaneceram estáveis ao longo do armazenamento refrigerado, sem sofrer interferências ou choque mecânicos, responsáveis por danos na matriz do gel (Lucey, 2002). Por outro lado, vários estudos demonstraram aumento progressivo da sinérese ao longo da estocagem de leites fermentados (KÜCÜKCETIN, 2008, FAROOQ; HAQUE, 1992).

As culturas utilizadas tiveram efeitos significativos sobre a sinérese média dos leites fermentados durante a estocagem refrigerada ($p < 0,05$). A cultura Rich produziu ao longo da armazenagem produtos com sinérese média de 16,94% e a cultura La-5 de 17,92%, valores estatisticamente diferentes. No entanto, quando se compara a sinérese para cada ingrediente, esta diferença estatística ($p < 0,05$) foi observada somente no produto controle, após 1 dia de fabricação (Tabela 15).

Achanta, Aryana e Boeneke (2007) estudaram a sinérese de iogurtes fortificados com minerais e detectaram o aumento da sinérese ao longo do tempo de estocagem, que pode ser explicado pela contração das micelas da caseína provocada pelo abaixamento do pH. Farooq e Haque (1992) também verificaram aumento significativo da sinérese de iogurtes elaborados com aspartame ao durante 14 dias de estocagem a 4°C.

A sinérese pode ser reduzida ou eliminada aumentando-se o teor de sólidos totais até aproximadamente 15% e utilizando-se estabilizantes ou culturas lácticas produtoras de exopolissacarídeos (AMATAYAKUL; SHERKAT; SHAH, 2006). Jaros e colaboradores (2002) observaram redução da separação do soro quando aumentou-se a quantidade de sólidos totais.

Tabela 15 – Comparação dos valores de sinérese (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	Dias	Rich	La-5
Controle	1	15,42 ^b ±0,59	18,75 ^a ±0,35
	14	16,25 ^a ±0,82	18,84 ^a ±1,65
	28	17,50 ^a ±0,71	19,00 ^a ±2,83
SAC 5%	1	15,59 ^a ±2,24	17,58 ^a ±1,77
	14	16,25 ^a ±2,01	18,17 ^a ±1,89
	28	17,09 ^a ±1,54	18,42 ^a ±1,29
ASP 0,025%	1	16,00 ^a ±1,41	18,42 ^a ±2,24
	14	16,67 ^a ±1,65	18,00 ^a ±1,17
	28	16,84 ^a ±1,65	18,42 ^a ±0,59
SCI 0,025%	1	16,83 ^a ±2,12	17,34 ^a ±1,65
	14	17,00 ^a ±2,36	17,92 ^a ±1,29
	28	17,59 ^a ±2,95	17,67 ^a ±0,23
ASA 0,014%	1	17,75 ^a ±1,77	16,50 ^a ±0,95
	14	18,00 ^a ±1,41	17,00 ^a ±1,41
	28	18,50 ^a ±0,71	17,92 ^a ±0,83
SAC 7%	1	15,42 ^a ±1,06	18,09 ^a ±3,42
	14	15,92 ^a ±1,53	19,17 ^a ±2,60
	28	16,67 ^a ±1,65	19,50 ^a ±2,12
ASP 0,035%	1	16,50 ^a ±2,12	18,34 ^a ±2,60
	14	17,00 ^a ±2,83	18,59 ^a ±1,53
	28	17,17 ^a ±1,65	18,75 ^a ±0,11
SCI 0,035%	1	17,25 ^a ±2,01	16,84 ^a ±0,23
	14	17,25 ^a ±2,01	17,08 ^a ±0,35
	28	17,92 ^a ±1,29	18,17 ^a ±0,71
ASA 0,020%	1	17,09 ^a ±1,29	16,92 ^a ±2,00
	14	17,50 ^a ±0,94	17,75 ^a ±1,53
	28	17,84 ^a ±0,71	17,67 ^a ±1,41

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Como os leites fermentados foram elaborados com leite em pó reconstituído a 14% e os edulcorantes foram adicionados em pequenas quantidades, não afetaram negativamente a sinérese, sem aumento da expulsão do soro durante o armazenamento refrigerado. A sacarose possui estrutura mais complexa do que os edulcorantes e, por isso, esperava-se que os leites fermentados com esse ingrediente apresentassem valores de sinérese inferiores. No entanto, este comportamento não foi observado no estudo.

5.3.3.3. Capacidade de retenção de água (CRA)

Os valores de CRA obtidos para os leites fermentados variaram de 25,34 a 32,98% para a cultura Rich (Tabela 16) e de 25,79 a 32,48% para a cultura La-5 (Tabela 17) durante o período de estocagem refrigerada. O tipo e a concentração de edulcorantes não afetaram a CRA dos leites fermentados no período estudado ($p < 0,05$). Além disso, não houve aumento significativo ($p < 0,05$) da CRA ao longo da estocagem refrigerada, com exceção dos leites fermentados elaborados com aspartame + acesulfame-K para a cultura Rich e dos leites fermentados elaborados com 0,025% de sacarina + ciclamato e 0,020% de aspartame + acesulfame-K, para a cultura La-5.

A eliminação da gordura e do açúcar para atender às exigências do consumidor preocupado com sua saúde, afeta as propriedades tecnológicas dos produtos, tais como a capacidade de retenção de água e textura (FAROOQ; HAQUE, 1992).

Tabela 16 – CRA (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	25,34 ^{aA} ±2,11	27,99 ^{aA} ±0,78	29,25 ^{aA} ±2,06
SAC 5%	26,24 ^{aA} ±0,42	30,25 ^{aA} ±3,27	28,84 ^{aA} ±0,23
ASP 0,025%	25,65 ^{aA} ±1,35	30,57 ^{aA} ±2,71	29,52 ^{aA} ±1,87
SCI 0,025%	29,15 ^{aA} ±0,63	32,98 ^{aA} ±2,71	29,35 ^{aA} ±1,75
ASA 0,014%	25,73 ^{aB} ±1,65	28,19 ^{aAB} ±0,08	32,74 ^{aA} ±1,38
SAC 7%	26,65 ^{aA} ±0,58	30,85 ^{aA} ±2,98	29,86 ^{aA} ±0,12
ASP 0,035%	27,15 ^{aA} ±0,52	31,23 ^{aA} ±2,19	29,17 ^{aA} ±1,48
SCI 0,035%	28,88 ^{aA} ±0,88	32,40 ^{aA} ±2,22	30,29 ^{aA} ±1,70
ASA 0,020%	25,76 ^{aB} ±1,68	28,73 ^{aAB} ±1,44	32,71 ^{aA} ±1,20

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa. ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Tabela 17 – CRA (%) dos leites fermentados pela cultura La-5 durante a estocagem refrigerada.

Tratamentos	1 dia	14 dias	28 dias
Controle	27,48 ^{aA} ±1,27	30,78 ^{aA} ±1,17	30,32 ^{aA} ±0,11
SAC 5%	26,39 ^{aA} ±0,18	31,22 ^{aA} ±3,68	31,92 ^{aA} ±3,68
ASP 0,025%	26,19 ^{aA} ±0,64	27,44 ^{aA} ±1,32	28,53 ^{aA} ±1,94
SCI 0,025%	26,51 ^{aB} ±1,11	28,40 ^{aAB} ±1,03	30,60 ^{aA} ±0,21
ASA 0,014%	26,25 ^{aA} ±1,73	30,57 ^{aA} ±1,50	27,45 ^{aA} ±0,58
SAC 7%	27,08 ^{aA} ±0,18	31,59 ^{aA} ±4,57	32,48 ^{aA} ±4,03
ASP 0,035%	26,98 ^{aA} ±0,86	27,64 ^{aA} ±0,84	28,75 ^{aA} ±2,21
SCI 0,035%	25,79 ^{aA} ±2,54	28,43 ^{aA} ±0,89	30,00 ^{aA} ±0,37
ASA 0,020%	27,22 ^{aB} ±0,43	31,19 ^{aA} ±0,39	28,85 ^{aAB} ±1,04

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^a Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A, B} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

O processo de fabricação dos leites fermentados causa mudanças irreversíveis nas propriedades das proteínas do leite. Primeiro, o leite é fortificado com ingredientes lácteos para atingir o conteúdo de proteína desejado. Depois, a base de preparação dos produtos é submetida a um drástico tratamento térmico, que resulta em desnaturação das proteínas do soro e sua fixação parcial nas micelas de caseína (LUCEY; MUNRO; SINGH, 1999).

O processo central da conversão do leite em leite fermentado é a aglomeração das micelas de caseína em uma rede com estrutura tridimensional. A caseína compreende quatro componentes principais, que são: α_{s1} , α_{s2} , β e κ . As caseínas α e β estão aprisionadas no centro da micela de caseína. A κ caseína está na superfície da micela, com as sequências C-terminais, carregadas e expostas, formando uma “cabeleira”, a qual atua como uma barreira para a agregação (HAQUE; RICHARDSON; MORRIS, 2001).

No leite fermentado, com a produção de ácido láctico, a carga das proteínas é eliminada devido à redução do pH, que elimina as barreiras estéricas, entrópicas e eletrostáticas à aglomeração das micelas de caseína, provocando desestabilização da rede micelas de caseínas, resultando na gelificação das proteínas (CORREDIG; DALGLEISH, 1999; HAQUE; RICHARDSON; MORRIS, 2001).

As mais importantes características de textura do iogurte são a firmeza e a habilidade de reter água, sendo que estas duas propriedades estão intimamente relacionadas à estrutura do coágulo formado. Como a firmeza do gel é determinada pelo número e força das ligações entre as micelas de caseína, fatores que interferem na associação entre as micelas de caseína, como proteína de soja e glóbulos de gordura, resultam na formação de um coágulo menos firme (HASSAN et al., 1996).

As culturas utilizadas não afetaram a CRA dos leites fermentados ($p < 0,05$). O valor médio de CRA foi de 29,37% e 28,64% para as culturas Rich e La-5, respectivamente. Quando se compara a CRA para cada ingrediente, para ambas as culturas, houve diferença estatística ($p < 0,05$) somente no produto contendo 0,014% de aspartame + acesulfame-K no 28º dia após a fabricação (Tabela 18).

Tabela 18 – Comparação dos valores de CRA (%) dos leites fermentados pelas culturas Rich e La-5 a estocagem refrigerada.

Tratamentos	Dias	Rich	La-5
Controle	1	25,34 ^a ±2,11	27,48 ^a ±1,27
	14	27,99 ^a ±0,78	30,78 ^a ±1,17
	28	29,25 ^a ±2,06	30,32 ^a ±0,11
SAC 5%	1	26,24 ^a ±0,42	26,39 ^a ±0,18
	14	30,25 ^a ±3,27	31,22 ^a ±3,68
	28	28,84 ^a ±0,23	31,92 ^a ±3,68
ASP 0,025%	1	25,65 ^a ±1,35	26,19 ^a ±0,64
	14	30,57 ^a ±2,71	27,44 ^a ±1,32
	28	29,52 ^a ±1,87	28,53 ^a ±1,94
SCI 0,025%	1	29,15 ^a ±0,63	26,51 ^a ±1,11
	14	32,98 ^a ±2,71	28,40 ^a ±1,03
	28	29,35 ^a ±1,75	30,60 ^a ±0,21
ASA 0,014%	1	25,73 ^a ±1,65	26,25 ^a ±1,73
	14	28,19 ^a ±0,08	30,57 ^a ±1,50
	28	32,74 ^a ±1,38	27,45 ^b ±0,58
SAC 7%	1	26,65 ^a ±0,58	27,08 ^a ±0,18
	14	30,85 ^a ±2,98	31,59 ^a ±4,57
	28	29,86 ^a ±0,12	32,48 ^a ±4,03
ASP 0,035%	1	27,15 ^a ±0,52	26,98 ^a ±0,86
	14	31,23 ^a ±2,19	27,64 ^a ±0,84
	28	29,17 ^a ±1,48	28,75 ^a ±2,21
SCI 0,035%	1	28,88 ^a ±0,88	25,79 ^a ±2,54
	14	32,40 ^a ±2,22	28,43 ^a ±0,89
	28	30,29 ^a ±1,70	30,00 ^a ±0,37
ASA 0,020%	1	25,76 ^a ±1,68	27,22 ^a ±0,43
	14	28,73 ^a ±1,44	31,19 ^a ±0,39
	28	32,71 ^a ±1,20	28,85 ^a ±1,04

Média de dois processamentos. As análises foram realizadas em triplicata.

^{a, b} Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

SAC – sacarose; ASP – aspartame; SCI – sacarina + ciclamato; ASA – aspartame + acesulfame-K.

Os adoçantes utilizados na fabricação dos leites fermentados não afetaram negativamente a formação dos coágulos obtidos. Mozaffar e Haque (1992) mostraram que peptídeos anfipáticos, como o aspartame, afetam a interação proteína-proteína, que é um dos requisitos mais importantes durante a formação dos géis de iogurtes.

Remeuf et al. (2003) estudaram o efeito de caseinatos e concentrados protéicos de soro, usados juntos e separadamente, na capacidade de retenção de água de iogurtes. A CRA foi obtida pela centrifugação de 20 gramas do iogurte a 483 x G por 10 minutos. Os maiores valores de CRA (acima de 90%) foram obtidos nos produtos fortificados com leite em pó desnatado ou elaborados com misturas de caseinatos e concentrados protéicos de soro, pelo elevado teor de sólidos totais.

6. CONCLUSÕES

As características físico-químicas dos leites fermentados atenderam aos requisitos legais e apresentaram diferenças somente nos teores de sólidos totais, cinzas e valor calórico para os produtos elaborados com sacarose.

O tipo e a concentração de edulcorante afetaram (i) a fermentação da cultura La-5 e (ii) a acidez titulável dos produtos com a cultura Rich, no entanto, não influenciaram (iii) o tempo de fermentação da cultura Rich, (iv) a viabilidade de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*, (v) a acidez titulável dos produtos com a cultura La-5, (vi) a sinérese e (vii) a CRA dos leites fermentados elaborados.

O tipo de cultura (Rich e La-5) influenciou (i) o tempo de fermentação do leite, sendo superiores os tempos obtidos para La-5 e (ii) a acidez titulável, com valores superiores para a cultura Rich, no entanto, não influenciou (iii) a sinérese e a (iv) CRA dos leites fermentados elaborados.

Os diferentes tipos e concentrações de edulcorantes utilizados não tiveram influência sobre a qualidade dos produtos, portanto, todos podem ser empregados na fabricação de leites fermentados de baixa caloria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, K.; ARYANA, K.; BOENEKE, C. A. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. **Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 3, p. 424-429, 2007.

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 9, n. 3, p. 216-221, 2006.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.

ANTUNES, A. C. **Influência do concentrado protéico do soro de leite e de culturas probióticas nas propriedades de iogurtes naturais desnatados**. 2004. 219p. Tese de doutorado (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ANTUNES, L. A. F. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. **Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 6, n. 34, p. 30-34, 2001.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 13 ed. Washington: AOAC, 1980.

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

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. D. **Experimentação agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNESP, 1995.

BARRANTES, E.; TAMIME, A. Y.; SWORD, A. M. Production of low-calorie yogurt using skim milk powder and fat-substitute. 2. Compositional qualities. **Milchwissenschaft - Milk Science International**, Munchen, v. 49, n. 3, p. 135-19, 1994.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; ALMEIDA, D. K.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.

BARTOSHUK, L. M. Sweetness: history, preference, and genetic variability. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 11, p. 108-113, 1991.

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**, Champaign, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.

BELLENGIER, P.; RICHARD, J.; FOUCAUD, C. Associative growth of *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc mesenteroids* strains in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 8, p. 1520-1527, 1997.

BOTAZZI, V. **Aggiornamento di microbiologia dei batteri lattici**. Milano: Centro Sperimentale Del Latte, 1987. 372p.

BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 5, n. 25, p. 24-38, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >. Acesso em: 26/02/09.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, de 09 de janeiro de 2002. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1567&word=>>>. Acesso em: 21/05/2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos. Recomendações da comissão já aprovadas pela diretoria de alimentos em toxicologia, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alimentos/comissoes/tecno.htm>. Acesso em: 09/01/09.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos adulcorantes, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos. Resolução RDC nº 3, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=3181&word=>> >. Acesso em: 25/02/09.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". Resolução nº 5, de 13 de Novembro de 2000. **Diário Oficial da União**, 27 de novembro 2000. Seção 1, p. 9. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> >. Acesso em: 13/05/2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Portaria 369, 4 setembro de 1997. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis> >. Acesso em: 05/11/2008.

BRASIL. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de

Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2.

CÂNDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. **Alimentos para fins especiais: dietéticos**. 1ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 423p.

CASE, R. A.; BRADLEY, JR.; WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: **American Public Health Association**. Standard Methods for the examination of dairy products. 15 ed. p. 327-404, 1985.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 61-84, 2005.

COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. **Dairy starter cultures**. New York: Wiley-VCH, 1995. 277p.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Barking, v. 48, n. 5-6, p. 487-490, 1998.

COLLINS, M. L.; ARAMAKI, K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 3, p.353-357, 1980.

CORREDIG, M.; DALGLEISH, D. G. The mechanisms of the heat-induced interaction of whey proteins with casein micelles in milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 3-6, p. 233-236, 1999.

CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packing system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, Barking, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.

DAMIN, M. R. **Avaliação do efeito da suplementação do leite com hidrolisado de caseína, proteína concentrada de soro e leite em pó desnatado na produção de bioiogurtes fermentados por *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus***. Tese de Doutorado (Doutor em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effect of level of starter culture on viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts. **Food Australia**, North Sydney, v. 49, n. 4, p. 164-168, 1997a.

Dave, R. I., a Shah, N. P. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, n. 11, p. 707–715, 1997c.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 9, p. 1529-1536, 1996.

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

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 10, p. 1181-1189, 2006.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation for the probiotics in food. London, 2002.

FAROOQ, K.; HAQUE, Z. U. Effect of sugar esters on the textural properties of nonfat low calorie yogurt. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 10, p. 2676-2680, 1992.

FERREIRA, C. L. L. F. Microrganismos probióticos e de ação probiótica. **Leite & Derivados**, São Paulo, ano XVII , n.103, p. 17-20, 2008.

FONDEN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Culture-containing dairy products – effect on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, n. 352, 2000. 30p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M.; DESTRO, M. T. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, 182 p.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R; GUERZONI; M. E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 2, p. 125–134, 1999.

GESLEWITS, G. Probiotics: new strains amid growing pains. Vitamin retailer, 11(1):1-12, 2001. Disponível em: <www.vitaminretailer.com/VR/articles/Probiotics.htm>. Acesso em: 12/06/2008.

GIESE, J. H. Alternative sweeteners and bulking agents – an overview of their properties, function and regulatory status. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n.1, p.113-126, 1993.

GILLILAND, S. E.; STALEY, E. T.; BUSH, J. L. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 12, p. 3045-3051, 1984.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Guildford, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GOMES, R. G. **Efeito dos teores de leite, soro e proteínas de soja nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais de bebidas lácteas probióticas**. 2005, 161f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual "Julho de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, 2005.

GRICE, H. C.; GOLDSMITH, L. A. Sucralose - An overview of the toxicity. **Food Chemistry and Toxicology**, Chicago, v. 38, supl. 2, p.1-6, 2000.

GUEIMONDE, M.; DELGADO S.; BALTASAR, M.; MADIEDO-RUAS, P.; MARGOLLES A.; REYES-GAVILÁN, C. G. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, Barking, v. 37, n. 9, p. 839-850, 2004.

HAQUE, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Effect of fermentation temperature on the reology of set and stirred yogurt. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, n. 4-6, 2001.

HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CANOVAS, G. V. Low-fat set yogurt made from milk subjected to combinations of high hydrostatic pressure and thermal processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1074-1082, 2003.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; SCHMIDT, K. A.; SHALAB, S. I. Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 12, p. 2098-2103, 1996.

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

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HUGHES, D. B.; HOOVER, D. G. Viability and enzymatic acitivity of bifidobacteria in milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 2, 1995.

HULL, R. R.; ROBERTS, A. V. Differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 39, n. 4, p. 160–163, 1984.

HUSSAIN, I.; RAHMAN, A.; ATKINSON, N. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 9-12, 2009.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and enumeration of *L. acidophilus*. **Bulletin of the IDF n°306**, p. 23-33, 1995.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. **International IDF Standard 117/B**, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas de Instituto Adolfo Lutz**. 2 ed. São Paulo: IAL, 1985.

ISHIBASHI, N.; SHIMAMURA, S. *Bifidobacteria*: Research and development in Japan. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 6, p. 129–134, 1993.

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

JAROS, D.; ROHM, H.; HAQUE, A.; KNEIFEL, W. Influence of the starter cultures on the relationship between dry matter content and physical properties of set-style yogurt. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 57, n. 6, p. 325-328, 2002.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. L. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: their therapeutic potential and survival in yogurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, Highett, v. 52, n. 1, p. 241-245, 1997.

KAPITULA, M. M.; KLEBUKOWSKA, L.; KORNACKI, K. Evaluation of the possible use of potentially probiotic *Lactobacillus* strains in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 61, n. 2, p. 165-169, 2008.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KÜCÜCETIN, A. Effect of heat treatment of skim milk and final fermentation pH on graininess and roughness of stirred yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 61, n. 4, p. 385-390, 2008.

KURMANN, J. A. Os fatores biológicos e técnicos da fabricação do iogurte. In: Congresso Nacional de Laticínios, 4, Juiz de Fora, 1977, **Anais ...**, p. 74-84.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K., SALMINEN, S.; GORBACK, S.L. **Handbook of Probiotics**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1999, 211p.

LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Guildford, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends Food Science and Technology**, Cambridge, v.15, n. 2, p.67-78, 2004.

LIM, K. S.; HUH, C. S.; BAEK, Y. J. A selective enumeration medium for bifidobacteria in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 10, p. 2108-2112, 1995.

LIMA, S. C. G.; ALMEIDA, T. C. A.; GIGANTE, M. L. Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de sólidos nas características sensoriais do iogurte tipo firme. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 8, n. 2, p. 147-156, 2006.

LIN, S. Y.; AYRES, J. W.; WINKLER, W. J.; SANDINE, W. E. *Lactobacillus* effects on cholesterol: *in vitro* and *in vivo* products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 3045-3051, 1989.

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

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Effects of heat treatment and whey protein addition on the rheological properties and structure of acid skim milk gels. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 3-6, p. 275-279, 1999.

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

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

MARTEAU, P.; DE VRESE, M.; CELLIER, C. J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, n, 2, p. 430-436, 2001.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MATTO, J.; SAARELA, M. Lactic acid bacteria with health claims: interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, n. 1, p. 25-35, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P. M.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MILLER, C. W.; NGUYEN, M. H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The control of dissolved oxygen content in probiotic yogurts by alternative packing material. **Packaging Technology and Science**, v. 16, n. 2, p. 61-67, 2003.

MORTAZAVIAN, A. M.; EHSANI, M. R.; MOUSAVI, S. M.; REZAEI, K.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J. A. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 60, n. 2, p. 123-127, 2007.

MOZAFFAR, Z.; HAQUE, Z. U. Casein hydrolysate: 3. some functional properties of hydrophobic peptides synthesized from casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 573-579, 1992.

NABORS, L. B. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 2001. 553p.

NEIROTTI, E.; OLIVEIRA, A. J. Produção de iogurte pelo emprego de cultura lácticas mistas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 1-2, p. 1-16, 1988.

NELSON, A. L. **Sweeteners alternative: practical guide for the food industry**. Saint Paul: Eagan Press, 2000. 99p.

NIGHSWONGER; BRASHEARS, M. M.; GILLILAND, S. E. Viability of *L. acidophilus* and *L. casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p.212-219, 1996.

NIKOLELIS, D. P.; PANTOULIAS, S. Selective continuous monitoring and analyses of mixtures of acesulfame-K, cyclamate and saccharin in artificial sweetener tablets, diet soft drinks, yogurts and wines using filter-supported bilayer lipid membranes. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 73, n. 24, p. 5945-5952, 2001.

NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended Dietary Allowances – RDA**. 10 ed., Washington D. C.: National Academy of Sciences, 1989. 283p.

NUTRASWEET. Ingredient overview. **Bulletin Nutrasweet Kelco Company**, Deerfield, n. 5200, 1996. 4p.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, supl 0, p. 172-176, 2003.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 11-12, p. 935-942, 2001.

PARVEZ, S.; MALIK, A. K.; KANG, S.; KIM, Y. H. Probiotics and their fermented products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, 2006.

PEREIRA, M. A. G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogurtes**. 2002. 86 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2002.

PINHEIRO, M. V. S. **Caracterização de iogurtes fabricados com edulcorantes, fermentados por culturas lácticas probióticas**. 2003. 196 p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

PINHEIRO, M. V. S.; OLIVEIRA, M. N.; PENNA, A. L. B.; TAMINE, A. Y. The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts – a review. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 58, n. 4, p. 193-198, 2005.

PORTMAN, M. O.; KILCAST, D. Descriptive profiles of synergistic mixtures of bulk and intense sweeteners. **Food Quality and Preference**, Barking, v. 9, n. 4, p. 221-229, 1998.

RASIC, J. L.; KURMANN, J. A. **Yoghurt: scientific grounds technology, manufacture and preparation**. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978. 427p.

REMEUF, F.; MOHAMMED, S.; SODINI, I.; TISSIER, J. P. Preliminary observations on the effects of milk fortification and heating on microstructure and physical properties of stirred yogurt. **International Dairy Journal**, Barking, v. 13, n. 9, p. 773-782, 2003.

RODAS, M. A. B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. N.; SGARBI, C. R.; LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p. 304-309, 2001.

RYBKA, S.; FLEET, G. H. Populations of *Lactobacillus delbureckii* spp *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yogurts. **Food Australia**, North Sydney, v. 49, n. 10, p. 471-475, 1997.

RYBKA; S.; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yogurt bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, n. 8-9, p. 839-850, 1996.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, 2006.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão. **Boletim da Sociedade**

Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008. 101f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALJI, J. P.; ISMAIL, A. A. Effect of initial acidity of plain yoghurt on acidity changes during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n.1, p. 249-258, 1983.

SALMINEN, S.; BOULEY, M. C.; BOUTRON-RUALT, M. C.; CUMMINGS, J.; FRANCK, A.; GIBSON, G. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, suppl. 1, p.147-171, 1998.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SAXELIN, M. B.; GRENOV, U.; SVENSSON, R.; FONDEN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM. The technology of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, Guildford, v. 10, n. 12, p. 387-392, 1999.

SAXELIN, M.; PESSI, T.; SALMINEN, S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 199 – 203, 1995.

SCHMIDT, R. H.; SISTRUNK, C. P.; RICHTER, R. L.; CORNELL, J. A. Heat treatment and storage effects on texture characteristics of milk and yogurt systems fortified with oil-seed proteins. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, n. 3, p. 471-475, 1980.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 73, n. 2, p. 361s-364s, 2001.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p.894-907, 2000.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

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

SHIHATA, H. S.; SHAH, N. P. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 9, p. 765-772, 2002.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68-69, p. 41-50, 2000.

SILVA, S. V. **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SODINI, I.; LUCAS, A.; OLIVEIRA, M. N.; REMEUF, F. T.; CORRIEU, G. Effect of milk base and starter culture on acidification, texture and probiotic cell counts in fermented Milk processing. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 10, p.2479-2488, 2002.

SPILLANE, W. J.; RYDER, C. A.; WALSH, M. R.; CURRAN, P. J.; CONCAGH, D. G.; WALL, S. N. Sulfamate sweeteners. **Food Chemistry**, London, v. 56, n. 3, p. 291-302, 1996.

SPREER, E.; MIXA, A. **Milk and dairy product technology**. New York: Marcel Dekker, 1998. 483p.

STAFF, M. C. Cultured milk and fresh cheese. In: EARLY, R. **The technology of dairy products**. 2 ed. London: Blackie Academic, 1998. Cap. 4, p. 123-157.

STANLEY, G. Microbiology of fermented milk products. In: EARLY, R. **The Technology of Dairy Products**. 2 ed. London: Blackie Academic, 1998. Cap. 2, p. 50-80.

TALWALKAR, A.; MILLER, C. W.; KAILASAPATHY, K.; NGUYEN, M. H. Effect of packaging conditions and dissolved oxygen on the survival probiotic bacteria in yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 605-611, 2004.

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. **Yogurt: technology and biochemistry**. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 43, n. 12, p. 939-977, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: science and technology**. 3 ed. England: Woodhead Publishing Limited, 1999, 619 p.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K.; LATRILLE, E. Yoghurt and other fermented milks. In: TAMIME, A.Y.; LAW, B.A. **Mechanization and Automation in Dairy Technology**. Reading: Sheffield Academic, 2001. cap. 11, p. 296-317.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

THOMOPOULOS, C.; TZIA, C.; MILKAS, D. Influence of processing of solids-fortified milk on coagulation time and quality properties of yoghurt. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 48, n. 8, p. 426-430, 1993.

TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M. L.; PHILIPPI, S. T.; RODRIGUES, R. S. M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 145-150, 2000.

TRAMER, J. Yoghurt cultures. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 26, n. 1, p. 16-21, 1973.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos**. Tecnología, química y microbiología, p. 1-34, 365-401, 1994. Zaragoza: Acribia.

VASILJEVIC, T. SHAH, N. P. Probiotics: From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VELOZO, E. S. et al. **Química do leite: teoria da prática**. Salvador: UFBA, s.d. Disponível em: <<http://www.lapemm.ufba.br/leite.htm>>. Acesso em: 22/11/2008.

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

VINDEROLA, C. G.; COSTA, G. A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J. A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 7, p. 579-589, 2002.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v.10, n. 4, p. 271-275, 2000.

VINDEROLA, G. C.; BAILO, N.; REINHEIMER, A. J. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Research International**, Barking, v. 33, n. 2, p. 97-102, 2000.

VINDEROLA, G. C.; MOCCHUITTI, P.; REINHEIMER, A. J. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p.721-729, 2002.

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: Marcel Dekker, 1999. 727p.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2 ed. New York: CRC Press, 2006. 782p.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.