

Raquel Guttierres Gomes

Efeitos dos Teores de Leite, Soro e Proteínas de Soja nas
Características Físico-Químicas, Microbiológicas, Reológicas e
Sensoriais de Bebidas Lácteas Probióticas



1910001386



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos

**Efeito dos Teores de Leite, Soro e Proteínas de Soja nas
Características Físico-Químicas, Microbiológicas, Reológicas e
Sensoriais de Bebidas Lácteas Probióticas.**

Raquel Guttierres Gomes

Engenheira de Alimentos

Profª. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

Orientadora

São José do Rio Preto

2005



Raquel Guttierres Gomes

**Efeito dos Teores de Leite, Soro e Proteínas de Soja nas
Características Físico-Químicas, Microbiológicas,
Reológicas e Sensoriais de Bebidas Lácteas Probióticas.**



Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio
Preto, para obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Profª. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
Orientadora

São José do Rio Preto

2005



637.146

633e

04/04/2005

Doação

R\$ 30,00

AUTOR(A)

076/2005

112/05

Gomes, Raquel Gutierrez.

Efeito dos teores de leite , soro e proteínas de soja nas características físico-químicas , microbiológicas, reológicas e sensoriais de bebidas lácteas probióticas / Raquel Gutierrez Gomes – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

159 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Ana Lúcia Barretto Penna

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Bebida láctea . 2. Soro de leite . 3. Isolado protéico de soja. 4. Probióticos. 5. Prebióticos. 6. Alimentos funcionais. I. Penna, Ana Lúcia Barretto Penna. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 637.146



Raquel Guttierres Gomes

**Efeito dos Teores de Leite, Soro e Proteínas de Soja nas
Características Físico-Químicas, Microbiológicas,
Reológicas e Sensoriais de Bebidas Lácteas Probióticas.**

Comissão Julgadora

Presidente e orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

2º Examinadora: Profa. Dra. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

3º Examinador: Prof. Dr. Elizeu Antônio Rossi

São José do Rio Preto
2005

A **Deus** pela existência, força e por mais
esta conquista.

Aos **meus pais**, pela vida, pelo amor que
nos une e por sempre me incentivaram a
nunca parar de estudar.

O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.
(Isaac Newton 1643-1727)



AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, pela orientação, dedicação, apoio, confiança e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo, carinho e amor.

À CAPES pela concessão de bolsa de pesquisa durante o decorrer do trabalho.

À Rhodia pela doação das culturas lácteas, à Nestlé pela doação do leite em pó desnatado, à Sweet Mix pela doação do soro de leite em pó, à Bunge/Solae pela doação do isolado protéico de soja e à Duas Rodas pela doação do aroma e corante.

Aos professores pela dedicação e ensinamentos.

Aos colegas de curso pelo apoio.

Aos técnicos Ginaldo e Tânia, pelos auxílios prestados.

Ao amigo Kólem, pelo carinho e ajuda.



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 Alimentos funcionais	24
3.2 Bebidas lácteas	28
3.3 Soro de queijo	33
3.4 Proteínas de soja	39
3.5 Bactérias lácteas usadas em leite fermentados	46
4. MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Equipamentos	56
4.2 Matérias primas	57
4.3 Métodos	57
4.3.1 Preparação da cultura láctica	57
4.3.2 Preparação da bebida	58
4.3.3 Planejamento estatístico dos ensaios experimentais	58
4.3.4 Análises físico-químicas das matérias primas e das bebidas lácteas	60
4.3.5 Caracterização microbiológica das bebidas lácteas	61
4.3.6 Caracterização reológica das bebidas lácteas	62
4.3.7 Avaliação sensorial das bebidas lácteas	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
5.1 Caracterização das matérias primas	65
5.2 Caracterização da cultura láctica	69



5.3 Caracterização físico-química das bebidas lácteas	73
5.3.1 Tempo de fermentação	76
5.3.2 Valor de pH e acidez titulável	78
5.3.3 Teor de proteínas	82
5.3.4 Teor de sólidos	84
5.3.5 Teor de cinzas	87
5.4 Caracterização microbiológica das bebidas lácteas	90
5.5 Avaliação sensorial das bebidas lácteas	100
5.6 Caracterização reológica das bebidas lácteas	108
5.7 Formulação otimizada	117
6. CONCLUSÕES	131
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	134
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
APÊNDICES	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do processo de obtenção de soro	34
Figura 2	Fluxograma do processamento da proteína isolada de soja	43
Figura 3	Ficha de avaliação sensorial	64
Figura 4	Crescimento das colônias de <i>Bifidobacterium</i> no meio de cultura MRS-IM ágar glicose com solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína, após 72 horas de incubação	71
Figura 5	Crescimento das colônias de <i>L. acidophilus</i> no meio de cultura MRS-IM ágar com maltose, após 72 horas de incubação	71
Figura 6	Crescimento das colônias de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> no meio de cultura MRS-IM glicose acidificado, após 72 horas de incubação	72
Figura 7	Crescimento das colônias de <i>S. thermophilus</i> no meio de cultura ágar M17, após 48 horas de incubação	72
Figura 8	Tempos de fermentação obtidos nos processos de fabricação das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	76
Figura 9	Valores de pH das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	80
Figura 10	Valores de acidez das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	81
Figura 11	Valores de proteínas das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	82
Figura 12	Efeito dos teores de leite em pó desnatado e de isolado protéico de soja sobre o teor de proteínas das bebidas lácteas	83
Figura 13	Valores de sólidos totais das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	84
Figura 14	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5%	86



Figura 15	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0%	86
Figura 16	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5%	87
Figura 17	Valores de cinzas das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2	88
Figura 18	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5%	89
Figura 19	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0%	89
Figura 20	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5%	90
Figura 21	Contagem de microrganismos, em UFC/mL, das bebidas lácteas do bloco 1	93
Figura 22	Contagem de microrganismos, em UFC/mL, das bebidas lácteas do bloco 2	94
Figura 23	Efeito dos teores de leite em pó e de isolado protéico de soja sobre a população de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	99
Figura 24	Valores médios da aceitabilidade geral, aparência, cor, consistência, sabor e aroma das bebidas lácteas do bloco 1	102
Figura 25	Valores médios da aceitabilidade geral, aparência, cor, consistência, sabor e aroma das bebidas lácteas do bloco 2	102
Figura 26	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5 %	106

Figura 27	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0 %	107
Figura 28	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5 %	107
Figura 29	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de consistência (K) ascendente das bebidas lácteas	113
Figura 30	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) ascendente das bebidas lácteas	113
Figura 31	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de consistência (K) descendente das bebidas lácteas	115
Figura 32	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) descendente, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5 %	115
Figura 33	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) descendente, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0 %	116
Figura 34	Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) descendente, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5 %	116
Figura 35	Curvas de acidificação das bebidas lácteas otimizadas do tratamento 3	119
Figura 36	Curvas de acidificação das bebidas lácteas otimizadas do tratamento 7	119

Figura 37	Curva de pH durante os 42 dias de armazenamento das bebidas lácteas otimizadas	121
Figura 38	Curva de acidez titulável (°D) durante os 42 de armazenamento das bebidas lácteas otimizadas	121
Figura 39	Contagem de microrganismos probióticos e tradicionais da bebida láctea otimizada do tratamento 3	123
Figura 40	Contagem de microrganismos probióticos e tradicionais da bebida láctea otimizada do tratamento 7	123
Figura 41	Reogramas da formulação otimizada do tratamento 3	126
Figura 42	Reogramas da formulação otimizada do tratamento 7	126
Figura 43	Sinérese das bebidas lácteas otimizadas durante o armazenamento	128
Figura 44	Acompanhamento da sinérese das bebidas lácteas otimizadas	130

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Compostos presentes nos alimentos funcionais e os benefícios à saúde	26
Quadro 2	Composição química do leite integral, desnatado e dos soros doce e ácido	35
Quadro 3	Comparação entre a digestibilidade de várias fontes de proteínas	36
Quadro 4	Composição química (g/100 mL) de “leite” de soja	41
Tabela 1	Planejamento dos experimentos	59
Tabela 2	Valores de pH, teores de acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais das matérias primas do bloco 1	66
Tabela 3	Valores de pH, teores de acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais das matérias primas do bloco 2	66
Tabela 4	Valores da população de <i>Bifidobacterium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i> na cultura láctica usada para fermentação das bebidas lácteas do bloco 1	69
Tabela 5	Valores da população de <i>Bifidobacterium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> e <i>S. thermophilus</i> na cultura láctica usada para fermentação das bebidas lácteas do bloco 2	69
Tabela 6	Valores médios das análises físico-químicas das bebidas lácteas do bloco 1	74
Tabela 7	Valores médios e resultados do Teste de Tukey das análises físico-químicas das bebidas lácteas do bloco 2	75
Tabela 8	Valores médios da população dos microrganismos, em UFC/mL, nas bebidas lácteas do bloco 1	91



Tabela 9	Valores médios da população dos microrganismos, em UFC/mL, nas bebidas lácteas do bloco 2	92
Tabela 10	Valores médios da avaliação sensorial das bebidas lácteas do bloco 1	100
Tabela 11	Valores médios da avaliação sensorial das bebidas lácteas do bloco 2	101
Tabela 12	Parâmetros reológicos das bebidas lácteas do bloco 2 obtidos pelo Modelo da Lei da Potência ($\tau = K \dot{\gamma}^n$).	109
Tabela 13	Médias das características físico-químicas das formulações otimizadas	118
Tabela 14	Valores de pH e acidez das bebidas lácteas otimizadas, durante o armazenamento	120
Tabela 15	Caracterização microbiológica das bebidas lácteas otimizadas	122
Tabela 16	Parâmetros reológicos das bebidas lácteas otimizadas obtidos pelo Modelo da Lei da Potência ($\tau = K \dot{\gamma}^n$).	125
Tabela 17	Valores médios da análise sensorial das bebidas lácteas otimizadas	128
Tabela 18	Acompanhamento da sinérese das bebidas lácteas otimizadas durante o armazenamento	129

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A	Curvas de acidificação das bebidas lácteas do bloco 2	147
Apêndice B	Análise de variância para os dados experimentais de pH das bebidas lácteas	151
Apêndice C	Análise de variância para os dados experimentais de acidez titulável das bebidas lácteas	151
Apêndice D	Análise de variância para os dados experimentais do teor de proteínas das bebidas lácteas	151
Apêndice E	Análise de variância para os dados experimentais dos teores de sólidos totais das bebidas lácteas	152
Apêndice F	Análise de variância para os dados experimentais dos teores de cinzas das bebidas lácteas	152
Apêndice G	Análise de variância para os dados experimentais da contagem de <i>Bifidobacterium</i> das bebidas lácteas	152
Apêndice H	Análise de variância para os dados experimentais da contagem de <i>L. acidophilus</i> das bebidas lácteas	153
Apêndice I	Análise de variância para os dados experimentais da contagem de <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> das bebidas lácteas	153
Apêndice J	Análise de variância para os dados experimentais da contagem de <i>S. thermophilus</i> das bebidas lácteas	153
Apêndice L	Análise de variância para os dados experimentais de aceitabilidade geral das bebidas lácteas	154
Apêndice M	Análise de variância para os dados experimentais de sabor das bebidas lácteas	154



Apêndice N	Análise de variância para os dados experimentais de índice de consistência (K) ascendente das bebidas lácteas	154
Apêndice O	Análise de variância para os dados experimentais de índice de comportamento de fluxo (n) descendente das bebidas lácteas	155
Apêndice P	Análise de variância para os dados experimentais de índice de consistência (K) descendente das bebidas lácteas	155
Apêndice Q	Análise de variância para os dados experimentais de índice de comportamento de fluxo (n) descendente das bebidas lácteas	155
Apêndice R	Reogramas das bebidas lácteas do bloco 2	156

RESUMO

Na tendência dos alimentos saudáveis, as indústrias de laticínios estão entre as que apresentam o maior crescimento no mercado de alimentos para fins especiais, incluindo os produtos funcionais. Este setor emergente de funcionais engloba as categorias dos nutracêuticos, bebidas funcionais nutricionais contendo probióticos, prebióticos, proteínas de soja e fitosteróis, com forte potencial de crescimento. Neste contexto, foi estudado o efeito dos teores de soro de leite em pó (3,0; 3,5; 4,0%), leite em pó desnatado (4,0; 5,0; 6,0%) e isolado protéico de soja (1,5; 2,0; 2,5%) na caracterização físico-química, microbiológica e reológica e avaliação sensorial de doze formulações de bebidas lácteas funcionais. A bebida láctea foi fermentada por uma cultura láctea contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*. Os produtos foram submetidos à análises físico-químicas (pH, acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais), contagem das bactérias lácticas, avaliação sensorial (aceitabilidade geral, aparência e cor, consistência, sabor e aroma) e avaliação reológica. As bebidas lácteas apresentaram características físico-químicas e microbiológicas normais, atendendo o estabelecido pela legislação brasileira em vigor. Os produtos apresentaram características reológicas de fluido não Newtoniano, com a presença de tixotropia. As bebidas lácteas funcionais preparadas conforme os tratamentos 3 e 7, contendo 3,0% de soro de leite em pó, 6,0% de leite em pó desnatado e 1,5 ou 2,5% de isolado protéico de soja, respectivamente, obtiveram os maiores valores para os atributos sensoriais ou as maiores contagens dos microrganismos probióticos. Foi feito o acompanhamento destes produtos em estocagem refrigerada por 42 dias. Observou-se diminuição do pH, aumento da acidez, variações no índice de consistência, presença de sinérese, e preferência pela bebida láctea do tratamento 3. As bebidas lácteas funcionais formuladas com soro, leite e proteínas de soja, preparadas nas condições

experimentais, mostraram características físico-químicas adequadas, boa aceitabilidade pelos consumidores, e elevadas contagens de probióticos, tornando-se uma opção conveniente, barata, de alto valor nutritivo, e podendo ser considerada fonte de probióticos.

Palavras Chaves: bebida láctea, soro de leite, isolado protéico de soja, probióticos, prebióticos e alimentos funcionais.

ABSTRACT

Following the trend of elaboration of healthy foods, dairy industries are among the industries that had shown the biggest increase in the market of special purpose food, including the functional products. This emerging market of functional foods or items include the categories of nutraceuticals, functional nutritional beverages containing probiotic, prebiotic, soy proteins and phytosterols, with high growth potential. In this context it was studied the effect of whey milk powder (3,0; 3,5; 4,0%), skim milk powder (4,0; 5,0; 6,0%); and soy protein isolated (1,5; 2,0; 2,5%) contents on the physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of 12 different formulas of functional dairy beverages. The dairy beverage was fermented by a starter culture containing *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*. The product was submitted to physicochemical evaluations (pH, acidity, proteins, ash and total solids contents), lactic bacteria counts, a sensory evaluation (general acceptance, appearance, flavor and aroma) and rheology. The beverages showed normal physicochemical and microbiological characteristics in conformity to the Brazilian legislation in force. The products showed non-Newtonian fluid rheological characteristics, and tixotropy was noted. The functional dairy beverages prepared according to the treatment 3 and 7 that contained 3.0% whey milk powder, 6.0% skim milk powder, 1.5 or 2.5% soy protein isolate respectively, presented the biggest values of sensorial attributes and/or the highest counts of probiotic microorganisms. An evaluation of refrigerated storage during 42 days was performed. It was observed a decrease of pH, increase in acidity, variations on consistency index, presence of syneresis, and preference for the dairy beverage prepared according to treatment 3. The functional dairy beverages formulated with whey, milk and soy proteins prepared under experimental conditions, showed suitable physicochemical characteristics,

good acceptability by consumers, high counts of probiotics microorganisms, becoming a suitable low-cost, and highly nutritional option, considered an important source of probiotics.

Keywords: dairy beverages, whey milk powder, soy protein isolate, probiotic, prebiotic and functional foods.

1 INTRODUÇÃO

Fatores como mudanças na atitude e expectativa dos consumidores em relação aos alimentos adquiridos e disponíveis nas prateleiras dos supermercados, relação entre os constituintes dietéticos e os processos fisiológicos, e avanço da ciência e tecnologia têm ampliado o mercado de alimentos funcionais. [Esses alimentos, além da função normal de nutrir, exercem uma função específica na saúde.]

A ciências de alimentos, anteriormente, preocupava-se em desenvolver alimentos para a sobrevivência humana, objetivo que foi substituído pelo conceito de produzi-los com qualidade.

No entanto, o reconhecimento da relação positiva entre dieta e saúde tem levado os consumidores a mudanças nos hábitos alimentares, com o intuito de se prevenir contra doenças como o câncer, evitar problemas como a diarreia e a constipação; reduzir doenças coronárias decorrentes do alto nível de colesterol no sangue; promover a saúde de ossos e dentes; e aumentar a resistência à doenças.

Seguindo esta tendência, as indústrias de laticínios estão entre as que apresentam maior crescimento de produtos funcionais, em especial nos iogurtes e leites fermentados com a utilização de culturas probióticas.

Os produtos lácteos podem ser adaptados para atender as exigências de praticamente qualquer tendência, produtos de baixo ou pelo contrário, de alto valor calórico, desde produtos dietéticos especiais para tratamentos nutricionais específicos até deliciosas sobremesas.

No Brasil, o aumento do consumo de iogurte começou em 1970, quando a produção era de cerca de 100 gramas *per capita* por ano. Na década de 90, o mercado de iogurte passou por um crescimento expressivo, especialmente de 94 para 95, quando o consumo praticamente duplicou. Nos anos seguintes, a ampliação do mercado foi contínua e essa tendência mantém-

se até hoje, pois segundo a Associação Brasileira da Indústria de Iogurtes, o consumo per capita de iogurte no Brasil em 2002 foi de 4,1 kg/habitante/ano, superior a 2,7 kg/habitante ano em 2001.

Até o presente, o consumo de leite fermentado esteve baseado no iogurte produzido com *S. thermophilus* e *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, mas atualmente também se utiliza microrganismos chamados probióticos, que promovem benefícios nos indivíduos, associados ou não aos microrganismos tradicionais, ou como agentes que melhoram as características tecnológicas do produto tradicional, reduzindo a acidificação do iogurte e leites fermentados. As bactérias mais utilizadas são os lactobacilos, como o *L. acidophilus* e as bifidobactérias.

O soro de queijo, apesar de seu elevado valor nutritivo, pela presença de proteínas de alto valor biológico, vitaminas do complexo B, vitaminas lipossolúveis e diversos minerais, ainda é visto por muitas empresas como um resíduo e não como um subproduto capaz de representar uma fonte de recursos para os laticínios.

O Brasil produz aproximadamente 4 milhões de toneladas de soro/ano e por ser um subproduto da indústria de queijo e caseína, normalmente é descartado. Mas como é um potente agente de poluição, pode provocar a destruição da flora e fauna devido ao excessivo consumo de oxigênio. Descartar o soro sem um tratamento eficiente não é só um crime previsto por lei, mas é também rejeitar um alimento que possui alta qualidade.

A maior diferenciação no mercado brasileiro comparado à de outros países europeus refere-se às bebidas lácteas nas quais são adicionados soro de queijos (20 a 40%) o que além de reduzir os custos resulta em um produto bastante leve e refrescante. Outra característica da indústria de iogurte e bebidas lácteas fermentadas no Brasil é que a mesma, embora ainda bastante concentrada na mão de grandes empresas, a cada ano passa a ter uma participação maior de médias e pequenas empresas regionais.



O suplemento limitado de proteínas animais em algumas partes do mundo gera a necessidade de se desenvolver processos pelos quais as proteínas vegetais possam ser incorporadas na alimentação. Entre os alimentos de origem vegetal, a soja é a melhor fonte de proteínas, tanto em qualidade como em quantidade e também possui um conjunto de substâncias que atuam na manutenção da saúde. No entanto, os produtos à base de soja não são tão largamente aceitos no Ocidente quanto o são no Oriente. O sabor característico da soja crua e os oligossacarídeos não digeríveis são obstáculos que limitam o uso popular da soja. Numerosos processos têm sido desenvolvidos para remover ou reduzir esses fatores indesejáveis. As bactérias lácticas são utilizadas para melhorar a aceitabilidade do extrato de soja, bem como para a fabricação de “iogurtes” contendo extrato de soja com características sensoriais aceitáveis.

Nos últimos anos tem-se incrementado de maneira notável o consumo de bebidas lácteas fermentadas que se caracterizam por apresentar baixa viscosidade e são consumidas como bebidas suaves e refrescantes.

Neste contexto, o desenvolvimento de uma bebida fermentada com microrganismos probióticos, formulada com leite, soro e proteínas de soja, seria uma alternativa bastante inovadora para o aproveitamento do soro nas indústrias lácteas, sem a necessidade de grandes investimentos em equipamentos ou mudanças nos processos de fabricação. Com isso, as empresas também estariam reduzindo o desperdício e a poluição, além do recebimento das receitas provenientes deste novo produto com maior valor agregado.



2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Propor uma alternativa para o aproveitamento do soro de leite;
- Elaborar bebidas lácteas probióticas adicionadas de proteínas de soja;
- Avaliar as características físico-químicas, microbiológica, reológica e sensoriais das bebidas;
- Estudar o efeito dos teores de leite, soro e proteínas de soja nas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e no grau de aceitação de bebidas lácteas probióticas utilizando a metodologia de superfície de resposta;
- Definir a melhor formulação da bebida láctea utilizando soro e proteínas de soja e avaliar suas características durante o armazenamento;



3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos Funcionais

Os produtos funcionais constituem um segmento do mercado de alimentos que têm apresentado um crescimento nas últimas duas décadas (PARK; KOO; CARVALHO, 1997).

Seja qual a definição adotada, todos os alimentos funcionais são vistos como promotores de saúde e podem estar relacionados à redução de riscos a certas doenças. Entretanto, os cientistas esclarecem que os alimentos funcionais sozinhos não podem garantir a boa saúde, eles podem melhorar a saúde quando parte da dieta contém uma variedade de alimentos, incluindo frutas, vegetais, grãos e legumes.

O Brasil foi o primeiro país da América Latina a ter legislação específica para novos alimentos que tenham alegações funcionais. No Japão a legislação existe desde a década de 80 e o país possui mais de 200 diferentes tipos de alimentos funcionais. A importância dada aos alimentos é tanto que foi criado um selo de qualidade para alimentos funcionais pelo governo japonês (LAJOLO, 2001).

O conceito de alimento funcional surgiu no Japão nos anos 80, associados à questão do envelhecimento populacional, aumento da expectativa de vida, ocorrência na terceira idade de doenças crônico-degenerativas tais como o câncer, a hipertensão, diabetes, artrites e cardiopatias. Neste período houve um grande incentivo ao desenvolvimento de projetos para a caracterização de alimentos e/ou ingredientes que possuíssem além de suas funções nutricionais normais, uma função modeladora dos processos metabólicos. Estes alimentos poderiam melhorar as condições de saúde, promover o bem estar, prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas, e conseqüentemente, reduzir a escalada dos custos nacionais da previdência social com o amparo à saúde (PUPIN, 2001). Em 1991, o conceito

de alimentos benéficos para a saúde recebeu o nome de FOSHU (*Food for Specified Health Use*) pelo Ministério da Saúde e Bem Estar no Japão (ALIMENTOS, 2001).

A Portaria nº 398 de 30/04/1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil fornece a definição legal de alimentos funcional: “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

Nessa portaria faz-se distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedades de saúde, como segue:

- alegação de propriedades funcional: é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (seja nutriente ou não) têm no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.
- alegação de propriedades de saúde: é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doenças ou condição relacionada à saúde. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

O que torna funcional um alimento é a presença ou não de um novo grupo de compostos identificados nas frutas e nos vegetais, que desempenham um papel fundamental para o organismo: ajudam a promover a saúde e a prevenir doenças, oferecendo apoio ao sistema de defesa interno (PARK; KOO; CARVALHO, 1997).

No Quadro 1, estão descritos alguns exemplos de componente com ação funcional presentes nos alimentos e seus possíveis efeitos.

Lajolo (2001a) sugeriu a seguinte definição para alimentos funcionais: alimentos semelhantes em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir demonstrados efeitos metabólicos ou fisiológicos, úteis na manutenção de

uma boa saúde física e mental, podendo auxiliar na redução do risco de doenças crônico/degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas.

Quadro 1 Compostos presentes nos alimentos funcionais e os benefícios à saúde.

Classe	Compostos	Possíveis Efeitos
Prebióticos: oligossacarídeos; polissacarídeos	Frutooligosacarídeos (inulina) e soja; fibra solúvel e insolúvel	Aumento do número de bactérias bifidogênicas, redução do risco de câncer e de doenças cardíacas
Probióticos: bactérias lácteas	<i>L. acidophilus e Bifidobacterium</i>	Melhora do balanço microbiano no intestino, redução do risco de câncer
Flavonóides	Quercitina, catequina, genisteína, daidzeína, hesperidina, maríngena, antocianinas	Redução do risco de doenças cardíacas
Carotenóides	Licopeno, luteína, zeaxantina, beta-caroteno	Redução do risco de câncer
Organosulfurados	Glucosinolatos, alicina, isotiocianatos	Redução do risco de câncer
Fitosteróis	Sitosterol, sitostanol, campesterol, stigmasterol, orizanol	Redução do risco de doenças cardíacas
Ácidos graxos	Linoléico (n-6), alfa-linolênico (n-3), eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DPA)	Redução do risco de doenças cardíacas

Fonte: Lajolo, 2001a.

Quanto aos alimentos industrializados com caráter funcional, é importante esclarecer que o simples consumo desse tipo de alimento, com a finalidade de obter um menor risco para o desenvolvimento de doenças, não atingirá o objetivo proposto se não for associado a um estilo de vida saudável levando em consideração principalmente, a alimentação e a atividade física (STELLA, 2002).

Para serem comercializados esses alimentos devem ter registro no Ministério da Saúde e para obterem registro precisam demonstrar sua eficácia e sua segurança de uso, nesse caso, com base em análise de risco (LAJOLO, 2002).

Atualmente, existem cinco segmentos de mercado onde encontrar alimentos funcionais: bebidas, produtos lácteos, produtos de confeitaria, produtos de panificação e cereais matinais. Os principais fatores que garantirão este desenvolvimento futuro serão: a qualidade do produto, segurança a respeito da procedência e qualidade do alimento, ética e conservação ambiental. Tais fatores demonstram que o potencial de crescimento do mercado de alimentos funcionais movimentou cerca de 27,8 bilhões de dólares em 1998, 31,6 bilhões em 1999, e estima-se que alcançará 51,3 bilhões em 2004. [Só nos EUA o mercado de alimentos funcionais foi de cerca de 17 bilhões em 2001]. Entre as dificuldades para uma maior expansão incluem-se a legislação, confusão do consumidor com o conceito de alimento funcional, mensagens muito complicadas sobre os benefícios para a saúde e a percepção dos alimentos funcionais pelos consumidores (BRANDÃO, 2002).

O mercado de produtos funcionais está aberto e não é difícil prever para o mercado brasileiro um futuro promissor, principalmente relacionado aos iogurtes e leites fermentados contendo culturas probióticas e substâncias prebióticas (PENNA, 2002).

[Os prebióticos podem ser definidos como: ingredientes alimentares não digeríveis que afetam de maneira benéfica o organismo por estimular seletivamente o crescimento e ou atividade de um ou de um número limitado de bactérias no cólon. São substâncias que modificam a composição da microflora colônia da tal forma que as bactérias com potencial de promoção de saúde (i.e. não patogênicas, especialmente *Lactobacilli* e *Bifidobacterium*) se tornam a maioria predominante (PUPIN, 2002).

Para ser considerado prebiótico, um ingrediente alimentar deve atender aos seguintes itens: não pode ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato gastrointestinal; deve



ser seletivamente fermentado por um ou um limitado número de bactérias potencialmente benéficas no cólon; deve alterar a composição da microbiota colônica para uma composição mais saudável; deve preferencialmente induzir efeitos que são benéficos para a saúde do hospedeiro (PUPIN, 2002).

A funcionalidade dos alimentos prebióticos está relacionada à sua atuação direta no aumento do tempo de esvaziamento do estômago, na modulação do trânsito do trato gastrointestinal, na diminuição do colesterol, via adsorção de ácidos biliares (FERREIRA, C., 2001a; BERTERRECHE, 2002) e à sua atuação indireta na modulação da fermentação microbiana através de estímulo das bactérias bífidas, que são responsáveis pela diminuição do pH e da absorção de amônia (TOMOMATSU, 1994; FERREIRA, C., 2001a; BERTERRECHE, 2002).

3.2 Bebidas Lácteas

Aliado à necessidade de se criar alternativas para a utilização do soro proveniente da crescente produção de queijos no Brasil, a produção de bebida láctea utilizando soro de queijo em sua formulação vem ganhando um mercado muito grande. Isto deve principalmente ao maior nível de informação sobre os benefícios nutricionais, menor custo de produção para o fabricante, e redução do preço final para o consumidor (SANTOS; FERREIRA, 2001).

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 1999) especifica que bebida láctea é o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea representa pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto.

O mesmo regulamento define Bebida Láctea Fermentada como o produto descrito na definição acima, fermentada mediante a ação de cultivo de microrganismos específicos, e/ou



adicionado de leite fermentado e/ou outros produtos lácteos fermentados e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácteas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 1999).

As bebidas lácteas podem conter em sua formulação além do soro do leite e dos cultivos de bactérias lácticas já tradicionais, acidulantes, aromatizantes, reguladores de acidez, estabilizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, pedaços de polpa ou sucos de frutas, mel, etc. (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

Os leites fermentados e iogurtes são considerados produtos saudáveis, similares ao leite, fontes de proteínas de alta qualidade, cálcio, fósforo, magnésio, zinco e vitaminas. A ação proteolítica das culturas bacterianas usadas na fermentação resulta em maior teor de aminoácidos livres, embora a concentração de aminoácidos totais seja equivalente ao do leite (BUTTRISS, 1997).

A categoria iogurte líquido e outras bebidas lácteas (bebidas à base de iogurte, “shakes”, leites modificados) teve um aumento significativo durante o período de 3 anos, com diversas inovações na categoria, inclusive bebidas com culturas vivas, bebidas enriquecidas com sabor, lançamentos de novos sabores e de bebidas à base de soja (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002). Hoje, a indústria de iogurte está dominada pelo iogurte batido, pois este permite aos produtores adicionar vários estabilizantes para prevenir a sinérese durante a vida de prateleira (LUCEY, 2002). O produto final deve apresentar os microrganismos de forma viável e abundante (SEIBEL, CANSIAN, 2000).

As bebidas lácteas são produtos formulados contendo iogurte, soro de leite, polpa ou suco de frutas, outras matérias primas e aditivos permitidos. Estas bebidas apresentam grau de acidez mais baixo e se adaptam melhor ao paladar do brasileiro. Estes produtos foram os responsáveis pelo crescimento do mercado de iogurtes. Essa nova combinação foi resultado

da constatação de que cerca de 50 a 60% do consumo de leite no Brasil é modificado e sendo assim as bebidas lácteas apresentam-se como uma boa alternativa, com a vantagem da pasteurização que permite uma validade de 30 dias (ALMEIDA, BONASSI, ROÇA, 2000).

Para os laticínios, a conversão de soro líquido em bebidas, fermentadas ou não, é uma das mais atrativas opções para utilização do soro, devido à simplicidade do processo, utilização de equipamentos comuns para o beneficiamento do leite, além das excelentes propriedades funcionais das proteínas do soro (LIMA; MADUREIRA; PENNA, 2002).

Estudos têm mostrado a viabilidade da utilização do soro em concentrações que pode variar de 30 a 70% da quantidade líquida total para a produção de bebidas lácteas, diminuindo assim o desperdício e a poluição, e principalmente aumentando o valor nutricional deste produto (SEIBEL; CANSIAN, 2000).

As bebidas lácteas podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com características específicas: bebidas refrescantes (bebidas de baixos preços e curta vida de prateleira), bebidas destinadas à dietas de esportistas ou outras dietas específicas (altos preços e média vida de prateleira), bebidas fermentadas similares aos leites fermentados (possuem ação sobre a microflora intestinal, propriedades metabólicas e grande aceitação pelos consumidores) e as bebidas nutritivas (baixos preços, grande vida de prateleira e alto valor nutritivo) (MARCHINI, 1998).

Mais recentemente, a indústria tem utilizado outros ingredientes opcionais, como os substitutos de gordura, edulcorantes para substituir o açúcar, vitaminas, fibras, prebióticos e microrganismos probióticos, dependendo do tipo de produto que se quer produzir e do público alvo (TAMINE, 1997; BERTERRECHE, 2002; FERREIRA, A., 2002).

Na literatura encontramos diversos estudos sobre a fabricação de bebidas fermentadas ou não, adicionadas de soro.

Barbosa et al. (2003) elaboraram uma bebida láctea fermentada, onde ao soro líquido foram adicionados uma mistura composta de estabilizantes, açúcar, soro em pó, cultura láctea (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus*), polpa e aroma. Os produtos foram submetidos a análises físico-químicas (pH e acidez) e sensoriais. As bebidas apresentaram acidez final variando entre 0,66% e 0,73% de ácido láctico e pH entre 4,35 e 3,70 e na avaliação sensorial o produto apresentou características positivas ficando a pontuação entre gostei muito e gostei moderadamente (médias entre 7 e 8).

Gonçalves et al. (1994) desenvolveram uma bebida láctea com soro de queijo Minas frescal, acrescido de 10% de açúcar refinado e cerca de 2% de uma cultura de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus*. As bebidas lácteas foram embaladas e armazenadas sob refrigeração durante 30 dias. Foi verificada sua estabilidade através de análises físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas. O pH da bebida pronta foi de 4,29 e a acidez média de 3,82%. Os resultados sensoriais demonstraram a possibilidade desse produto vir a ser industrializado.

Almeida, Bonassi e Roça (2001) elaboraram uma bebida láctea preparada com três concentrações de soro de queijo Minas frescal (30, 40 e 50%), empregando-se dois tipos de culturas lácteas: uma tradicional para iogurte contendo *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. lactis* e *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e outra contendo *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*. O objetivo foi de verificar as características físicas e químicas e sua estabilidade durante 28 dias. O pH das bebidas probióticas (5,07 a 5,14) foi maior que o pH do iogurte tradicional (4,56 a 4,63), pois algumas espécies de *Bifidobacteria* não se desenvolvem em pH entre 4,50 e 5,00. Houve diminuição do teor de gordura e extrato seco a medida que aumentava a proporção de soro em relação ao leite, houve também uma diminuição no teor de proteína, mas esta não foi significativa.



Uma bebida láctea, à base de soro de queijo, foi fortificada com ferro e vitaminas A e D, aromatizadas com sabor morango ou chocolate, e submetida à análise sensorial, através de teste de aceitação. O objetivo foi avaliar a aceitação das bebidas de soro para uso em programa de intervenção nutricional de tratamento de portadores de anemias ferropriva. Foram avaliados três níveis de concentração de polpa (12, 15 e 18%) para a bebida sabor morango e dois níveis de açúcar (8 e 10%) na bebida sabor chocolate. O teste de aceitação, para cada formulação, foi aplicado a provadores não treinados, com fichas contendo a identificação de faixa etária e sexo do provador. Os resultados mostraram maior aceitação para a bebida sabor morango contendo 15% de polpa e para a bebida sabor chocolate contendo 8% de açúcar (ALMEIDA et al., 1999).

Silva et al. (2001) desenvolveram uma bebida láctea fermentada à base de soro de queijo, fortificada com ferro aminoácido quelato, e avaliaram as características físico-químicas, microbiológicas, nutricionais e sensoriais. O produto apresentou-se estável, com elevado valor nutritivo, teor de ferro de 4,1 mg/80 mL e uma média de 78% de aceitação na análise sensorial. Portanto, o produto apresentou-se como um adequado veículo para suplementação com ferro.

Santos e Ferreira (2001) desenvolveram uma bebida láctea fermentada, sabor cravo e canela, com o objetivo de criar alternativas para o aproveitamento do soro pelos laticínios. O produto final apresentou 2% de gordura, acidez titulável de 0,70% e pH 4,25. A acidez do produto bem como o aroma de cravo e canela tiveram elevada aceitação pelos provadores, sendo o produto adequado para ser colocado junto ao mercado consumidor pelos pequenos e médios laticínios.

Lima (2003) elaborou uma bebida láctea à base de soro de queijo fortificada com ferro e avaliou as características físico-químicas e sensoriais. Os pHs das bebidas (3,5 ou 5,5) as concentrações de açúcar de (13 ou 16%) e as diferentes fontes de ferro (sulfato ferroso, ferro



amino quelato e ferro amino quelato com vitaminas A e D) não interferiram na aceitabilidade do produto, e a produção industrial da bebida fortificada, realizada na linha de produção do leite pasteurizado, demonstrou ser viável, sem a necessidade de aquisição de novos equipamentos.

3.3 Soro de Queijo

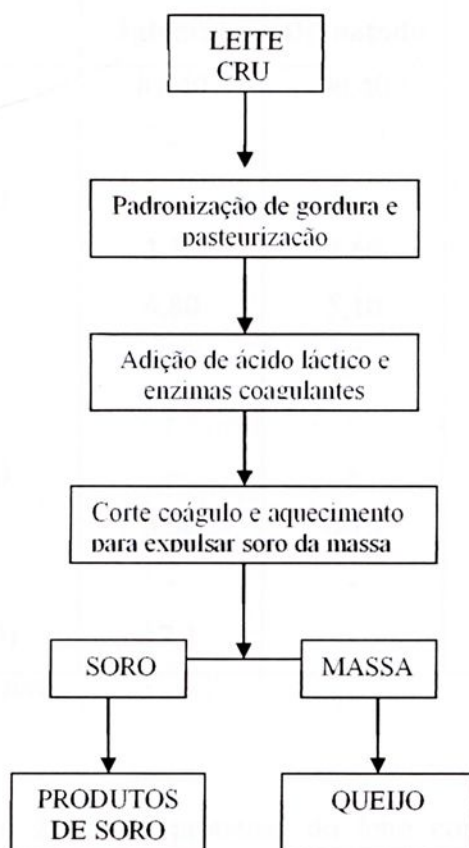
Segundo dados da Associação Brasileira dos Produtores de Leite – ABPL (2001), o consumo de queijo foi recorde nos últimos cinco anos e continua em ascensão, com isto existe um grande interesse por parte das indústrias no aproveitamento do soro de leite, o que tem levado a um aumento na aplicabilidade do mesmo em produtos alimentícios. O soro fornece elementos essenciais e de alta qualidade, importante característica quando se necessita complementar dietas inadequadas (DALLAS, 1999).

O soro lácteo é a parte aquosa do leite, que se obtém durante a coagulação, nos processos de fermentação do leite por ação bacteriana, acidificação direta ou por ação de enzimas coagulantes na produção de queijos ou de caseína, como pode ser observado na Figura 1. A natureza e composição do soro varia em função dos processos tecnológicos empregados e do tipo de leite utilizado na produção de queijo ou caseína (DUARTE; MIDIO, 1997).

Basicamente há dois tipos de soro: doce e ácido. A composição química do leite integral, desnatado e dos soros doce e ácido está apresentada no Quadro 2.

(O soro doce é obtido a partir da fabricação do queijo através do uso de enzimas (exemplos: queijo cheddar, queijo suíço, frescal, mussarela e tipos similares) e apresenta percentual de lactose mais elevado e menor teor de cálcio em relação ao soro ácido. O soro ácido é obtido através da acidificação do leite pela ação das culturas lácteas ou adição de

ácido láctico, como por exemplo, os queijos cottage e ricota. Apresenta além da acidez mais elevada, teor de lactose mais baixo e teor de cálcio mais alto em relação ao soro doce. Isto ocorre porque quantidade significativa de lactose é convertida em ácido láctico antes que o soro seja separado da massa. À medida que aumenta a acidez, uma quantidade crescente dos sais de cálcio no leite se dissocia, o que provoca a solubilização do cálcio. Ocorre também uma menor retenção do cálcio pela caseína. O soro ácido é muito apropriado para realçar o sabor e apelo sensorial de molhos cremosos para saladas (CAL-VIDAL, 1979).



Fonte: USDEC, 1997.

Figura 1 – Fluxograma do processo de obtenção de soro

Segundo Neves (1993), o soro pode ser visto sob dois aspectos:

- como um agente de poluição, se considerado um produto descartável. A descarga de soro em cursos d'água pode provocar a destruição da flora e da fauna devido à sua alta

demanda bioquímica de oxigênio (DBO), que é da ordem de 30.000 a 50.000 mg de O₂ por litro de soro;

- como um produto nobre, que pelo seu teor em proteínas solúveis ricas em aminoácidos essenciais e pela presença de grande número de vitaminas do grupo B, deve ser processado para alimentação humana ou de animais;

Quadro 2 Composição química do leite integral, desnatado e dos soros doce e ácido.

Componentes	Leite Integral	Leite Desnatado	Soro Doce	Soro Ácido
Água (%)	87,40	90,40	93-94	94-95
pH	-	-	6,45	4,60
Sólidos Totais (%)	-	-	6,70	6,40
Proteínas (%)	3,50	3,60	0,90	0,90
Lactose (%)	4,80	5,10	4,90	4,30
Cinzas (%)	0,70	0,70	0,50	0,80
Cálcio (mg/100g)	-	-	43,2	-
Fósforo (mg/100g)	-	-	39,4	-
Lipídios (%)	3,50	0,10	0,3	0,10
Ácido Lático (%)	-	-	Traços	Até 0,80
Acidez Dornic (°D)	17,1	-	11,5	-

Fonte: ABREU, 2000.

Aproximadamente 20% das proteínas do leite consiste de proteínas do soro. O desenvolvimento comercial de concentrados proteicos de soro (CPS), isolado proteico de soro (IPS) e mais recentemente, frações de proteína de soro propiciou o crescimento de aplicações tecnológicas. Esses produtos têm funcionalidade tecnológica e nutricional comprovadas e são matérias de inúmeras pesquisas, como na prevenção de câncer e da cárie dentária (JELEN; LUTZ, 1998).

As proteínas do soro possuem um dos mais altos índices de valor biológico em comparação a outras fontes de proteínas, tais como ovos, carne bovina, soja e caseína. É um conjunto heterogêneo de proteínas que representam aproximadamente 20% do total de proteína láctea (RICHARDS, 2002). As proteínas do soro ultrapassam os níveis de todos os aminoácidos essenciais da proteína de referência da FAO, mostrando claramente o seu grande valor biológico (PORTER, 1978).

As duas proteínas presentes em maior quantidade no soro de queijo, a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina, são globulares, possuem elevadas propriedades nutricionais, funcionais, fisiológicas e terapêuticas, são eficazes na estabilidade de emulsões, têm boa capacidade de retenção de água e são ingredientes alimentícios com potencial para substituir outros de maior custo, como por exemplo, a ovoalbumina (ZUÑIGA et al., 2000). O Quadro 3 compara a digestibilidade do concentrado protéico de soro com a de várias outras proteínas.

Quadro 3 Comparação entre a digestibilidade de várias fontes de proteínas.

Fontes de Proteína	Digestibilidade (%)
Concentrado protéico de soro	99
Concentrado protéico de soja	84 – 90
Proteína isolada de soja	93 – 97
Ovo inteiro	93 – 100
Leite	90 – 98
Carne bovina	91 – 99
Caseína	94 - 97
Glúten de trigo	91

Fonte: Archibald, 2003.

O concentrado protéico de soro é obtido pela remoção de quantidades suficientes de constituintes não protéicos do soro pasteurizado, de modo que o produto acabado em pó contenha de 34 a 80% de proteínas. Não acarreta problemas de sabor, como acontecia até



alguns anos e é fabricado por meio de técnicas de separação física, tais como precipitação, filtração ou diálise (USDEC, 1997).

A produção de concentrados protéicos de soro envolve a ultrafiltração do soro para concentração das proteínas e a diafiltração para a remoção da maior parte da lactose e de minerais e de outros componentes de baixo peso molecular. A seguir, o produto é novamente concentrado por evaporação antes da secagem por atomização, com o objetivo de reduzir o custo de remoção da água e melhorar as propriedades físicas do pó. (A diferença na funcionalidade tecnológica das proteínas concentradas de soro é provavelmente mais influenciada pela modificação nas proteínas e outros componentes, causada pelos processos que são usados na produção de queijos ou caseína, do que pelos processos de produção dos concentrados.) Um grande número de produto de soro é fabricado atualmente e esses produtos variam com respeito à concentração de proteínas, de minerais, de lipídios e de lactose (de la FUENTE et al., 2002). A acidez pode ser ajustada com a adição de corretores de pH seguros e apropriados. É usado em produtos lácteos como sorvetes, iogurtes, queijos, bebidas e achocolatados, produtos de panificação, de confeitaria, "snacks", salgadinhos, preparados aromatizados para café e outros alimentos industrializados e produtos nutricionais, como (1) fonte econômica de sólidos lácteos e (2) substituto parcial de leite em pó desnatado que incorpora concentrações similares de lactose, de proteínas e minerais/cinzas, e proteína solúvel em soluções ácidas ao produto final (USDEC, 1997).

Existem também outros métodos para o aproveitamento do soro, porém, nem todos se aplicam a qualquer indústria. Dentre eles pode-se citar a produção de combustível pela fermentação anaeróbica produzindo calor necessário à fabricação de queijo, o emprego na alimentação animal, a secagem e posterior utilização na alimentação humana como matéria prima na fabricação de outros produtos, como: proteínas de soro, concentrados protéicos,



lactose, ácido láctico e como mencionado anteriormente, o aproveitamento direto em formulações como as bebidas lácteas (SANTOS; FERREIRA, 2001).

(Em países da Europa e Estados Unidos, o soro de queijo é amplamente utilizado como ingredientes, ou mesmo como produto primário; e é empregado na fabricação de bebidas lácteas, molhos para salada, panificação, sopas, sorvetes, entre outros (SMITHERS; COPELAND, 1998). No Brasil grande parte do soro produzido ainda é utilizada para produção de ração animal ou é despejado em efluentes, tornando-se um desperdício econômico e causando poluição ambiental devido às suas características orgânicas descritas anteriormente (NEVES, 1993).)

A proteína é indiscutivelmente o componente de maior valor nutricional do soro, sendo que suas propriedades e aplicações são de grande interesse em várias áreas como saúde nutricional infantil, desempenho atlético e processamento de alimentos (ARCHIBALD, 2003). São várias as propriedades funcionais das proteínas do leite em alimentos, destacando a estabilidade ácida, devido a proteína do soro ser uma das poucas proteínas solúveis em alimentos de pH baixo (produtos fermentados), com isto estão sendo largamente utilizados em iogurtes devido às suas propriedades funcionais e nutracêutica e a gelatinização que é explorada na fabricação de leites fermentados, queijos ácidos, iogurtes e caseínas ácidas (SILVA et al., 2002). Iogurtes produzidos com leite fortificado com concentrado protéico apresentam uma melhor textura (mais suave), consistência (USDEC, 1997) e sabor (HUGUNIN, 1999).

Porém, a intensidade de algumas dessas propriedades pode variar de acordo com o tratamento térmico ao qual o soro foi submetido durante e após o processo de fabricação de queijo, bem como da origem do soro, do pH e da concentração de cátions, tornando-se necessário portanto que a fonte de obtenção desse produto seja extremamente confiável (MOSQUIM et al., 1999).



Um exemplo é a alimentação dos esportistas, totalmente revolucionada, pois se verificou que as proteínas do soro fornecem energia rápida, requerida para os exercícios, além de aumentar a massa muscular e reparo muscular após uma série de exercícios. A proteína do soro contém uma alta concentração de aminoácidos de cadeias ramificadas, que são usados pelas fibras musculares durante os exercícios (REZENDE JR., 2003).

(Estudos recentes sugerem que as proteínas do soro possuem propriedades anticarcinogênicas. Uma possível causa relacionada a estas propriedades é a composição em aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina). Aminoácidos sulfurados são necessários para a síntese de glutathione, um tripeptídeo (L-gg-glutamyl-L-cisteína-glicina) contendo um grupo sulfidrilico. Sua maior concentração ocorre no fígado, que regula o fluxo do plasma sanguíneo e a bile. O fígado é o órgão principal envolvido na desintoxicação e eliminação de genobióticos, enquanto a mucosa gastrointestinal (onde a bile age durante o processo digestivo) é exposta a substâncias exógenas com potencial mutagênico e carcinogênico. Desta forma os aminoácidos sulfurados agem como agentes de prevenção, interferindo no desenvolvimento de tumores de cólon (PARODI, 1998).)

3.4 Proteínas de Soja

A soja é um alimento capaz de enriquecer a dieta dos brasileiros. É rica em proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. Várias pesquisas têm demonstrado que a soja é útil na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer no seio e próstata, na redução dos sintomas da menopausa e osteoporose, dentre outras (LIU, 2000).

A soja transformou-se em um insumo importante para o mercado de alimentos funcionais devido às propriedades ligadas a seus componentes: proteínas, lecitinas, fibras e fitoquímicos (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).



Os fitoquímicos possuem diversas funções na planta, principalmente de defesa contra o ataque de predadores e patógenos. Quando presentes em alimentos de origem vegetal, podem ter tanto efeitos benéficos como prejudiciais ao ser humano. As isoflavonas são as formas mais comuns de fitoestrôgenos, sendo predominantemente encontradas em leguminosas e especialmente abundantes na soja (GENOVESE; LAJOLO, 2001b). As principais isoflavonas são a genisteína, a daidzeína (PEREIRA, 2002) e a gliciteína, as quais apresentam-se como várias formas de conjugados glicosídios, dependendo da extensão do processamento ou fermentação.

Devido à versatilidade do uso da soja, são vários os produtos tradicionais encontrados no mercado: óleo de soja, molho de soja, “leite” de soja, tofu, tempeh, brotos de soja, produtos com proteínas de soja, concentrado protéico de soja, isolado protéico de soja, etc., e também os produtos de novas gerações, que são os alimentos produzidos com ingredientes protéicos de soja: “carnes” de soja, “hambúrguer” de soja, “iogurtes” de soja, sorvetes de soja. Existem também os ingredientes funcionais da soja: lecitina de soja, oligossacarídeos, isoflavonas, tocoferol, fitosterol e inibidores da tripsina (LIU, 2000).

A ingestão de 20 gramas diárias de proteínas de soja ou de 50 gramas de grãos de soja é o suficiente para a proteção da saúde, evitando principalmente doenças coronárias, mas um dos principais motivos que distancia a soja da mesa dos brasileiros é o sabor do grão (SOY FOOD GUIDE, 2004).

□ O gosto de feijão (*beany-flavors*) da soja está diretamente ligado à presença de compostos como aldeído e hidrocarbonetos que são produzidos durante o processamento do grão. Eles se ligam à proteína de soja e, quando o grão é aquecido, é ainda mais difícil de removê-los. Esses compostos são derivados da oxidação do óleo, processo iniciado pela ação de enzimas presentes no grão, denominadas lipoxigenases. Além de alterar o sabor da soja provocam a rancificação do óleo e diminuem a vida de prateleira dos alimentos. A exceção é



o isolado protéico de soja. Durante o processamento dos grãos, os aldeídos e hidrocarbonetos e demais compostos relacionados ao gosto de feijão são eliminados gradativamente. A proteína isolada de soja é um exemplo e, por isso, não tem gosto característico (SOY FOOD GUIDE, 2004). Uma vez desenvolvido o sabor desagradável na soja, torna-se praticamente impossível mascará-lo completamente (GOMES, 1990).

A eliminação das lipoxigenases em soja contribui sensivelmente para a melhoria do sabor de feijão cru, mas ainda persistem a adstringência e amargor desagradáveis (ARAÚJO; CARLOS; SEDYAMA, 1997).

O extrato hidrossolúvel de soja ou “leite” de soja é o produto obtido a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos de soja; constitui fonte de proteínas e pode ser usado como alimento ou como ingrediente para a elaboração de alimentos. Entretanto, o sabor característico da soja crua e os oligossacarídeos não digeríveis são obstáculos que limitam o uso popular do “leite” de soja. Para melhorar a aceitabilidade do “leite” de soja, o uso de bactérias lácteas tem sido sugerido (WANG; ASCHERI, 1991).

A composição média do “leite” de soja pode ser observada no Quadro 4.

Quadro 4 Composição química (g/100mL) de “leite” de soja.

Componentes	Teor (%)
Proteínas	3,29
Matéria graxa	2,50
Cinzas	0,39
Carboidratos*	0,80
Água**	93,02
Sólidos totais	6,98

*Calculado por diferença (sólidos totais - proteína - matéria graxa - cinzas).

** Calculado por diferença (100- sólidos totais).

Fonte: WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994.



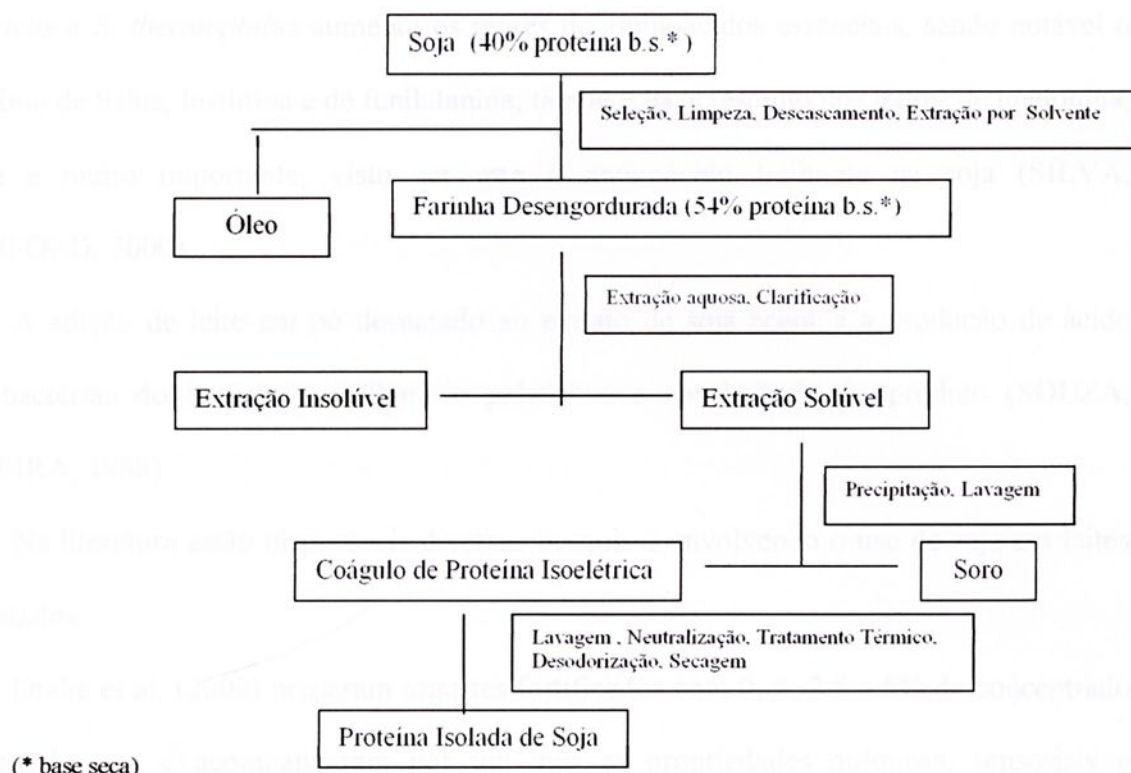
A utilização da soja, seja em forma de extrato aquoso ou de proteínas isoladas, em formulações de diversos produtos tem como principal finalidade a substituição de produtos lácteos, pois apresenta baixo custo de produção e alto retorno para indústrias. Tais produtos, como a bebida fermentada, proporcionam, além de sabor diferenciado, uma alternativa viável e promissora para consumidores que não consomem produtos lácteos (KLEIN; RICHARDS, 2003).

A proteína isolada de soja é a forma mais refinada entre os derivados protéicos mais comuns da soja (entre eles farinha de soja, proteína texturizada e concentrada). Com mais de 90% de proteínas, é preparada a partir da fração protéica dos grãos de soja separada dos demais componentes não protéicos, como pode ser observado na Figura 2. Além disso, as proteínas isoladas de soja possuem perfil de sabor mais neutro que as proteínas concentradas e texturizadas, sendo mais indicadas quando não se deseja alterar o sabor intrínseco dos alimentos (BUNGE ALIMENTOS, 2003).

No processamento para obtenção de isolado protéico de soja os inibidores de tripsina se encontram na fração solúvel que é descartada, após precipitação ácida das proteínas do extrato bruto (GENOVESE; LAJOLO, 1998).

As proteínas isoladas de soja são macromoléculas de tamanhos e estruturas variadas que são denominadas globulinas e são formadas principalmente por dois tipos de moléculas de tamanho diferentes: a beta-con-glicinina e a glicinina. Essas moléculas são responsáveis pelas propriedades funcionais da proteína isolada de soja (BUNGE ALIMENTOS, 2003).





Fonte: BUNGE ALIMENTOS, 2003.

Figura 2 Fluxograma do processamento da proteína isolada de soja.

Na fabricação de “iogurte” de soja, os microrganismos fermentadores devem ser capazes de utilizar os açúcares típicos da soja, como sacarose, estaquiose e rafinose, a menos que sejam adicionados açúcares ao “leite” de soja que possam ser utilizados por estes microrganismos e assim obter uma acidez e aroma ideal no “iogurte” de soja (WANG; MARINHO; CARVALHO, 1994). *L. acidophilus* e *S. thermophilus* crescem bem no extrato de soja sem suplemento de carboidratos promovendo abaixamento de pH e aumento de acidez titulável. O mesmo não ocorre com *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, para o qual, o enriquecimento com glicose ou lactose no “leite” de soja favorece a produção de ácido (WANG; ASCHERI, 1991).

Comparações entre o extrato de soja e o leite fermentado indicam maior teor protéico e de gordura no produto vegetal; porém os teores de cálcio e fósforo são bem menores. A fermentação do extrato de soja por culturas mistas de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp.*

bulgaricus e *S. thermophilus* aumenta os teores de aminoácidos essenciais, sendo notável o acréscimo de lisina, histidina e de fenilalanina; também há acréscimo nos teores de metionina, o que é muito importante, visto ser este o aminoácido limitante na soja (SILVA; STAMFORD, 2000).

A adição de leite em pó desnatado ao extrato de soja acentua a produção de ácido pelas bactérias do iogurte e melhora o paladar e a consistência do produto (SOUZA; OLIVEIRA, 1988).

Na literatura estão disponíveis diversas pesquisas envolvendo o uso de soja em leites fermentados.

Drake et al. (2000) preparam iogurtes fortificados com 0; 1; 2,5 e 5% de concentrado protéico de soja e acompanharam por um mês as propriedades químicas, sensoriais e microbiológicas. A contagem microbiológica, tempo de fermentação e o desenvolvimento da acidificação não foram afetados. A viscosidade (medida instrumental) e a textura (análise sensorial), aroma e sabor de soja tiveram um aumento durante o tempo de estocagem. O iogurte com 5% de concentrado protéico de soja apresentou alterações na cor e perda da doçura quando comparado com os demais. O iogurte com 1 ou 2,5% de concentrado protéico de soja foram os que mais se assimilaram ao iogurte normal.

Scalabrini et al. (1998) utilizaram 27 culturas de *Bifidobacterium* na fermentação de extrato de soja com o objetivo de estudarem a atividade da α galactosidase e a produção de ácido acético e láctico para a fermentação do extrato de soja e concluíram ser o extrato um bom meio de crescimento deste microrganismo, porque contém sacarose, rafinose e estaquiose (açúcares responsáveis pela flatulência após a fermentação). Através de cromatografia líquida foi constada a produção de ácido láctico e acético pelas culturas de *Bifidobacterium*.



Nos Estados Unidos, principalmente, já é expressivo o emprego de proteína de soja em iogurtes e até em alguns tipos de bebidas lácteas. Essa tendência é muito promissora em nosso mercado, já que o Brasil é um grande produtor de soja, possibilitando uma ampla variedade de inovações na área de iogurtes (SANTOS, 2002). Com seu uso em composição com o soro de leite, é possível desenvolver bebidas nutritivas e com ótimo sabor e textura, além de uma excelente relação custo/benefícios (BUNGE ALIMENTOS, 2003).

Um exemplo disto é o trabalho desenvolvido por Prudêncio et al. (2002), que foi a elaboração de uma bebida a partir de extrato de soja adicionado de antioxidantes e soro de queijo ou água. As bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja apresentaram diferença quanto à preferência dos provadores quando o soro de queijo substituiu a água e não entre as amostras adicionadas de antioxidantes (ácido ascórbico e ácido cítrico). Não houve diferença significativa quanto ao tipo de antioxidante utilizado. A adição de ácido cítrico e ascórbico não influenciaram no sabor das amostras.

Em virtude do aumento da produção de soja a partir de sementes geneticamente modificadas, produtos elaborados com soja passaram a receber atenção especial.

No Brasil, o decreto nº 3871, de 18 de julho de 2001, estabelece que deverão ser rotulados os alimentos embalados, destinados ao consumo humano, que contenham ou sejam produzidos com organismos geneticamente modificados (OGM), pois a maioria dos alimentos processados consumidos atualmente contém soja ou seus derivados (óleo, proteína texturizada, lecitina) como ingredientes na sua composição. A legislação brasileira estabelece o limite de 4% do produto. No Japão foi estabelecido o nível de 5%, na China, o limite estabelecido foi de 1% e em Hong Kong 5% e na União Européia, está em vigor legislação determinando que alimentos contendo uma porcentagem superior a 1% de organismos geneticamente modificados devem ser rotulados (NUTTI, 2002).



A medida que a discussão sobre as questões de comércio internacional relacionadas à biotecnologia se intensifica, observa-se a crescente necessidade de se distinguir alimentos geneticamente modificados daqueles que não foram geneticamente modificados. Em vários países, a legislação para a rotulagem de alimentos estabelece limites permissíveis de OGM's, os chamados "threshold levels". Assim, alimentos que contêm ingredientes geneticamente modificados em níveis acima do permitido devem ser rotulados como "geneticamente modificados" (NUTTI, 2002).

Branquinho et al. (2003) avaliaram a presença de soja geneticamente modificada em alimentos obtidos por vários tipos de processamento. Foram analisados os seguintes produtos: "leites" de soja (12 produtos), biscoitos (2 produtos), proteína texturizada de soja (1 produto), macarrões (3 produtos), salsichas (6 produtos), bebidas com soja e misturas (9 produtos), soja em grão (15 produtos), sopas em lata (4 produtos), sopas desidratadas (6 produtos) e mistura de cereais (2 produtos). As amostras positivas revelam que está sendo utilizada soja geneticamente modificada na formulação de vários tipos de produtos alimentícios sendo necessário, portanto esforços para implantação de testes quantitativos para a verificação da adequação dos rótulos à legislação brasileira.

3.5 Bactérias Lácteas usadas em Leites Fermentados

Leites fermentados e queijos existem há pelo menos 10.000 anos, mas somente nos últimos 100 anos as bases científicas da microbiologia dessas fermentações vêm sendo elucidadas. As primeiras definições de bactérias lácteas como um grupo restringiram-se à capacidade que essas bactérias tinham de coagular ou fermentar o leite, provocando alterações orgânicas que vão aumentar a vida de prateleira dos produtos. A lactose presente no leite é fermentada pelas bactérias lácticas e resulta principalmente em ácido lático, favorecendo a

redução do pH, e conseqüentemente, a precipitação das proteínas do leite, dando origem aos vários produtos fermentados (FERREIRA, C. 2001b).

Durante o processo de fermentação ocorre a produção de ácido láctico como produto principal e a produção de pequenas quantidades de outros subprodutos que influenciam profundamente as características sensoriais das bebidas lácteas. O acetaldeído é produzido em maior quantidade, seguido por acetona, 2 butanona, diacetil e acetoína. O ácido láctico resultante da fermentação contribui para a desestabilização da micela de caseína, provocando sua coagulação no ponto isoelétrico (pH 4,6 – 4,7) e conduzindo à formação de um gel (RASIC; KURMAN, 1978). Nos iogurtes firmes ou batidos as reações bioquímicas responsáveis pela formação do gel/coágulo são exatamente as mesmas. As únicas diferenças existentes entre o iogurte firme e o batido são as propriedades reológicas do coágulo (TAMIME; ROBINSON, 1999).

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

As atividades proteolíticas dos lactobacilos promovem a liberação de pequenos peptídios e aminoácidos que favorecem o desenvolvimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula o crescimento dos bacilos, devido à produção de ácido fórmico, gás carbônico e a redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (WALSTRA et al., 1999).

Segundo Rasic e Kurman (1978), a temperatura ótima de crescimento do *S. thermophilus* situa-se entre 40 e 45°C, atingindo um mínimo a 20°C e máximo a 50°C. Para o *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, a temperatura ótima de crescimento situa-se entre 40 e 43°C,



atingindo um mínimo a 22°C e um máximo a 52,5°C. Na associação entre o *S. thermophilus* e o *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* a temperatura ótima de crescimento fica entre 40 e 45°C e a coagulação pode demorar mais que 4 horas, dependendo da porcentagem de inóculo adicionada. Após o iogurte ter atingido o pH desejável, geralmente de 4,6, o gel é resfriado à temperatura menor que 10°C. O pH final na maioria dos iogurtes varia entre 4,6 e 4,0 (LUCEY; SINGH, 1998).

O termo probiótico, de origem grega, significa “para a vida”, sendo definido como microrganismos viáveis (o que inclui bactérias lácteas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado) que exibem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após ingestão, devido à melhoria das propriedades da microflora (GOMES; MALCATA, 1999). Estes microrganismos podem não ser necessariamente habitantes constantes do trato gastrointestinal, mas devem ter um efeito benéfico sobre o estado geral e saúde do ser humano ou dos animais (FULLER, 1989; SALMINEN; OUWEHAND; ISOLAURI, 1998).

Segundo o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde da Resolução RDC nº 2, de janeiro de 2002, entende-se por probióticos os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus*, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bile e conseqüentemente não sobrevivem a passagem através do trato gastrointestinal, portanto não são consideradas como probióticas. No entanto, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e melhoram a digestão da lactose devido à presença da enzima β -galactosidade na célula (HATTINHG; VILJOEN, 2001).



As bactérias *S. thermophilus*, pertencente ao grupo dos cocos positivos, é móvel, suas células tem formato que varia de esférico a ovóide, normalmente, encontram-se agrupadas em pares ou em longas cadeias. Estes microrganismos são altamente adaptados ao leite, sendo este o melhor, meio para o seu crescimento. Tanto a temperatura quanto o valor nutricional do meio influenciam na morfologia; crescem bem em leite a temperatura de 40 a 45°C, formando pequenas cadeias, enquanto a 30°C, muitas linhagens aparecem como diplococos, e em leite com alta acidez, podem formar longas cadeias. Assim como as demais bactérias lácteas, *S. thermophilus* é homofermentativo, transformando 85 a 98% da lactose em ácido láctico, além de produzir pequenas quantidades de outros metabólitos. Quando cultivada em leite produz ácidos voláteis, tais como: fórmico, acético, propiônico, butírico, isovalérico e capróico, além de acetoina, pequenas quantidade de acetaldeído, cetona, etanol e butanona-2 (CHAVES, 2000). A maior parte das linhagens de *S. thermophilus* só é capaz de fermentar três açúcares: lactose, glucose e sacarose. Em alguns casos, alternativamente, a rafinose pode ser usada como fonte energética (MERCENIER; LEMOINE, 1989).

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus é descrito como bacilo circular, Gram positivo. Não esporulado, geralmente de 1 a 3 µm de diâmetro, ocorrendo só em par ou formando pequenas cadeias. As colônias são geralmente brancas ou cinzas claras. O crescimento a 15°C é raro e muito lento, em temperaturas superiores, o crescimento depende da cepa, sendo que algumas crescem a 45°C ou acima de 50-52°C (RASIC; KURMANN, 1978).

Até o presente, o consumo de leites fermentados esteve baseado no iogurte tradicionalmente produzido com fermentos compostos de *L. delbrueckii ssp bulgaricus* e *S. thermophilus*. Atualmente são também usados os microrganismos probióticos, associados ou não a esses tradicionais, quer como agentes biotecnológicos, ou seja, que melhoram as características do produto tradicional, como reduzir a pós-acidificação do iogurte e leites

fermentados, fato evidenciado pela ação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium sp*, quer como agentes terapêuticos, ou seja, microrganismos que promovem efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem (ANTUNES, 2001).

A utilização de culturas mistas pode influenciar positivamente o organismo, porque juntos os microrganismos tradicionais e os probióticos (lactobacilos e bifidobactérias) podem atuar beneficemente ao produzir enzimas que ajudam o organismo a digerir os alimentos, produzir vitaminas do complexo B, e em casos de diarreia ajudam a neutralizar os microrganismos patogênicos responsáveis por infecções. O uso de probióticos é, nos dias de hoje, cada vez mais recomendado, mesmo para pessoas que não sofram de problemas digestivos. Estes microrganismos vivos podem ser ingeridos nos leites fermentados, em cápsulas ou em pó.

As bactérias probióticas são de origem intestinal e tem mais chances de estabelecerem por mais tempo que as demais e de resistirem melhor às condições de digestão. Os efeitos benéficos destas bactérias ocorrem no intestino e não no estômago, mas ao atravessá-lo para alcançarem o intestino, poucas resistem ao pH estomacal e aos sais biliares. Elas devem chegar ilesas ao intestino, viáveis e em alto número (10^6 UFC/g), para que haja compensação das perdas e as remanescentes se estabeleçam no intestino e permaneçam por algum tempo. Para o produto ser considerado probiótico as seguintes espécies são freqüentemente utilizadas: *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium adolescentis* (MATSUBARA, 2001; KOT; BEZKOROVAINY, 2000; SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997; SHAH, 2001; SILVA; STAMFORD 2000; VINDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000). Estes microrganismos possuem habilidade para se estabelecerem na biota do intestino e aprimorar beneficemente a biota intestinal e as funções fisiológicas do trato intestinal humano (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; SABOYA; OETTERER;



OLIVEIRA, 1997; SHAH, 2001; SILVA; STAMFORD, 2000). Os autores acima descritos consideraram *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* como probióticos, ao contrário do que descrito por Hattingh e Viljoen, 2001.

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

Os probióticos podem ser adicionados aos alimentos ou estar presentes naturalmente. Tais propriedades probióticas estão ligadas não as espécies bacterianas propriamente ditas, mas, de modo mais específico, a certas linhagens dentro das espécies. Portanto, é necessário uma seleção cuidadosa da linhagem (NESTLÉ, 1999).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* atuam no intestino delgado, enquanto que as *Bifidobacterium* atuam no intestino grosso (FERREIRA, C., 2001a; SGARBIERI; PACHECO, 1999). Estas bactérias lançam ao meio seus produtos de metabolismos, 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). Devido às boas características metabólicas de crescimentos destes microrganismos no leite, os principais produtos probióticos são de origem láctea (FERREIRA, C., 1998).

Bifidobacterium são catalase negativa, Gram-positivo, apresentam formato irregular de bastonete, e muitas formam células ramificadas. Eles são organismos anaeróbicos e não crescem na presença de oxigênio. São considerados habitantes normais do intestino e são resistentes à bile. Possuem muitas características observadas no *L. acidophilus* conferindo os mesmos efeitos benéficos à saúde. A maior diferença nos produtos fermentados por

bifidobactérias, comparado com lactobacilos é a produção de ácido acético além do ácido láctico. Isto se torna um importante fator quando considerado o potencial para fornecer antagonismo contra microrganismos indesejáveis no trato intestinal. O ácido acético é mais tóxico para microrganismos que o ácido láctico. Como as bifidobactérias são anaeróbicas e não sobrevivem bem na presença de oxigênio, dificuldades são encontradas para manter alta a viabilidade nos produtos durante a estocagem, a não ser que sejam em condições anaeróbicas (COGAN, ACCOLAS, 1995). A temperatura ótima de crescimento é 37- 41°C, sendo o pH ótimo perto do neutro (6,5-7,0) e não ocorre o crescimento em valores de pH abaixo de 4,5 e acima de 8,5 (ROBINSON, 2002).

Lactobacillus acidophilus é descrito como bacilo circular, Gram-positivo, não móvel, não esporulado, geralmente de 0,6 a 0,9 μm , ocorrendo só em par ou formando pequenas cadeias. As colônias são geralmente brancas. O crescimento a 15°C é raro e muito lento, em temperaturas superiores, o crescimento depende da cepa, sendo que algumas crescem a 45°C e outras a 48°C. Seu metabolismo energético é fermentativo. Fermenta hexoses, mas não fermenta pentoses e gluconato. Acetoína e diacetil são produzidos a partir de citrato e de piruvato. Na presença de lactato ou em pH inferior de 4,25 o piruvato não é imediatamente convertido a diacetil ou cetoína. Não fermenta ramnose (DU PLESSIS et al., 1996). O *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, riboflavina, minerais como magnésio, manganês e ferro, e ácidos graxos livres. A presença de aminoácidos do grupo tiol presentes no soro de leite, peptonas e tripsina estimulam seu crescimento (GOMES; MALCATA, 1999).

Alguns critérios usados na seleção de uma boa linhagem de probióticos incluem os requisitos: ser de origem humana, ter habilidade de sobreviver ao trânsito pelo trato



gastrointestinal, aderir à mucosa intestinal, produzir substâncias antimicrobianas contra os patógenos, equilibrar a microbiota intestinal, ter propriedades antigenotóxicas, possuir curto tempo de geração, apresentar boa estabilidade nos alimentos ou preparações em pó e não ser patogênicos ao ser humano (COLLINS et al., 1998; GOLDIN, 1998; KLAEBHAMMER, KULLEN, 1999; MATTILLA-SANDHOLM; MATTO; SAARELA, 1999).

Vários fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos e a perda de nutrientes no leite podem reduzir a viabilidade dos microrganismos e, conseqüentemente, as suas propriedades probióticas (PUPIN, 2002). Para se tentar minimizar este tipo de problema podemos citar o uso de probióticos liofilizados (na forma de cápsulas ou pílulas), utilização da técnica de microencapsulação, como descrito por Siuta-Cruce e Goulet (2001), ou ainda utilizar a tecnologia da engenharia genética para desenvolver linhagens mais específicas a determinadas condições do paciente.

Os probióticos também podem ajudar a aliviar a intolerância à lactose produzindo a enzima lactase. Esta deficiência de digestibilidade de lactose freqüentemente se produz no homem provocando dor de estômago, produzindo gases e diarreia aquosa. Por carência da enzima lactase, a lactose que não é hidrolisada, é utilizada pelas bactérias para produzir gases como hidrogênio, dióxido de carbono e ácidos graxos voláteis que se acumulam no cólon (SEDAS; KUBIAK; LÓPEZ, 1996).

No Brasil diversos trabalhos têm focado a resistência e viabilidade dos probióticos. Lima et al. (2003) estudaram a resistência de culturas probióticas (*L. casei* Shirota e *L. casei* LCI) aos sucos gástrico e entérico, em diferentes condições fisiológicas, empregando-se modelos simulados *in vitro*. Em suco gástrico em pH 1,5 e 2,0, após 30 min, as duas culturas não são mais cultiváveis. Em pH 2,5, após 120 min, a redução é de 4 ciclos log, e em pH 3,0, a sobrevivência é total após esse tempo. O suco entérico é capaz de reverter a injúria induzida

pelo suco gástrico muito ácido: mesmo as células não mais cultiváveis devido à exposição aos pH 1,5 e 2,0, passam a ser cultiváveis após exposição ao suco entérico. Quanto aos efeitos decorrentes da presença de leite no trato gastro intestinal, verifica-se claramente seu efeito protetor, como já observado por Charteris et al. (1998), em que a adição de proteínas do leite aumentou a tolerância de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* ao tratamento. Dessa forma, culturas probióticas podem sobreviver à passagem pelo trato intestinal, quando ingeridas com produtos à base de leite.

Botelho et al. (2003) partindo do ponto de que a habilidade de sobrevivência de bactérias lácteas à passagem pelo estômago, bem como a sua adesão e colonização na mucosa intestinal são essenciais para a produção dos efeitos benéficos desejáveis, verificou a resistência à bile de 36 cepas de microrganismos, isolados de leites fermentados e iogurtes comercializados no Brasil. As cepas foram inoculadas em ágar MRS contendo 0,2; 0,6 e 1,0% de bile e incubadas por 48-72 horas em anaerobiose. Nenhuma das cepas analisadas apresentou sensibilidade à bile, podendo ser consideradas, sob esse aspecto, potencialmente probióticas.

Oliveira e Batista (2002) reforçaram a necessidade de ingestão diária de um probiótico em quantidade adequada para manter os níveis artificialmente elevados e desenvolver algum efeito benéfico, mas oferecendo um intervalo para que os microrganismos patogênicos não desenvolvam resistência.

Liserre, Ré e Franco (2003) estudaram a microencapsulação do *Bifidobacterium lactis* em micropartículas de alginato, alginato-quitosana, alginato-quitosana-Sureteric e alginato-quitosana-Acryl-Eze, com diâmetro médio de 50 a 110 nm. A liberação e a sobrevivência *in vitro* de *B. lactis*, encapsulado e não encapsulado, foram avaliadas em condições simuladas do trato gastrointestinal sem adição de enzimas, através de incubação a 37°C em pH 1,5 de 0 a 120 min, posteriormente em pH 5,6 de 121 a 240 min, e em pH 7,5 de 241 a 360 min. As

populações de *B. lactis* diminuíram rapidamente em pH 1,5, chegando ao limite de detecção do teste (<100 UFC/g) após 60 min. Todavia, quando o pH foi aumentado de 1,5 para 5,6 e depois para 7,5, a população de células viáveis aumentou novamente mostrando que as células encapsuladas puderam sobreviver mesmo após exposição a pH 1,5 por 120 minutos. As células não encapsuladas, adicionadas ao meio em uma concentração inicial de 10^8 UFC/ml, por outro lado, não foram recuperadas após os primeiros 60 min de ensaio. Esses resultados mostram que a liberação de células das micropartículas teve uma relação direta com a mudança de pH do meio de incubação e que a microencapsulação melhorou significativamente a sobrevivência de *B. lactis* em fluidos simulados do trato gastrointestinal em comparação com células não encapsuladas.



4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- agitador de tubos Marconi,
- agitador magnético marca Fisatom,
- autoclave vertical marca Fabbe-Primar,
- balança analítica marca Ohaus,
- balança semi-analítica marca Gehaka,
- banho termostatzado marca Biomatic/Marconi,
- bloco digestor de nitrogênio marca Marconi,
- bomba de vácuo,
- centrífuga de Gerber marca Plurinox,
- contador de colônias marca Hexis
- destilador de nitrogênio marca Marconi,
- estufa a vácuo MA 030 marca Marconi,
- estufa para esterilização e secagem marca Fanem,
- estufa para fermentação marca Odontobrás,
- estufa para fermentação tipo B.O.D. marca Marconi
- forno mufla 100-1200°C marca Quimis,
- pHmetro marca Analion,
- refrigerador marca Consul,
- registradores de dados marca Instruterm
- reômetro marca Brookfield modelo RVDVIII,
- seladora marca Brasholanda Equipamentos Industriais S/A,
- termômetro,
- vidrarias básicas e reagentes diversos de laboratório,



4.2 Matéria Primas

- soro de leite em pó marca Sweet Mix
- isolado protéico de soja marca Solae
- leite em pó desnatado marca Nestlé
- cultura láctea MY BIO 6 (Ezal-Rhodia), contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*
- sacarose marca Guarani
- aroma de pêssago marca Duas Rodas
- corante urucum

4.3 Métodos

4.3.1 Preparação da cultura láctica

A cultura mista MY BIO 6 (EZAL-RHODIA), liofilizada e de uso direto, foi dissolvida assepticamente em um litro de leite desnatado esterilizado e resfriado a 5°C, e distribuída em frascos esterilizados. Os frascos foram mantidos em congelador, à temperatura de -18°C, e na ocasião do uso foram descongelados e a cultura inoculada diretamente na mistura de soro de leite em pó, leite em pó desnatado e isolado protéico de soja e demais ingredientes para a fabricação da bebida láctea.

Para avaliar a viabilidade das bactérias lácticas que compõem a cultura, no final dos experimentos, foram feitas enumerações de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.



4.3.2 Preparação da bebida

O planejamento experimental foi constituído de 2 blocos contendo 12 tratamentos cada um. Foram estudados os efeitos das variáveis independentes: teor de soro de leite em pó (3,0; 3,5; 4,0%), teor de leite em pó desnatado (4,0; 5,0; 6,0%) e teor de isolado protéico de soja (1,5; 2,0 ; 2,5%), sobre as características físico-químicas, microbiológicas, reológicas e sensoriais de bebidas lácteas probióticas. Foi acrescentado 5% de sacarose aos ingredientes em todos os tratamentos do bloco 1 e 7% no bloco 2.

Os ingredientes foram pesados e misturados na forma seca e reconstituídos em água, conforme o planejamento dos experimentos (Tabela 1), para preparar 3 litros de bebida.

A mistura foi aquecida a 85°C, mantida em um banho termostatizado por 15 minutos, e resfriada em banho de água e gelo até atingir 43°C, para receber a 3% de cultura láctica em condições assépticas. O produto foi incubado a 43°C. O tempo de fermentação da bebida láctea foi calculado a partir do início da inoculação, até obter-se o valor de pH próximo a 4,5. Terminada a fermentação, foi feito um resfriamento inicial até aproximadamente 20°C, e a quebra do coágulo por agitação manual durante 30 segundos. Em todos os experimentos foi acrescentado 1 mL de corante e 0,5 mL de aromatizante. Em seguida, foi feito o resfriamento final em banho de água e gelo. A bebida foi embalada em copos plásticos transparentes e armazenada em refrigerador à temperatura de 5°C, aproximadamente.

4.3.3 Planejamento estatístico dos ensaios experimentais

A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e os níveis das variáveis que foram usados no planejamento experimental composto por 12 tratamentos. Os ensaios foram realizados com um planejamento experimental do tipo fatorial com três níveis (2^3) e quatro pontos centrais (MONTGOMERY, 2001).



O ponto central codificado como “0” foi selecionado segundo dados da literatura e os níveis de variação codificados como -1 e 1 foram escolhidos para cobrir a região experimental conveniente. Os valores originais desses níveis foram estabelecidos pelas equações:

$$X_1 = \frac{\text{soro} - 3,5}{0,5}$$

X_1 = valor codificado da variável soro de leite em pó (%)

$$X_2 = \frac{\text{leite} - 5}{1}$$

X_2 = valor codificado da variável leite desnatado em pó (%)

$$X_3 = \frac{\text{soja} - 2}{0,5}$$

X_3 = valor codificado da variável isolado protéico de soja (%)

A Tabela 1 mostra as variáveis independentes e os níveis das variações que foram usados no planejamento experimental composto por 12 tratamentos.

Tabela 1 Planejamento dos experimentos.

Tratamentos	Níveis das variáveis codificadas			Níveis das variáveis originais		
	X_1	X_2	X_3	Soro (%)	Leite (%)	Soja (%)
1	-1	-1	-1	3	4	1,5
2	+1	-1	-1	4	4	1,5
3	-1	+1	-1	3	6	1,5
4	+1	+1	-1	4	6	1,5
5	-1	-1	+1	3	4	2,5
6	+1	-1	+1	4	4	2,5
7	-1	+1	+1	3	6	2,5
8	+1	+1	+1	4	6	2,5
9	0	0	0	3,5	5	2
10	0	0	0	3,5	5	2
11	0	0	0	3,5	5	2
12	0	0	0	3,5	5	2

X_1 = soro de leite em pó; X_2 = leite em pó desnatado; X_3 = isolado protéico de soja

Segundo Barros Neto, Scarminio e Bruns (1995), uma equação polinomial de segundo grau foi usada para estabelecer um modelo matemático preditivo, cuja equação geral é:

$$Y = b_0 + b_1.X_1 + b_2.X_2 + b_3.X_3 + b_{12}.X_1.X_2 + b_{13}.X_1.X_3 + b_{23}.X_2.X_3 + b_{123}.X_1.X_2.X_3 + \varepsilon$$

onde:

Y = função da resposta genérica,

X = as variáveis codificadas, obtidas a partir das variáveis originais,

b = os coeficientes estimados pela técnica de mínimos quadrados,

ε = o resíduo, medindo o erro experimental.

A significância dos modelos foi testada pela análise da variância (ANOVA) dos resultados das amostras com a utilização do teste de Tukey, através do programa ESTAT desenvolvido por Banzato e Kronka (1995). Foi considerado um nível de significância de $p = 0,01$. A influência das variáveis foi visualizada pela representação tridimensional da superfície de resposta e das linhas de iso-resposta, empregando-se o programa computacional STATISTICA.

4.3.4 Análises físico-químicas das matérias primas e das bebidas lácteas

Para a análise do leite em pó desnatado, soro de leite em pó e isolado protéico de soja, foi feita uma solução contendo aproximadamente 11% de sólidos totais.

As soluções preparadas e as bebidas lácteas foram submetidas às análises físico-químicas, em triplicata, descritas a seguir:

- pH: as medidas dos valores de pH foram realizados em potenciômetro digital (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

- acidez titulável: as determinações dos teores de acidez foram realizadas através da titulação ácido-alcalimétrica, usando-se fenolftaleína como indicador (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).
- sólidos totais: as determinações foram feitas através da secagem da amostra em estufa a vácuo a 70°C por 24 horas (CASE; BRADLEY JR.; WILLIAMS, 1985).
- proteínas: as análises foram realizadas baseando-se na determinação do nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). Para a conversão de nitrogênio em proteínas multiplicou-se por 6,38 para produtos lácteos e 6,00 para o isolado protéico de soja.
- cinzas: as determinações das cinzas foram feitas através da incineração da amostra em mufla a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.3.5 Caracterização microbiológica das bebidas lácteas

A caracterização microbiológica foi realizada através da contagem das bactérias lácteas das bebidas a partir de diluições decimais seriadas. Dez mL da amostra foram transferidos de forma asséptica para um frasco de Erlenmeyer estéril contendo 90 mL de água peptonada. Essa solução foi agitada vigorosamente, e em seguida foram feitas as diluições subseqüentes.

- contagem de *Streptococcus thermophilus*:

Para a enumeração de *Streptococcus thermophilus* foi utilizado o meio ágar M 17. A técnica utilizada para a inoculação foi por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em aerobiose a 37°C por 48 horas (IDF, 1997).

- contagem de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*:

Para a enumeração de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* foi utilizado o meio MRS ágar glicose acidificado. A técnica utilizada para a inoculação foi por profundidade.



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

- contagem de *Bifidobacterium*:

Para a enumeração de *Bifidobacterium sp* foi utilizado o meio De Man, Rogosa Sharp MRS-IM com glicose e adicionado de solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína. A técnica utilizada para a inoculação foi por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37°C por 72 horas (CHR. HANSEN, 1999).

- contagem de *Lactobacillus acidophilus*:

Para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus* foi utilizado o meio De Man, Rogosa Sharp MRS-IM com maltose. A técnica utilizada para a inoculação foi por profundidade. Após a inoculação, as placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac) a 37°C por 72 horas (IDF, 1999).

4.3.6 Caracterização reológica das bebidas lácteas

Os parâmetros foram obtidos em duplicata usando-se um reômetro de cone e placa, modelo RVDV III, marca Brookfield, Stoughton, USA. O reômetro possui uma camisa termostatizada situada ao redor do arranjo cone e placa, em cujo interior circula água para aquecimento ou resfriamento, permitindo um melhor controle de temperatura. O aumento da tensão de cisalhamento foi obtido pelo aumento da rotação, a partir da variação contínua da velocidade angular do cone. Foram utilizadas rotações entre 5 e 61 rpm com acréscimo de 2

rpm a cada 10 segundos, em curvas ascendentes e descendentes e cone CP41. A taxa de deformação variou de 10 a 122 s⁻¹.

Os parâmetros reológicos foram determinados usando-se o programa computacional Brookfield Reocalc for Windows.

4.3.7 Análise sensorial das bebidas lácteas

As bebidas lácteas foram submetidas à análise sensorial por meio de uma equipe de 50 provadores não treinados. Os parâmetros avaliados foram:

- aceitabilidade geral: é traduzida pelo conjunto, relativa à primeira impressão causada pelo produto como um todo, sem representar a média das notas das outras características avaliadas;
- aparência e cor: diz respeito ao aspecto visual do produto;
- consistência: diz respeito ao corpo do produto quando consumido;
- sabor;
- aroma.

Para expressar sua opinião a respeito das amostras, os provadores utilizaram uma escala hedônica de 9 pontos, cuja ficha de avaliação sensorial está representada na Figura 3 (MORAES, 1983).

As amostras foram servidas em potes brancos de plástico, com capacidade de 70 mL, codificados com números aleatórios, sempre duas horas antes ou depois das refeições, no período mais adequado para a realização destas avaliações.



Nome: _____ Data: ____/____/____

Instruções:

Experimente as amostras e use a escala abaixo para expressar sua opinião a respeito da aceitabilidade geral, aparência e cor, consistência, sabor e aroma. Após experimentar cada amostra, tome um pouco de água e experimente a próxima.

- Aceitabilidade geral: é traduzida pelo conjunto, relativa à primeira impressão causada pelo produto como um todo, sem representar a média das notas das outras características avaliadas;
- Aparência e cor: diz respeito ao aspecto visual do produto;
- Consistência: diz respeito ao corpo do produto quando removido do recipiente;
- Sabor;
- Aroma.

Escala:

- 9 – Gostei muitíssimo

8 – Gostei muito

7 – Gostei moderadamente

6 – Gostei ligeiramente

5 – Indiferente
- 4 – Desgostei ligeiramente

3 – Desgostei moderadamente

2 – Desgostei muito

1 – Desgostei muitíssimo

Código da amostra	Acceptabilidade geral	Aparência e cor	Consistência	Sabor	Aroma

Figura 3 Ficha de avaliação sensorial.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bebidas lácteas foram elaboradas segundo o planejamento experimental descrito na Tabela 1. Todos os tratamentos foram preparados duas vezes constituindo-se os blocos 1 e 2.

Primeiramente, foi feita a caracterização físico-química do leite em pó desnatado, do soro de leite e do isolado protéico de soja, depois se procedeu a caracterização físico-química, microbiologia e sensorial das bebidas do bloco 1. A análise reológica dos tratamentos do bloco 1 não foi realizada em consequência de problemas com o equipamento.

Os resultados obtidos com as bebidas do bloco 1 permitiram efetuar uma readequação das formulações e do processo, corrigindo eventuais problemas que não haviam sido previstos anteriormente, para tanto foi aumentado o teor de açúcar das bebidas, para ter uma aceitabilidade maior na análise sensorial e foi utilizado uma cultura láctica nova, para assegurar maior população microbiológica e ser possível realizar a formulação otimizada com acompanhamento de vida de prateleira. Após as modificações foram elaboradas as bebidas do bloco 2. Neste, foram feitas as caracterizações físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e reológicas dos produtos elaborados conforme os 12 tratamentos. No bloco 2 foi possível obter também as curvas de acidificação para cada tratamento, que estão apresentadas no Apêndice A.

5.1 Caracterização das Matérias-Primas

Para a caracterização do leite em pó desnatado, soro de leite e isolado protéico de soja, utilizados como matérias primas na fabricação das bebidas lácteas, foram efetuadas as seguintes análises: pH, teores de acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais. Os valores médios obtidos nas avaliações dos lotes estão apresentados nas Tabelas 2 e 3. Esta caracterização teve como objetivo constatar se estes produtos poderiam ser utilizados como matéria prima para a fabricação das bebidas lácteas.



Tabela 2 Valores de pH, teores de acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais das matérias primas do bloco 1.

Matérias Primas	Soro de Leite em Pó reconstituído	Leite em Pó Desnatado reconstituído	Isolado Protéico de Soja em solução
pH	6,25	6,44	6,48
Acidez (°D)	13,67	20,37	21,13
Proteínas (%)	1,40	4,19	9,82
Cinzas (%)	0,69	0,94	0,44
Sólidos Totais (%)	10,98	11,16	11,30

Tabela 3 Valores de pH, teores de acidez, proteínas, cinzas e sólidos totais das matérias primas do bloco 2.

Matérias Primas	Soro de Leite em Pó reconstituído	Leite em Pó Desnatado reconstituído	Isolado Protéico de Soja em solução
pH	6,38	6,49	6,64
Acidez (°D)	14,34	21,19	23,52
Proteínas (%)	0,83	3,62	9,20
Cinzas (%)	0,67	0,94	0,47
Sólidos Totais (%)	10,94	11,51	11,43

Para o soro de leite, os valores médios de pH variaram de 6,25 a 6,38, 13,67 a 14,34 °D de acidez titulável, 0,83 a 1,40 % de proteínas, 0,67 a 0,69 % de cinzas e 10,94 a 10,98 % de sólidos totais. Para o leite em pó desnatado, o pH variou de 6,44 a 6,49, 20,37 a 21,19 °D para acidez, 3,62 a 4,19 % de proteínas, 0,94 % de cinzas e 11,16 a 11,51% de sólidos totais, e para isolado protéico de soja, as variações foram de 6,48 a 6,64 para o pH, 21,13 a 23,52 °D

de acidez , 9,20 a 9,82 % de proteínas, 0,44 a 0,47 % de cinzas e 11,30 a 11,43 % de sólidos totais.

Comparando-se a composição das matérias primas, observou-se que o soro de leite em pó apresentou menor acidez e menor teor de proteínas do que o leite em pó e isolado protéico de soja, sendo que este último apresentou teor de proteínas cerca de 7 a 11 vezes maior do que o soro de leite em pó. Desta maneira, o isolado protéico de soja pode ser considerado a maior fonte protéica da bebida láctea.

A composição do soro pode variar em função do processo de fabricação e do tipo de queijo fabricado. Também está relacionada com a composição inicial do leite, que por conseqüente, sofre influência de diversos fatores como, ração do animal, alimentação, período de chuva ou seca, período de lactação e processamento do soro em pó. A composição de sólidos totais do soro, portanto, pode variar segundo a composição do leite e do tipo de queijo processado.

De maneira geral, o soro doce líquido possui pH entre 5,8 a 6,6, tem 93 a 94 % de água, 0,1 a 0,6% de gordura, 4,5 a 5,0% de lactose, 0,8 a 1,0% de cinzas, 10 a 20°D de acidez, 6,7% de sólidos totais e 0,5% de sais minerais (SIVIERI, 2002; MARCOANTÔNIO; RICHARDS, 1998).

Verificou-se que os valores obtidos nas análises do soro de leite foram muito semelhantes, com exceção do teor de proteínas, que apresentou maior variação entre os blocos 1 e 2. Isto pode estar relacionado com a variação da composição do leite e do processamento utilizado para a obtenção do soro em pó. Para o leite em pó desnatado as maiores variações foram para o teor de acidez e de sólidos totais, mas segundo Tamine e Deeth (1980) e Brandão (1987), a acidez titulável pode ser afetada pelo conteúdo de sólidos totais do leite, devido à ação tampão de proteínas, fosfatos, citratos, lactatos. O conteúdo de sólidos totais no leite é importante para a consistência e para o aroma do produto. A variação no teor de acidez



do isolado protéico de soja pode estar relacionada à variação entre diferentes lotes, durante a fabricação do produto.

Os valores encontrados atendem aos requisitos estabelecidos pela Portaria 369 de 4 de setembro de 1997 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualificação de Leite em Pó (BRASIL, 1997), demonstrando ser esta matéria prima adequada para a elaboração das bebidas lácteas. Os padrões legais para o leite em pó desnatado são matéria gorda (%) menor que 1,5%, umidade (%) máximo 4% e acidez titulável (mL NaOH/10g sólidos não gorduroso) máximo de 18°D.

Para o soro de leite, o teor mínimo de proteínas é de 11,5%, máximos de 1,0% de gordura, 6% de cinzas e 3,0% de umidade e pH entre 6,2 e 6,7. Os padrões para o isolado protéico de soja são: proteína (N x 6,25) de 92%, umidade de 5,0 %, cinzas de 4,0% e pH de 6,6 a 7,1.

A composição do soro reconstituído é semelhante à obtida por Sivieri e Oliveira (2002), que utilizaram soro de queijo para a elaboração de bebidas lácteas que apresentaram resultados médios de $6,54 \pm 0,09$ para o pH, $12,11 \pm 0,55^\circ\text{D}$ para acidez e $6,39 \pm 0,10\%$ para sólidos totais.

Os valores médios da avaliação de leite reconstituído estão de acordo com o do Regulamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (RISPOA) pelo artigo 476, onde define que para o leite desnatado reconstituído ser considerado normal deve apresentar teor de acidez igual a 15 a 20 °D, e extrato seco total $\geq 8,5\%$ (BRASIL, 1980).

Dentre os resultados disponíveis na literatura, Penna (1997) analisou soros de queijos para elaboração de bebidas lácteas, sendo que os valores encontrados foram: densidade $1,027 \text{ g/cm}^3$, teor de acidez $9,18^\circ\text{D}$, valor de pH 6,43, 1,5 % de gordura e 6,29 % de sólidos totais, e Mosquim (1996), avaliando a composição de soro de diversos tipos de queijos, obteve média de 0,40% para o teor de gordura e 6,76% para o teor de sólidos totais.



5.2 Caracterização da Cultura Láctica

Os resultados da contagem das bactérias lácticas presentes na cultura utilizada para preparação das bebidas lácteas do bloco 1 estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Valores da população de *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus* na cultura láctica usada para a fermentação das bebidas lácteas do bloco 1.

Microrganismos	<i>Bifidobacterium</i> (UFC/mL)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> (UFC/mL)	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)
	$8,08 \times 10^{15}$	$1,15 \times 10^{14}$	$1,01 \times 10^{13}$	$1,20 \times 10^{14}$

Foi feito um acompanhamento quinzenal da contagem das bactérias lácteas presentes na cultura usada na preparação das bebidas lácteas do bloco 2, e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Valores da população de *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus* na cultura láctica usada para a fermentação das bebidas lácteas do bloco 2.

Data	<i>Bifidobacterium</i> (UFC/mL)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> (UFC/mL)	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)
29/03/2004	$6,65 \times 10^{17}$	$4,50 \times 10^{17}$	$1,40 \times 10^{18}$	$1,44 \times 10^{17}$
11/04/2004	$1,05 \times 10^{18}$	$8,18 \times 10^{17}$	$2,30 \times 10^{18}$	$4,50 \times 10^{15}$
25/04/2004	$1,32 \times 10^{18}$	$7,68 \times 10^{17}$	$3,59 \times 10^{15}$	$1,50 \times 10^{15}$
10/05/2004	$1,77 \times 10^{18}$	$1,58 \times 10^{14}$	$1,16 \times 10^{15}$	$2,00 \times 10^{15}$



A contagem de microrganismos probióticos variou de $6,65 \times 10^{17}$ a $1,77 \times 10^{18}$ para *Bifidobacterium*, $1,58 \times 10^{14}$ a $8,18 \times 10^{17}$ para *L. acidophilus*, e a contagem dos microrganismos tradicionais variou de $2,30 \times 10^{18}$ a $1,16 \times 10^{15}$ para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e de $1,44 \times 10^{17}$ a $1,15 \times 10^{15}$ *S. thermophilus*, como mostra a Tabela 5, muito superior ao valor mínimo estabelecido pela legislação brasileira em vigor, de 10^6 UFC/mL para a bactéria de cultivos específicos e 10^7 UFC/mL para a contagem total de bactérias lácticas (BRASIL, 1997).

Observou-se também a elevada contagem dos microrganismos probióticos (*L. acidophilus* e *Bifidobacterium*) comparados ao *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus*. Este último apresentou contagens inferiores aos demais microrganismos.

As características das colônias de *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* estão apresentadas nas Figuras de 4 a 7, respectivamente.



Figura 4. Características das colônias de *L. acidophilus* no meio de cultura M15-1M após 48 horas de incubação a 37°C.

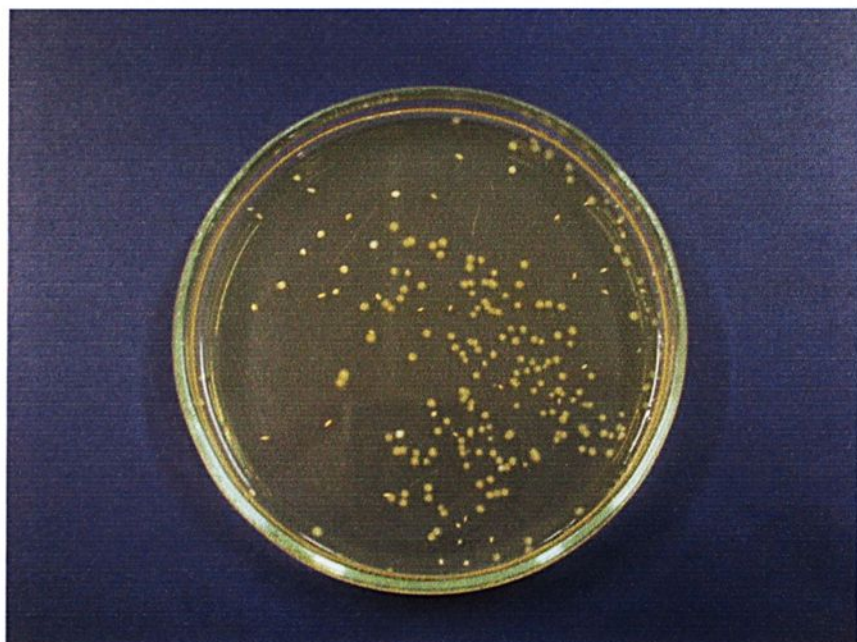


Figura 4 Crescimento das colônias de *Bifidobacterium* no meio de cultura MRS-IM ágar glicose com solução de dicloxacilina, cloreto de lítio e cloridrato de cisteína após 72 horas de incubação.

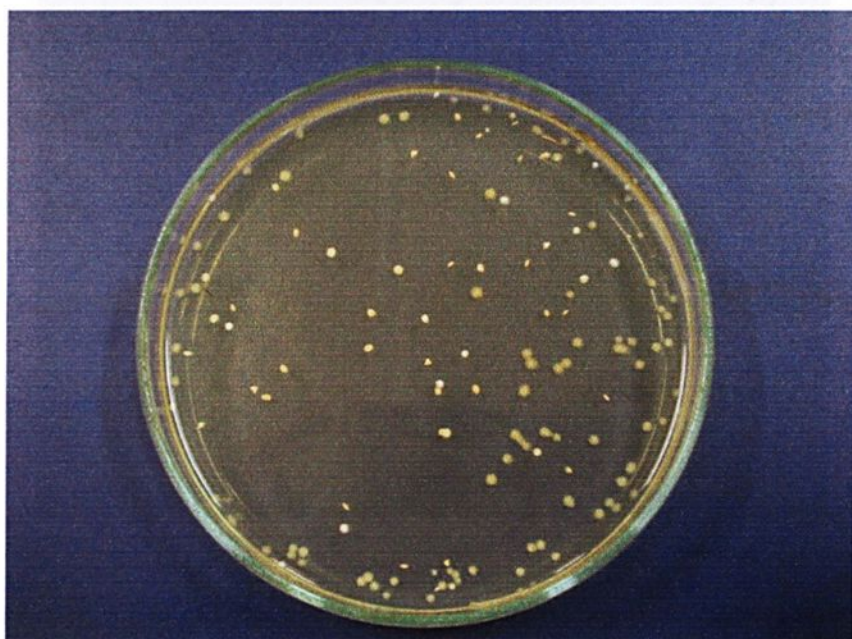


Figura 5 Crescimento das colônias de *L. acidophilus* no meio de cultura MRS-IM ágar com maltose, após 72 horas de incubação.

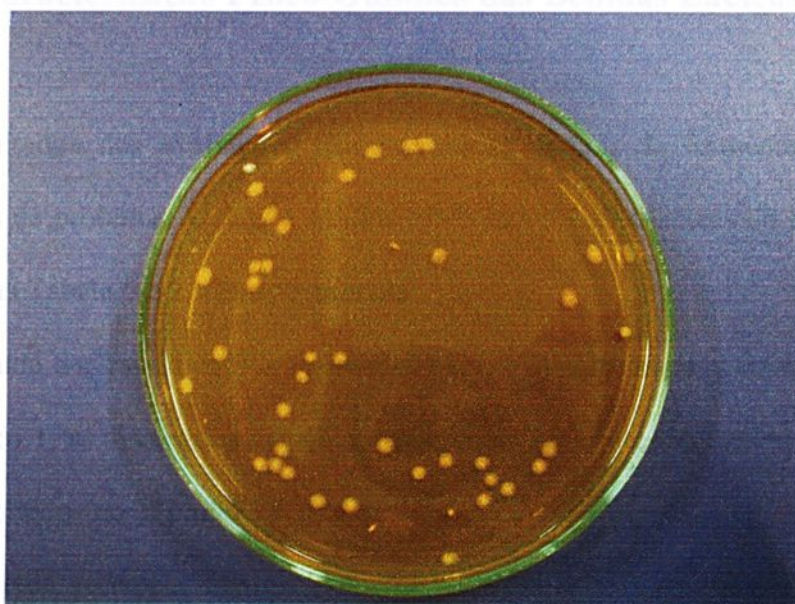


Figura 6 Crescimento das colônias de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* no meio de cultura MRS-IM ágar glicose acidificado, após 72 horas de incubação.

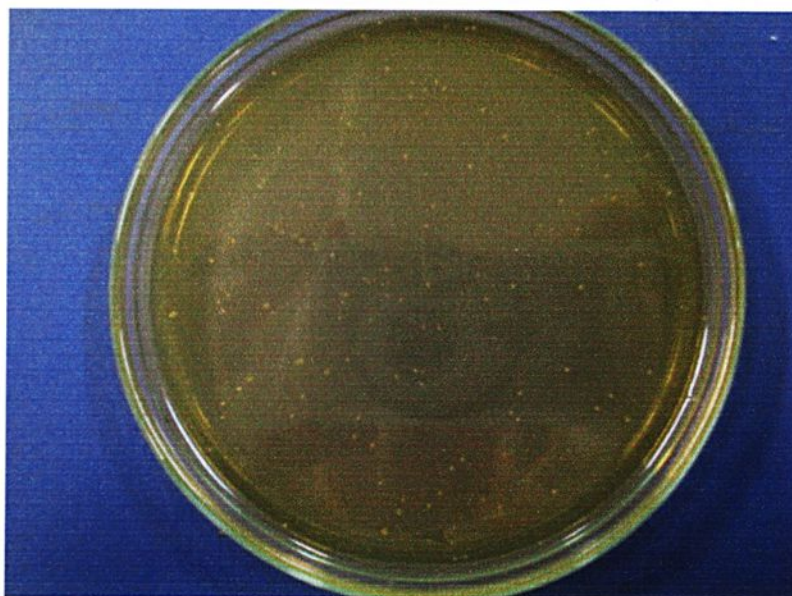


Figura 7 Crescimento das colônias de *S. thermophilus* no meio de cultura ágar M17, após 48 horas de incubação.

5.3 Caracterização Físico-Química das Bebidas Lácteas

Os resultados das avaliações físico-químicas: tempo de fermentação, pH, acidez titulável, teores de proteínas, cinzas e sólidos totais das bebidas lácteas do bloco 1 e 2 estão apresentados nas Tabela 6 e 7, respectivamente.

Em virtude das modificações realizadas para readequação das bebidas lácteas após o término do bloco 1, as discussões e análises estatísticas referentes às bebidas foram baseadas nos resultados obtidos no 2º bloco.

A análise de variância dos resultados das bebidas lácteas do bloco 2 demonstrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, com relação ao pH, acidez titulável, proteínas, cinzas e sólidos totais.

As curvas de acidificação das bebidas lácteas do bloco 2 estão apresentadas no ApêndiceA.

Tabela 6 Valores médios das análises físico-químicas das bebidas lácteas do bloco I.

Tratamentos	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Acidez °D	Proteínas %	Sólidos Totais %	Cinzas %	Fermentação (h.)
01	-1	-1	-1	4,59 ± 0,01	58,96 ± 0,62	2,91 ± 0,04	13,27 ± 0,03	0,60 ± 0,06	3:15
02	+1	-1	-1	4,60 ± 0,01	65,65 ± 0,34	3,17 ± 0,13	14,30 ± 0,02	0,61 ± 0,01	4:10
03	-1	+1	-1	4,50 ± 0,02	72,21 ± 0,23	3,53 ± 0,04	15,10 ± 0,33	0,74 ± 0,00	4:05
04	+1	+1	-1	4,51 ± 0,06	74,71 ± 0,13	3,83 ± 0,07	15,91 ± 0,04	0,81 ± 0,00	4:30
05	-1	-1	+1	4,60 ± 0,03	54,93 ± 0,98	3,85 ± 0,21	14,08 ± 0,06	0,63 ± 0,02	3:20
06	+1	-1	+1	4,62 ± 0,02	69,15 ± 0,85	3,96 ± 0,13	14,99 ± 0,08	0,63 ± 0,01	4:30
07	-1	+1	+1	4,52 ± 0,01	73,05 ± 0,19	4,42 ± 0,04	16,00 ± 0,08	0,76 ± 0,03	4:05
08	+1	+1	+1	4,51 ± 0,02	72,79 ± 0,23	4,27 ± 0,07	16,62 ± 0,03	0,83 ± 0,01	4:20
09	0	0	0	4,62 ± 0,02	68,51 ± 4,96	3,76 ± 0,00	14,96 ± 0,01	0,72 ± 0,02	3:40
10	0	0	0	4,53 ± 0,01	69,61 ± 0,30	3,21 ± 0,22	14,76 ± 0,15	0,68 ± 0,03	4:15
11	0	0	0	4,54 ± 0,01	67,21 ± 0,20	3,79 ± 0,15	15,27 ± 0,04	0,71 ± 0,00	4:35
12	0	0	0	4,47 ± 0,01	73,63 ± 0,20	3,87 ± 0,04	14,95 ± 0,03	0,71 ± 0,01	4:35

X₁ = soro de leite; X₂ = leite em pó desnatado; X₃ = isolado protéico de soja.

Tabela 7 Valores médios e resultados do Teste de Tukey das análises físico-químicas das bebidas lácteas do bloco 2.

Tratamentos	X ₁	X ₂	X ₃	pH	Acidez °D	Proteínas %	Sólidos Totais %	Cinzas %	Fermentação (h.)
01	-1	-1	-1	4,50 ± 0,01 ^{EF}	58,21 ± 1,74 ^G	3,70 ± 0,04 ^{DEF}	15,07 ± 0,10 ^I	0,56 ± 0,00 ^G	3:05
02	+1	-1	-1	4,55 ± 0,02 ^D	57,24 ± 0,11 ^G	2,93 ± 0,13 ^G	15,45 ± 0,03 ^H	0,59 ± 0,01 ^F	3:00
03	-1	+1	-1	4,55 ± 0,01 ^{CD}	72,68 ± 0,20 ^C	3,52 ± 0,04 ^F	16,50 ± 0,01 ^{EF}	0,67 ± 0,00 ^C	4:45
04	+1	+1	-1	4,41 ± 0,02 ^G	79,66 ± 0,19 ^A	3,73 ± 0,13 ^{DE}	17,45 ± 0,02 ^B	0,73 ± 0,03 ^B	6:15
05	-1	-1	+1	4,57 ± 0,02 ^{BCD}	64,35 ± 0,51 ^E	4,85 ± 0,04 ^A	15,66 ± 0,02 ^G	0,59 ± 0,01 ^F	3:30
06	+1	-1	+1	4,51 ± 0,02 ^E	71,31 ± 0,17 ^C	3,90 ± 0,06 ^D	16,88 ± 0,02 ^C	0,65 ± 0,01 ^D	4:05
07	-1	+1	+1	4,60 ± 0,01 ^B	76,82 ± 0,23 ^B	4,20 ± 0,07 ^C	17,40 ± 0,02 ^B	0,70 ± 0,01 ^B	5:05
08	+1	+1	+1	4,65 ± 0,02 ^A	79,53 ± 0,11 ^A	4,58 ± 0,04 ^B	18,46 ± 0,03 ^A	0,76 ± 0,01 ^A	3:55
09	0	0	0	4,59 ± 0,02 ^B	60,73 ± 0,56 ^F	3,74 ± 0,07 ^{DE}	16,70 ± 0,01 ^D	0,67 ± 0,00 ^C	3:00
10	0	0	0	4,59 ± 0,01 ^{BC}	71,07 ± 0,41 ^C	3,55 ± 0,04 ^{EF}	16,55 ± 0,02 ^E	0,66 ± 0,02 ^{CD}	4:10
11	0	0	0	4,47 ± 0,01 ^F	68,35 ± 0,23 ^D	3,72 ± 0,06 ^{DEF}	16,44 ± 0,03 ^F	0,62 ± 0,00 ^E	3:55
12	0	0	0	4,65 ± 0,01 ^A	62,28 ± 0,30 ^F	3,85 ± 0,00 ^D	16,70 ± 0,03 ^D	0,64 ± 0,01 ^{DE}	3:50

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p<0,01).

X₁ = soro de leite; X₂ = leite em pó desnatado; X₃ = isolado protéico de soja.

5.3.1 Tempo de Fermentação

O tempo de fermentação foi definido como o tempo necessário para que a bebida láctea atingisse o pH de 4,60, para logo em seguida ser feito um resfriamento até 20°C.

As Tabelas 6 e 7 e a Figura 8 apresentam os tempos de fermentação obtidos nos 12 tratamentos dos blocos 1 e 2. O tempo de fermentação variou de 3:15 a 4:35 h para o bloco 1 e de 3:00 a 6:15 h para o bloco 2.

As bebidas que apresentaram os menores tempos de fermentação foram elaboradas com 3% de soro de leite, 4% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja para o bloco 1 e 4% de soro de leite, 4% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja para o bloco 2.

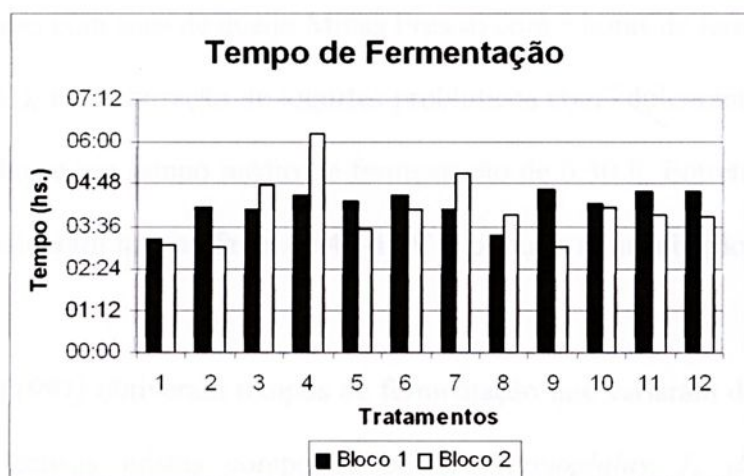


Figura 8 Tempos de fermentação obtidos nos processos de fabricação das bebidas lácteas do bloco 1 e 2.

A variação nas concentrações das matérias primas utilizadas na elaboração das bebidas lácteas e o tempo de estocagem da cultura láctica no congelador podem ter influenciado na

viabilidade da cultura e conseqüentemente na variação dos tempos de fermentação, pois a cultura utilizada no bloco 1 possuía maior tempo de estocagem da cultura.

Os tempos de fermentação das bebidas lácteas preparadas no bloco 1 foram inferiores aos obtidos por Rossi (1984) para um iogurte formulado com soro de leite e extrato aquoso de soja, de 5:00 a 5:30 h de fermentação, no entanto, os tempos de fermentação observados no bloco 2 foram semelhantes, apesar do uso de diferentes culturas.

Umbelino et al. (2001) estudaram os aspectos tecnológicos e sensoriais de "iogurte" de soja enriquecido com cálcio e obtiveram tempo de fermentação de 4:00 a 6:30h, superiores aos apresentados nas Tabelas 6 e 7. Por outro lado, Madureira (2004) relatou que o tempo médio necessário para a cultura MYBIO 6 atingir valor de pH de 4,60, é de aproximadamente 5 horas, para formulação de bebidas lácteas sem a utilização de isolado protéico de soja, e Almeida, Bonassi e Rossi (2001) desenvolveram bebidas lácteas fermentadas com culturas probióticas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal com 5 horas de fermentação.

Pinheiro (2003), na elaboração de iogurtes probióticos com edulcorantes, utilizando a cultura MYBIO 6, obteve um tempo médio de fermentação de 6:30 h. Entretanto, Tamime e Robinson (1991) consideram que na faixa de 40-45°C o período de incubação pode variar de 2:00 a 5:00 h.

Dave e Shah (1997) obtiveram tempos de fermentação que variaram de 3:50 a 6:00 h utilizando culturas lácticas mistas compostas de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* na fabricação de iogurtes. Os produtos fabricados com *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* tiveram tempos de fermentação maiores (6:50 a 11:00 horas). Provavelmente, a ausência de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* neste caso, tenha acarretado o aumento do tempo de fermentação destes produtos, uma vez que a sua relação simbiótica com o *S. thermophilus* e sua alta atividade proteolítica são muito importantes durante a fermentação.



Para se estudar o efeito dos diferentes teores de soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja sobre o tempo de fermentação, a partir dos resultados obtidos nos tratamentos, procedeu-se a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Entretanto, a análise de variância deste modelo demonstrou que ele não era significativo estatisticamente ($R^2 = 0,6177$, $p = 0,1196$) e por isso a equação não está sendo apresentada.

Desta forma não foi possível comprovar a influência da formulação nos diferentes tempos de fermentação obtidos. Provavelmente, outros fatores além destes testados, tais como a viabilidade da cultura láctica e o tratamento térmico da mistura, tenham influenciado este parâmetro. Observou-se também maior tempo de fermentação do tratamento 4 do bloco 2 quando comparado, tanto com os demais tratamentos do mesmo bloco, quanto com o tratamento do bloco 1, aumento este que não pode ser detectado sua causa.

5.3.2 Valor de pH e acidez titulável

Os resultados médios do pH das bebidas lácteas podem ser observados na Figura 9. Os valores de pH variaram de 4,47 a 4,62 para o bloco 1 e 4,41 a 4,65 para o bloco 2, muito semelhantes ao encontrados por Klein e Richards (2003), que foram de 4,50 a 4,56. A análise de variância (Apêndice B) demonstrou que esta diferença foi significativa, como mostram os resultados do teste de Tukey para o valor de pH (Tabela 7). O controle do pH é importante no processo de fermentação, pois a separação do soro está diretamente relacionada com este parâmetro. Em produtos com $\text{pH} > 4,6$, a coalhada não foi suficientemente formada favorecendo a sinérese. Em produtos com $\text{pH} < 4,0$, ocorre separação do soro devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo (BRANDÃO, 1997).



Sivieri (2002) obteve valores médios de pH de 6,50 a 6,73 e acidez de 15,36 a 19,66°D em bebidas lácteas fabricadas com soro de leite e leite desnatado fermentados pelos microrganismos *S. thermophilus* e *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Os valores de pH são bem superiores, e conseqüentemente, os de acidez bem inferiores aos obtidos com as bebidas lácteas contendo isolado protéico de soja (Tabelas 6 e 7). Por outro lado, o estudo realizado por Penna, Sivieri e Oliveira (2001) em dez amostras de cinco bebidas lácteas comerciais demonstrou que o pH destas bebidas variou de 3,86 a 4,08, mostrando que as bebidas comerciais encontravam-se muito mais ácidas do que as preparadas com isolado protéico de soja.

Menores valores de pH (4,42 a 4,47) e maiores teores de acidez (82 a 90°D) devido à presença de sais foram obtidos por Umbelino et al. (2001) no estudo de um “iogurte” de soja enriquecido com cálcio e utilizando cultura tradicional (*L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus*) no processo de fermentação.

O valor de pH tem sua importância relacionada também com o aspecto visual do produto final durante sua conservação em temperaturas baixas. É fundamental que haja um controle rigoroso para que não ocorram possíveis separações de fase, acidificação elevada, influenciada pelo tipo de fermentação, além de alterações nas características sensoriais que poderão tornar o produto indesejável.

Além disso, o valor de pH interfere na viabilidade da microflora probiótica em leites fermentados. Com o decréscimo do pH ocorre uma redução nas contagens de células viáveis de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, durante a estocagem refrigerada de iogurtes (VIDEROLA; BAILO; REINHEIMER, 2000).

As diferenças nos valores de pH dos diferentes produtos podem estar relacionadas ao tipo de cultura utilizada, à atividade desta cultura, ao nível de inóculo, ao valor estabelecido para finalizar a fermentação, à quantidade de soro de leite utilizada na elaboração das bebidas



lácteas, à adição de diferentes ingredientes, assim como o tempo de armazenamento da cultura láctica.

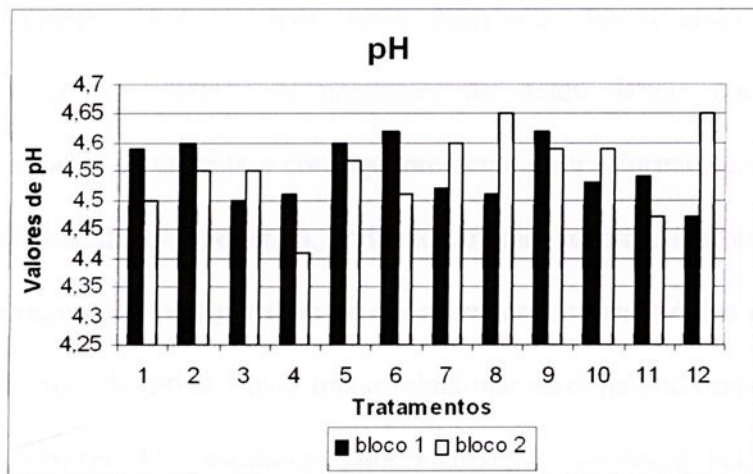


Figura 9 Valores de pH das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

Os teores de acidez obtidos nas bebidas lácteas foi de 54,93 a 74,71°D para o bloco 1 e 57,24 a 79,66°D para o bloco 2 (ver Figura 10), estando dentro da faixa estabelecida para bebidas lácteas na legislação brasileira, que é de 60 a 150°D (BRASIL, 2000). Pode-se observar que no bloco 2 foi obtido uma menor variação nos valores de acidez entre os tratamentos, quando comparado ao bloco 1.

Estes valores estão semelhantes aos encontrados por Santos e Ferreira (2001) para uma bebida láctea fermentada formulada com 30% de soro, 64 a 70°D, e por Seibel e Cansian (2000), 50 a 60°D, para bebidas lácteas formuladas com teor de soro variando de 60,65 a 70% e fermentadas com cultura tradicional de iogurte.

A análise de variância dos resultados demonstrou que a diferença encontrada para os teores de acidez entre os tratamentos foi significativa estatisticamente, como mostram os resultados do Teste de Tukey do Apêndice C.

A acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados e é um dos fatores que limita a aceitação dos mesmos. A produção de ácido láctico, substância característica de todos os leites fermentados, age como conservante natural além de tornar os componentes do leite mais digeríveis, favorecendo os indivíduos aclorídricos (SILVA et al., 2001). A produção de ácido láctico contribui para a desestabilização das micelas de caseína e conseqüentemente para a formação do gel, além de proporcionar o seu sabor ácido característico, podendo também acentuar o aroma do produto.

Foi feita uma regressão múltipla com os dados experimentais médios de pH e acidez titulável das bebidas lácteas do bloco 2 para tentar relacionar estes parâmetros com a variação na composição das bebidas. Os resultados para análise de variância para este modelo mostraram não ser significativos estatisticamente. Os coeficientes de determinação e nível de significância foram $R^2 = 0,0231$ e $p = 0,5172$ para o valor de pH, e $R^2 = 0,5139$ e $p = 0,1806$ para acidez titulável.

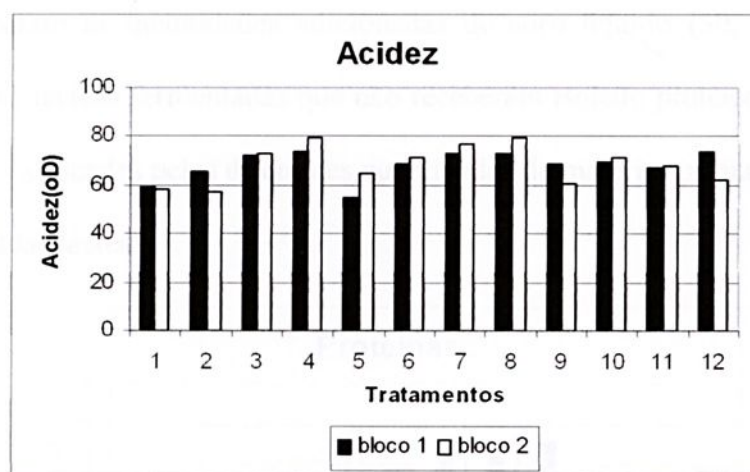


Figura 10 Valores de acidez das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

5.3.3 Teor de proteínas

O teor de proteínas das bebidas lácteas no bloco 1 apresentou uma variação de 2,91 a 4,42% e no bloco 2 de 2,93 a 4,85%, como mostra a Figura 11, muito superior ao mínimo estabelecido pela legislação, de 1,2% (BRASIL, 2000). A análise de variância dos resultados demonstrou que a diferença encontrada para o teor de proteínas entre os tratamentos foi significativa estatisticamente, como mostram os resultados do teste de Tukey (Apêndice D). A variação encontrada entre os tratamentos está relacionada ao teor de proteínas do soro de leite, leite em pó e o isolado protéico de soja, destacando os valores dos tratamentos 5, 6, 7 e 8, os quais foram os elaborados com 2,5% de isolado protéico de soja. Como o isolado protéico de soja tem teor de proteínas superior ao do soro de leite em pó e leite em pó desnatado, à medida que se aumentou o teor protéico de soja, o teor de proteínas na bebida láctea aumentou. Os valores foram maiores que os encontrados por Madureira (2004), de 1,83 a 2,28%, quando variaram as quantidades adicionadas de soro líquido (30, 40 e 50%) na elaboração de bebidas lácteas fermentadas que não receberam isolado protéico de soja. Estas variações podem ser explicadas pelas diferentes quantidades de matérias primas utilizadas nas formulações das bebidas lácteas.

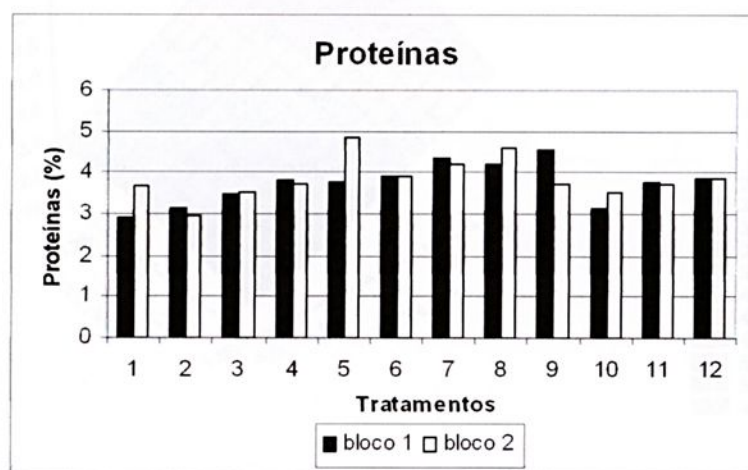


Figura 11 Valores de proteínas das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

A partir dos resultados médios dos tratamentos procedeu-se a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado, como mostra a Equação 1.

$$Y_1 = 3,825 + 0,1275.X_2 + 0,41.X_3 + 0,2425.X_2.X_3 \text{ (Equação 1)}$$

O coeficiente de determinação para o modelo polinomial foi 94,50% e o nível de significância foi de 0,0217. O teor de proteínas é dependente das variáveis X_2 (leite em pó) e X_3 (isolado protéico de soja) e da interação entre as variáveis X_2 , X_3 (leite em pó e isolado protéico de soja).

A Figura 12 mostra a representação tridimensional da superfície de resposta, através da relação entre os teores de leite em pó desnatado e isolado protéico de soja com o teor de proteínas. Quanto maior a quantidade de leite em pó e de isolado protéico de soja, maior o teor de proteínas da bebida láctea.

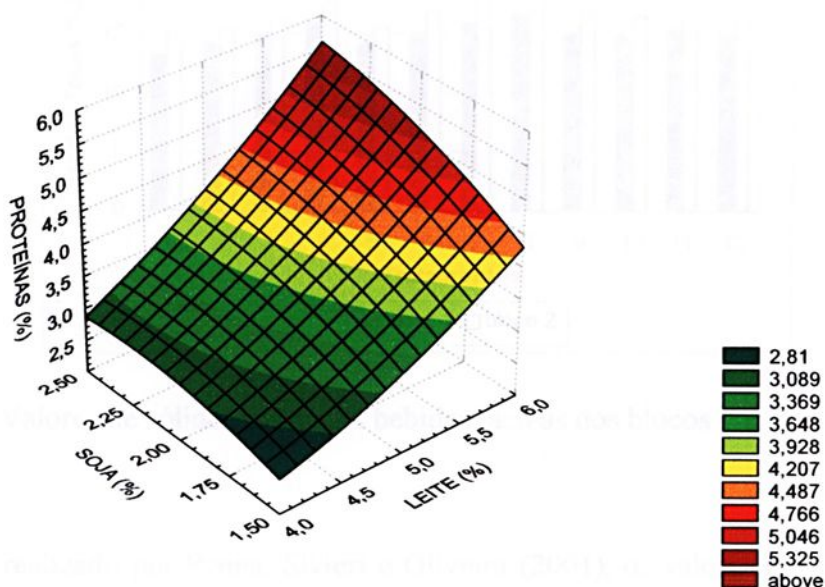


Figura 12 Efeito dos teores de leite em pó desnatado e de isolado protéico de soja sobre o teor de proteínas das bebidas lácteas.

5.3.4 Teor de sólidos

As bebidas lácteas elaboradas no bloco 1 apresentaram uma variação de 13,27 a 16,62% de sólidos totais e no bloco 2 de 15,07 a 18,46% de sólidos totais, conforme apresentado na Figura 13. A variação nos teores de sólidos totais está relacionada à variação na composição das bebidas lácteas. O teor de sólidos é importante pelas suas propriedades físicas, como a consistência e a viscosidade e pelo valor nutritivo do produto, podendo variar de 9 a 30% nos leites fermentados (TAMIME; ROBINSON, 1991). Porém, níveis de sólidos acima de 25% afetam a disponibilidade de umidade e retardam a atividade da cultura.

O aumento do teor de sólidos não gordurosos do leite pode produzir os seguintes efeitos: aumento do valor nutricional e energético e melhoria nas propriedades sensoriais, tais como sabor e consistência (PENNA, 2000).

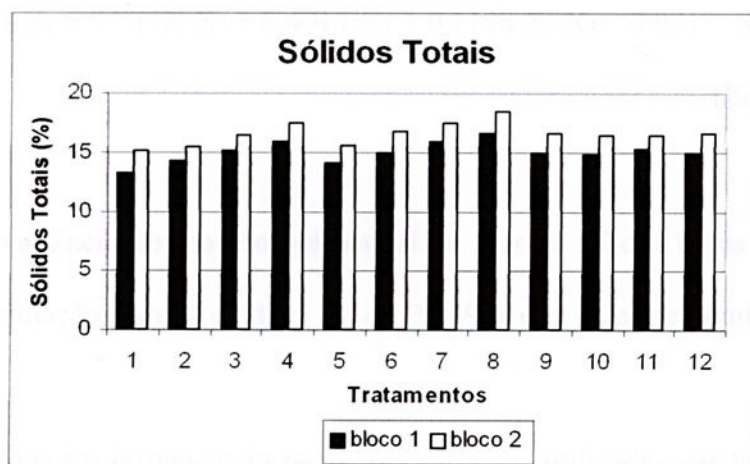


Figura 13 Valores de sólidos totais das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

No estudo realizado por Penna, Sivieri e Oliveira (2001), os valores de sólidos totais de bebidas lácteas fermentadas comerciais variaram de 19,01 a 21,71%, muito superiores aos observados nas Tabelas 6 e 7.

O aumento no teor de sólidos das bebidas lácteas no bloco 1 para o bloco 2 estão relacionadas ao aumento na quantidade de açúcar das bebidas, necessários para a adequação das formulações.

A análise de variância dos resultados demonstrou que a diferença encontrada para o teor de sólidos entre os tratamentos foi significativa estatisticamente, como mostram os resultados do teste de Tukey no Apêndice E.

Esta variação está diretamente relacionada às quantidades de soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja utilizadas nas elaborações das bebidas lácteas. Quanto menor o teor de soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja, menor o teor de sólidos totais das bebidas lácteas.

A partir dos resultados médios dos tratamentos procedeu-se a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado como mostra a Equação 2.

$$Y_2 = 16,605 + 0,4513.X_1 + 0,8438.X_2 + 0,4913.X_3 + 0,1188.X_1.X_3 - 0,0913.X_1.X_2.X_3$$

(Equação 2)

A análise de variância do modelo polinomial do teor de sólidos totais mostrou que o coeficiente de determinação para o modelo foi de 99,49% e o nível de significância foi de 0,0002.

O teor de sólidos foi influenciado pelas três variáveis utilizadas nas formulações das bebidas lácteas: soro de leite (X_1), leite em pó desnatado (X_2) e isolado protéico de soja (X_3) separadamente, e pelas interações do soro de leite e proteínas de soja ($X_1.X_3$) e soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja ($X_1.X_2.X_3$).

As Figuras 14 a 16 mostram as superfícies de resposta, com a relação entre os teores de soro de leite, leite em pó e sólidos totais, em função da quantidade de isolado protéico de

soja. Quanto maior o teor de leite em pó e de isolado protéico de soja, maior o teor de sólidos totais das bebidas lácteas.

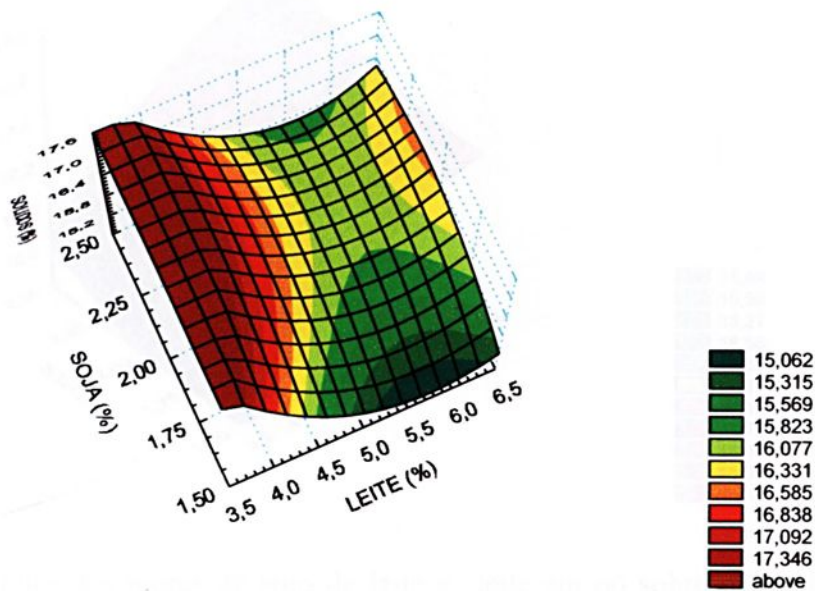


Figura 14 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5 %.

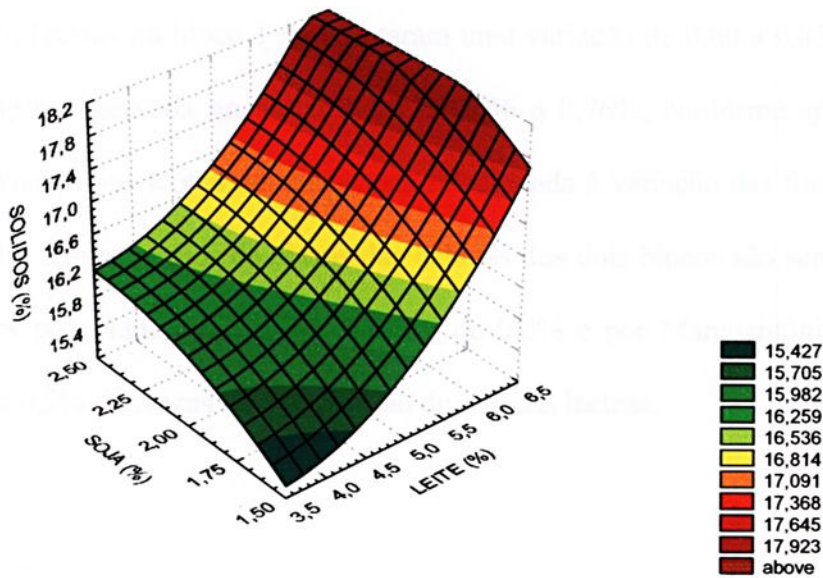


Figura 15 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se com o teor de isolado protéico de soja em 2,0 %.

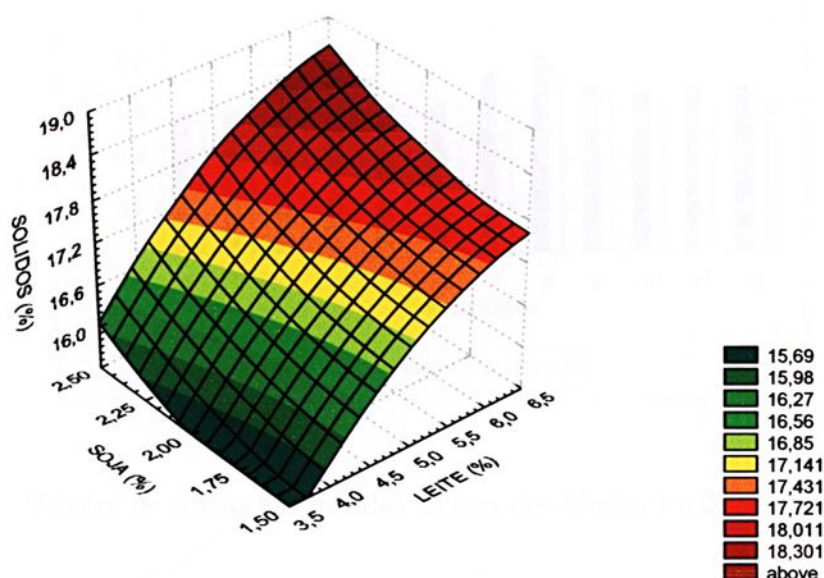


Figura 16 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de sólidos totais, fixando-se com o teor de isolado protéico de soja em 2,5%.

5.3.5 Teor de cinzas

As bebidas lácteas no bloco 1 apresentaram uma variação de 0,60 a 0,83% de cinzas, enquanto a variação observada no bloco 2 foi de 0,56 a 0,76%, conforme apresentado na Figura 17. A diferença nos teores de cinzas está relacionada à variação das formulações das bebidas lácteas. Os teores médios de cinzas das bebidas dos dois blocos são semelhantes aos resultados obtidos por Madureira (2004), que foi de 0,6% e por Marcoantônio e Richards (1998), que foi de 0,5% de cinzas na composição de bebidas lácteas.

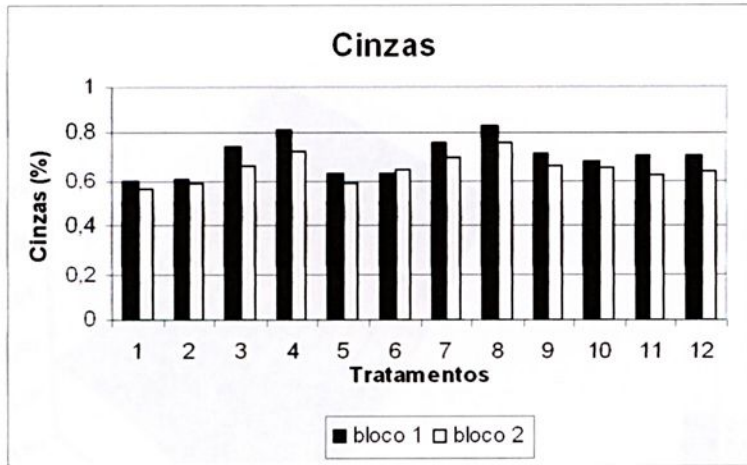


Figura 17 Valores de cinzas das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

A análise de variância dos resultados demonstrou que a diferença encontrada entre os tratamentos foi significativa estatisticamente, como mostram os resultados do teste de Tukey no Apêndice F.

Foi feita a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado, como mostra a Equação 3.

$$Y_3 = 0,6533 + 0,0263.X_1 + 0,0588.X_2 + 0,0188.X_3 \text{ (Equação 3)}$$

O coeficiente de determinação para o modelo foi de 95,59% e o nível de significância de 0,0142. O teor de cinzas é dependente das variáveis X_1 (soro de leite), X_2 (leite em pó) e X_3 (isolado protéico de soja).

As Figuras 18 a 20 mostram a representação das superfícies de resposta da relação entre os teores de soro de leite e leite em pó e cinzas, em função do isolado protéico de soja. Quanto maior o teor de isolado protéico de soja e leite em pó das bebidas lácteas, maior foi o teor de cinzas.

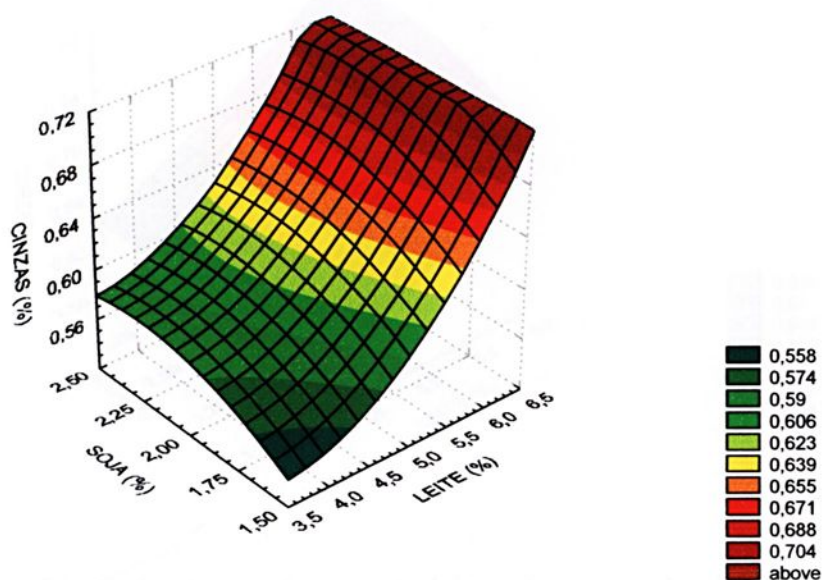


Figura 18 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja fixado em 1,5 %.

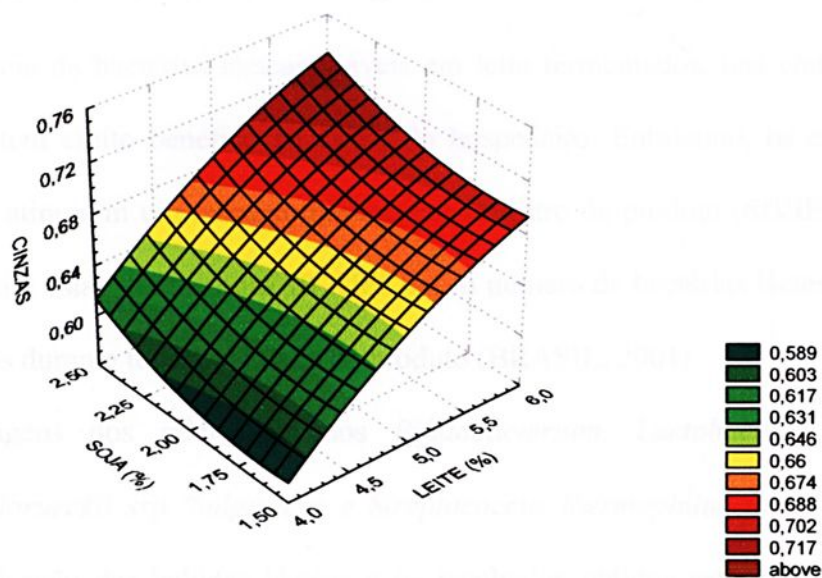


Figura 19 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja fixado em 2,0 %.

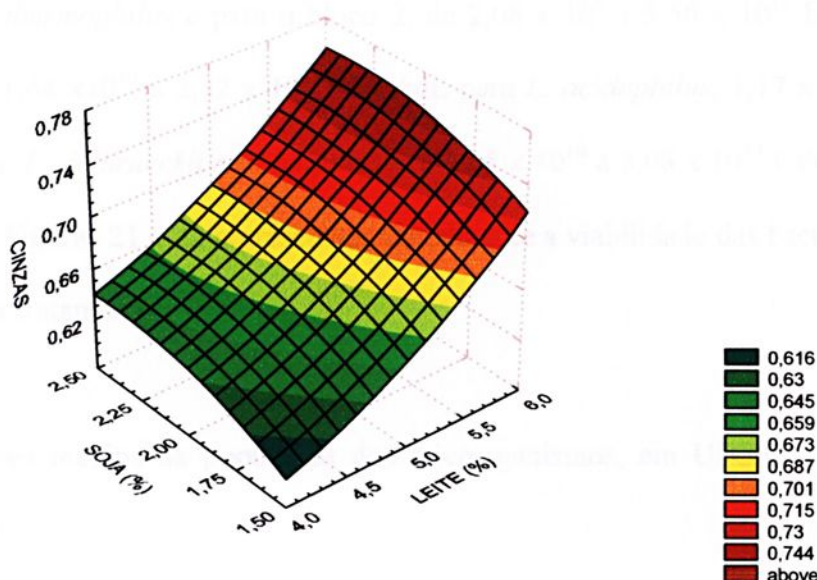


Figura 20 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o teor de cinzas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja fixado em 2,5%.

5.4 Caracterização Microbiológica das Bebidas Lácteas

A existência de bactérias lácteas viáveis em leite fermentados, tais como iogurtes e bebidas lácteas, tem efeito benéfico na saúde do hospedeiro. Entretanto, os efeitos só são possíveis se elas atingirem um número mínimo por mililitro de produto (SIVIERI, 2002). A legislação brasileira estabeleceu como 10^6 UFC/mL o número de bactérias lácteas viáveis em leites fermentados durante toda a validade do produto (BRASIL, 2001).

As contagens dos microrganismos *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* foram realizadas 7 dias após a fabricação das bebidas lácteas e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 8 e 9.

No bloco 1 a contagem dos microrganismos variou de $1,85 \times 10^6$ a $5,77 \times 10^{11}$ UFC/mL para *Bifidobacterium*, $1,17 \times 10^7$ a $2,85 \times 10^{11}$ UFC/mL para *L. acidophilus*, $7,05 \times 10^6$ a $2,17 \times 10^{11}$ UFC/ml para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e $3,60 \times 10^{10}$ a $1,47 \times 10^{13}$

UFC/mL para *S. thermophilus* e para o bloco 2, de $2,08 \times 10^9$ a $5,50 \times 10^{11}$ UFC/mL para *Bifidobacterium*, $1,68 \times 10^{10}$ a $2,42 \times 10^{12}$ UFC/mL para *L. acidophilus*, $1,17 \times 10^9$ a $3,62 \times 10^{12}$ UFC/ml para *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e $1,05 \times 10^{10}$ a $8,08 \times 10^{13}$ UFC/mL para *S. thermophilus*. As Figuras 21 e 22 representam visualmente a viabilidade das bactérias lácticas presentes em cada tratamento.

Tabela 8 Valores médios da população dos microrganismos, em UFC/mL, nas bebidas lácteas do bloco 1.

Tratamentos	<i>Bifidobacterium</i> (UFC/mL)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> (UFC/mL)	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)
1	$1,63 \times 10^9$	$1,97 \times 10^9$	$1,15 \times 10^9$	$2,56 \times 10^{11}$
2	$1,15 \times 10^9$	$1,17 \times 10^7$	$9,50 \times 10^8$	$3,60 \times 10^{10}$
3	$1,32 \times 10^7$	$2,74 \times 10^7$	$1,23 \times 10^7$	$4,20 \times 10^{10}$
4	$6,70 \times 10^8$	$1,93 \times 10^9$	$2,00 \times 10^8$	$1,76 \times 10^{11}$
5	$2,82 \times 10^9$	$4,85 \times 10^8$	$1,78 \times 10^7$	$7,76 \times 10^{11}$
6	$1,68 \times 10^9$	$1,67 \times 10^7$	$1,03 \times 10^9$	$1,30 \times 10^{11}$
7	$2,38 \times 10^7$	$1,54 \times 10^9$	$2,66 \times 10^7$	$1,47 \times 10^{13}$
8	$1,85 \times 10^6$	$1,49 \times 10^7$	$7,05 \times 10^6$	$5,80 \times 10^{12}$
9	$1,08 \times 10^9$	$3,44 \times 10^9$	$8,55 \times 10^8$	$4,06 \times 10^{11}$
10	$2,03 \times 10^9$	$5,81 \times 10^7$	$8,35 \times 10^8$	$7,95 \times 10^{10}$
11	$1,52 \times 10^7$	$1,87 \times 10^9$	$1,10 \times 10^9$	$1,93 \times 10^{11}$
12	$5,77 \times 10^{11}$	$2,85 \times 10^{11}$	$2,17 \times 10^{11}$	$6,10 \times 10^{11}$

Tabela 9 Valores médios da população dos microrganismos, em UFC/mL, nas bebidas lácteas do bloco 2.

Tratamentos	<i>Bifidobacterium</i> (UFC/mL)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. delbrueckii</i> <i>ssp. bulgaricus</i> (UFC/mL)	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)
1	2,93 x 10 ^{11BC}	1,32 x 10 ^{12BC}	4,52 x 10 ^{9C}	2,53 x 10 ^{13BCD}
2	2,24 x 10 ^{9E}	3,27 x 10 ^{11DE}	1,17 x 10 ^{9C}	1,50 x 10 ^{11D}
3	2,18 x 10 ^{11BCD}	5,17 x 10 ^{11CDE}	1,67 x 10 ^{9C}	3,15 x 10 ^{12D}
4	2,90 x 10 ^{10DE}	2,42 x 10 ^{12A}	1,08 x 10 ^{12B}	1,05 x 10 ^{10D}
5	3,14 x 10 ^{9E}	1,68 x 10 ^{10E}	2,99 x 10 ^{10C}	4,54 x 10 ^{13B}
6	5,50 x 10 ^{11A}	1,06 x 10 ^{12BCD}	5,50 x 10 ^{11BC}	6,75 x 10 ^{12CD}
7	2,12 x 10 ^{11BCD}	4,83 x 10 ^{11CDE}	2,93 x 10 ^{12A}	3,60 x 10 ^{13BC}
8	3,75 x 10 ^{10DE}	1,48 x 10 ^{12B}	3,62 x 10 ^{12A}	1,15 x 10 ^{10D}
9	2,08 x 10 ^{9E}	1,99 x 10 ^{10E}	3,26 x 10 ^{10C}	8,08 x 10 ^{13A}
10	3,16 x 10 ^{11B}	4,78 x 10 ^{11CDE}	2,06 x 10 ^{11C}	3,89 x 10 ^{13B}
11	1,52 x 10 ^{11BCDE}	3,86 x 10 ^{11DE}	1,84 x 10 ^{11C}	2,15 x 10 ^{13BCD}
12	9,00 x 10 ^{10CDE}	2,47 x 10 ^{11DE}	1,46 x 10 ^{11C}	1,90 x 10 ^{10D}

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p<0,01).

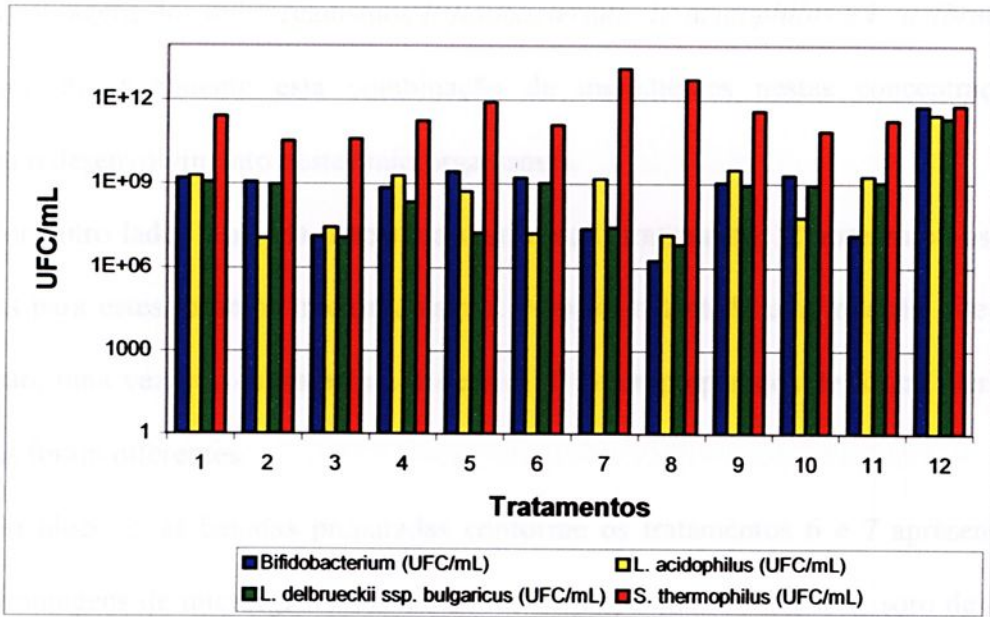


Figura 21 Contagem de microrganismos, em UFC/mL, das bebidas lácteas do bloco 1.

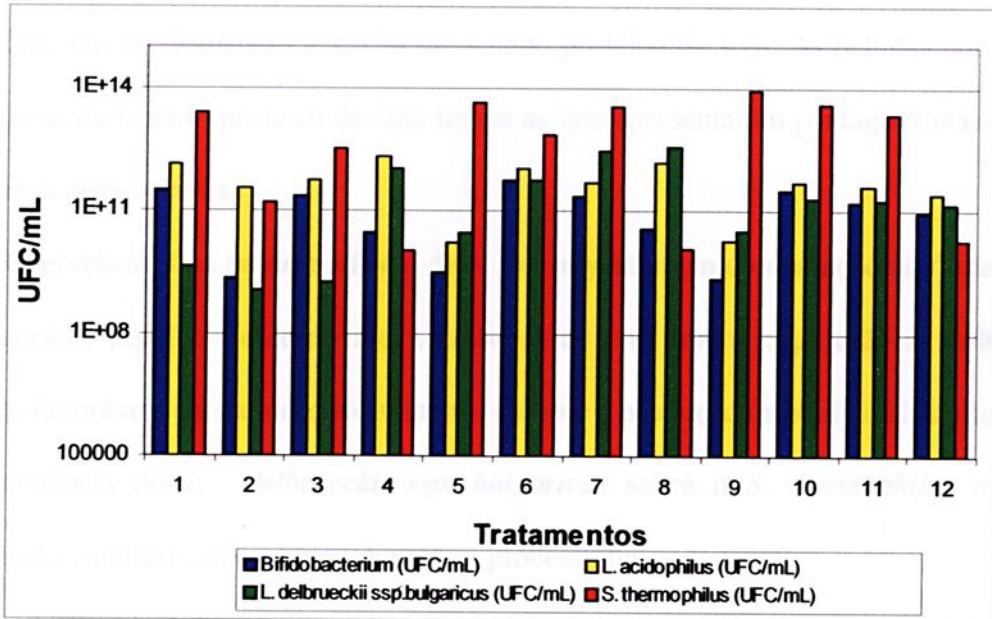


Figura 22 Contagem de microrganismos, em UFC/mL, das bebidas lácteas do bloco 2.

No bloco 1 a bebida preparada conforme o tratamento 8, que contém 4 % de soro de leite em pó, 6% de leite em pó desnatado e 2,5% de isolado protéico de soja apresentou as

menores contagens dos microrganismos *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Provavelmente esta combinação de ingredientes nestas concentrações não favoreceu o desenvolvimento destes microrganismos.

Por outro lado, a bebida preparada conforme o tratamento 12 apresentou as maiores contagens para estes mesmos microrganismos. Não foi detectada uma relação direta com a formulação, uma vez que os tratamentos de 9 a 11 foram preparados de forma idêntica e as contagens foram diferentes.

No bloco 2, as bebidas preparadas conforme os tratamentos 6 e 7 apresentaram as maiores contagens de microrganismos. Estas foram preparadas com 4% de soro de leite, 4% de leite em pó desnatado e 2,5 % de isolado protéico de soja, e 3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 2,5% de isolado protéico de soja, respectivamente. As menores contagens foram observadas no tratamento 2, cuja formulação continha 4% de soro de leite, 4% de leite em pó desnatado e 1,5 % de isolado protéico de soja. As bebidas com maiores porcentagens de isolado protéico de soja foram as que apresentaram contagens mais altas em relação às demais bebidas.

Observou-se uma predominância de *S. thermophilus* em comparação ao *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* possivelmente devido à presença de uma maior população na cultura e de condições favoráveis ao seu desenvolvimento durante a produção da bebida. Na cultura, havia a predominância do *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* sobre o *S. thermophilus* mostrando alterações no equilíbrio microbiano durante o processo fermentativo.

O *S. thermophilus* e o *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* exibem uma relação simbiótica durante a produção de iogurte. O *S. thermophilus* produz ácido láctico e fórmico reduzindo o pH do meio para um nível ótimo de crescimento do *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. O ácido láctico produzido e pequenas quantidades de ácido fórmico estimulam o crescimento do *L.*



delbrueckii ssp. bulgaricus (HATTING; VILJOEN, 2001; MOON; REINBOLD, 1976; SHAH, 2001; SHANKAR; DAVIES, 1977; TAMIME; DEETH, 1980).

As bactérias probióticas (*Bifidobacterium* e *L. acidophilus*) são mais sensíveis ao abaixamento do valor de pH, apresentando menor viabilidade. Verificou-se que houve uma pequena predominância dos *L. acidophilus* em relação as *Bifidobacterium* e isto pode ser porque as bifidobactérias são muito exigentes no que diz respeito às condições necessárias para seu crescimento. O seu pH ótimo está na faixa de 6,5 a 7,0, mas não toleram pH < 5,1 e > 8,0 (ARUNACHALAM, 1999). Como as bebidas apresentaram pH médio de 4,55, este pode ter sido um dos fatores de inibição.

Almeida, Bonassi e Roça (2001) elaboraram uma bebida láctea com valores de pH entre 5,07 e 5,14 pois algumas espécies de *Bifidobacteria* não se desenvolvem em pH entre 4,50 e 5,00. Porém neste estudo a contagem de microrganismos probióticos apresentou contagem acima do exigido pela legislação nos dois blocos.

O crescimento das bifidobactérias pode também ser estimulado pela presença de carboidratos complexos, conhecidos como oligossacarídeos, que estão presentes na soja e seus derivados. Certos oligossacarídeos são considerados prebióticos e são usados para maximizar o efeito dos produtos bífidos. Eles servem como fonte de carbono e energia e são referidos como fatores bifidogênicos (SHAH, 2001).

How, Yu e Chou (2000) estudaram as mudanças nos componentes de leite de soja durante a fermentação com bifidobactérias e concluíram que num período de 48 horas, as porcentagens de proteína e acidez titulável tiveram um aumento durante a fermentação. Os conteúdos de ácidos acético e láctico aumentaram inicialmente e depois foram diminuindo durante a fermentação. O conteúdo de estaquiose, rafinose e sacarose tiveram uma diminuição, sendo que a estaquiose foi a que apresentou redução maior. Por outro lado, o conteúdo de frutose, glicose e galactose tiveram um aumento durante a fermentação.



Esta alteração pode estar relacionada ao fato que *S. thermophilus* e o *L. acidophilus* utilizam a sacarose, o principal açúcar fermentável do “leite” de soja, e mostram crescimento significativo, produzindo quantidades substanciais de ácido. O *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* tem um inexpressivo crescimento e produção de ácido no “leite” de soja devido à sua falta de capacidade para fermentar a sacarose e outros carboidratos da soja (ANGELES; MARTH, 1971; MITAL; MAYLOR, 1974). Por outro lado, as menores contagens de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* pode ser considerado interessante, uma vez que este microrganismo é altamente acidificante, podendo levar a rejeição do produto pelo consumidor.

Menores contagens de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* no produto final diminuem a pós-acidificação do iogurte durante sua vida de prateleira. Isto é importante tanto para garantir ao produto final um sabor suave (PEREIRA, 2002), quanto para evitar os efeitos adversos do pH baixo sobre as bactérias probióticas (DAVE; SHAH, 1997).

A relação final 1:1 entre as bactérias do iogurte vem sendo cada vez menos usada, em virtude da preferência dos consumidores por produtos com sabor suave e menos ácido. Esta proporção pode ser manipulada, de acordo com as características desejadas no produto final. Objetivando-se diminuir a pós-acidificação do iogurte durante sua vida de prateleira e garantir um sabor suave, tem-se aumentado muito o número de *S. thermophilus* em relação ao *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, sendo que a relação pode variar de 7:1 a 10:1 (PEREIRA, 2002).

Dos fatores que afetam a viabilidade dos microrganismos em produtos lácteos fermentados pode se citar a presença de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* em razão do abaixamento do pH e da produção de peróxidos de hidrogênio. O efeito antagônico do *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* sobre a *Bifidobacterium* aparentemente depende da cepa de *Lactobacillus*. Amostras de iogurtes probióticos onde sua população excedia a 10^6 UFC/mL também continham alto número de *S. thermophilus* (VINDEROLA et al., 2000).

Scalabrini et al. (1998) estudaram 27 culturas de *Bifidobacterium* e observaram que estas bactérias se desenvolvem bem no “leite de soja”, pois as mesmas utilizam sacarose, rafinose e estaquiose presentes no extrato de soja para a produção de ácido.

Oliveira e Damim (2002) também obtiveram maiores contagens de *S. thermophilus* em relação ao *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* quando avaliaram a viabilidade destes microrganismos em leites fermentados com diferentes teores de sólidos e açúcar.

Reis et al. (2002) avaliaram a qualidade de 20 bebidas lácteas de diferentes marcas comerciais no município de Lavras - MG e verificaram que cerca de 60% das amostras analisadas apresentaram contagem total de bactérias lácteas viáveis abaixo do padrão mínimo exigido pela legislação, os outros 40% tiveram resultados entre $1,3 \times 10^7$ e $3,7 \times 10^{12}$ UFC/mL.

Através da análise de variância ficou demonstrado que as diferenças encontradas entre os tratamentos para as contagens dos microrganismos foram significativas estatisticamente, como demonstrado através do teste de Tukey na Tabela 9 e nos Apêndices G a J.

A partir dos resultados médios obtidos nas contagens de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, *L. acidophilus* e de *Bifidobacterium* procedeu-se a regressão linear múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa, na tentativa de relacionar os valores encontrados com as diferentes formulações das bebidas lácteas. Os resultados da análise de variância mostraram não ser significativas estatisticamente as regressões obtidas para *S. thermophilus* ($R^2 = 0$, $p = 0,9276$), para *L. acidophilus* ($R^2 = 0,3496$, $p = 0,2892$) e para a *Bifidobacterium* ($R^2 = 0,5171$, $p = 0,1786$), por isso as equações não estão sendo apresentadas, mas foi significativa estatisticamente para o *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* ($R^2 = 0,6557$).



A partir dos resultados médios dos tratamentos procedeu-se a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado, como mostra a Equação 4.

$$Y_4 = 7,32 \times 10^{11} + 8,81 \times 10^{11} \cdot X_2 + 7,55 \times 10^{11} \cdot X_3 + 6,12 \times 10^{11} \cdot X_2 \cdot X_3 \text{ (Equação 4)}$$

Através da análise de variância do modelo polinomial do teor de sólidos totais, o coeficiente de determinação para o modelo foi de 87,48% e o erro padrão de 0,0995.

A população de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* é dependente da variável X_2 (leite em pó), X_3 (isolado protéico de soja) e da interação $X_2 \cdot X_3$ (leite em pó e isolado protéico de soja).

A Figura 23 mostra a representação da superfície de resposta, da relação entre os teores de leite em pó e isolado protéico de soja na população de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*. Quanto maior o teor de isolado protéico de soja e leite em pó das bebidas lácteas, maior a população de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

5.5 Avaliação Sensorial das Bebidas Lácteas

As análises dos atributos das bebidas lácteas avaliadas de acordo com a metodologia, sabor e aroma estão representados nas Tabelas 10 e 11 e nas Figuras 24 e 25, respectivamente, para os blocos 1 e 2.

A Tabela 10 apresenta os resultados referentes ao atributo de sabor para o bloco 1 e o tratamento 1 para o bloco 2, portanto as bebidas preferidas pelos provadores. A diferença de gosto entre as bebidas 2 e 3 é pequena, mas a bebida 2 é a preferida. A mudança de 1 para 2% de açúcar na formulação das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2 pode também estar relacionada com a mudança de preferência. Uma aumento no teor de açúcar e preferência mudou da bebida láctea do tratamento 4, que continha 4% de soro de leite para o tratamento 3, que continha 2% de soro de leite em pó. Além disso, estas bebidas são as que possuem

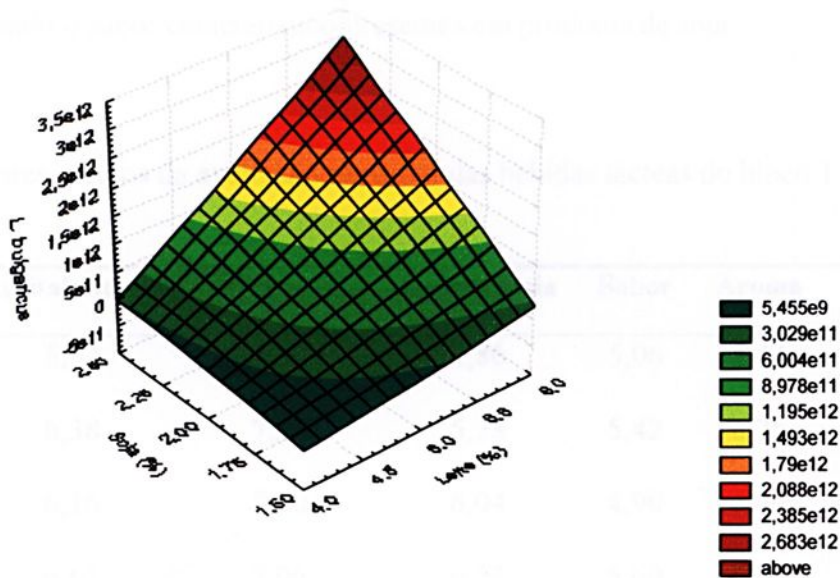


Figura 23 Efeito dos teores de leite em pó e de isolado protéico de soja sobre a população de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*.

5.5 Avaliação Sensorial das Bebidas Lácteas

As médias dos resultados dos atributos sensoriais: aceitabilidade geral, aparência, cor, consistência, sabor e aroma estão apresentados nas Tabelas 10 e 11 e nas Figuras 24 e 25, respectivamente para os blocos 1 e 2

A bebida láctea elaborada conforme o tratamento 4 foi o que obteve maior média para o bloco 1 e o tratamento 3 para o bloco 2, portanto as bebidas preferidas pelos provadores. A preferência do produto está relacionada à composição das bebidas lácteas. A mudança de 5 para 7% de açúcar na formulação das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2 pode também estar relacionada com esta mudança de preferência. Com aumento no teor de açúcar, a preferência mudou da bebida láctea do tratamento 4, que continha 4% de soro de leite para o tratamento 3, que continha 3% de soro de leite em pó. Além disso, estas bebidas são as que possuem

maiores concentrações de leite em pó (6%), e menor concentração do isolado protéico de soja (1,5%), mascarando o sabor característico presentes em produtos de soja.

Tabela 10 Valores médios da avaliação sensorial das bebidas lácteas do bloco 1.

Tratamentos	Aceitabilidade	Aparência/Cor	Consistência	Sabor	Aroma	Índice de Aceitabilidade
1	5,52	6,22	5,86	5,06	6,44	5,82
2	6,38	7,20	5,78	5,42	6,76	6,31
3	6,16	7,00	6,04	4,90	6,46	6,11
4	6,62	7,06	6,22	5,60	6,80	6,46
5	5,52	6,46	6,18	4,86	6,60	5,92
6	5,62	7,06	5,44	3,76	5,58	5,49
7	5,84	6,96	5,96	4,62	6,34	5,94
8	6,50	7,20	6,22	5,22	6,34	6,30
9	5,88	6,56	6,30	5,40	6,84	6,20
10	6,24	7,20	6,18	4,98	6,54	5,23
11	6,32	6,86	5,96	5,52	6,38	6,21
12	6,42	6,90	6,20	5,48	6,62	6,32



T. 1336/05

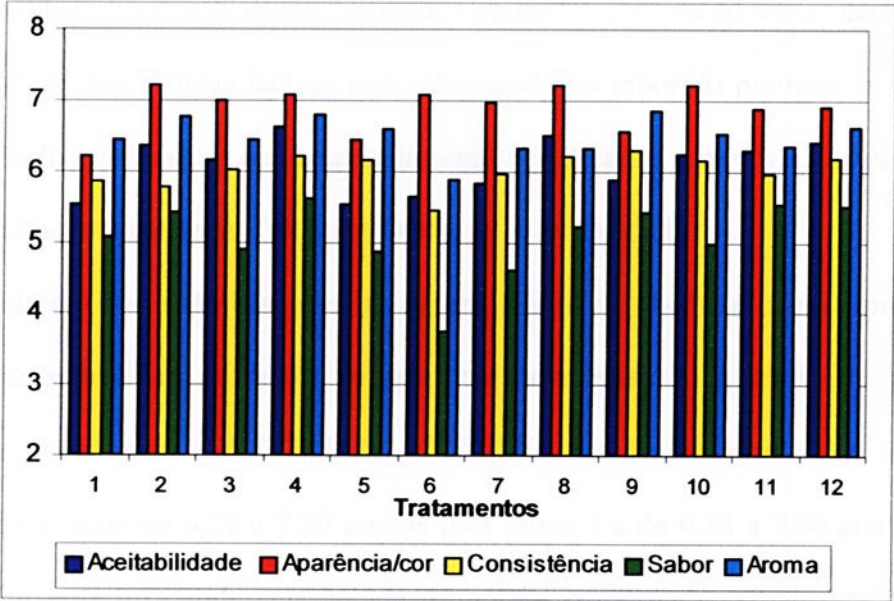


Tabela 11 Valores médios da avaliação sensorial das bebidas lácteas do bloco 2.

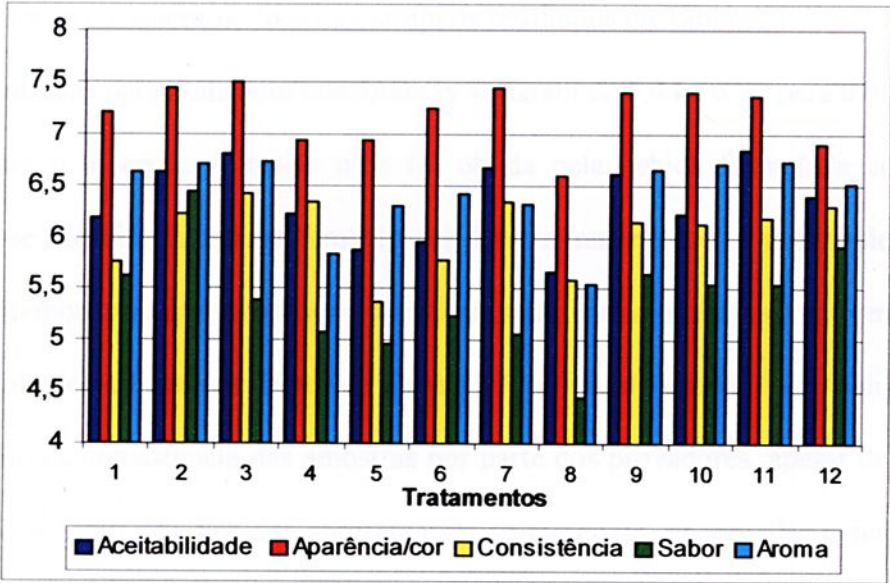
Tratamentos	Aceitabilidade	Aparência/Cor	Consistência	Sabor	Aroma
1	6,18 ^{AB}	7,20 ^A	5,76 ^A	5,62 ^{ABC}	6,62 ^A
2	6,62 ^{AB}	7,44 ^A	6,22 ^A	6,44 ^A	6,70 ^A
3	6,80 ^{AB}	7,50 ^A	6,42 ^A	5,40 ^{ABC}	6,72 ^A
4	6,22 ^{AB}	6,94 ^A	6,34 ^A	5,08 ^{BC}	5,84 ^A
5	5,88 ^{AB}	6,94 ^A	5,38 ^A	4,96 ^{BC}	6,30 ^A
6	5,96 ^{AB}	7,24 ^A	5,78 ^A	5,24 ^{ABC}	6,42 ^A
7	6,66 ^{AB}	7,44 ^A	6,34 ^A	5,06 ^{BC}	6,32 ^A
8	5,66 ^{AB}	6,58 ^A	5,58 ^A	4,44 ^C	5,54 ^A
9	6,60 ^{AB}	7,40 ^A	6,14 ^A	5,64 ^{ABC}	6,64 ^A
10	6,22 ^{AB}	7,40 ^A	6,12 ^A	5,50 ^{ABC}	6,70 ^A
11	6,84 ^A	7,36 ^A	6,18 ^A	5,54 ^{ABC}	6,72 ^A
12	6,40 ^{AB}	6,90 ^A	6,30 ^A	5,92 ^{AB}	6,52 ^A

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,01$).

A aceitabilidade geral é entendida pelo conjunto relativo à primeira impressão causada pelo produto como um todo. Os valores obtidos para este atributo variaram de 5,52 a 6,62 pontos para o bloco 1 e de 5,66 a 6,84 pontos para o bloco 2. A maior nota foi obtida pela bebida láctea do tratamento 11 (3,5% de soro de leite, 5% de leite em pó desnatado e 2% de isolado protéico de soja), seguida pela bebida láctea do tratamento 3 (3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja), e depois as dos demais tratamentos, que por sua vez diferiram estatisticamente, como apresentado na Tabela 11.



Figuras 24 Valores de aceitabilidade geral, aparência/cor, consistência, sabor e aroma das bebidas lácteas do bloco 1.



Figuras 25 Valores de aceitabilidade geral, aparência/cor, consistência, sabor e aroma das bebidas lácteas do bloco 2.

A aceitabilidade geral apresentou resultados parecidos com os de sabor, demonstrando que a aceitabilidade das bebidas lácteas está relacionada ao sabor do produto. A análise de variância dos resultados mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, como mostram os resultados do teste de Tukey da Tabela 11 e Apêndice L.

A aparência e a cor estão baseadas no aspecto visual do produto, como a presença ou não de soro na superfície, produção de gás, cor característica, ausência de grumos e homogeneidade do produto (MADUREIRA, 2004). Os resultados obtidos na análise de aparência e cor variaram de 6,22 a 7,20 pontos para bloco 1 e de 6,58 a 7,50 pontos para o bloco 2. A maior nota foi obtida pela bebida formulada conforme o tratamento 3, que não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. Todas as bebidas apresentaram aspecto homogêneo, sem a presença de grumos, gás e cor característica (corante de urucum) para aroma de pêssego. A análise de variância dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos, como mostram os resultados da Tabela 11.

As notas obtidas para o atributo consistência variaram de 5,44 a 6,30 para o bloco 1 e de 5,38 a 6,42 para o bloco 2. A maior nota foi obtida pela bebida formulada conforme o tratamento 3, que não diferiu estatisticamente dos demais tratamentos. A análise de variância dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos, como mostram os resultados do teste de Tukey da Tabela 11, indicando que não houve diferença no grau de aceitação da consistência das amostras por parte dos provadores, apesar da diferença no teor de sólidos totais. As bebidas apresentaram-se cremosas, encorpadas e sem grumos, porém com sinérese e separação de fases. Na avaliação da consistência deve-se levar em conta o corpo do produto quando consumido. Coágulo com grumos, corpo fraco e problemas com a viscosidade são defeitos que podem levar à rejeição por parte dos consumidores (GUEDES NETO et al., 2003). A granulação pode ser causada pelo baixo desenvolvimento de acidez (PINHEIRO, 2003) e por problemas com a dissolução dos sólidos que farão parte da



composição das bebidas lácteas. A baixa viscosidade pode ser causada pela menor concentração de sólidos totais, tratamento térmico e homogeneização insuficientes, agitação incorreta, destruição do gel durante a acidificação, tipo de fermento e temperatura de incubação muito baixa (GUEDES NETO et al., 2003).

A preocupação com a textura de produtos com baixo teor de gordura tornou-se uma realidade. A solução pode ser a escolha de uma cultura láctica composta por bactérias que produzam substâncias que melhorem a viscosidade e a cremosidade do produto final e também a utilização de sólidos de origem láctea, como os concentrados protéicos e/ou misturas de hidrocolóides (FIORAVANTE, 2001).

Os resultados obtidos nas avaliações de sabor foram 3,76 a 5,60 pontos e aroma de 5,88 a 6,80 pontos, e de 4,44 a 6,44 pontos de sabor e 5,54 a 6,72 pontos de aroma para as bebidas dos blocos 1 e 2, respectivamente. Houve um pequeno aumento nas notas atribuídas às bebidas lácteas do bloco 2, que pode estar relacionado ao aumento do teor de açúcar de 5 para 7 % nas formulações. A maior nota para o atributo sabor foi para a bebida elaborada conforme o tratamento 2 e para aroma, as bebidas dos tratamentos 3 e 11, respectivamente. Dois dos tratamentos (5 e 8) elaborados com maior porcentagem de isolado protéico de soja, foram os que receberam menores notas para sabor. Isto pode se explicado porque os demais constituintes dessas formulações não foram suficientes pra mascarar o gosto de soja. Pode-se observar também que as médias das notas de sabor e aroma do bloco 2 foram maiores em relação ao bloco 1, mas o pH foi menor e a acidez titulável maior, diferindo do que relatou Man e Jones (1996) que com o aumento da acidez pode-se alterar o perfil de sabor dos iogurtes, diminuindo a preferência do produto.

A análise de variância dos resultados demonstrou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para o atributo aroma, como mostrou os resultados do teste de Tukey da Tabela 11, entretanto houve diferença significativa entre o sabor das bebidas conforme os



tratamentos (Tabela 11) e os dados da análise de variância podem ser observados no Apêndice M.

O sabor e aroma dos produtos fermentados devem ser ligeiramente ácidos, portanto o sabor e aroma dependem dos microrganismos da cultura e de seu metabolismo durante a fermentação (GUEDES NETO et al., 2003).

Apesar dos resultados satisfatórios com o aroma utilizado, diferentes aromas podem apresentar maior capacidade de mascarar o sabor típico da soja, ou ainda, outros aromas podem apresentar uma melhor combinação com produtos de soja do que o produto testado. Assim, estudos complementares precisam ser realizados para uma melhor decisão sobre qual é a combinação de aromas adequados para uso em bebidas lácteas contendo proteínas de soja, que atendam ao paladar do brasileiro.

Apesar das médias variarem numa faixa de 3,76 a 7,20 pontos e de 4,44 a 7,50 pontos para as bebidas lácteas nos blocos 1 e 2, respectivamente, de um modo geral, as notas individuais apresentaram uma variação muito grande nos atributos analisados, ou seja, alguns gostaram muito e outros desgostaram muito. Provavelmente haja necessidade de direcionamento do produto a um consumidor específico, acostumado a consumir produtos de soja ou enriquecido com soja.

A partir dos resultados médios dos tratamentos de cada atributo avaliado na análise sensorial procedeu-se a regressão múltipla para a obtenção de uma equação polinomial completa. Para os atributos aceitabilidade geral, aparência/cor, aroma e sabor, a análise de variância mostrou não serem significativas estatisticamente as regressões obtidas (aceitabilidade geral $R^2 = 0,2938$, $p = 0,3280$; aparência e cor $R^2 = 0,3791$, $p = 0,2690$; aroma $R^2 = 0,4255$, $p = 0,2377$ e sabor $R^2 = 0,5433$, $p = 0,1626$). Por isso, as equações não estão sendo apresentadas. A regressão obtida para o atributo consistência foi significativa



estatisticamente ($R^2 = 0,7052$, $p = 0,0753$). Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado, como mostra a Equação 5.

$$Y_5 = 6,047 + 0,1925.X_2 - 0,2075.X_3 - 0,2125.X_1.X_2 \text{ (Equação 5)}$$

A análise de variância do modelo polinomial do atributo consistência mostrou que o coeficiente de determinação para o modelo foi de 70,52% e o nível de significância de 0,0753. A consistência é dependente da variável X_2 (leite em pó), X_3 (isolado protéico de soja) e da interação entre as variáveis $X_1.X_2$ (soro de leite e leite em pó).

As Figuras 26 a 28 mostram a representação das superfícies de resposta, da relação entre os teores de leite em pó, soro de leite e a consistência das bebidas lácteas, em função da quantidade de isolado protéico de soja. Quanto maior o teor de leite em pó e de isolado protéico de soja, maior a consistência das bebidas lácteas.

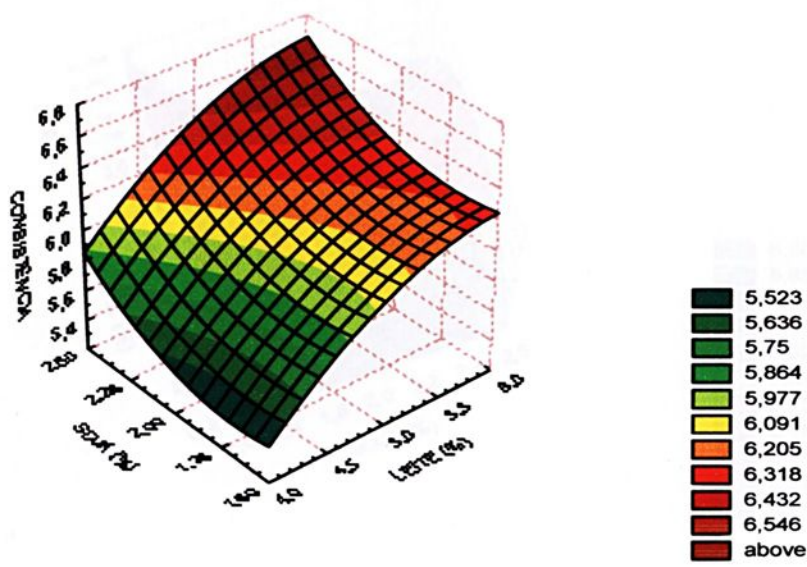


Figura 26 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5 %.

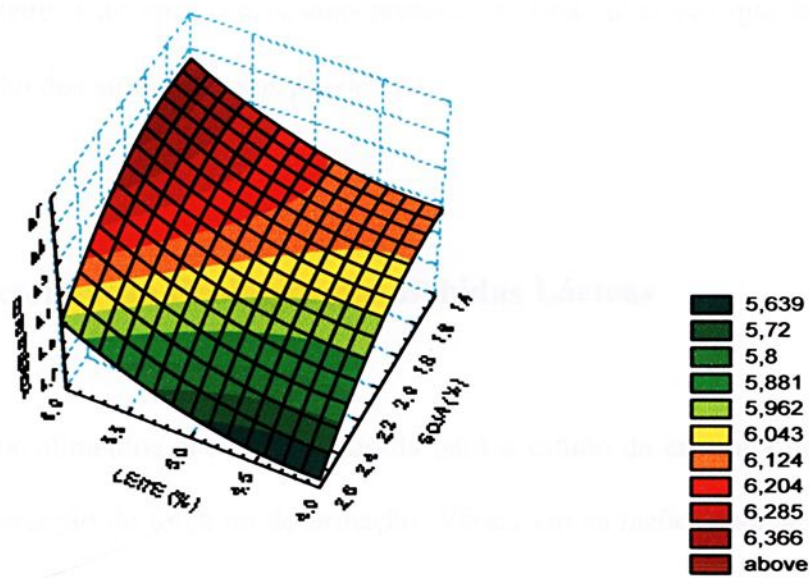


Figura 27 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0 %.

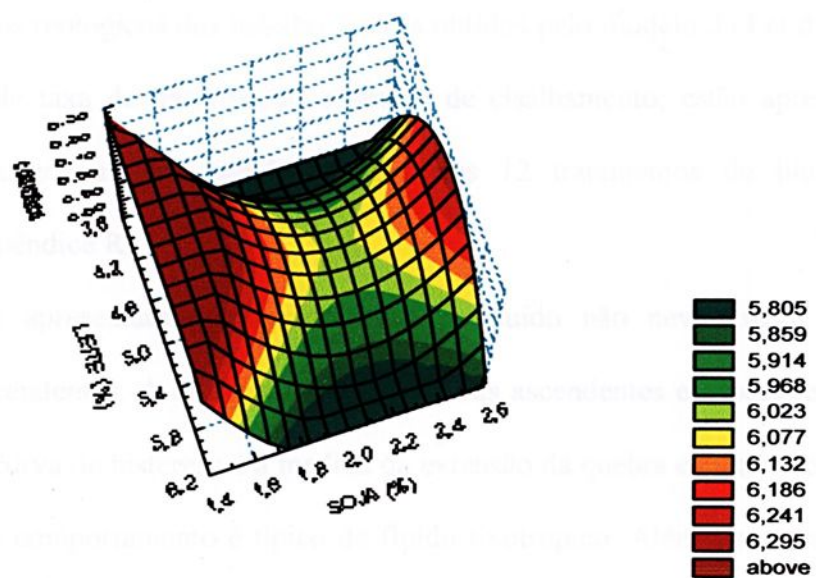


Figura 28 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre a consistência das bebidas lácteas, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5%.

Não foi possível relacionar a preferência do painel dos provadores com as variações nos teores de soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja uma vez que houve grande variação na avaliação dos atributos pelos provadores.

5.6 Caracterização Reológica das Bebidas Lácteas

Na ciência dos alimentos, a reologia é usada para o estudo da estrutura dos alimentos como resposta à aplicação de força ou deformação. Várias são as razões para se conhecer as propriedades reológicas dos alimentos, dentre elas: efetuar o controle de qualidade de matéria primas de processo ou fabricação de produtos finais, estudar a influência de componentes de formulação e relacionar a estrutura dos produtos com as suas características reológicas (STEFFE, 1996).

Os parâmetros reológicos das bebidas lácteas obtidos pelo modelo da Lei da Potência a partir dos dados de taxa de deformação e tensão de cisalhamento, estão apresentados na Tabela 12. Os reogramas das bebidas lácteas dos 12 tratamentos do bloco 2 estão apresentados no Apêndice R.

As amostras apresentaram comportamento de fluido não newtoniano, nas curvas ascendentes e descendentes. A diferença entre as curvas ascendentes e descendentes, com a formação de uma curva de histerese é a medida da extensão da quebra estrutural causada pelo cisalhamento. Este comportamento é típico de fluido tixotrópico. Além disso, os índices de consistência (K) foram maiores para as curvas ascendentes em comparação com as descendentes. Na curva descendente, o índice de comportamento (n) foi maior, demonstrando que o produto após cisalhado apresenta comportamento mais próximo aos dos fluidos newtonianos ($n=1$). Em algumas bebidas, o comportamento observado foi dilatante.

Tabela 12 Parâmetros reológicos das bebidas lácteas do bloco 2, obtidos pelo Modelo da Lei da Potência ($\tau = K \dot{\gamma}^n$).

Tratamentos	Curvas ascendentes			Curvas descendentes		
	K Pa.s ⁿ	n	R ²	K Pa.s ⁿ	n	R ²
1	0,0856 ^D	0,9182 ^{BC}	0,9858	0,0248 ^{FG}	1,1517 ^{BC}	0,9748
2	0,0094 ^D	1,3184 ^A	0,9956	0,0434 ^{DE}	1,4580 ^A	0,9857
3	0,7968 ^{AB}	0,6051 ^E	0,9865	0,0270 ^F	1,0389 ^{CD}	0,9559
4	0,4633 ^{BC}	0,7710 ^D	0,9909	0,0037 ^H	1,0436 ^{CD}	0,9608
5	0,0907 ^D	0,9120 ^{BC}	0,9937	0,0127 ^{GH}	1,0541 ^{CD}	0,9648
6	0,0815 ^D	1,0262 ^B	0,9916	0,0709 ^C	1,3452 ^{AB}	0,9743
7	1,0403 ^A	0,6202 ^E	0,9852	0,1051 ^B	0,8840 ^D	0,9558
8	0,1297 ^{CD}	0,9826 ^B	0,9933	0,1278 ^A	1,2921 ^{AB}	0,9659
9	0,0868 ^D	0,9687 ^B	0,9940	0,0442 ^D	1,1621 ^{BC}	0,9656
10	0,1760 ^{CD}	0,8471 ^{CD}	0,9863	0,1010 ^B	1,0024 ^{CD}	0,9626
11	0,2738 ^{CD}	0,8539 ^{CD}	0,9903	0,0288 ^F	1,1740 ^{BC}	0,9658
12	0,0701 ^D	1,0297 ^B	0,9934	0,0301 ^{EF}	1,1971 ^{BC}	0,9696

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,01$).

K – índice de consistência, n – índice de comportamento do escoamento e R² – coeficiente de determinação.

Nos fluidos dilatantes ocorre o aumento da viscosidade aparente com o aumento da velocidade de cisalhamento. O fenômeno de dilatância é explicado pela existência no líquido de um sistema de partículas densamente empacotado e, quando submetido a uma tensão de cisalhamento, as partículas se separam. Os vazios entre elas aumentam e são imediatamente preenchidos com líquido da fase contínua. Como o líquido é insuficiente para saturar o sistema, preencher os vazios e cobrir as partículas, a viscosidade aparente aumenta rapidamente e o sistema parece secar ou solidificar (CARVALHO, 1990).

A principal característica da relação cisalhamento/deformação é o desenvolvimento da curva de histerese, quanto maior a área sob a curva, maior o efeito tixotrópico (HOLDSWORTH, 1993). A maior histerese foi observada na bebida láctea preparada conforme o tratamento 7, em cuja formulação contém 3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 2,5% de isolado protéico de soja, esta é a bebida com o maior teor de sólidos. Penna (2000) relatou maior tixotropia nas bebidas lácteas que apresentaram os maiores índices de consistência.

O tixotropismo pode ser atribuído à presença de ligações de hidrogênio presentes entre as micelas coloidais e que rompidas pela agitação voltam a se formar no sistema em repouso (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

As bebidas lácteas apresentaram índice de consistência (K) variando de 0,0094 a 1,0403 Pa.sⁿ para as curvas ascendentes e 0,0045 a 0,4871 Pa.sⁿ para as curvas descendentes e índice de comportamento do escoamento (n) variando de 0,6051 a 1,3184 para as curvas ascendentes e 0,8840 a 1,4580 para as curvas descendentes. Os coeficientes de determinação (R^2) variaram de 0,9852 a 0,9956 para as curvas ascendentes e de 0,9558 a 0,9857 para as curvas descendentes, explicando mais que 95% dos resultados experimentais, justificando o uso deste modelo para fins preditivos.

As análises de variância dos resultados do índice de consistência (K) e do índice de comportamento do escoamento (n) nas curvas ascendentes demonstraram que houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme mostram os resultados do teste de Tukey na Tabela 12 e nos Apêndices N e O.

A partir dos dados médios procedeu-se a regressão múltipla destes dois parâmetros para a obtenção de uma equação polinomial completa, na tentativa de relacionar estatisticamente o índice de consistência (K) e o índice de comportamento de fluxo (n) para as curvas ascendentes, com as variações de soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja.



Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado como mostram as Equações 6 (índice de consistência) e 7 (índice de comportamento do escoamento).

$$Y_6 = 0,2375 - 0,1502.X_1 + 0,2286.X_2 - 0,1246.X_1.X_2 \text{ (Equação 6)}$$

e

$$Y_7 = 0,9198 + 0,1294.X_1 - 0,1405.X_2 \text{ (Equação 7)}$$

A análise de variância dos modelos polinomiais índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento (n) mostrou que o coeficiente de determinação para os modelos foram de 90,76% e 92,37% e o nível de significância de 0,0574 e 0,0402, respectivamente.

O índice de consistência (K) é dependente da variável X_1 (soro de leite), X_2 (leite em pó) e da interação $X_1.X_2$ (soro de leite e leite em pó), e o índice de comportamento do escoamento (n) é dependente das variáveis X_1 (soro de leite) e X_2 (leite em pó).

As Figuras 29 e 30 mostram as superfícies de resposta da relação entre as variáveis (leite em pó e soro de leite) com os parâmetros reológicos (índice de consistência e índice de comportamento do escoamento).

Quanto maior o teor de leite em pó e soro de leite, maior o índice de consistência das bebidas lácteas, enquanto o índice de comportamento do escoamento teve resultado oposto.

A bebida láctea que apresentou maior índice de consistência ($K=1,0403 \text{ Pa.s}^n$) foi a elaborada conforme o tratamento 7 (com 3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 2,5% de isolado protéico de soja, totalizando 17,40% de sólidos totais), apesar dos produtos elaborados conforme os tratamentos 8 e 4 apresentarem os maiores teores de sólidos totais, 18,467 e 17,43% respectivamente. A bebida láctea elaborada conforme o tratamento 3 (com 3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja

apresentou o menor índice de comportamento de escoamento ($n=0,6051$). Isto demonstra que outros fatores, além da variação da formulação, tiveram influência sobre os parâmetros reológicos, tais como pequenas variações durante o tratamento térmico, a atividade da cultura, variação na temperatura de incubação, o tempo de fermentação, a produção de ácido, a quebra do gel, a temperatura de estocagem e o manuseio das amostras.

Renkema (2004) estudou a relação entre as propriedades reológicas e a estrutura da cadeia em isolados protéicos de soja através da função do pH e da força iônica em pH de 3,8, 5,2 e 7,6 e concentração de sal de 0,0, 0,2 e 0,5 M. O experimento mostrou que as propriedades reológicas variaram com o pH e a força iônica devido às diferenças na estrutura das cadeias. As diferenças nas propriedades reológicas podem ser explicadas pela quantidade de proteínas incorporadas na estrutura da cadeia.

Penna, Sivieri e Oliveira (2001) estudaram a relação entre a qualidade e as propriedades reológicas de 10 amostras de 5 bebidas lácteas comerciais, onde realizaram análises físico-químicas, análise sensorial e as características reológicas utilizando um reômetro Brookfield. Todas as amostras demonstraram um comportamento não newtoniano com tixotropia. As curvas ascendentes mostraram comportamento pseudoplásticos e as descendentes, comportamento dilatante em quase todas as marcas. O modelo da Lei da Potência foi o mais adequado para descrever o comportamento reológico.

As características reológicas também são afetadas pelas condições de fermentação. Aumentando a temperatura (de 37 a 46°C) ocorre um aumento na taxa de redução do pH e formação da estrutura, na firmeza do gel e na viscosidade do iogurte. O aumento na taxa de fermentação é atribuído ao aumento da atividade metabólica das bactérias lácteas. A formação do gel e a acentuada reologia do iogurte são atribuídas ao aumento na extensão e a força das ligações hidrofílicas quando a temperatura de fermentação é alcançada (HAQUE et al., 2001).



Os fatores que afetam as propriedades do fluxo podem ser: degradação enzimática, efeitos físico-químicos (pH) e efeitos físicos (teor de sólidos) (CAMPOS, 1989).

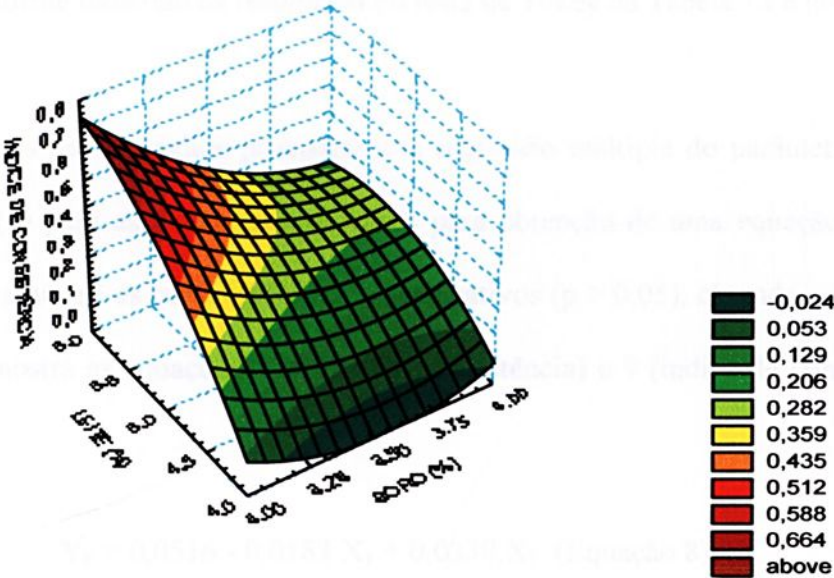
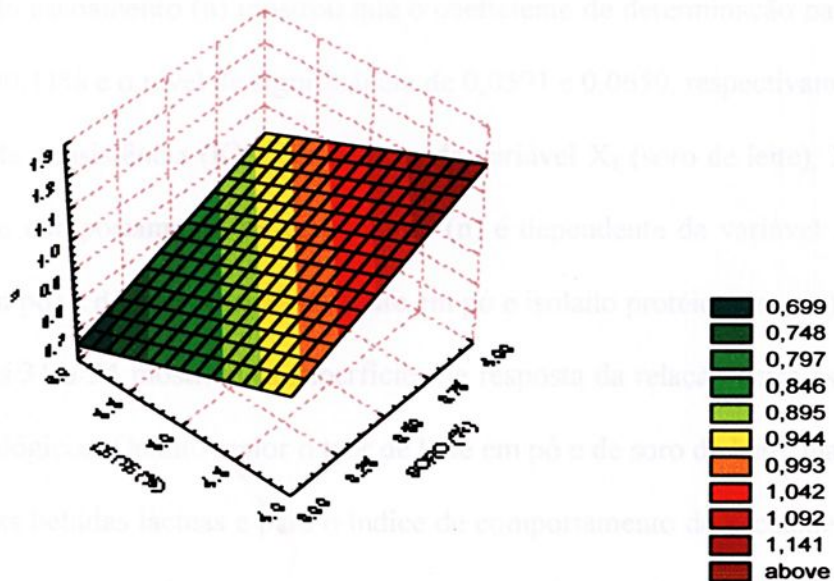


Figura 29 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre índice de consistência (K) ascendente das bebidas lácteas.



n = índice de comportamento de fluxo.

Figura 30 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre índice de comportamento de fluxo (n) ascendente das bebidas lácteas.

As análises de variância dos resultados do índice de consistência (K) e do índice de comportamento do escoamento (n) demonstraram que houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme mostram os resultados do teste de Tukey da Tabela 12 e no Apêndice P e Q.

A partir dos dados médios procedeu-se a regressão múltipla do parâmetro índice de comportamento (n) para as curvas descendentes para obtenção de uma equação polinomial completa. Eliminaram-se os coeficientes não significativos ($p > 0,05$), obtendo-se um modelo ajustado, como mostra as equações 8 (índice de consistência) e 9 (índice de comportamento do escoamento).

$$Y_8 = 0,0516 - 0,0183.X_1 + 0,0339.X_2 \text{ (Equação 8)}$$

e

$$Y_9 = 1,1493 + 0,1060.X_1 - 0,0723.X_2 + 0,0551.X_2.X_3 \text{ (Equação 9)}$$

A análise de variância dos modelos polinomiais índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento (n) mostrou que o coeficiente de determinação para o modelo foi de 90,61% e 90,11% e o nível de significância de 0,0591 e 0,0650, respectivamente.

O índice de consistência (K) é dependente da variável X_1 (soro de leite), X_2 (leite em pó), e o índice de comportamento do escoamento (n) é dependente da variável X_1 (soro de leite), X_2 (leite em pó) e da interação $X_2.X_3$ (leite em pó e isolado protéico de soja).

As Figuras 31 a 34 mostram as superfícies de resposta da relação entre as variáveis e os parâmetros reológicos. Quanto maior o teor de leite em pó e de soro de leite, maior o índice de consistência das bebidas lácteas e para o índice de comportamento do escoamento pode-se observar um aumento neste índice quanto menor o teor de leite em pó e de isolado protéico de soja.

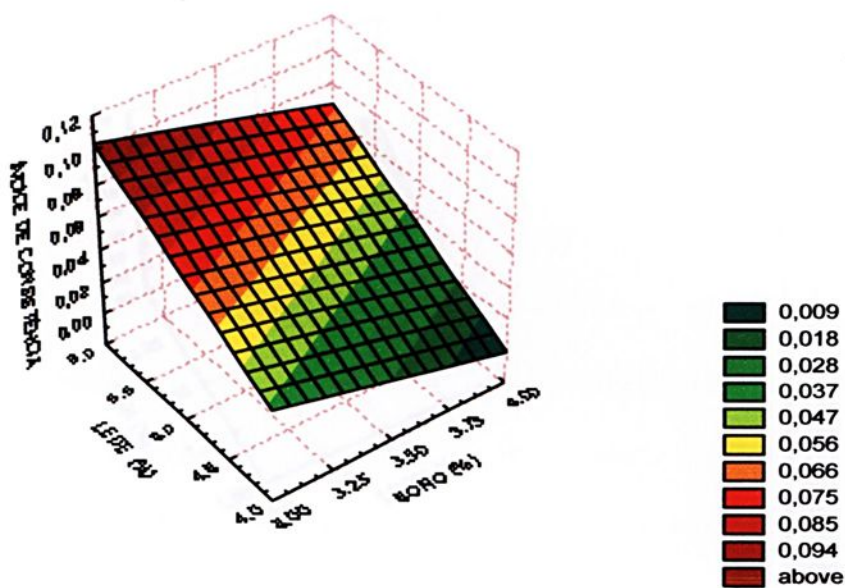
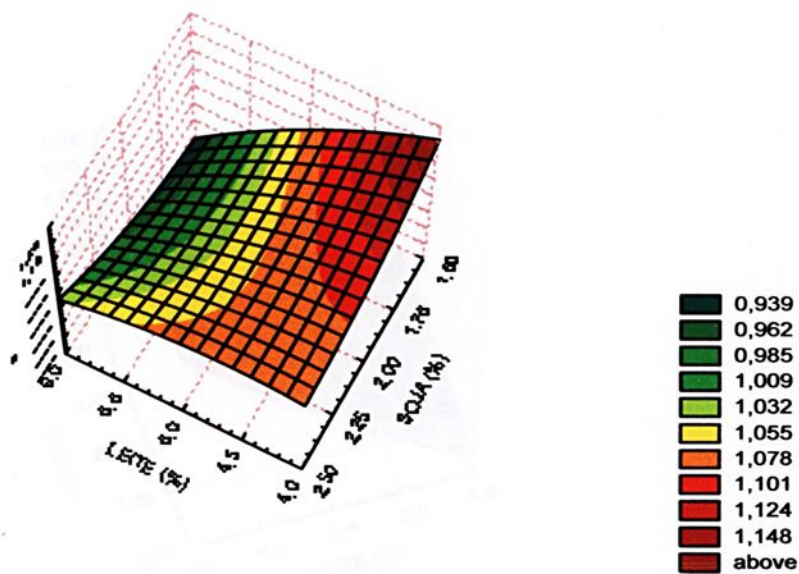
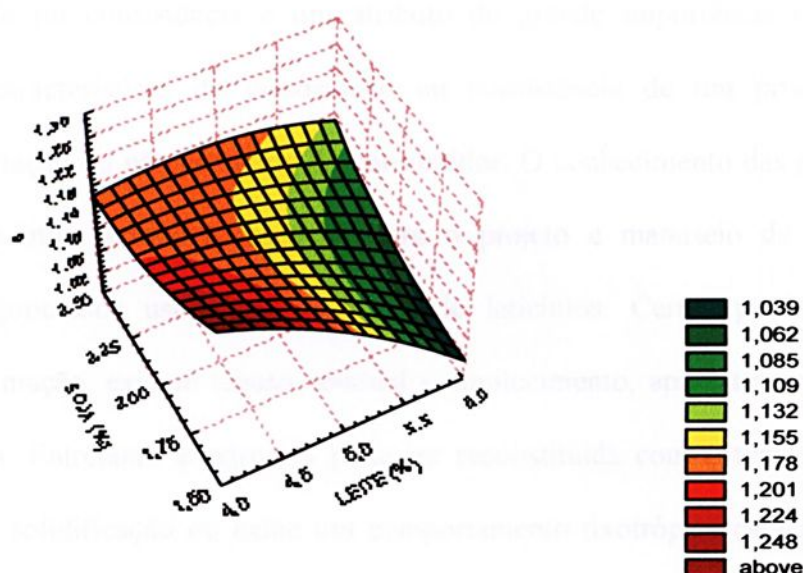


Figura 31 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre índice de consistência (K) descendente das bebidas lácteas.



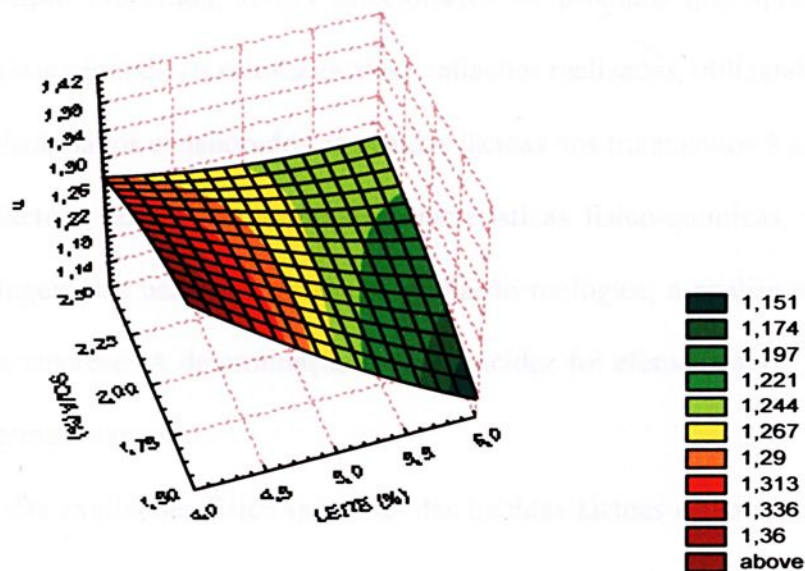
n = índice de comportamento de fluxo.

Figura 32 Efeito dos teores de soro de leite e leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) nas curvas descendentes, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 1,5 %.



n = índice de comportamento de fluxo

Figura 33 Efeito dos teores de soro de leite e de leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) nas curvas descendentes, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,0 %.



n = índice de comportamento de fluxo

Figura 34 Efeito dos teores de soro de leite e de leite em pó sobre o índice de comportamento de fluxo (n) nas curvas descendentes, fixando-se o teor de isolado protéico de soja em 2,5 %.

A viscosidade ou consistência é um atributo de grande importância em produtos alimentícios. As características de viscosidade ou consistência de um produto podem determinar sua aceitação ou não por parte do consumidor. O conhecimento das propriedades reológicas dos produtos lácteos é essencial para o projeto e manuseio de materiais e equipamentos de processos usados na indústria de laticínios. Certos produtos quando submetidos à deformação, exibem tensão residual e amolecimento, aparentemente devido à quebra da estrutura. Entretanto a estrutura pode ser reconstituída com o tempo, quando o produto é levado à solidificação ou exibe um comportamento tixotrópico característicos de muitos produtos alimentícios (PRENTICE, 1992).

5.7 Formulação Otimizada

Para a formulação otimizada, foram selecionados os produtos que apresentaram as melhores características segundo os resultados das avaliações realizadas, utilizando-se o Teste de Tukey. Foram selecionados e elaborados as bebidas lácteas dos tratamentos 3 e 7.

Nas bebidas lácteas, foram analisadas as características físico-químicas, o tempo de fermentação, a contagem das bactérias lácteas, a avaliação reológica, a análise sensorial e o acompanhamento da sinérese. A determinação de pH e acidez foi efetuada após 1, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias de armazenamento.

Os resultados das avaliações físico-químicas das bebidas lácteas estão apresentados na Tabela 13.



Tabela 13 Médias das características físico-químicas das formulações otimizadas.

Tratamentos	Tempo de fermentação	Valor de pH	Acidez (°D)	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Sólidos Totais (%)
3	4:15	4,62 ± 0,01	68,03 ± 0,70	4,07 ± 0,38	0,70 ± 0,01	16,90 ± 0,06
7	3:55	4,64 ± 0,01	76,56 ± 0,97	4,53 ± 0,01	0,72 ± 0,01	16,93 ± 0,00

As médias dos resultados obtidos nas análises físico-químicas das bebidas lácteas otimizadas foram de: 4,62 ± 0,01 para o pH, 68,03 ± 0,71 °D de acidez titulável, 4,07 ± 0,38% de proteínas, 0,70 ± 0,01 % de cinzas e 16,90 ± 0,06 % de sólidos totais para a bebida do tratamento 3, e 4,64 ± 0,01 para o pH, 76,56 ± 0,97 °D de acidez titulável, 4,53 ± 0,01% de proteínas, 0,72 ± 0,01 % de cinzas e 16,93 ± 0,00 % de sólidos totais para a bebida do tratamento 7. Estes valores estão próximos aos encontrados nas análises físico-químicas das bebidas lácteas dos blocos 1 e 2.

O tempo de fermentação foi de 4:15 para o tratamento 3 e 3:55 para o tratamento 7. Estes valores foram inferiores ao obtidos no bloco 2 e muito próximos aos obtidos no bloco 1. Esta diferença no tempo de fermentação pode estar relacionada a proporção de microrganismos presentes na cultura láctica, ao equilíbrio de microrganismos da cultura láctica ou ao tratamento térmico aplicado nas bebidas. As Figuras 35 e 36 mostram as curvas de acidificação das bebidas lácteas otimizadas em duplicata (amostra 1 e amostra 2).

A Tabela 14 e a Figura 37 apresentam a variação de pH durante os 42 dias de armazenamento do produto. No dia de fabricação a bebida do tratamento 3 apresentou pH de 4,62 ± 0,01, diminuindo gradativamente até alcançar 4,30 ± 0,01 e a bebida do tratamento 7 apresentou pH de 4,64 ± 0,01 diminuindo para 4,38 ± 0,01. A análise de variância dos resultados obtidos nos dois tratamentos demonstrou que houve diferença significativa como

mostra o teste de Tukey da Tabela 14. A diminuição do pH está relacionada a pós-acidificação das bebidas durante o armazenamento refrigerado.

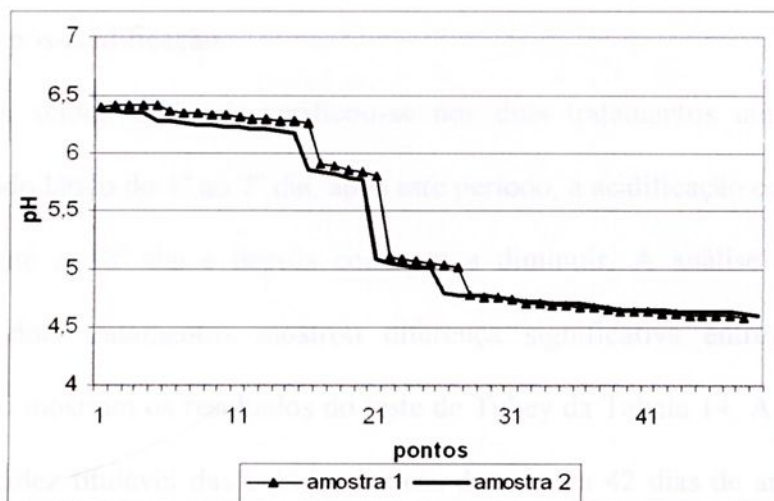


Figura 35 Curvas de acidificação das bebidas lácteas otimizadas do tratamento 3.

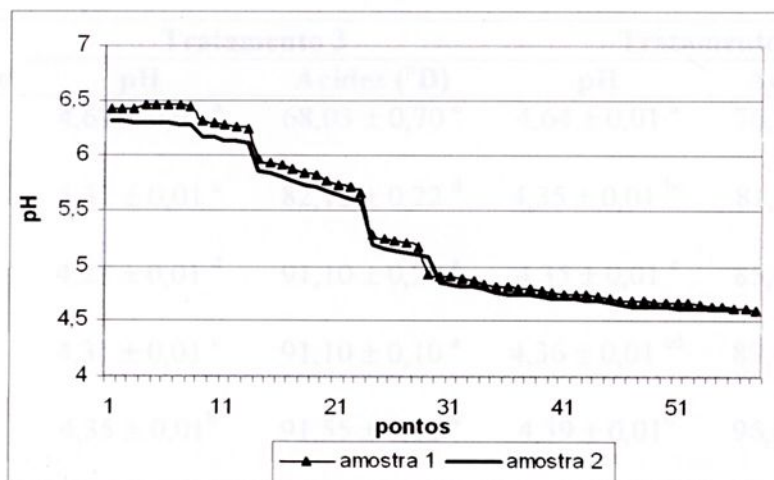


Figura 36 Curvas de acidificação das bebidas lácteas otimizadas do tratamento 7.

Oliveira e Damin (2002) estudaram a viabilidade das bactérias de iogurte e de probióticos em leite fermentados e obtiveram uma diminuição de 4,55 a 4,12 e 4,43 a 4,03 após 7 dias a 4°C.

Segundo Beal et al. (1999) a queda do pH nos sete primeiros dias de armazenamento está relacionada com o consumo de lactose e produção de ácido láctico e galactose, mostrando a existência de atividade metabólica da bactéria láctica durante a estocagem refrigerada, conhecida como pós-acidificação.

Quanto à acidez titulável, verificou-se nos dois tratamentos uma produção mais acentuada de ácido láctico do 1º ao 7º dia, após este período, a acidificação continuou de forma menos intensa até o 28º dia e depois começou a diminuir. A análise de variância dos resultados dos dois tratamentos mostrou diferença significativa entre os períodos de estocagem, como mostram os resultados do teste de Tukey da Tabela 14. A Figura 38 mostra a variação da acidez titulável das bebidas lácteas durante os 42 dias de armazenamento do produto.

Tabela 14 Valores de pH e acidez das bebidas lácteas otimizadas, durante o armazenamento.

Dias de armazenamento	Tratamento 3		Tratamento 7	
	pH	Acidez (°D)	pH	Acidez (°D)
1	4,62 ± 0,01 ^a	68,03 ± 0,70 ^e	4,64 ± 0,01 ^a	76,56 ± 0,97 ^g
7	4,32 ± 0,01 ^c	82,12 ± 0,22 ^d	4,35 ± 0,01 ^{bc}	81,98 ± 1,18 ^f
14	4,28 ± 0,01 ^d	91,10 ± 0,20 ^a	4,35 ± 0,01 ^e	85,67 ± 0,51 ^e
21	4,31 ± 0,01 ^c	91,10 ± 0,10 ^a	4,36 ± 0,01 ^{cd}	89,06 ± 0,10 ^d
28	4,35 ± 0,01 ^b	91,55 ± 0,12 ^a	4,39 ± 0,01 ^b	96,85 ± 0,11 ^a
35	4,29 ± 0,01 ^d	89,22 ± 0,11 ^b	4,32 ± 0,01 ^d	94,32 ± 0,30 ^b
42	4,30 ± 0,01 ^{cd}	83,21 ± 0,23 ^c	4,38 ± 0,01 ^d	91,36 ± 0,30 ^c

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,01$).



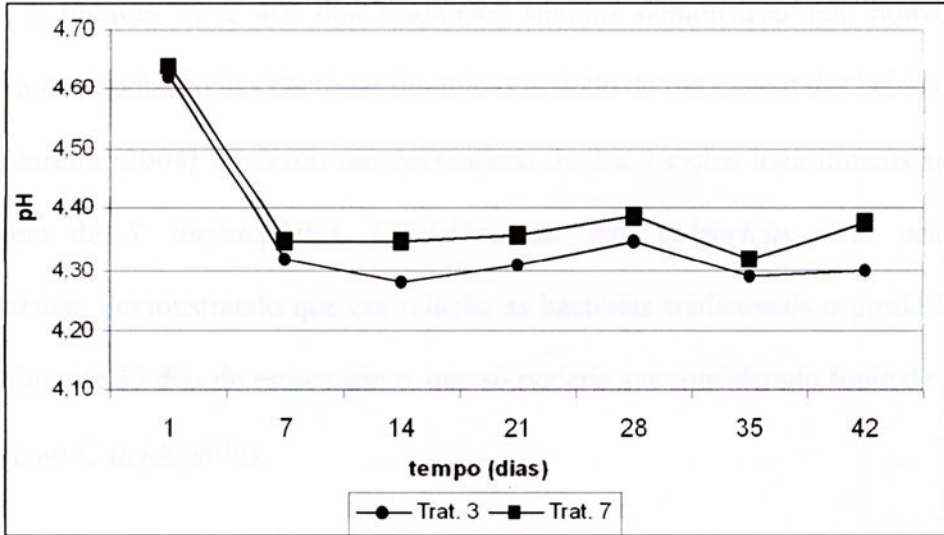


Figura 37 Curva de pH durante os 42 dias de armazenamento das bebidas lácteas otimizadas.

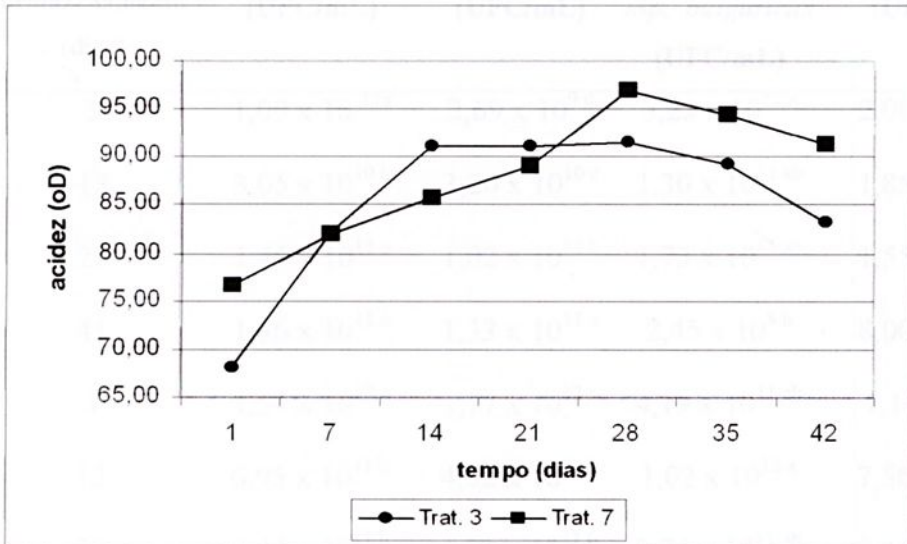


Figura 38 Curva de acidez titulável (°D) durante os 42 dias de armazenamento das bebidas lácteas otimizadas.

As análises de proteínas, cinzas e sólidos totais foram realizadas apenas no 2º dia, uma vez que estes parâmetros não sofrem variação com o período de estocagem.

A contagem das bactérias lácteas que compõe a cultura foi realizada após 3, 13, 29 e 41 dias de armazenamento das bebidas lácteas. A análise de variância (ver teste de Tukey da

Tabela 15 e Figuras 39 e 40) dos resultados obtidos demonstrou que houve diferença significativa na população das bactérias durante o período de estocagem das bebidas lácteas.

Madureira (2004) observou um decréscimo de 2 a 3 ciclos logarítmicos após 15 dias na contagem de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, demonstrando que em relação as bactérias tradicionais o produto atendeu a legislação durante 35 dias de estocagem e, que só poderia ser considerado fonte de probióticos com relação ao *L. acidophilus*.

Tabela 15 Caracterização microbiologia das bebidas lácteas otimizadas

	Tempo de armazenamento (dias)	<i>Bifidobacterium</i> (UFC/mL)	<i>L. acidophilus</i> (UFC/mL)	<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (UFC/mL)	<i>S. thermophilus</i> (UFC/mL)
Tratamento 3	3	$1,09 \times 10^{11a}$	$2,69 \times 10^{9d}$	$3,23 \times 10^{11a}$	$2,00 \times 10^{11b}$
	13	$3,05 \times 10^{10b}$	$3,20 \times 10^{10c}$	$1,30 \times 10^{11ab}$	$1,85 \times 10^{10b}$
	29	$1,45 \times 10^{11a}$	$1,02 \times 10^{11b}$	$1,73 \times 10^{11ab}$	$1,55 \times 10^{10b}$
	41	$1,36 \times 10^{11a}$	$1,33 \times 10^{11a}$	$2,45 \times 10^{8b}$	$8,00 \times 10^{11a}$
Tratamento 7	3	$1,54 \times 10^{12a}$	$1,77 \times 10^{12a}$	$4,19 \times 10^{11ab}$	$1,14 \times 10^{9c}$
	13	$6,95 \times 10^{11b}$	$4,02 \times 10^{11b}$	$1,02 \times 10^{12a}$	$7,56 \times 10^{13b}$
	29	$1,44 \times 10^{11b}$	$1,03 \times 10^{11b}$	$3,76 \times 10^{11ab}$	$9,44 \times 10^{13a}$
	41	$3,38 \times 10^{11b}$	$1,66 \times 10^{11b}$	$1,00 \times 10^{9b}$	$6,16 \times 10^{13b}$

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p < 0,01$).

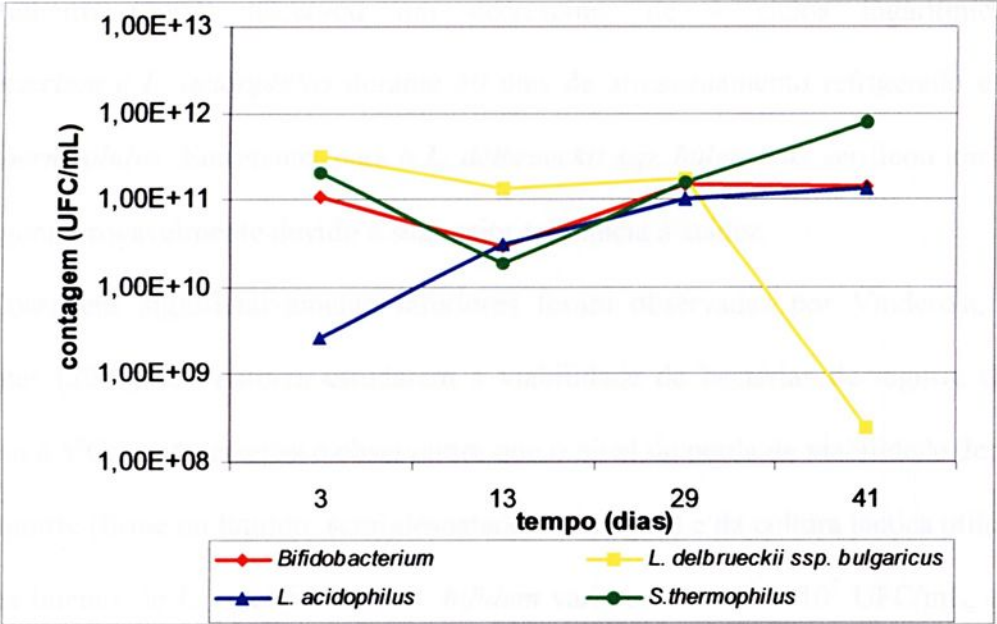


Figura 39 Contagem de microrganismos probióticos e tradicionais da bebida láctea otimizada do tratamento 3.

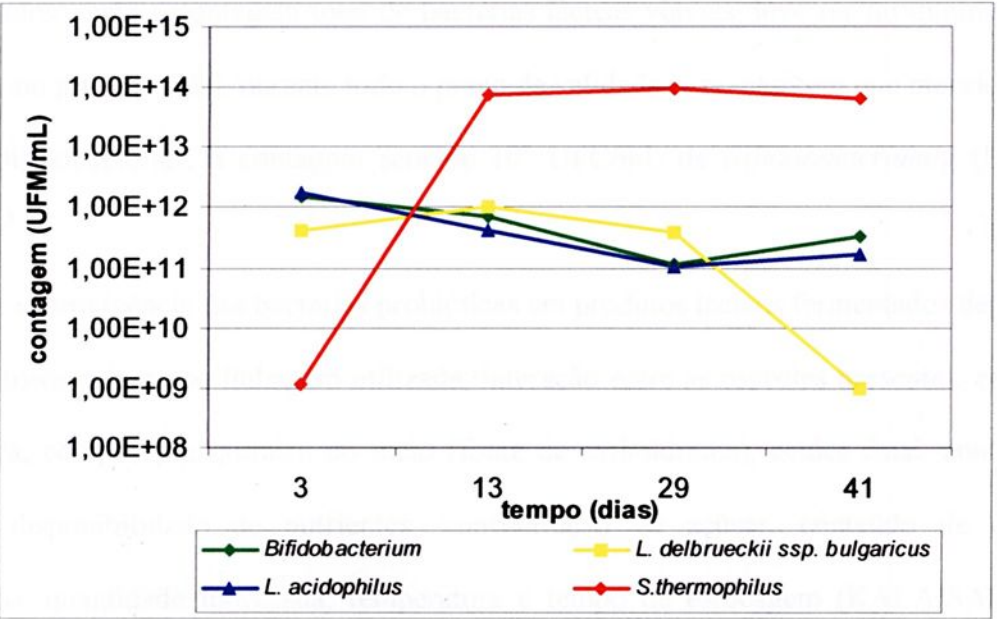


Figura 40 Contagem de microrganismos probióticos e tradicionais da bebida láctea otimizada do tratamento 7.

Pinheiro (2003) observou um decréscimo de 4 ciclos logarítmicos para *Bifidobacterium* e *L. acidophilus* durante 30 dias de armazenamento refrigerado e 2 ciclos para *S. thermophilus*. Entretanto, para o *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* verificou um aumento da contagem, provavelmente devido à sua maior tolerância à acidez.

Contagens significativamente inferiores foram observadas por Vinderola, Bailo e Reinheimer (2000). Os autores estudaram a viabilidade de bactérias de iogurte durante a estocagem a 5°C por 4 semanas e observaram que o nível de perda de viabilidade depende do tipo de iogurte (firme ou líquido, semi-desnatado ou integral) e da cultura láctica utilizada. As contagens iniciais de *L. acidophilus* e *B. bifidum* variaram de 10^6 a 10^7 UFC/mL, enquanto que no final da estocagem eram menores que 10^4 UFC/mL.

Os valores encontrados para a contagem de probióticos estão de acordo com padrão estabelecido pelo Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, onde a contagem total de bactérias lácteas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/mL no produto final, durante todo o prazo de validade e, no caso em que mencione(m) o uso de bifidobactérias, a contagem será de 10^6 UFC/mL de *Bifidobacterium*/g (BRASIL, 1997).

A sobrevivência das bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados depende de vários fatores, tais como linhagem utilizada, interação entre as espécies presentes, condições da cultura, composição química do meio (fonte de carboidratos), acidez final, conteúdo de sólidos, disponibilidade de nutrientes, concentração de açúcar, conteúdo de oxigênio dissolvido, quantidade inoculada, temperatura e tempo de estocagem (KALAIAPATHY; RYBKA, 1997; HATTING; ILJOEN, 2001; SHAH, 2001).

A reologia foi realizada após 2, 15, 30 e 43 dias de armazenamento das bebidas lácteas. A Tabela 16 e as Figuras 41 e 42 mostram os parâmetros reológicos e os reogramas



das bebidas lácteas otimizadas dos tratamentos 3 e 7, obtidos da relação entre a taxa de deformação e tensão de cisalhamento, pelo modelo da Lei da Potência.

As bebidas lácteas apresentaram comportamento não Newtoniano, com presença de tixotropia, durante todo o período de estocagem. Os índices de consistência (K) foram maiores nas curvas ascendentes em comparação com as descendentes. A diferença entre as curvas, com a formação de uma curva de histerese é a medida da extensão de quebra estrutural causada pelo cisalhamento. O índice de comportamento do escoamento (n) foi maior nas curvas descendentes, demonstrando que o produto apresenta comportamento mais próximo aos dos fluidos newtonianos ($n = 1$).

Tabela 16 Parâmetros reológicos das bebidas lácteas otimizadas obtidos pelo modelo da Lei da Potência ($\tau = K \dot{\gamma}^n$).

Tratamentos	Tempo de armazenamento (dias)	Curvas Ascendentes			Curvas Descendentes		
		K (Pa.s ⁿ)	n	R ²	K (Pa.s ⁿ)	n	R ²
3	2	0,5625 ^a	0,5505 ^a	0,9953	0.2563 ^a	0,7031 ^a	0,9823
	15	0,5090 ^a	0,5424 ^a	0,9961	0,3535 ^b	0,6241 ^b	0,9838
	30	0,4590 ^a	0,5793 ^a	0,9942	0,3692 ^b	0,6198 ^b	0,9793
	43	0,5337 ^a	0,5297 ^a	0,9964	0,3508 ^b	0,6067 ^b	0,9863
7	2	0,4280 ^c	0,6342 ^a	0,9932	0,2103 ^c	0,7709 ^a	0,9812
	15	0,5572 ^{ab}	0,5686 ^{ab}	0,9942	0,2962 ^{bc}	0,6834 ^b	0,9808
	30	0,6034 ^a	0,5191 ^b	0,9949	0,4205 ^a	0,5911 ^c	0,9871
	43	0,4958 ^{bc}	0,5297 ^b	0,9964	0,3509 ^{ab}	0,6067 ^c	0,9863

Letras iguais para a mesma coluna indicam que não há diferença significativa (p<0,01).

K – índice de consistência, n – índice de comportamento de escoamento e R² – coeficiente de determinação.

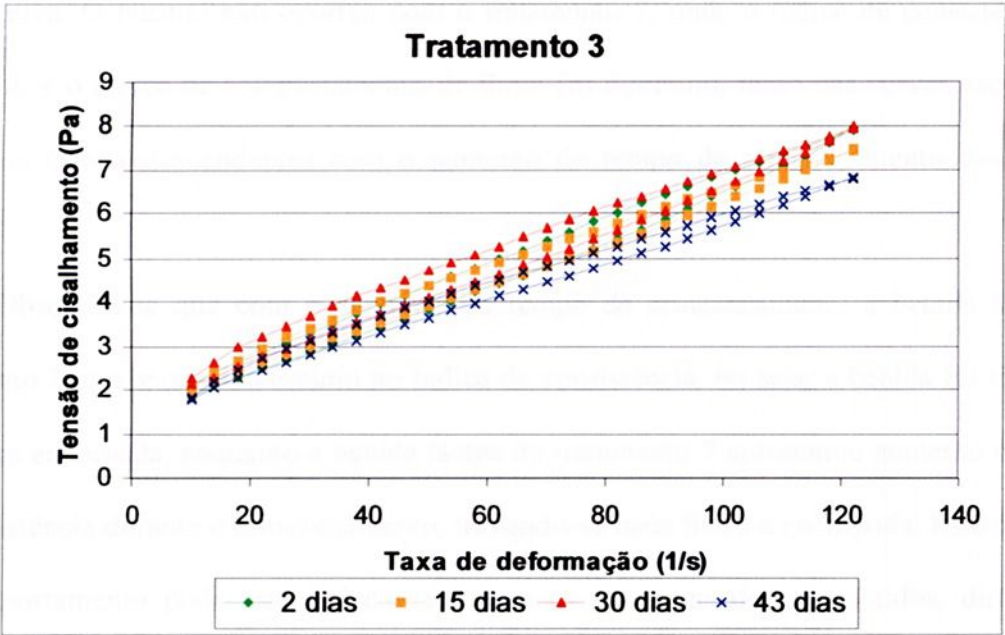


Figura 41 Reogramas da formulação otimizada do tratamento 3.

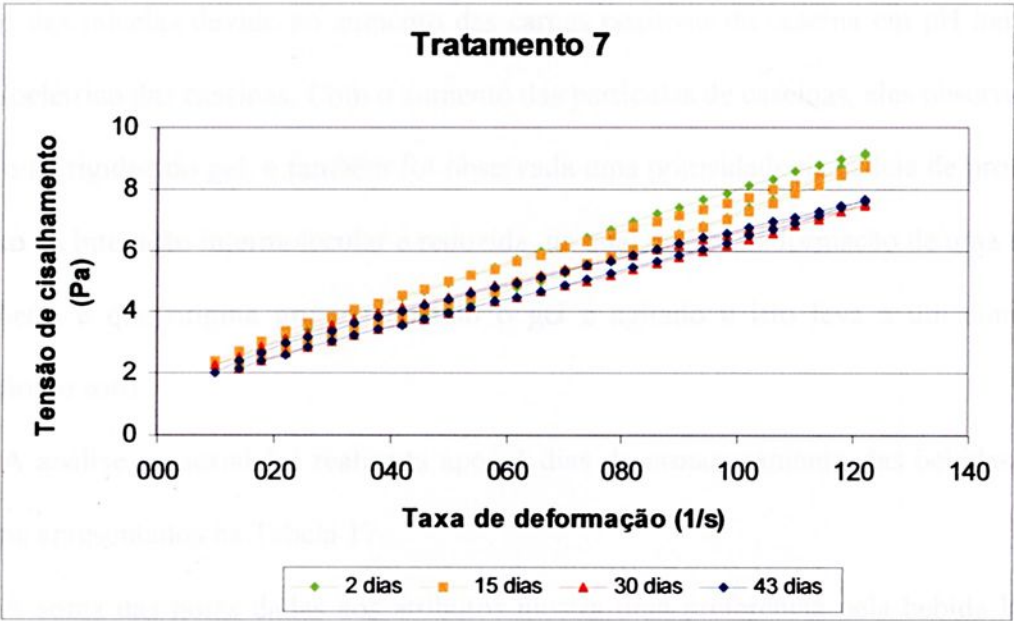


Figura 42 Reogramas da formulação otimizada do tratamento 7.

Durante o período de estocagem, no tratamento 3 houve diminuição do índice de consistência (K) e aumento do índice de comportamento de fluxo (n) para as curvas ascendentes e efeito inverso nas curvas descendentes, porém esta redução não foi

significativa. O mesmo não ocorreu com o tratamento 7, onde o índice de consistência (K) aumentou e o índice de comportamento de fluxo (n) diminuiu, tanto nas curvas ascendentes como nas curvas descendentes com o aumento do tempo de armazenamento das bebidas lácteas.

Observou-se que com o aumento do tempo de armazenamento a bebida láctea do tratamento 3 houve um decréscimo no índice de consistência, ou seja, a bebida foi tornando-se menos encorpada, enquanto a bebida láctea do tratamento 7 apresentou aumento do índice de consistência durante o armazenamento, tornando-se mais firme e encorpada. Esta diferença de comportamento pode estar relacionada com as estruturas dos géis obtidos, diretamente relacionado com a formulação das bebidas.

Harwalkar e Kalah (1986) pesquisaram o aumento de até 20% na firmeza do gel quando o pH diminuiu de 4,50 para 3,85. Eles explicaram que isto acontece por causa da repulsão das micelas devido ao aumento das cargas positivas da caseína em pH baixo, e do ponto isoeletrico das caseínas. Com o aumento das partículas de caseínas, eles observaram um aumento na rigidez do gel, e também foi observada uma porosidade na cadeia de proteína em pH baixo. A interação intermolecular é reduzida, na qual resulta na formação de uma estrutura mais aberta e que origina grumos quando o gel é agitado e isto leva a um aumento na separação do soro.

A análise sensorial foi realizada após 3 dias de armazenamento das bebidas lácteas, conforme apresentados na Tabela 17.

A soma das notas dadas aos atributos mostra uma preferência pela bebida láctea do tratamento 3, que possui em sua constituição 3% de soro de leite, 6% de leite em pó e 1,5% de isolado protéico de soja.



Tabela 17 Valores médios da análise sensorial das bebidas lácteas otimizadas

Tratamento	Aceitabilidade geral	Aparência/Cor	Consistência	Sabor	Aroma
3	6,28	7,32	5,94	5,68	6,90
7	5,80	7,32	5,50	5,38	6,70

O acompanhamento da sinérese foi realizado através da transferência de 100 mL das bebidas lácteas para provetas de 100 mL, onde foram mantidas em repouso e sob refrigeração durante 31 dias e os valores foram obtidos através da leitura da separação do soro, como mostra a Figura 43.



Figura 43 Sinérese das bebidas lácteas otimizadas durante o armazenamento.

A Tabela 18 e a Figura 44 mostram os resultados do acompanhamento da sinérese durante 31 dias de armazenamento das bebidas lácteas. Pode-se observar que a separação do soro aconteceu gradativamente até o 28º dia de armazenamento das bebidas lácteas, tornando-

se igual a partir do mesmo, isto pode ter acontecido devido à diminuição do valor de pH. Em produtos com pH menor que 4,0, ocorre separação do soro devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo (BRANDÃO, 1997).

Tabelas 18 Acompanhamento da sinérese das bebidas lácteas otimizadas.

Dias de Armazenamento	Tratamento 3 (%)	Tratamento 7 (%)
-	Preparação da bebida	Preparação da bebida
1	2,0	2,0
2	2,0	2,0
3	5,0	5,0
5	8,0	10,0
6	10,0	11,0
7	11,0	13,0
8	13,0	15,0
13	20,0	22,0
14	21,0	23,0
15	22,0	24,0
16	23,0	25,0
17	24,0	25,0
27	27,0	28,0
28	28,0	29,0
29	28,0	29,0
30	28,0	29,0
31	28,0	29,0

O aumento do conteúdo de sólidos totais do leite, particularmente de proteína, melhora o sabor, a consistência, a viscosidade e previne a separação do soro. A utilização de estabilizantes no preparo de bebidas lácteas também é importante para esta função. A etapa de homogeneização reduz também a susceptibilidade de sinérese e a formação de grânulos. Entretanto, é necessária a definição de uma pressão ótima para cada tipo de iogurte, para evitar um aumento na separação do soro. A redução da sinérese e o aumento da firmeza do gel são consequências das ligações covalentes entre a κ -caseína e a β -lactoglobulina, que resultam em uma menor exposição dos grupos hidrofóbicos (VARNAN; SUTHERLAND, 1994).

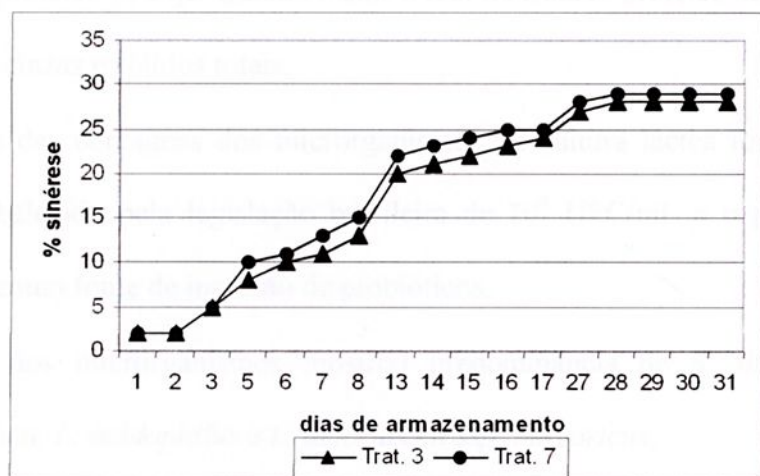


Figura 44 Acompanhamento da sinérese das bebidas lácteas otimizadas durante o armazenamento.

6 CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

- as matérias primas utilizadas na preparação das bebidas lácteas atenderam aos requisitos estabelecidos na legislação brasileira em vigor;
- as variações nos teores de soro de leite, leite em pó desnatado e isolado protéico de soja resultaram em pequenas variações nas características físico-químicas das bebidas lácteas;
- o teor de proteínas é dependente das variáveis leite em pó e isolado protéico de soja, enquanto o teor de cinzas e sólidos totais é dependente das variáveis soro de leite, leite em pó e isolado protéico de soja. Quanto maior o teor de isolado protéico de soja, maior o teor de proteínas, cinzas e sólidos totais;
- os resultados das contagens dos microrganismos da cultura láctea foram superiores ao mínimo estabelecido pela legislação brasileira de 10^6 UFC/mL e o produto pode ser considerado como fonte de ingestão de probióticos;
- a contagem dos microrganismos mostrou predominância de *S. thermophilus* sobre *Bifidobacterium*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*;
- a contagem de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* é dependente das variáveis leite em pó e isolado protéico de soja. Quanto maior o teor destes ingredientes na bebida, maior a população de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*;
- a bebida láctea preferida pelos provadores foi a elaborada com 4% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja (tratamento 4) do bloco 1 e a preparada com 3% de soro de leite, 6% de leite em pó desnatado e 1,5% de isolado protéico de soja (tratamento 3) do bloco 2;



- as variáveis leite em pó e isolado protéico de soja e a interação entre soro de leite e leite em pó tem um efeito positivo no atributo consistência sensorial. Quanto maior o teor destes ingredientes na formulação da bebida, maior a consistência das bebidas lácteas;
- as bebidas apresentaram características de fluidos não newtonianos, com presença de tixotropia;
- o índice de consistência (K) ascendente e descendente é dependente das variáveis soro de leite e leite em pó, assim, quanto maior o teor de soro de leite e de leite em pó, maior foi a consistência;
- o índice de comportamento do escoamento (n) ascendente é dependente das variáveis soro de leite e leite em pó, quanto maior o teor de leite em pó, maior foi a consistência;
- o índice de comportamento do escoamento (n) descendente é dependente das variáveis soro de leite, leite em pó e da interação entre o leite em pó e o isolado protéico de soja, quanto maior o teor de isolado protéico de soja, maior o n;
- as bebidas lácteas das formulações otimizadas 3 e 7 apresentaram características físico-químicas semelhantes às obtidas nos blocos 1 e 2. Durante estocagem refrigerada por 42 dias houve uma diminuição do pH e aumento da acidez, relacionada com a pós acidificação das bebidas lácteas;
- as contagens dos microrganismos das bebidas lácteas otimizadas 3 e 7 foram superiores ao mínimo estabelecido pela legislação brasileira de 10^6 UFC/mL durante a estocagem refrigerada e o produto pode ser considerado como fonte de probióticos;
- com o aumento do tempo de armazenamento a bebida láctea do tratamento 3 houve um decréscimo no índice de consistência, ou seja, a bebida foi tornando-se menos encorpada, enquanto a bebida láctea do tratamento 7 apresentou comportamento oposto, tornando-se mais firme e consistente;



- houve preferência pela bebida láctea do tratamento 3, que possui em sua constituição 3% de soro de leite, 6% de leite em pó e 1,5% de isolado protéico de soja;
- durante a estocagem refrigerada por 30 dias observou-se uma separação do soro, devido a ausência de estabilizantes e espessantes nas formulações das bebidas lácteas.



7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- estudar a aplicação de vários tipos de gomas para que minimizar a separação de fase e sinérese;
- utilizar um homogeneizador no processamento das bebidas lácteas para diminuir o tamanho das partículas, fornecendo as bebidas um aspecto mais uniforme;
- estudar outros tipos de aromas, que possam mascarar melhor o gosto característico da soja;
- estudar através de análises cromatográficas os compostos formados durante a fermentação das bebidas lácteas;
- efetuar um estudo de viabilidade econômica para a produção industrial.



8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**: curso de pós-graduação lato sensu em controle de qualidade em carne, leite, ovos e pescado. Lavras: FAEPE, 2000. 205p.

ALIMENTOS: alimentos funcionais: o maravilhoso mundo dos nutracêuticos. **Revista Aditivos e Ingredientes**, n. 17; p. 38-56, 2001.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctea. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 7-13, 2000.

ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 2, p. 187-192, 2001.

ALMEIDA, L. B.; MIGLIORANZA, L. H. S.; MATSUO, T. et al. Bebida láctea fortificada com ferro e vitaminas A e D. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p. 125-128, 1999.

ANGELES, A. G.; MARTH, E. G. Growth and activity of lactic acid bacteria in soy milk: in Growth and acid production. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 34, n. 1, p. 30-36, 1971.

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

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Washington:AOAC, 1995. v.1-2.

ARAUJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade em β -glicosidase na formação do sabor amargo e adstringente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 137-141, 1997.

ARCHIBALD, A. O que é proteína de soro? **Food Ingredients**, n. 22, p. 118-122, 2003.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE LEITE. Produção brasileira de queijos por tipo: 1993/1997. Produção brasileira de queijos comuns e especiais em estabelecimentos sob inspeção federal. Disponível em: <www.leitebrasil.org.br> Acesso em: 9 jan. 2004.

BANZATO, D. A.; KRONKA, S. D. **Experimentação Agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNESP, 1995. 247p.



BARBOSA, I. N.; PINTO, M. S.; CUNHA, L. R. et al. O aproveitamento do soro na elaboração de bebidas fermentadas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 58, n. 392, p. 194-197, 2003.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Ed.Unicamp, 1995. 299 p.

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

BERTERRECHE, J. Prebióticos e probióticos em produtos lácteos. In: **Simpósio de tecnologia de produtos lácteos**, 2, 2002. Germain, 2002.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. São Paulo: Varela, 1992. 143p.

BOTELHO, L.; SILVA, N.; NASCIMENTO, M. S. et al. Efeito da concentração de sais biliares na sobrevivência de cepas de *Lactobacillus* isoladas de produtos probióticos brasileiros. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 22., 2003, Florianópolis. 1 CD ROM

BRANDÃO, S. C. C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Indústria de Laticínios**, n. 37, p. 64-66, 2002.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurtes. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1987.

BRANDÃO, S. C. C. **Tecnologia da produção industrial de iogurte**: Semana do Laticinista, Instituto Cândido Tostes, Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1997. 52p. [Apostila].

BRANQUINHO, M. R.; FERREIRA, R. T.; CRUZ, F. et al. Detecção de soja geneticamente modificada em alimentos. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 22., 2003, Florianópolis. 1CD ROM.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Resolução RDC nº 2, 7 janeiro 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento da agricultura e do abastecimento: regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 dezembro 1999. Seção 1, p. 46-49.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento Regulamento mercosul de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 8 novembro 2000. Seção 1, p. 22-23.



BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leite pasteurizado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 setembro 2002. Seção 1, p. 13-22.

BUNGE ALIMENTOS. Proteína isolada de soja. Disponível em: <www.bungealimentos.com.br> Acesso em: 1 agosto 2003.

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal Dairy Technology**, v. 50, n. 1, p. 21-28, 1997.

CAL-VIDAL, J. Ultrafiltração de soro lácteo e aproveitamento de seus componentes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 34, n.123, p. 23-35, 1979.

CAMPOS, S. D. S. **Reologia e Textura de Alimentos**. Campinas: ITAL, 1989. 84 p.

CARVALHO, F. V. Determinação de algumas características reológicas do leite adicionado de goma xantana e/ou glucomannan. 1990. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1990.

CASE, R. A., BRADLEY JR., R. L., WILLIAMS, R. R. Chemical and physical methods. In: AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. 15. ed. Washington, 1985. p.327-404.

CHARTERIS, W. P; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; et al. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHAVES, A. C. S. D. **Engenharia metabólica de *Streptococcus thermophilus* para produção de acetaldeído (via treonina aldolase) em leites fermentados**. 2000. 123 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 2000.

CHRISTIAN HANSEN. **Method for counting probiotic bactéria. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacteria*** in milk products made with nutritive cultures. 1999. 5 p. [Procedimento Analítico].

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

COGAN, T. M.; ACCOLAS, J. P. **Dairy starter cultures**. Chichester: J.Wiley, 1995, 230 p.

DALLAS, P. O uso de derivados de soro de leite em aplicações em produtos de consumo. **Indústria de Laticínios**, v. 4, n. 21, p. 60-61, 1999.

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

DE LA FUENTE, M. A.; HEMAR, Y.; TAMEHANA, M. et al. Process-induced changes in whey proteins during manufacture of whey protein concentrates. **Trends Food Science Technology**, v. 12, p. 361-369, 2002

DRAKE, M. A.; CHEN, X. Q.; TAMARAPU, S. et al. Soy protein fortification affects sensory, chemical, and microbiological properties of dairy yogurts. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1244-1247, 2000.

DU PLESSIS, E. M.; DICKS, L. M. T.; VESCOVO, M. et al. *Lactobacillus acidophilus* and related species: a review. **Microbiology Enzimology**, v. 46, p. 319-340, 1998.

DUARTE, M.; MIDIO, A. F. Soro lácteo: características nutricionais e riscos na sua utilização. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 47, p. 23-25, 1997.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista Nutrição**, v. 14, n. 1, p. 43-52, 2001.

FERREIRA, A. C. Breve histórico e perspectivas para a indústria de laticínios no Brasil. In: **Simpósio de tecnologia de produtos lácteos**, 2, 2002, Germinal, 2002.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2001b. 112 p.

FERREIRA, C. L. L. F. Produtos lácteos probióticos: uma realidade. **Leite & Derivados**, n. 42, p. 66-70, 1998.

FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. In: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. et al. **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**, Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2001a. 204p.

FIORAVANTE, P. Combinação de ingredientes em iogurtes. **Revista Flavors Magazine**, n. 1, p. 48-49, 2001.

FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION Soy foods guide. Disponível em : www.soybean.org - Acesso em: 1 julho 2004.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Application Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. Atividades inibitória de tripsina em produtos derivados de soja (*Glycine max*) consumidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 8, n. 3, p. 18-26, 1998.

GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 86-93, 2001.

GOLDIN, B. R. Health benefits of probiotics. **Britanic Journal Nutrition**, n. 4, v. 80, suppl. 2; p. 203-207, 1998.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia**, n. 64, p. 12-22, 1999.

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

GOMES, J. C. Soy milk: flavor, lypoxigenase and hexanal. **Arquivo de Biologia e Tecnologia**, v. 3, n. 2, p. 665-686, 1990.

GONÇALVES, E. B.; FREIMAN, L. O.; SABAA SRUR, A. U. O. et al. Elaboração de bebidas lácteas a partir do soro de queijo minas frescal. In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos, 14, 1994, [S.l.], 90 p., 1994.

GUEDES NETO, L. G.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; PENNA, C. F. A. M. et al. Defeitos tecnológicos de leites fermentados. **Revista Leite e Derivados**, n. 74, p. 29-35, 2003.

HAQUE, A.; RICHARDSON, R. K.; MORRIS, E. R. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 593-602, 2001

HARWALKAR, V. R.; KALAB, M. Relationship between microstructure and susceptibility to syneresis in yogurt made from reconstituted nonfat dry milk. **Food Microstructure**, n. 5, p. 287-294, 1986.

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

HOLDSWORTH, S. D. Rheological models used for the prediction of the flow properties of food products: a literature review. **Trans. Inst. Chem. Eng.**, v. 71, part C, p. 139-179, 1993.

HOW, J. W.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research International**, n. 33, p. 393-397, 2000.

HUGUNIN, A. O uso de produtos de soro em iogurte e produtos lácteos fermentados. **Leite e Derivados**, n. 49, p. 22-33, 1999.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2. ed. São Paulo: IAL, 1985. v.1.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. **Bulletin of the IDF**, n. 306, p. 23-33, 1999.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms. **IDF/ISO Standard**, 1997. 5 p.

JELÉN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. **Funcional foods biochemical and processing aspects**. Ed.: Tecomic, 1998, p. 357-380.



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

KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 50, p. 45-57, 1999.

KLEIN, K. L.; RICHARDS, N. S. P. S. Elaboração de iogurte sabor morango utilizando leite em pó, soro de leite e whey protein concentrate (WPC-35%) e uma bebida fermentada à base de extrato aquoso de soja (P30): Parte I: Avaliação físico-químicas e sensoriais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 58, n. 333, p. 171-174, 2003.

KOT, E.; BEZKOROVAINY, A. The binding of H_2O_2 : generated Fe (III) to *Bifidobacterium thermophilum* depends on the method of its production. **Journal of Food Science**, v. 65; n. 6; p.1028- 1032, 2000.

LAJOLO, F. M. Alimentos funcionais. **Ser saudável**, n. 1, p. 8-10, 2001.

LAJOLO, F. M. Alimentos Funcionais: ciência, regulamentação e consumo. In: **Seminário Novos Aspectos de Legislação sobre Rotulagem de Alimentos Funcionais, Transgênicos, Meio Ambiente e Comércio Exterior**, 2002, ITAL, p. 4-5, 2002.

LAJOLO, F. M. Legislação dos produtos lácteos funcionais. In: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. et al. **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**, Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2001a. 204p.

LIMA, K. G. C.; KRUGER, F. M.; LANDGRAF, M. et al. Culturas probióticas de aplicação em alimentos: avaliação da resistência ao stress fisiológico empregando-se modelos simulados in vitro. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 22, 2003, Florianópolis. 1CD ROM

LIMA, S. M. C. G. **Desenvolvimento de uma bebida láctea a base de soro de queijo, fortificada com ferro**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, 2003.

LIMA, S. M. C. G.; MADUREIRA, F. C. P.; PENNA, A. L. B. Bebidas lácteas nutritivas e refrescantes. **Milkbizz Tecnologia Temático**, n. 3, p. 4-11, 2002.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* e avaliação da sua sobrevivência em condições simuladas do trato gastrointestinal. In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 22, 2003, Florianópolis. 1CD ROM

LIU, K. Expanding soybean food utilization. **Food Technology**, v. 54, n. 7, p. 46-58, 2000.

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

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



MADUREIRA, F. C. P. **Desenvolvimento de uma bebida láctea funcional**. 2004, 173 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho". São José do Rio Preto, 2004.

MAN, C. M. D.; JONES, A. A. (Ed.) **Shelf life evaluation of food**. Savoy, 1996. 321 p.

MARCHINI, M. Utilização de los sueros de lechería en la alimentación humana. **Industria Lechera**, n. 712, p. 32-37, 1998.

MARCOANTÔNIO, L. P.; RICHARDS, S. P. S. Avaliação da aceitabilidade de uma bebida láctea á base de soro, destinada ao público infantil. In: **Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, 16, Rio de Janeiro, 1998 Anais ICD-ROM.

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

MATSUBARA, S. Alimentos funcionais. **Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 34, p.10-18, 2001.

MERCENIER, A.; LEMOINE, Y. Genetic of *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 3444-3454, 1989.

MITAL, B. K.; MAYLOR, H. H. Growth of lactic acid bacteria in soy milks. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 5, p. 1018-1022, 1974.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. New York.: John Wiley, 2001. 684 p.

MOON, N. J.; REINBOLD, G. W. Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **Journal Milk Food Technology**, v. 39, n. 5, p. 337-341, 1976.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1983. 79 p.

MOSQUIM, M. C. A. V. Propriedades funcionais do soro de queijo. In: **Encontro Divital de Tecnologia de Laticínios: Aproveitamento Tecnológico/Racional de Efluentes de Laticínios**, 3, 1996, Viçosa. Viçosa: Ed. UFV, 1996. Não paginado.

MOSQUIM, M. C. A. V.; FURTADO, M. M.; MONTEIRO, R. R. et al. Desenvolvimento de "soft-drinks". **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 54, n. 309, p.164-175, 1999.

NEVES, B. S. Elaboração de bebidas lácteas a base de soro. **Leite & Derivados**, n. 10, p. 50-54, 1993.

NESTLÉ. Probióticos: Una bifidobacteria que protege a los niños: la Bb12. **Nutrición, Salud y Bienestar**, p. 27-33, 1999.



NUTTI, M. R. Rotulagem de alimentos geneticamente modificados: situação no Brasil e no mundo. In: **Seminário Novos Aspectos de Legislação Sobre Rotulagem de Alimentos Funcionais, Transgênicos, Meio Ambiente e Comércio Exterior**, 2002, ITAL, p.19-37, 2002.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leites fermentados. In.: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 2002, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBCTA, 2002.,p.3015-3018.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; CARVALHO, P. O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 31, p. 200-206, 1997.

PARODI, P. W. A role for milk proteins in cancer prevention. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 37-47, 1998.

PEREIRA, M. A. G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no processo de acidificação e pós-acidificação de iogurte**. 2002, 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2002.

PEREIRA, A. C. Proteínas de soja e o uso na indústria de alimentos. In: **Seminário Novas Alternativas de Mercado Alimentos Funcionais e Biotecnologia**, ITAL, p. 147-163, 2002.

PENNA, A. L. B. Hidrocolóides: usos em alimentos. **Food Ingredients**, n. 17, p. 58-64, 2000.

PENNA, A. L. B. **Parâmetros reológicos de gomas para a fabricação de bebidas lácteas a base de soro**. 1997, 128 f. Monografia - Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1997.

PENNA, A. L. B. Probióticos e Saúde. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 18, p. 4045-4047, 2002.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relations between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, n. 49, p. 7-13, 2001.

PINHEIRO, M. V. S. **Caracterização de iogurtes fabricados com edulcorantes, fermentados por cultura láctica probiótica**. 2003, 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”. São José do Rio Preto, 2003.

PORTER, J. W. G. The present nutritional status of milk proteins. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 31,n. 4, p. 199-202, 1978.

PRENTICE, J. H. Dairy rheology: a concise guide. [S.n.],1992, 165 p.



PRUDÊNCIO, E.; FALCÃO, L.D.; LUIZ, M.T.B. et al. Elaboração de uma bebida a partir de extrato de soja (*Glycine Max*) adicionada de soro de queijo e antioxidantes. In.: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 2002, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBCTA, 2002, p. 3055-3058.

PUPIN, A. C. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. In: **Seminário Novas Alternativas de Mercado Alimentos Funcionais e Biotecnologia**, Campinas: ITAL, p.133-145, 2002.

PUPIN, A. M. Legislação dos produtos lácteos funcionais. In: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F. et al. **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 2001, 204 p.

OLIVEIRA, L. T.; BATISTA, S. M. M. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. **Nutrição em pauta**, v. 10, n. 57, p. 15-21, 2002.

RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. **Yoghurt: Scientific Grounds Technology, Manufacture and Preparations**. Switzerland: Staempfli & Cie AG, Berne, 1978, 427 p.

REIS, K. C.; CLEMENTE, M. G.; VALLE, R. H. P.; PEREIRA, J. Avaliação da qualidade de bebidas lácteas comercializadas no município de Lavras –MG. In.: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18, 2002, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBCTA, 2002, p. 3019-3022.

RENKEMA, J. M. S. Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. **Food Hydrocolloids**, n. 18, p. 39-47, 2004.

REZENDE JÚNIOR, S. T. Soro: vilão ou solução? **Milkbizz Tecnologia Temática**, ano II, n. 7, p. 12-13, 2003.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, n. 17, p. 20-27, 2002.

ROBINSON, R. K. **Dairy microbiology handbook – the microbiology of milk and milk products**, New York, Wiley Interscience, 2002, 765 p.

ROSSI, E. A. **Formulação de um sucedâneo do iogurte a base de soro de leite e extrato aquoso de soja**. 1984. Dissertação [Mestrado em tecnologia de alimentos]. Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Paulista de Araraquara, 1984.

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**, v. 31, n. 2, p. 176-185, 1997.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 563-572, 1998.

SANTOS, J. A. Tendências dos ingredientes que dão um diferencial ao produto iogurte. **Leite & Derivados**, n. 63, p. 48-53, 2002.



SANTOS, J. P. V.; FERREIRA, C. L. L. F. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 3, p. 44-50, 2001.

SAXELIN, M.; GRENOU, B.; SVENSSON, U.; et al. The technology of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 12, p. 387-392, 1999.

SCALABRINI, P.; ROSSI, M.; SPETTOLI, P. et al. Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, n. 39, p. 213-219, 1998.

SEDAS, V. T. P.; KUBIAK, K. N. W.; LÓPEZ, G. R. Los probióticos y su futuro. **Archivos Latino Americanos de Nutrición**, v. 46, n. 1, p. 6-10, 1996.

SEIBEL, N. F.; CANSIAN, R. L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de bebidas lácteas. **Leite & Derivados**, n. 52, p. 44-49, 2000.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 2, p. 7-19, 1999.

SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.

SHANKAR, P. A.; DAVIES, F. L. Associative bacterial growth in yogurt starters, initial observation on stimulatory factors. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 30, n. 1, p. 31-32, 1997.

SILVA, A. T.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F. et al. Proteínas do leite: propriedades funcionais x características químicas. **Food Ingredients**, n. 21, p. 54-59, 2002.

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

SILVA, M. R.; FERREIRA, C. L. L.F.; COSTA, N. M. B. et al. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 7-14, 2001.

SIQUEIRA, I. M.; SOUZA, M. R.; CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Caracterização físico-química de quatro tipos de soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 225-227, 2002.

SIUTA-CRUSE, P.; GOULET, J. Improving probiotic survival in rates. **Food Technology**, v. 55, n. 10, p. 36-42, 2001.

SIVIERI, K. **Caracterização e otimização do uso de miméticos de gordura em bebidas lácteas**. 2002, 153 f. Dissertação[Doutorado em Bioquímica-Farmacêutica] - Faculdade de ciências farmacêuticas, USP, São Paulo, 2002.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida de prateleira de bebidas lácteas preparadas com "fat replacers" (Litesse e Dairy-lo). **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 24-31, 2002.

SMITHERS, G.; COPELAND, A. D. International whey conference. **Trends in Foods Science & Technology**, n. 30, v. 9, p. 119-123, 1998.

SOUZA, G.; OLIVEIRA, A. J. Fermentação láctica do "leite de soja". **Coletânea ITAL**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 1-8, 1988.

STEFFE, J. F. Rheological methods in food process engineering, [s.n.], 1996, 418 p.

STELLA, R. Alimentos funcionais: soluções para as doenças ? **Nutrição em pauta**, v. 12, n. 58, p. 11-12, 2002.

TAMIME, A. Y. Culturas starter lácticas e probióticas. In: LERAYER, A.L.S, SALVA, T.J.G., (coords.) **Leites fermentados e bebidas lácticas**. Campinas: ITAL, 1997. p. 211-225.

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

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciencia y tecnología**. Zaragoza: Acribia, 1991. 368 p.

TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**, v. 48, n. 10, p. 61-65, 1994.

UMBELINO, D. C.; ROSSI, E. A.; CARDELLO, H. M. A. B. et al. Aspectos tecnológicos e sensoriais do "iogurte" de soja enriquecido com cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 344-348, 2001.

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. Características, funções e novas aplicações das proteínas de soro e suas novas frações. **Food Ingredients**, n. 17, p. 50-56, 2002.

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL. **Manual de referência para produtos de soro dos Estados Unidos da América**, Ed. USDEC, 1997. p.25-40.

VARNAN, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos. Tecnología, química e microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1994. 476 p.

VINDEROLA, C. G.; BAILO, N.; REINHEIMER, J. A. Survival of probiotic in Argentina yogurts during refrigerate storage. **Food Research International**, v. 33, p. 97-102, 2000.

VINDEROLA, C. G.; PROCELLO, W.; GHIBERTO, D. et al. Viability of probiotic: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and non probiotic microflora in Argentinean fresco cheese. **Journal Dairy Science**, v. 83; p. 1905-1911, 2000.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A. et al. **Dairy Technology: principles of milk properties and process**. New York: Dekker, 1999. 727 p.



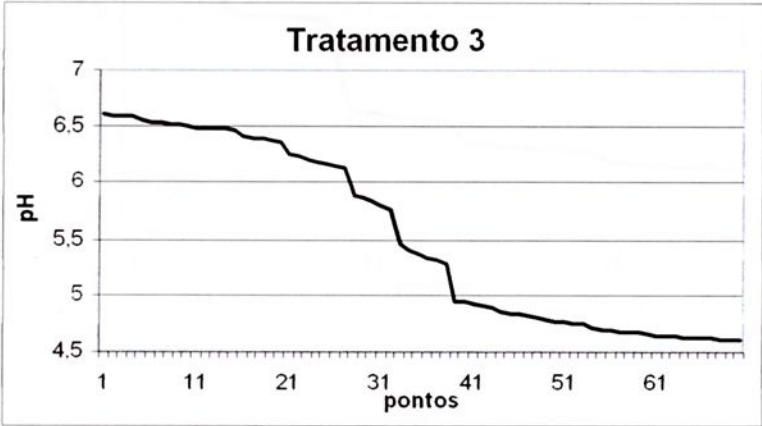
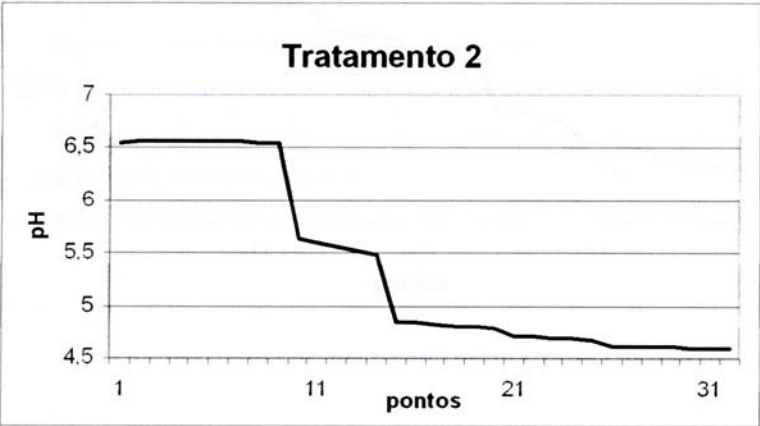
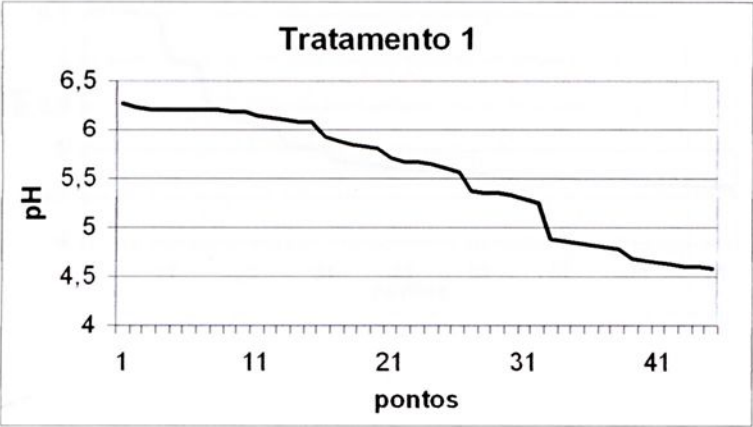
WANG, S. H.; ASCHERI, J. L. R. Iogurte de soja: fermentação láctica e avaliação sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 11, n. 2, p. 221-238, 1991.

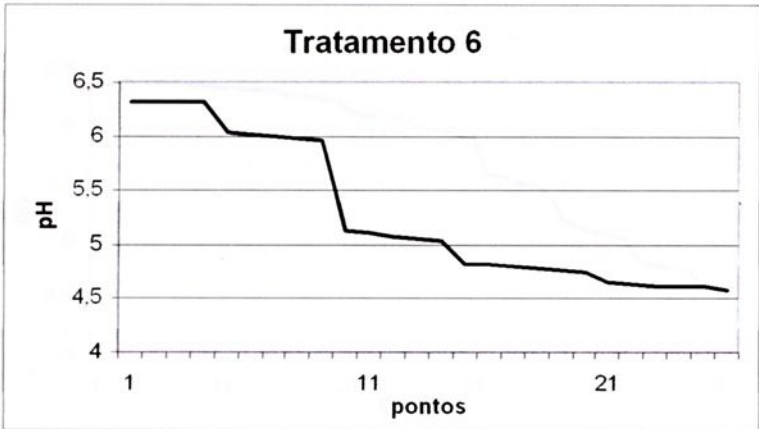
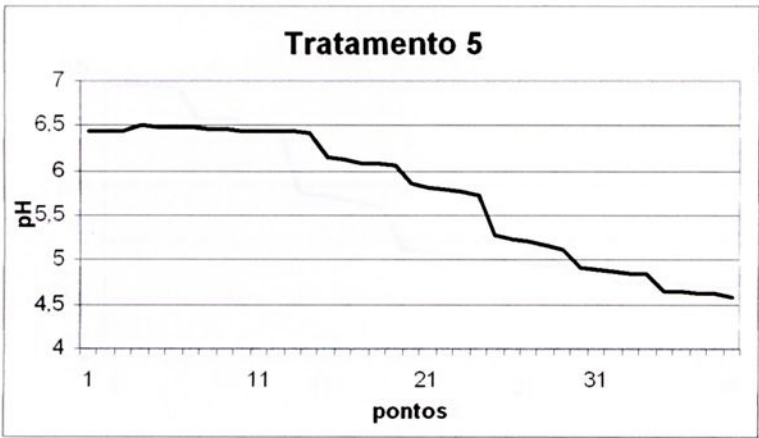
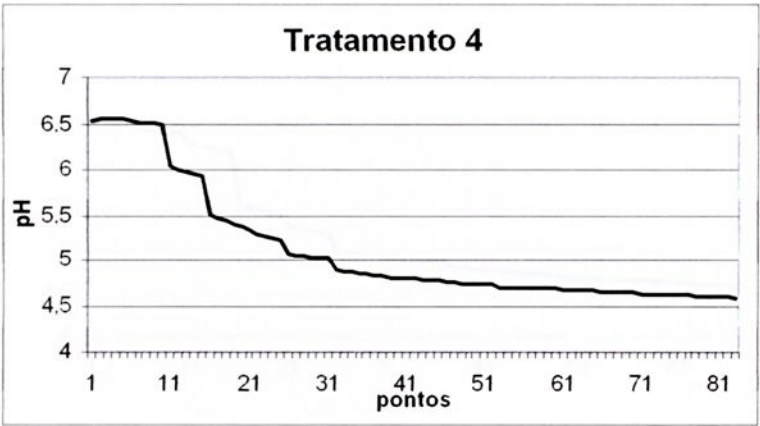
WANG, S. H.; MARINHO, C.; CARVALHO, E. P. Produção de iogurte de soja com diferentes associações de bactérias lácticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 1593-1601, 1994.

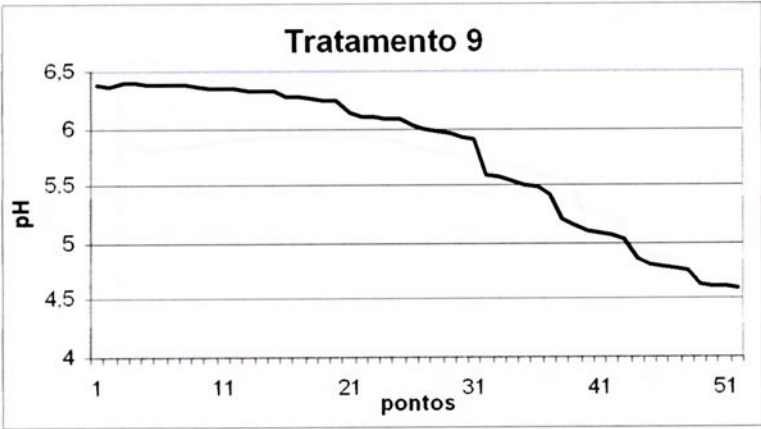
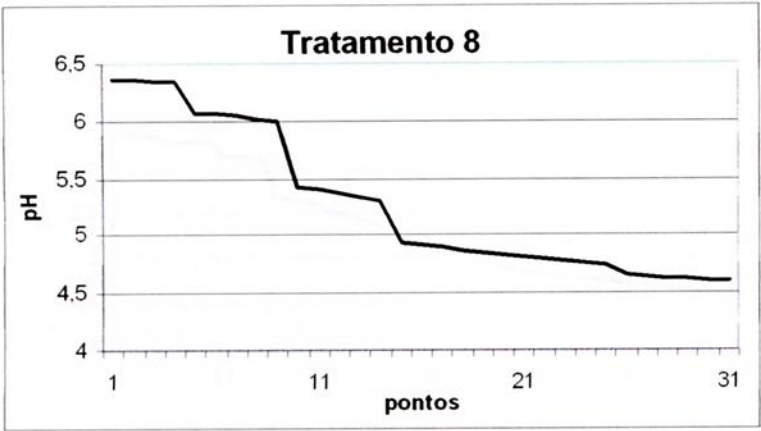
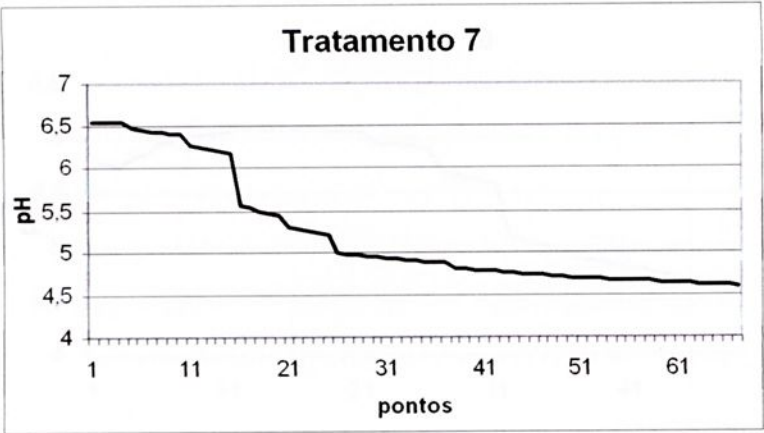
ZUÑIGA, A. D. G.; FERREIRA, R. C.; COIMBRA, J. S. R. et al. Quantificação de proteínas de soro de queijo através de cromatografia líquida de fase reversa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 316, v. 54, p. 17- 21, 2000.

APÊNDICE A

CURVAS DE ACIDIFICAÇÃO DAS BEBIDAS LÁCTEAS DO BLOCO 2

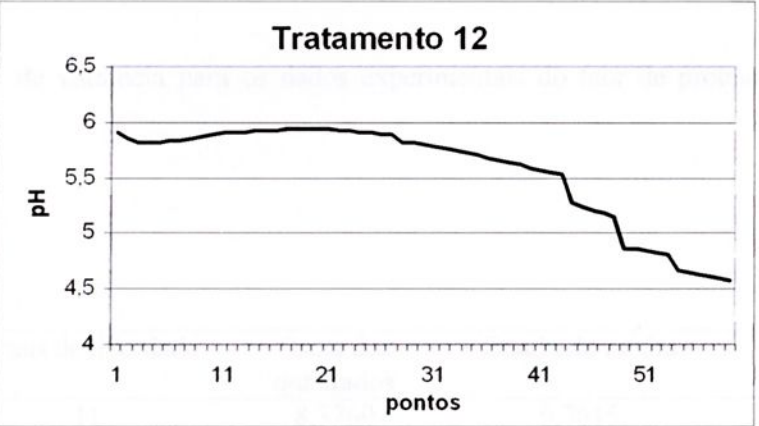
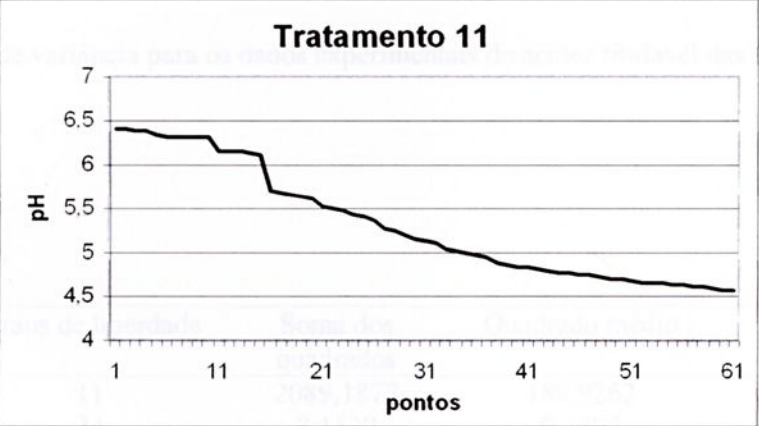
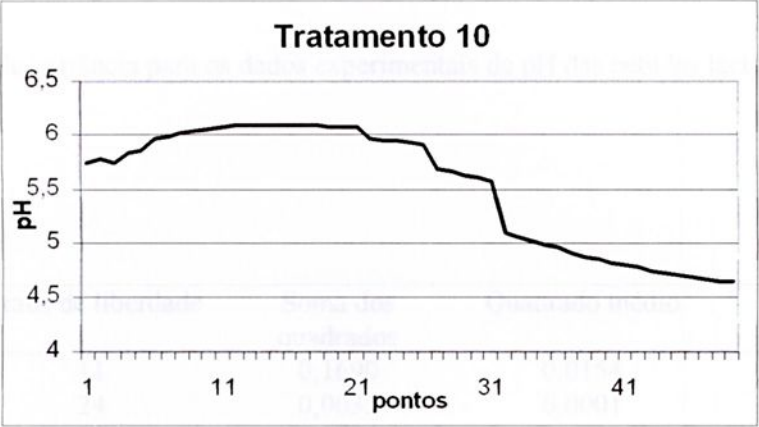






APÊNDICES

ANÁLISE DE VARIÂNCIA



APÊNDICES

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Apêndice B – Análise de variância para os dados experimentais de pH das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0121
Erro padrão da média	0,0070
Média geral	4,5547
Coeficiente de variação	0,27

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	0,1690	0,0154	104,33**
Resíduos	24	0,0035	0,0001	
Total	35	0,1725		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice C – Análise de variância para os dados experimentais de acidez titulável das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	-0,5829
Erro padrão da média	-0,3365
Média geral	-68,5194
Coeficiente de variação	-0,27

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	2089,1877	189,9262	559,07**
Resíduos	24	8,1539	0,3397	
Total	35	2097,3410		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice D – Análise de variância para os dados experimentais do teor de proteínas das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0683
Erro padrão da média	0,0394
Média geral	3,8569
Coeficiente de variação	1,77

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	8,3760	0,7615	163,46**
Resíduos	24	0,1118	0,0047	
Total	35	8,4878		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)



Apêndice E – Análise de variância para os dados experimentais dos teores de sólidos totais das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0343
Erro padrão da média	0,0198
Média geral	16,6061
Coefficiente de variação	0,21

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	28,4438	2,5858	2195,49**
Resíduos	24	0,0283	0,0012	
Total	35	28,4721		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice F – Análise de variância para os dados experimentais dos teores de cinzas das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0073
Erro padrão da média	0,0042
Média geral	0,6522
Coefficiente de variação	1,11

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	0,1102	0,0100	189,74**
Resíduos	24	0,0013	0,0001	
Total	35	0,1114		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice G – Análise de variância para os dados experimentais da contagem de *Bifidobacterium* das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	$5,20 \times 10^{10}$
Erro padrão da média	$3,68 \times 10^{10}$
Média geral	$1,59 \times 10^{11}$
Coefficiente de variação	$3,28 \times 10^{10}$

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	$6,23 \times 10^{14}$	$5,66 \times 10^{13}$	20,93**
Resíduos	12	$3,25 \times 10^{13}$	$2,71 \times 10^{12}$	
Total	23	$6,56 \times 10^{14}$		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)



Apêndice H – Análise de variância para os dados experimentais da contagem de *L. acidophilus* das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	$2,23 \times 10^{11}$
Erro padrão da média	$1,58 \times 10^{11}$
Média geral	$7,29 \times 10^{11}$
Coefficiente de variação	$3,08 \times 10^{11}$

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	$1,11 \times 10^{15}$	$1,01 \times 10^{14}$	20,16**
Resíduos	12	$6,02 \times 10^{13}$	$5,01 \times 10^{12}$	
Total	23	$1,17 \times 10^{15}$		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice I – Análise de variância para os dados experimentais da contagem de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	$2,16 \times 10^{11}$
Erro padrão da média	$1,52 \times 10^{11}$
Média geral	$7,30 \times 10^{11}$
Coefficiente de variação	$2,96 \times 10^{10}$

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	$3,37 \times 10^{16}$	$3,06 \times 10^{15}$	65,72**
Resíduos	24	$5,59 \times 10^{14}$	$4,66 \times 10^{13}$	
Total	35	$3,43 \times 10^{16}$		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice J – Análise de variância para os dados experimentais da contagem de *S. thermophilus* das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	$7,66 \times 10^{12}$
Erro padrão da média	$5,41 \times 10^{12}$
Média geral	$2,15 \times 10^{13}$
Coefficiente de variação	$3,56 \times 10^{11}$

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	$1,40 \times 10^{18}$	$1,27 \times 10^{17}$	21,74**
Resíduos	12	$7,03 \times 10^{16}$	$5,86 \times 10^{15}$	
Total	23	$1,47 \times 10^{18}$		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice L – Análise de variância para os dados experimentais de aceitabilidade geral das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	1,7979
Erro padrão da média	0,2543
Média geral	6,3367
Coefficiente de variação	28,37

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	79,3133	7,2103	2,23**
Resíduos	588	1900,6800	3,2324	
Total	599	1979,9933		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice M – Análise de variância para os dados experimentais de sabor das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	2,0539
Erro padrão da média	0,2905
Média geral	5,4067
Coefficiente de variação	37,99

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	142,3733	12,9430	3,07**
Resíduos	588	2480,4000	4,2184	
Total	599	2622,7733		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice N – Análise de variância para os dados experimentais do índice de consistência (K) ascendente das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,1436
Erro padrão da média	0,0718
Média geral	0,2753
Coefficiente de variação	52,17

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	4,7181	0,4289	20,79**
Resíduos	36	0,7428	0,0206	
Total	47	5,4609		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice O – Análise de variância para os dados experimentais do índice de comportamento de fluxo (n) ascendente das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0490
Erro padrão da média	0,0245
Média geral	0,9019
Coefficiente de variação	5,43

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	1,6413	0,1492	62,12**
Resíduos	36	0,0863	0,0024	
Total	47	1,7278		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice P – Análise de variância para os dados experimentais do índice de consistência (K) descendente das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0045
Erro padrão da média	0,0026
Média geral	0,0516
Coefficiente de variação	8,77

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	0,0531	0,0048	235,76**
Resíduos	36	0,0005	0,0000	
Total	47	0,0536		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

Apêndice Q – Análise de variância para os dados experimentais do índice de comportamento de fluxo (n) descendente das bebidas lácteas (bloco 2).

Desvio padrão	0,0825
Erro padrão da média	0,0413
Média geral	1,1503
Coefficiente de variação	7,17

Causas de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Fator F
Tratamentos	11	1,1260	0,1024	15,04**
Resíduos	36	0,2451	0,0068	
Total	47	1,3711		

** Teste significativo a 1% de probabilidade ($p < 0,01$)



APÊNDICE R

REOGRAMAS DAS BEBIDAS LÁCTEAS DO BLOCO 2

