

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

LUCIANA RODRIGUES FALEIRO

VIABILIDADE DE *Bifidobacterium longum* 5^{1A} E BL05
EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS COM
DIFERENTES CULTURAS INICIADORAS

Belo Horizonte
2015

LUCIANA RODRIGUES FALEIRO

VIABILIDADE DE *Bifidobacterium longum* 5^{1A} E BL05
EM BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS COM
DIFERENTES CULTURAS INICIADORAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Colaboradora: Profa. Dra. Inayara Cristina Lacerda, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Colaborador: Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza, Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
2015

F187v Faleiro, Luciana Rodrigues.
Viabilidade de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e BL05 em
bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas
iniciadoras / Luciana Rodrigues Faleiro. – 2015.
129f. : il.

Orientadora: Evelyn de Souza Oliveira Lopes.

Coorientador: Jacques Robert Nicoli.

Colaboradores: Inayara Cristina Lacerda.

Marcelo Resende de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade
de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos.

1. Alimentos funcionais – Teses. 2. Probióticos – Teses. 3. Bebidas
fermentadas – Teses. 4. Leite fermentado – Teses. 5. *Bifidobacterium* –
Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. II. Nicoli, Jacques Robert. III.
Lacerda, Inayara Cristina. IV. Souza, Marcelo Resende de. V.
Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VI.
Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS - PPGCA

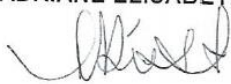
LUCIANA RODRIGUES FALEIRO

VIABILIDADE DE *Bifidobacterium longum* 5^{1ª} E BL05 EM BEBIDAS LÁCTEAS
FERMENTADAS COM DIFERENTES CULTURAS INICIADORAS

TESE APROVADA EM 11 DE AGOSTO DE 2015

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES


Profa. Dra. LÚCIA PERET DE ALMEIDA


Prof. Dr. JACQUES ROBERT NICOLI
Coorientador


Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES
Orientadora e Presidente da Comissão


Profa. Dra. RAQUEL LINHARES BELLO DE ARAUJO


Profa. Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA

Dedico este trabalho a meus pais, João e Celeste, pelo amor e dedicação que sempre me devotaram

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, João e Celeste, e aos meus irmãos, Júlio e Silvana, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu companheiro Lécio, por estar sempre ao meu lado e me ajudar nesta conquista.

A minha orientadora Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes, pelos ensinamentos, eterna amizade e paciência dedicada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção.

Aos professores colaboradores, Profa. Dra. Inayara Lacerda e Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza, que sem medirem esforços e com muita paciência, disponibilizaram seus conhecimentos e tempo, com muita dedicação e carinho.

A Profa. Dra. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, por disponibilizar o Laboratório de Análise Físico-Química I do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da escola de Veterinária da UFMG. Ao técnico Marco Antônio Guerra, pela inestimável ajuda na execução das análises realizadas neste laboratório.

A Profa. Dra. Leiliane Coelho André, pelas contribuições, atenção e generosidade em disponibilizar o Laboratório de Toxicologia Ocupacional para tentativa de realização das análises cromatográficas.

Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos, pela contribuição na minha formação profissional e, em especial, ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira, pela alegria e, também, pelo precioso auxílio no tratamento estatístico dos dados.

Ao professor Dr. Gabriel Vinderola, pelas contribuições, pelos artigos enviados e pela disponibilidade em ajudar.

A Beatriz, minha querida “Pereira, 2012”, pela imensa generosidade, amizade, respeito e apoio incondicional. Sem você, eu não teria conseguido concluir este trabalho.

A Eliane Lara, minha eterna “irmã do coração”, pela amizade, compreensão, apoio e ajuda nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A Carla Lara, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

A Michely Capobiango, pelo auxílio nas análises cromatográficas, pelo incentivo e enorme contribuição na minha vida profissional.

A Rita de Cássia Ribeiro, por sempre acreditar em mim e me apoiar nos meus projetos de vida.

A Elaine Cristina, pela sensatez, capacidade de “seguir em frente” e ponderação. Com você, aprendi a ser uma pessoa mais sensata e equilibrada.

A Tássia Souza e Fernanda Piló, pela ajuda, paciência e disponibilidade em ensinar.

A Andressa Xavier pela colaboração inestimável na realização deste trabalho. Obrigada pela companhia durante 12 horas do dia.

Aos companheiros do LAMIB, Fernanda Penido, Cosme, Murielle, Vanessa, Roberta Riquette e Denise, pela companhia, apoio e vivência de momentos inesquecíveis. Fernanda, obrigada pela preciosa ajuda nas correções de inglês.

A Damiana, Miriany e Matheus pela colaboração na tentativa da realização das análises cromatográficas.

Aos funcionários Úrsula, Raimunda, Batista e senhor Geraldo, pela ajuda concedida na realização deste trabalho, e, em especial, a Ana Diolina, pela troca de experiência de vida, pela companhia, pela paciência em ensinar e pelas ótimas sugestões ao trabalho.

A Dra. Patrícia Costa de Amorim, pelo respeito, pelas palavras sábias e carinho dedicado.

A Veridiana Martins, pela alegria e ajuda ao longo desta caminhada.

À DaniscoDupont, pela disponibilidade em enviar as amostras das culturas utilizadas nesta pesquisa, e, em especial, ao Antônio Salles, pelas informações técnicas que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Laticínio Porto Alegre, pelo envio das amostras de soro de leite e, em especial a Celi, pela disponibilidade em agilizar a entrega do material.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro ao projeto e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Por tanto amor
Por tanta emoção
A vida me fez assim
Manso ou feroz
Eu, caçador de mim

Milton Nascimento

RESUMO GERAL

Os principais estudos sobre as tendências de desenvolvimento de novos produtos alimentícios apontam para aspectos sensoriais, conveniência e praticidade, saúde e bem estar como as principais características de interesse dos consumidores. Dentre os produtos que surgiram para atender a esta última tendência destacam-se os alimentos funcionais, especialmente os probióticos. Bifidobactérias são usadas mundialmente como probióticos em vários produtos alimentícios. Entretanto, fatores como interações com bactérias lácticas, condições de fermentação e pH do produto podem afetar a viabilidade desses micro-organismos. A legislação brasileira exige a quantidade mínima de 10^8 UFC de células probióticas viáveis na recomendação diária do produto pronto para o consumo. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade das linhagens de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e BL05 em bebidas lácteas fermentadas, obtidas por diferentes métodos de fermentação. Foi também determinado o meio de cultura para enumeração seletiva das linhagens de *B. longum* 5^{1A} e BL05 na presença de culturas iniciadoras distintas. Para isto foram testados meios de cultura que permitissem alta taxa de recuperação das células de *B. longum* em relação ao meio de referência, ágar MRS, e ainda, meios que inibissem as bactérias da cultura iniciadora. As bebidas lácteas produzidas foram adicionadas de cultura de bifidobactéria liofilizada ou congelada e fermentadas com diferentes culturas iniciadoras (co-cultura de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb 340) + *Streptococcus thermophilus* (St-TA40); *S. thermophilus* St-TA40; *S. thermophilus* St1). A adição das bifidobactérias se deu em dois momentos do processamento, no início e no final da fermentação. A atividade proteolítica das diferentes linhagens de *S. thermophilus* também foi analisada. A linhagem St1 apresentou menor atividade proteolítica, menor capacidade de acidificação e conseqüentemente maior tempo de fermentação bem como menor taxa de pós acidificação das bebidas lácteas fermentadas, em relação à cultura St-TA40. O meio Bile-MRS mostrou-se adequado para enumeração das linhagens de *B. longum* na presença das culturas iniciadoras utilizadas. O emprego de cultura congelada e ativada em caldo MRS em relação à cultura liofilizada proporcionou maior viabilidade das células de *B. longum* BL05 durante a estocagem refrigerada. O tempo de fermentação foi drasticamente reduzido

quando ambas as linhagens de *B. longum* foram adicionadas no início da fermentação das bebidas fermentadas com St1. Não houve alteração do tempo de fermentação e sobrevivência das bifidobactérias nas bebidas lácteas fermentadas com a co-cultura St-TA40+Lb340, independentemente do momento de adição das diferentes linhagens de *B. longum*. A linhagem de *B. longum* 5^{1A} mostrou-se menos resistente às condições de estresse, apresentando uma redução na contagem das células viáveis de 2 a 3 logarítimos em relação à linhagem de *B. longum* BL05 ao final de 28 dias de armazenamento, nas bebidas adicionadas das bifidobactérias no início e final da fermentação, respectivamente.

Palavras-chave: *Bifidobacterium*, culturas iniciadoras, viabilidade, meio de cultura, processamento, estocagem

ABSTRACT

The main studies of trends in the development of new food products show sensory aspects, convenience and practicality, health and wellness as the main features of interest to consumers. Among the products that appear to meet this latest trend, functional foods stand out, especially probiotics. Bifidobacterias are used as probiotics worldwide in various foods. However, factors such as interactions with lactic acid bacteria, fermentation conditions and product pH affect the viability of these microorganisms. The Brazilian law requires the minimum amount of 10^8 UFC of viable probiotic cells in the daily recommendation of the product at the time of consumption. The objectives of the present study were to determine the culture medium for selective enumeration of strains of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} and BL05 in the presence of different starter cultures and evaluate viability of bifidobacteria during fermentation and refrigerated storage of fermented dairy beverages processed differently. Culture media allowing high recovery rate of *B. longum* cells when compared to the reference medium, agar MRS, and that would inhibit starter culture bacteria were tested. Fermented dairy beverages produced were added lyophilized or frozen *Bifidobacterium* culture and fermented with different compositions of starter cultures (co-culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb 340) + *Streptococcus thermophilus* (St-TA40); *S. thermophilus* St-TA40; *S. thermophilus* St1) and with addition of bifidobacteria in two stages of processing, at the beginning and in the end of fermentation. The proteolytic activity of *S. thermophilus* strains was also analysed. St1 strain showed, lower proteolytic activity, lower acidification ability, which resulted in a longer fermentation and a lower rate of post acidification of fermented dairy beverages compared to the St-TA40 culture. The medium Bile-MRS was suitable for enumeration of *B. longum* strains in the presence of the starter cultures used. The use of the frozen culture activated in MRS broth compared to the use of the lyophilized culture provided higher cell viability of *B. longum* BL05 during refrigerated storage. Fermentation time was greatly reduced when both *B. longum* strains were added at the beginning of fermentation of the fermented beverages with St1. However, the moment of addition of both strains of *B. longum* did not alter the fermentation time and the survival of the bifidobacteria in fermented dairy beverages with the co-culture St-

TA40+Lb340. The *B. longum* 5^{1A} strain was less resistant to stress conditions, showing a reduction in the count of viable cells of 2 to 3 logarithm in comparison with *B. longum* BL05 strain after 28 days of storage, in the group of bifidobacteria added beverages at the beginning and in the end of fermentation, respectively.

Keywords: *Bifidobacterium*, starter culture, viability, culture media, processing, storage

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	8
ABSTRACT.....	10
LISTA DE TABELAS.....	16
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	19
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Alimentos funcionais: probióticos.....	23
2.1.1 Seleção da linhagem do micro-organismo probiótico.....	24
2.1.2 Efeitos benéficos à saúde humana associados ao consumo de alimentos probióticos.....	27
2.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i>	29
2.2.1 Sobrevivência de bifidobactérias durante o processamento e estocagem de produtos alimentícios.....	33
2.2.1.1 Condições de fermentação.....	34
2.2.2.2 pH e acidez titulável.....	34
2.2.1.3 Oxigênio dissolvido e potencial redox.....	35
2.2.1.4 Momento de adição de bifidobactérias.....	36
2.2.1.5 Microencapsulação.....	37
2.2.3 Meios de cultura empregados na enumeração seletiva de <i>Bifidobacterium</i> na presença das bactérias da cultura iniciadora.....	37
2.2.4 Efeitos benéficos à saúde humana atribuídos à ação de bifidobactérias...	40
2.2.5 <i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A}	40
2.3 Bebida láctea.....	42
CAPITULO I Influência de diferentes linhagens de <i>Streptococcus thermophilus</i> isoladas de culturas comerciais do iogurte na enumeração seletiva de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47

1	INTRODUÇÃO.....	48
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1	Culturas microbianas.....	50
2.2	Diferenciação das linhagens de <i>Streptococcus thermophilus</i>	52
2.3	Seleção do meio de cultura.....	53
2.4	Análise quantitativa.....	56
2.5	Análise estatística.....	56
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1	Discriminação genotípica das linhagens de <i>Streptococcus thermophilus</i>	57
3.2	Recuperação dos micro-organismos da cultura iniciadora.....	58
4	CONCLUSÃO.....	62
	CAPÍTULO II Influência de diferentes métodos de processamento de bebidas lácteas fermentadas na viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> 5 ^{1A} e BL05 durante a fermentação e o armazenamento.....	63
	RESUMO.....	64
	ABSTRACT.....	66
1	INTRODUÇÃO.....	68
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	71
2.1	Matérias-primas.....	71
2.2	Culturas microbianas.....	71
2.2.1	Culturas iniciadoras liofilizadas.....	71
2.2.2	Cultura iniciadora congelada.....	71
2.2.3	Cultura liofilizada de <i>Bifidobacterium longum</i>	72
2.2.4	Culturas congeladas de <i>Bifidobacterium longum</i>	72
2.3	Análises físico-químicas e microbiológica das matérias-primas	72
2.4	Determinação da atividade proteolítica das linhagens de <i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i>	73
2.5	Padronização e obtenção do inóculo para elaboração das bebidas lácteas fermentadas.....	74
2.5.1	Determinação do número de células nas culturas iniciadoras e nas culturas de <i>Bifidobacterium longum</i> para padronização do inóculo.....	74

2.5.1.1	Culturas iniciadoras liofilizadas	74
2.5.1.2	Cultura iniciadora congelada	74
2.5.1.3	Cultura de <i>Bifidobacterium longum</i> liofilizada.....	75
2.5.1.4	Culturas de <i>Bifidobacterium longum</i> congeladas.....	75
2.5.2	Preparo das culturas para obtenção do inóculo	76
2.5.2.1	Culturas iniciadoras liofilizadas	76
2.5.2.2	Cultura iniciadora congelada.....	76
2.5.2.3	Cultura de <i>Bifidobacterium longum</i> liofilizada.....	77
2.5.2.4	Culturas de <i>Bifidobacterium longum</i> congeladas.....	77
2.6	Elaboração das bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras.....	78
2.6.1	Fermentação.....	81
2.6.1.1	Adição das linhagens de <i>Bifidobacterium longum</i> no início da fermentação.....	81
2.6.1.2	Adição das linhagens de <i>Bifidobacterium longum</i> no final da fermentação.....	81
2.7	Elaboração das bebidas lácteas controles	82
2.8	Análises microbiológicas para o controle de qualidade das bebidas lácteas fermentadas	82
2.9	Estudo da vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas.....	83
2.9.1	Viabilidade das bactérias das culturas iniciadoras e de bifidobactérias.....	83
2.9.2	pH e acidez titulável.....	84
2.9.3	Susceptibilidade a sinérese	84
2.10	Delineamento experimental e análise estatística.....	84
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1	Testes preliminares.....	86
3.2	Análises físico-químicas e microbiológica das matérias-primas.....	88
3.2.1	Análises microbiológicas.....	88
3.2.2	Análises físico-químicas	88
3.3	Atividade proteolítica das culturas de <i>Streptococcus thermophilus</i> utilizadas na elaboração das bebidas lácteas fermentadas.....	89

3.4	Viabilidade da linhagem de <i>Bifidobacterium longum</i> BL05 proveniente de cultura congelada ou liofilizada e variação de pH nas bebidas lácteas durante o armazenamento	90
3.5	Influência da composição da cultura iniciadora e do momento de adição de <i>Bifidobacterium longum</i> 5 ^{1A} ou BL05 no tempo de fermentação das bebidas lácteas.....	94
3.6	Vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas: Determinação do pH, acidez e viabilidade de <i>Bifidobacterium longum</i> BL05 e 5 ^{1A} e das bactérias da cultura iniciadoras.....	99
3.6.1	pH e acidez.....	99
3.6.2	Viabilidade das linhagens de <i>Bifidobacterium longum</i>	104
3.6.3	Viabilidade das bactérias das culturas iniciadoras.. ..	108
3.7	Susceptibilidade à sinérese.....	110
3.8	Análises microbiológicas das bebidas lácteas fermentadas.....	112
4	CONCLUSÃO.....	113
	CONCLUSÕES INTEGRADAS.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116
	ANEXO A.....	127

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

- Tabela 1- Contagem de células (\log_{10} UFC.mL⁻¹) e taxa de recuperação (%) de *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} nos diferentes meios seletivos..... 55
- Tabela 2- Contagem de células (\log_{10} UFC ml⁻¹) e taxa de recuperação (%) de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nos diferentes meios seletivos..... 59

CAPÍTULO II

- Tabela 1- Resultados das análises físico-químicas dos lotes de leite em pó..... 88
- Tabela 2- Viabilidade de *Bifidobacterium longum* BL05 congelada e liofilizada, adicionadas às diferentes bebidas lácteas fermentadas, durante o período de armazenamento..... 91
- Tabela 3- Variação nos valores de pH durante o armazenamento das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium longum* BL05 congelada e liofilizada..... 92
- Tabela 4- Tempo de fermentação das bebidas lácteas produzidas com diferentes culturas iniciadoras..... 95
- Tabela 5- Variação de pH das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de bifidobactérias no início ou final da fermentação durante o período de armazenamento..... 100
- Tabela 6- Variação da acidez das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium longum* BL05 e 5^{1A} no início ou final da fermentação, durante o período de armazenamento..... 103
- Tabela 7- Viabilidade de linhagens de *Bifidobacterium longum* (5^{1A} e BL05) em diferentes tipos de bebidas lácteas adicionadas destas bactérias no início e final da fermentação durante o período de armazenamento..... 105
- Tabela 8- Índice de sinérese das diferentes bebidas lácteas adicionadas de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} ou BL05 no final da fermentação durante o período de armazenamento..... 111

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURAS

Figura 1-	Alguns mecanismos pelos quais bactérias probióticas induzem respostas benéficas à saúde do hospedeiro.....	26
Figura 2-	Proposta de dupla função exercida pelas células dos micro-organismos probióticos.....	28
Figura 3-	Via “Bifidus”: metabolização de hexoses por <i>Bifidobacterium</i>	32
Figura 4-	Principais fatores que afetam a viabilidade de micro-organismos probióticos durante o processamento e armazenamento dos alimentos.....	33

QUADROS

Quadro 1 -	Critérios desejáveis para a seleção de linhagens probióticas em aplicações comerciais.....	25
Quadro 2-	Espécies de <i>Bifidobacterium</i> e suas origens.....	31
Quadro 3-	Principais meios seletivos usados para enumeração seletiva de <i>Bifidobacterium</i> na presença dos micro-organismos da cultura iniciadora.....	39
Quadro 4-	Parâmetros microbiológicos para bebidas lácteas fermentadas.....	42

CAPITULO I

FIGURAS

Figura 1-	Dendograma de amostras de <i>Streptococcus. thermophilus</i> isoladas de culturas comerciais.....	58
-----------	---	----

QUADROS

Quadro 1-	Origem e composição bacteriana das culturas congeladas e liofilizadas usadas neste estudo	51
Quadro 2-	Meios de cultura usados neste estudo para avaliação da eficácia destes na enumeração seletiva de <i>B.longum</i> 5 ^{1A} , <i>B.breve</i> 110 ^{1A} , <i>B.pseudolongum</i> 119 ^{1A} e <i>B.bifidum</i> 162 ^{2A} na presença de diferentes culturas iniciadoras.....	53

CAPÍTULO II

FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma de elaboração das bebidas lácteas fermentadas.....	79
Figura 2-	Varição nos valores de pH das bebidas lácteas fermentadas com as linhagens de <i>Streptococcus thermophilus</i> St1 e St-TA 40 durante 28 dias de estocagem refrigerada 5°C.....	87
Figura 3-	Bebidas fermentadas com <i>Streptococcus thermophilus</i> St1 em diferentes valores de pH de interrupção da fermentação.....	87
Figura 4-	Decréscimo de pH em leites fermentados e atividade proteolítica de <i>Streptococcus thermophilus</i> durante o tempo de fermentação do leite..	89
Figura 5-	Tempo de fermentação das bebidas lácteas controles.....	96
Figura 6-	Mudança nos valores de pH das bebidas lácteas controles durante o período de armazenamento.....	102
Figura 7-	Contagem das bactérias (UFC.mL ⁻¹) constituintes da cultura das bebidas lácteas controles durante o período de armazenamento.....	108
Figura 8-	Viabilidade das bactérias da cultura iniciadora durante o período de armazenamento das diferentes bebidas lácteas fermentadas.....	109

QUADROS

Quadro 1-	Composição, proporção das bactérias das culturas iniciadoras, linhagens de <i>Bifidobacterium longum</i> e momento de adição das bifidobactérias usadas para a elaboração das diferentes bebidas lácteas fermentadas.....	80
Quadro 2-	Composição das culturas usadas para a fermentação das bebidas controles e pH de interrupção da fermentação.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

B-MRS – Ágar MRS adicionado de Sais Biliares

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DVI – *Direct-to-Vat Inoculation*

DVS – *Direct Vat Set*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FIESP – Federação das Indústrias do Estado de São Paulo

G-MRS – Ágar MRS adicionado de Gentamicina

GRAS – Geralmente Reconhecidas como Seguras

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos

LAB – *Lactic Acid Bacteria*

LABIP – *Lactic Acid Bacteria Industrial Platform*

LP-MRS – Ágar MRS adicionado de Cloreto de Lítio e Propionato de Sódio

M-MRS – Ágar MRS com substituição da Glicose pela Maltose

MRS – de Man, Rogosa & Sharpe

NMP – Número Mais Provável

PCR – Polymerase Chain Reaction

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UHT – *Ultra High Temperature*

WHO – *World Health Organization*

1. INTRODUÇÃO GERAL

Alimentos que além de fornecerem nutrição básica, promovam a saúde destacam-se na preferência dos consumidores. Nesta categoria de produtos sobressaem-se os alimentos funcionais e, dentre estes, os probióticos. Segundo a FAO/WHO (2002) probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Algumas espécies de *Bifidobacterium* são micro-organismos amplamente utilizados como probióticos. Leites fermentados e iogurtes contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover à saúde (SIRÓ *et al.*, 2008).

Bebida láctea fermentada é o produto resultante da mistura de leite e soro de leite, fermentada mediante ação de cultivo de micro-organismos específicos. A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas é relativamente simples. Neste contexto, o desenvolvimento de bebidas lácteas com a utilização de culturas probióticas é bastante promissor (DAMIN *et al.*, 2009). É também, para os laticínios, uma alternativa de obtenção de um produto de alto valor agregado, sem que haja a necessidade de grandes investimentos.

A viabilidade e atividade de bifidobactérias podem ser afetadas durante todas as etapas do processamento e armazenamento dos alimentos. Fatores como tipo de matriz, oxigênio dissolvido, acidez e pH, reidratação de células liofilizadas, interações com bactérias lácticas, temperatura de fermentação e armazenamento e tipo embalagem afetam a viabilidade de probióticos (TRIPATHI & GIRI, 2014). Dentre os fatores citados, o pH dos alimentos parece ser o fator mais crítico para a estabilidade dos micro-organismos probióticos, especialmente para as bifidobactérias, durante o armazenamento (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; SHIHATA & SHAH, 2002). Bifidobactérias não proporcionam características sensoriais desejadas aos produtos fermentados e apresentam baixa atividade proteolítica, ocasionando um tempo de fermentação prolongado. Portanto, é comum o uso de culturas iniciadoras, como por exemplo, a do iogurte, em conjunto com o probiótico para a produção de leites fermentados com propriedades sensoriais satisfatórias (PRASANNA *et al.*, 2014). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, micro-organismo constituinte da cultura do

iogurte, produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada, processo conhecido como pós acidificação, o que pode contribuir para a redução da viabilidade de bifidobactérias. Uma estratégia para reduzir a taxa de pós acidificação nos produtos lácteos fermentados, é a retirada de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da cultura iniciadora (KNEIFEL *et al.*, 1993).

O momento de adição do probiótico - início ou final da fermentação – pode afetar a viabilidade de bifidobactérias durante a estocagem refrigerada. A adição de *Bifidobacterium* no início da fermentação pode favorecer a maior multiplicação desta bactéria, uma vez que, substâncias resultantes do metabolismo dos micro-organismos da cultura iniciadora podem ser utilizadas pelo probiótico (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Entretanto, o crescimento rápido dos micro-organismos da cultura iniciadora e a rápida acidificação do meio são fatores que podem dificultar a produção de leites fermentados adicionados de probióticos, devido a possibilidade de redução da viabilidade dos mesmos (CHAMPAGNE *et al.*, 2005, MOHAMMADI *et al.*, 2012). Para minimizar este efeito, um método usado é a adição da cultura probiótica após a fermentação (MOHAMMADI *et al.*, 2012). Além disto, como *Bifidobacterium* produz ácido acético e láctico durante a fermentação na proporção de 3:2, a adição do probiótico no final da fermentação, poderia minimizar o *off flavor* advindo do metabolismo da bifidobactéria (GRANATO *et al.*, 2010).

Os benefícios de saúde proporcionados pelas bactérias probióticas só podem ser alcançados, quando a concentração mínima de células viáveis destas, for assegurada no alimento no momento do consumo. Embora essa concentração não esteja estabelecida de forma definitiva (RAEISI *et al.*, 2013), estudos recomendam o mínimo de 10^6 UFC mL⁻¹ de células viáveis do probiótico no produto final (BIBILONI *et al.*, 2001; SHAH, 2000; TRIPATHI & GIRI, 2014). A legislação brasileira exige a quantidade mínima entre 10^8 e 10^9 UFC de células viáveis dos micro-organismos probióticos na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2008). Portanto, a determinação do número de células viáveis do probiótico, durante a vida de prateleira, em produtos comerciais, torna-se imprescindível. Diversos meios de cultura para enumeração seletiva de bifidobactérias na presença dos micro-organismos da cultura iniciadora estão descritos na literatura. Meios diferenciais, baseados na diferença da morfologia das colônias das bactérias para a contagem dos micro-organismos de interesse, também são descritos na literatura. Contudo, este

método é muito subjetivo e o uso de meios seletivos é altamente recomendável (CASTEELE *et al.*, 2006).

É indicado o uso de bactérias probióticas de origem humana, uma vez que o efeito benéfico proporcionado pelo probiótico é maior quando o micro-organismo encontra-se em ambiente similar ao qual foi isolado (ANTUNES, 2007; SAARELA *et al.*, 2000). No presente estudo foram utilizadas duas linhagens de *Bifidobacterium* de origem humana: *B. longum* BL05, comercial (DaniscoDupont) e *B. longum* 5^{1A} isolada de fezes de crianças saudáveis e caracterizada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (GOMES, 2005). A procura por novas linhagens com potencial probiótico, contribuirá para o desenvolvimento de novos produtos funcionais. De acordo com Vinderola e colaboradores (2011), o desafio é cada vez mais específico: uma determinada linhagem, em um alimento específico, administrado durante um dado período de tempo é capaz de conferir um efeito benéfico específico à saúde.

O principal objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de diferentes culturas iniciadoras e métodos de processamento de bebidas lácteas fermentadas na viabilidade de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e BL05 durante a fermentação e o armazenamento. O objetivo adicional foi avaliar a eficácia dos meios de cultura, B-MRS, LP-MRS, M-MRS, G-MRS, definidos em estudo anterior (PEREIRA, 2012), na enumeração seletiva de *Bifidobacterium* na presença de diferentes culturas iniciadoras e também na presença de diferentes linhagens de *S. thermophilus* encontradas nestas culturas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentos funcionais: probióticos

Nas últimas décadas, a busca por produtos saudáveis tem aumentado consideravelmente. Alimentos que além de fornecerem nutrição básica, promovam a saúde destacam-se na preferência dos consumidores. Nesta categoria de produtos, sobressaem-se os alimentos funcionais, e dentre estes os probióticos.

No início do século XX, o pesquisador Metchnikoff do Instituto Pasteur, apresentou a “teoria da longevidade” que relacionava a vida longa de camponeses búlgaros ao consumo de leite fermentado por *Lactobacillus* ssp. A teoria se baseava na competição entre esse micro-organismo benéfico e bactérias putrefativas do intestino, sendo que estas poderiam diminuir o tempo de vida das pessoas por produzirem substâncias tóxicas (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

A palavra probiótico é derivada da língua grega e significa “para a vida” e inicialmente foi usada como antônimo de antibiótico. A origem do primeiro uso dessa palavra é atribuída a Kollath em 1953 que descreveu a restauração da saúde em pacientes desnutridos que consumiam diferentes suplementos orgânicos e inorgânicos. Em 1965, Lilly e Stiwell definiram probióticos como “substâncias secretadas por um micro-organismo para estimular o crescimento de outro” (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Muitas definições para probiótico foram propostas desde então. Especialistas da *Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization* (FAO/WHO, 2002) elaboraram uma definição que é aceita internacionalmente: “probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. No Brasil, probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2008).

As culturas comerciais empregadas como probióticas incluem principalmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Ambos os gêneros são considerados seguros e reconhecidos como GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) e são dominantes no intestino humano: *Lactobacillus* no intestino delgado e *Bifidobacterium*

no intestino grosso. Micro-organismos dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionobacterium*, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) e fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae*) também têm sido utilizados como probióticos devido à capacidade de promoverem à saúde (RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003).

A América Latina é considerada um mercado emergente para alimentos e bebidas funcionais, sendo responsável pela movimentação de US\$ 45 bilhões em 2013, que corresponderam a 17% do mercado mundial desses alimentos. O Brasil lidera esta tendência representando 44% do crescimento total latino americano (METAANALISE, 2014). Estima-se que os alimentos probióticos compreendam entre 60 a 70% do mercado dos alimentos funcionais (TRIPATHI & Giri, 2014). No Brasil, 65% do consumo de funcionais são de produtos contendo probióticos (CRUZ *et al.*, 2007).

Probióticos podem ser adicionados em uma ampla variedade de produtos como alimentos e suplementos alimentares (pós e cápsulas). Leites e cereais fermentados, queijos, iogurtes, sucos de frutas e vegetais, produtos cárneos como presunto e salsicha, maionese estão entre os alimentos de interesse para adição de micro-organismos probióticos (FOLIGNÉ *et al.*, 2013; TRIPATHI & GIRI, 2014). Destaca-se o emprego de leites fermentados como matriz para adição de bactérias probióticas, uma vez que, estes são alimentos muito consumidos, relativamente de baixo custo, fáceis de transportar, ampla variedade de sabores e formas de apresentação e ingeridos periodicamente (SIRÓ *et al.*, 2008). No Brasil, o iogurte, tipo de leite fermentado, é o produto que mais desperta o desejo do consumidor quando lançado no mercado (FIESP & ITAL, 2010).

2.1.1 Seleção da linhagem do micro-organismo probiótico

A seleção adequada da linhagem da bactéria probiótica é um dos aspectos críticos no desenvolvimento dos alimentos probióticos. As linhagens selecionadas devem apresentar características tecnológicas apropriadas como viabilidade durante o processamento e estocagem, e também fisiológicas, como sobrevivência durante o trânsito gastrointestinal, além de potenciais efeitos promotores de saúde do consumidor (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Os critérios desejáveis para a seleção de linhagens probióticas em aplicações comerciais estão apresentados na Quadro 1.

QUADRO 1
Critérios desejáveis para a seleção de linhagens probióticas em aplicações comerciais

Critérios gerais	Propriedades
Segurança	Origem (humana x não humana) Comprovação da ausência de risco à saúde do consumidor através de estudo da patogenicidade e infectividade da linhagem e também estudo dos fatores de virulência (toxicidade, propriedades intrínsecas como resistência à antibióticos)
Tecnológicos	Linhagem geneticamente estável Viabilidade durante o processamento e estocagem Propriedades sensoriais adequadas Produção em larga escala Resistência à bacteriófagos
Funcionais	Tolerância à acidez gástrica Tolerância à bile Adesão à superfície da mucosa intestinal Efeitos de saúde documentados e validados
Fisiológicos	Imunomodulação Atividade antagonista à patógenos Diminuição do colesterol sérico Redução da intolerância à lactose Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas

Fonte: VASILJEVIC & SHAH, 2008; TRIPATHI & GIRI, 2014

As propriedades relacionadas à adesão do probiótico à mucosa intestinal são apontadas como fatores decisórios para seleção de uma nova linhagem probiótica. O mecanismo de ação do probiótico contra patógenos do intestino consiste principalmente de: competição por nutrientes e sítios de adesão; produção de compostos antimicrobianos; mudanças nas condições ambientais para favorecer o crescimento de micro-organismos benéficos; modulação da resposta imune do hospedeiro (SAAD *et al.*, 2013). Alguns mecanismos pelos quais bactérias probióticas induzem respostas benéficas à saúde do hospedeiro estão ilustrados na Figura 1.

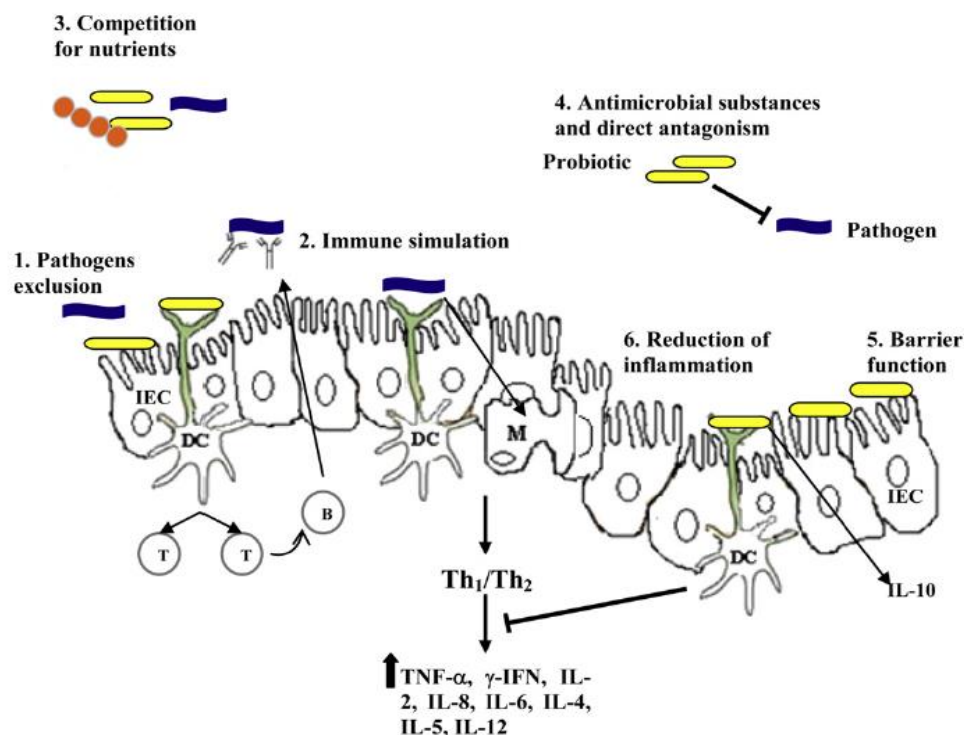


FIGURA 1: Alguns mecanismos pelos quais bactérias probióticas induzem respostas benéficas à saúde do hospedeiro

1: Exclusão e competição com patógenos pela adesão às células epiteliais; 2: Estimulação do sistema imune; 3: Competição por nutrientes e produtos prebióticos; 4: Produção de substâncias antimicrobianas: efeito antagonista com patógenos; 5: Proteção da barreira intestinal; 6: Regulação de citocinas anti-inflamatórias e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias. IEC: Células do epitélio intestinal; DC: Células dendríticas; IL: Interleucinas; M: Células intestinais M; TNF: Fator de necrose tumoral

Fonte: SAAD *et al.*, 2013

Vários autores (ANTUNES *et al.*, 2007; OUWEHAND *et al.*, 1999) recomendam o uso de micro-organismos probióticos de origem humana, pois uma linhagem probiótica irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar ao qual foi isolado, visto que é hospedeiro-específica (SAARELA *et al.*, 2000). Em 1998, pesquisadores do programa LABIP (*Lactic Acid Bacteria Industrial Platform*) recomendaram o emprego de micro-organismos probióticos de origem humana em alimentos destinados ao consumo humano (DUNNE *et al.*, 2001). Em 2001, especialistas da FAO/WHO sugeriram que a especificidade da ação probiótica seria mais importante que a origem do micro-organismo (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Dogi & Perdígóni (2006) ao avaliarem a importância da seleção de bactérias probióticas hospedeira-específicas na capacidade de imunomodulação, concluíram que a interação de bactérias comensais (C) e não comensais (NC) com o intestino ocorre

da mesma forma. Ambas as bactérias (C e NC) foram capazes de estimular o sistema imune da mucosa intestinal. “Embora a origem da linhagem probiótica não seja estabelecida pela legislação, deve-se destacar que o uso de micro-organismos com potencial probiótico de origem não humana requer mais estudos para a comprovação de sua eficácia e segurança para o uso em alimentos destinados ao consumo humano, conforme informado por Celso Gabriel Vinderola”.¹

2.1.2 Efeitos benéficos à saúde humana associados ao consumo de alimentos probióticos

Muitos benefícios para a saúde humana têm sido atribuídos à ação dos micro-organismos probióticos. Alguns desses benefícios estão bem documentados e outros mostraram-se promissores em modelos animais, sendo necessários ensaios com humanos para confirmação dos achados. Ressalta-se que os benefícios de saúde atribuídos às bactérias probióticas são altamente dependentes da linhagem (linhagem-específica), ou seja, não existe uma linhagem que ofereça todos os benefícios propostos, nem mesmo linhagens da mesma espécie (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Os benefícios à saúde atribuídos à ação de micro-organismos probióticos que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal, controle da síndrome do intestino irritável, controle de doenças inflamatórias do intestino, supressão de patógenos endógenos, redução do câncer de cólon, atividade antimutagênica e anticarcinogênica, melhoria da intolerância à lactose, estimulação do sistema imune, diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, produção de vitamina B, melhoria da absorção de minerais como cálcio, ferro e magnésio, redução de compostos tóxicos e redução dos sintomas de alergia alimentar em crianças (GRANATO *et al.*, 2010; TRIPATHI & GIRI, 2014; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Embora o número de micro-organismos viáveis para garantia do efeito probiótico não esteja estabelecida de forma definitiva (RAEISI *et al.*, 2013), diversos estudos recomendam o mínimo de 10^6 UFC g^{-1} de células viáveis no produto final (BIBILONI *et al.*, 2001; SHAH, 2000). No Brasil, é exigida a contagem entre 10^8 e 10^9

¹ Palestra realizada pelo Engenheiro Celso Gabriel Vinderola, CONICET, Argentina, no Workshop sobre Probióticos, FEA, Campinas, 2014.

UFC de células viáveis do probiótico na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2008). A porção de bebida láctea definida pela legislação brasileira é de 200 mL (BRASIL, 2003b). Portanto, considerando-se o consumo diário médio de uma porção de bebida láctea, a concentração de células do micro-organismo probiótico deverá ser entre 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹ durante a vida de prateleira desse produto.

A definição de probiótico da FAO/WHO implica na utilização de micro-organismos vivos para alcançar os benefícios de saúde relacionados à linhagem probiótica. Entretanto alguns estudos indicam que tanto células viáveis como não viáveis podem gerar respostas biológicas benéficas (ADAMS, 2010; TAVERNITI & GUGLIELMETTI, 2011). Segundo Adams (2010), probióticos podem desempenhar um efeito duplo, uma vez que células viáveis podem influenciar a microbiota intestinal e exercer um efeito imunomodulador, enquanto componentes de células não viáveis podem produzir um efeito anti-inflamatório (Figura 2).

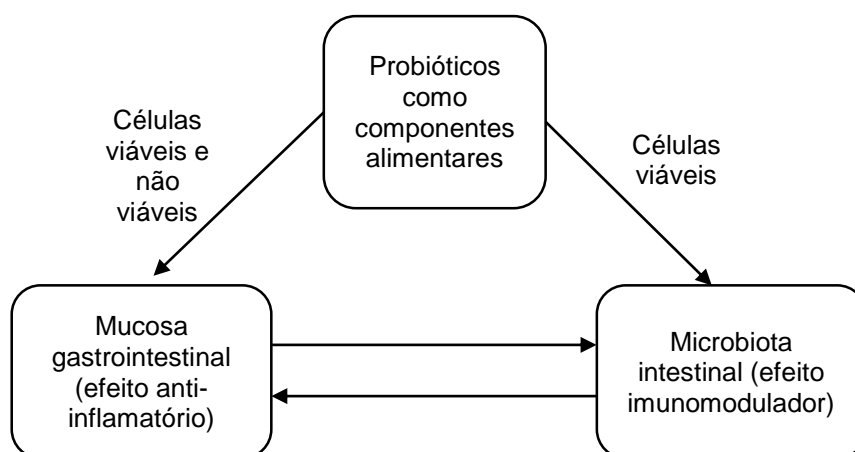


FIGURA 2: Proposta de dupla função exercida pelas células dos micro-organismos probióticos
Fonte: ADAMS, 2010

Tavertini & Guglielmetti (2011) propuseram um novo termo, paraprobiótico, definido como “células microbianas não viáveis ou frações celulares, que administradas em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do consumidor humano ou animal”. Deve-se ressaltar que embora estudos apontem benefícios à saúde relacionados à ação de células não viáveis de micro-organismos probióticos, a legislação brasileira exige, no momento do consumo, a contagem mínima de 10^8 UFC de células viáveis do probiótico na recomendação diária do produto pronto para consumo.

O futuro dos alimentos probióticos depende de todo processo envolvido no desenvolvimento de um produto saudável e palatável. Além disso, o sucesso desses alimentos dependerá essencialmente da aceitação dos mesmos pelo consumidor. Como se trata de alimentos relacionados à promoção da saúde, a informação referente à alegação de saúde deve estar disponível para o consumidor de forma clara, confiável e consistente (GRANATO *et al.*, 2010, FOLIGNÉ *et al.*, 2013). Em muitos países, a legislação restringe os termos de alegação de saúde permitidos no rótulo do produto. Espera-se que legislações mais restritivas aumente a qualidade da investigação e exigência quanto à promoção da saúde por parte das empresas de alimentos (FOGLIANO & VITAGLIONE, 2005). No Brasil, a única alegação de saúde permitida para os probióticos é “o (indicar a espécie do micro-organismo) contribui para o equilíbrio da flora intestinal” (ANVISA, 2008). Portanto, como os aspectos legais influenciam diversos setores, dentre estes, pesquisa, estratégia de comunicação, fabricação e rotulagem dos produtos alimentícios, a comunicação entre agências regulatórias, pesquisadores, fabricantes, consumidores e profissionais de saúde deve ser otimizada (FOLIGNÉ *et al.*, 2013; SANDERS *et al.*, 2013).

2.2 Gênero *Bifidobacterium*

Henry Tissier do Instituto Pasteur isolou a primeira linhagem de *Bifidobacterium* de fezes de lactentes em 1899 e a denominou como *Bacillus bifidus*. Devido as suas características morfológicas e fisiológicas, este gênero de bactéria foi classificado como *Lactobacillus* durante grande parte do século XX. Antes do lançamento da 8ª edição do *Manual Bergey* (1974), o gênero foi reclassificado e denominado *Bifidobacterium*, consistindo de 11 espécies (RUSSEL *et al.*, 2011).

São conhecidas aproximadamente 30 espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, sendo pelo menos 11 destas espécies de origem humana: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, e *B. scardovii* (MEILE *et al.*, 2008). As espécies *B. catenulatum*, *B. longum* (subsp. *longum*) e *B. adolescentis* predominam na microbiota intestinal de adultos enquanto *B. breve* e *B. longum* subsp. *infantis* na microbiota intestinal de crianças (MATSUKI *et al.*, 1999). As espécies de *Bifidobacterium* e sua origem estão descritas no Quadro 2.

Bifidobacterium são bactérias Gram-positivas, anaeróbias obrigatórias, não-móveis e não formadoras de esporos. Apresentam formas variadas como bacilos curvos e curtos e bastonetes em forma de Y. Em ambientes desfavoráveis são pleomórficas, embora predomine a forma bastonete em seu habitat natural (LEAHY *et al.*, 2005). A forma da bifidobactéria é linhagem-meio-depende (TANNOCK, 1999). Meios contendo quantidades maiores de N-acetilglicosamina, alanina, ácido aspártico, serina, ácido glutâmico e íons Ca^{2+} podem influenciar a forma da célula de *Bifidobacterium* (LINDNER *et al.*, 2007).

A temperatura ótima para o crescimento de bifidobactérias é de 37-41°C, mínimo de 25 a 28°C e máximo de 43 a 45°C (SHAH, 2007). Pesquisas indicam que a maioria das espécies de *Bifidobacterium* de origem humana, apresentam temperatura ótima de crescimento entre 36-37°C e de origem animal entre 41-43°C (PRASANNA *et al.*, 2014).

QUADRO 2
Espécies de *Bifidobacterium* e suas origens

Espécies de <i>Bifidobacterium</i>	Origens
<i>B. adolescentis</i>	Intestino de adultos
<i>B. angulatum</i>	Fezes de humanos
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	Fezes de animais
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	logurte
<i>B. asteroides</i>	Mel de abelha
<i>B. bifidum</i>	Fezes de crianças
<i>B. boum</i>	Rúmen de gato
<i>B. breve</i>	Fezes de crianças
<i>B. catenulatum</i>	Intestino de adultos
<i>B. choerinum</i>	Fezes de porco
<i>B. coryneforme</i>	Mel de abelha
<i>B. cuniculi</i>	Fezes de coelhos
<i>B. dentium</i>	Cárie dental
<i>B. gallicum</i>	Fezes de humanos
<i>B. gallinarum</i>	Ceco de galinhas
<i>B. indicum</i>	Mel de abelha
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	Intestino de adultos
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	Intestino de crianças
<i>B. magnum</i>	Fezes de coelhos
<i>B. merycicum</i>	Rúmen de bovinos
<i>B. minimum</i>	Esgoto
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Fezes de crianças
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	Fezes de suínos
<i>B. pullorum</i>	Fezes de galinhas
<i>B. ruminantium</i>	Rúmen de bovinos
<i>B. saeculare</i>	Fezes de coelhos
<i>B. scardovii</i>	Sangue humano
<i>B. subtile</i>	Esgoto
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>thermacidophilum</i>	Águas residuais
<i>B. thermacidophilum</i>	Fezes de suínos
<i>B. thermacidophilum</i> subsp. <i>porcinum</i>	Fezes de leitão

Fonte: PRASANNA *et al.*, 2014

Bifidobactérias são micro-organismos sacarolíticos e produzem ácido acético e láctico sem geração de oxigênio. Fermentam glicose, galactose e frutose (LEAHY *et al.*, 2005). No entanto, a capacidade de fermentação de outros carboidratos é dependente da espécie e linhagem da referida bactéria. Dados confirmam que bifidobactérias podem utilizar vários tipos de carboidratos como xilo-oligossacarídeos (XOS) (PALFRAMAN *et al.*, 2003), pectina (SLOVAKOVA *et al.*, 2002) e fruto-oligossacarídeos (FOS) (KAPLAN & HUTKINS, 2000). Algumas espécies como *B. bifidum* e *B. animalis* DN-173 010 foram capazes de utilizar a lactose como substrato para a fermentação. Em geral, *Bifidobacterium* metaboliza hexoses via “Bifidus” conforme mostrado na Figura 3. A enzima chave desta via é a frutose-6-fosfato fosfoacetolase (F6PPK) (PRASANNA *et al.*, 2014).

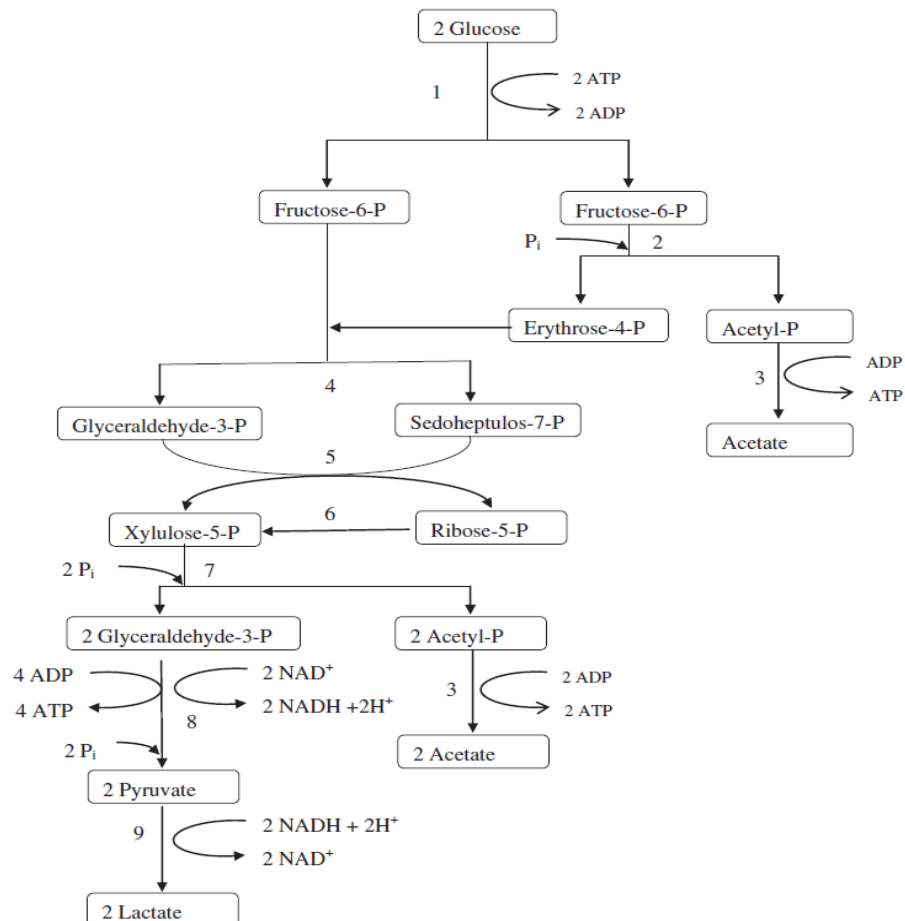


FIGURA 3: Via “Bifidus”: metabolização de hexoses por *Bifidobacterium*.
Fonte: PRASANNA *et al.*, 2014

2.2.1 Sobrevivência de bifidobactérias durante o processamento e estocagem de produtos alimentícios

A viabilidade dos micro-organismos probióticos, como por exemplo bifidobactérias, pode ser afetada por diversos fatores durante todas as etapas do processamento e armazenamento dos alimentos. Os principais fatores estão resumidos na Figura 4.

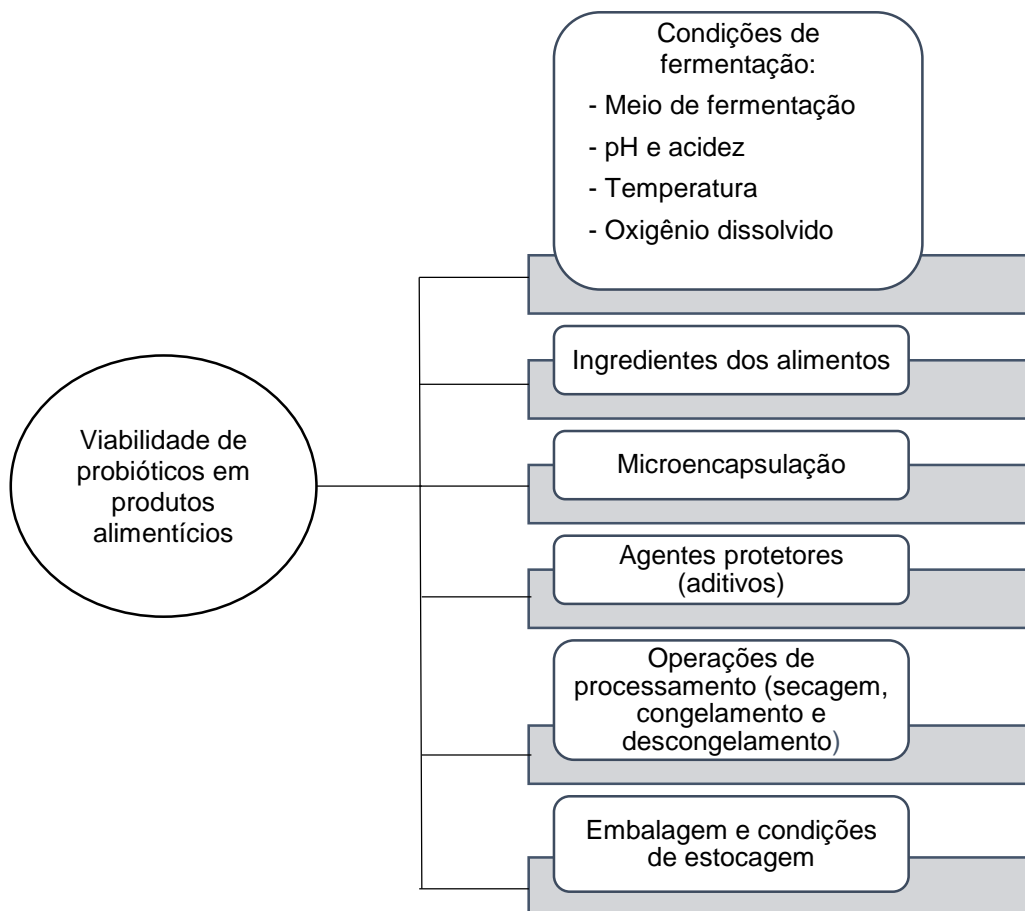


FIGURA 4: Principais fatores que afetam a viabilidade de micro-organismos probióticos durante o processamento e armazenamento de alimentos
Fonte: TRIPATHI & GIRI, 2014

A sobrevivência de *Bifidobacterium* durante o processamento, não está diretamente relacionada com a manutenção de sua viabilidade durante a estocagem dos alimentos (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Bifidobactérias de origem humana são ainda mais sensíveis às condições de estresse do que às de origem animal. Por isto, novas tecnologias devem ser desenvolvidas para produtos contendo bifidobactérias, especialmente de origem humana (ABE *et al.*, 2009).

2.2.1.1 Condições de fermentação

A temperatura de fermentação é um dos fatores que afetam a viabilidade de micro-organismos probióticos em produtos fermentados (TRIPATHI & GIRI, 2014). Melhores resultados de viabilidade de *Bifidobacterium* subsp. *lactis* BB12, após o término da fermentação, foram observados por Shafiee e colaboradores (2010), quando foi empregada temperatura de incubação de 37°C em relação às temperaturas de incubação mais altas (40 e 44°C). A contagem de *B. longum* BB 536 foi significativamente superior ($p < 0,05$) após 5 semanas de estocagem em iogurte fermentado a 37°C, em relação a contagem desta bactéria em iogurte fermentado a 39 e 41° C (ABE *et al.*, 2009).

A concentração das células no inóculo afeta a viabilidade de bactérias probióticas, o tempo de fermentação e as características sensoriais do produto final. Em geral, a concentração das bactérias probióticas amplia em paralelo com o aumento da concentração do inóculo, quando apenas essas bactérias são usadas como culturas iniciadoras. Quando a concentração das células das bactérias do iogurte e do micro-organismo probiótico no inóculo é semelhante, pode resultar em elevado tempo de fermentação e um produto com propriedades sensoriais insatisfatórias. Entretanto, quando a concentração das células dos micro-organismos do iogurte é maior em relação ao probiótico, pode haver predomínio das bactérias do iogurte com consequente aumento da pós acidificação. Esta é ocasionada especialmente pela bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, resultando em perda de viabilidade do probiótico (MOHAMMADI *et al.*, 2012). Hansen (1985) sugere usar $4-5 \cdot 10^8$ UFC. mL⁻¹ de células de *Bifidobacterium* no inóculo. Champagne e colaboradores (2005) recomendam que o iogurte seja adicionado de um inóculo, na qual a concentração do probiótico seja no mínimo a exigida no produto final, ou seja, 10^6 UFC. mL⁻¹.

2.2.1.2 pH e acidez titulável

A sobrevivência de bactérias probióticas, inclusive bifidobactérias, durante a estocagem é afetada pelo pH e acidez titulável do produto. Valores baixos de pH aumentam a concentração de ácidos orgânicos não dissociados em produtos

fermentados, com conseqüente aumento do efeito bactericida desses ácidos (TRIPATHI & GIRI, 2014). Em geral, bifidobactérias não são tolerantes a meios ácidos e não apresentam boa viabilidade e crescimento em pH abaixo de 4,0 (SAARELA *et al.*, 2011). Entretanto, a tolerância à acidez de bifidobactérias depende da espécie e das características do substrato. Por exemplo, *B. longum* sobrevive melhor na presença de ácido e sais biliares, e, *B. lactis* em leites fermentados (TRIPATHI & GIRI, 2014). As bactérias utilizadas para a produção do iogurte - *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* - são também amplamente empregadas na produção de outros leites fermentados, por fornecerem produtos com características tecnológicas e sensoriais adequadas ao consumo. Entretanto, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* segue produzindo ácido láctico durante a estocagem refrigerada do produto – processo conhecido como pós-acidificação – afetando a viabilidade das culturas probióticas (DAVE & SHAH, 1997). A pós-acidificação torna-se crítica especialmente quando a temperatura durante a distribuição, armazenamento e venda dos produtos fermentados não é devidamente controlada. Diversos autores sugerem a retirada da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da cultura iniciadora visando a redução da pós acidificação e conseqüente melhoria da viabilidade do probiótico durante a estocagem refrigerada (IHSAN & ARZU, 2008; KAILASAPATHY *et al.*, 2008; SACCARO *et al.*, 2009).

2.2.1.3 Oxigênio dissolvido e potencial redox

A exposição ao oxigênio durante a fermentação e estocagem desempenha um papel importante na perda de viabilidade de bactérias sensíveis ao oxigênio, como por exemplo, *Bifidobacterium*. O oxigênio afeta a sobrevivência dos probióticos de três formas: é diretamente tóxico para algumas células; produção de peróxido por determinados micro-organismos na presença de oxigênio; radicais livres formados pela oxidação de componentes (exemplo: ácidos graxos) são tóxicos para células probióticas (TRIPATHI & GIRI, 2014). Micro-organismo como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, usado em produtos fermentados adicionados de probióticos, podem produzir peróxidos (H₂O₂) reduzindo a viabilidade de bifidobactérias (SHAH, 2000). Embora este gênero de probiótico seja considerado altamente sensível ao oxigênio, a tolerância ao mesmo é dependente da linhagem e do meio de cultivo. *B. animalis* subsp. *lactis* apresenta boa tolerância ao oxigênio; *B. boum* e *B. thermophilum*

crecem bem mesmo em presença de 20% de oxigênio (KAWASAKI *et al.*, 2006). Correlação positiva entre bifidobactérias aerotolerantes e altos níveis das enzimas NAD-oxidase e NADH-peroxidase tem sido relatada, na medida em que essas enzimas são responsáveis pela remoção do oxigênio intercelular (ROY, 2005). Portanto, a escolha de linhagens mais aerotolerantes facilitam o desenvolvimento de produtos probióticos contendo bifidobactérias. Ainda, diversos métodos têm sido testados para redução do conteúdo de oxigênio durante a estocagem de produtos probióticos: uso de embalagens com baixa permeabilidade ao oxigênio, adição de antioxidantes, embalagens à vácuo, emprego de enzimas como glicose-oxidase têm-se mostrado úteis na melhoria da viabilidade de *Bifidobacterium* em produtos lácteos (CRUZ *et al.*, 2007; CRUZ *et al.*, 2013, TRIPATHI & GIRI, 2014).

2.2.1.4 Momento de adição de bifidobactérias

O momento de adição de *Bifidobacterium* ao produto fermentado pode afetar a sobrevivência do probiótico durante a estocagem. Bactérias probióticas podem ser adicionadas no início ou final da fermentação (CHAMPAGNE *et al.*, 2005, MOHAMMADI *et al.*, 2012). A cultura do iogurte é adicionada aos leites fermentados probióticos para reduzir o tempo de fermentação e proporcionar sabor e textura próprio do iogurte (MOHAMMADI *et al.*, 2012). A adição de bifidobactéria no início da fermentação pode resultar na maior multiplicação desta bactéria, uma vez que, substâncias resultantes do metabolismo dos micro-organismos da cultura iniciadora podem ser utilizadas pelo probiótico (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). A mistura de linhagens probióticas não proteolíticas com bactérias da cultura iniciadora com alta atividade proteolítica pode ser útil, porém se estes últimos micro-organismos crescerem muito rapidamente, o desenvolvimento do probiótico pode ser comprometido (KLAVER *et al.*, 1993). O crescimento rápido dos micro-organismos da cultura iniciadora e a rápida acidificação do meio, são fatores que podem dificultar a produção de leites fermentados adicionados de probióticos, devido a possibilidade de redução da viabilidade dos mesmos (CHAMPAGNE *et al.*, 2005, MOHAMMADI *et al.*, 2012). Para minimizar este efeito, um método usado é a adição da cultura probiótica após a fermentação, processo conhecido como 'inoculação pós fermentação' (MOHAMMADI *et al.*, 2012). Outro fator a ser considerado na adição de bifidobactérias no início da fermentação é a produção de ácido acético e láctico na proporção de 3:2

por estes micro-organismos. O aroma e gosto de vinagre podem comprometer a qualidade sensorial de produtos lácteos, defeito conhecido como 'flavor de probiótico'. A adição da cultura de *Bifidobacterium* após a fermentação também é uma alternativa para minimizar este defeito (GRANATO *et al.*, 2010). Porém, grande perda de viabilidade de *L. acidophilus* em iogurte armazenado a 5°C, foi relatado por Hull e colaboradores (1984), quando este probiótico foi adicionado no fim da fermentação em comparação a adição no início da fermentação.

2.2.1.5 Microencapsulação

Microencapsulação é uma técnica de empacotamento das células utilizando revestimento adequado, para segregá-las e preservá-las das condições prejudiciais do ambiente circundante, de maneira que ocorra a liberação de células adequadas no intestino (KRASAEKPOOT *et al.*, 2003). A microencapsulação preserva as células probióticas de fatores ambientais prejudiciais como elevada acidez, sais biliares, oxigênio molecular no caso de micro-organismos anaeróbicos, bacteriófagos e agentes antimicrobianos. Além disso, outras vantagens como melhoria e estabilização dos atributos sensoriais e imobilização das células com distribuição homogênea por todo o produto, também podem ser alcançadas por essa técnica (MOHAMMADI *et al.*, 2012; TRIPATHY & GIRI, 2014). A microencapsulação melhorou a sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* em relação às células livres deste probiótico em iogurtes armazenados durante 7 semanas. A adição das cápsulas não alterou de forma significativa a aparência, cor e *flavor* dos iogurtes, mas modificou significativamente ($p < 0,05$) a textura do produto (KAILASAPATHY, 2006).

2.2.3 Meios de cultura empregados na enumeração seletiva de *Bifidobacterium* na presença das bactérias da cultura iniciadora

A legislação brasileira exige a contagem mínima de 10^8 UFC de células viáveis do probiótico na recomendação diária do produto pronto para o consumo. *Bifidobacterium* são filogeneticamente semelhantes e com exigências nutricionais similares às bactérias das culturas iniciadoras utilizadas na fermentação de produtos lácteos o que dificulta a enumeração deste probiótico em meios de cultura seletivos.

Portanto, técnicas seguras e confiáveis para enumeração seletiva de probióticos são requeridas.

Tradicionalmente, bactérias lácticas são contadas em ágar MRS (De Man, Rogosa, Sharpe), mas este meio não é seletivo para bactérias probióticas em presença dos micro-organismos da cultura iniciadora. A enumeração seletiva do probiótico depende, dentre outros fatores, da formulação do meio de cultura, tempo, temperatura e atmosfera de incubação (LIMA *et al.*, 2009).

A literatura apresenta diversos meios seletivos e diferenciais para a enumeração de *Bifidobacterium* em presença dos micro-organismos da cultura iniciadora (CASTEELE *et al.*, 2006; DAVE & SHAH, 1996; FACHIN *et al.*, 2008; LIMA *et al.*, 2009; RYBKA & KAILASAPATHY, 1996; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004; VINDEROLA & REINHEIMER, 1999). Meios diferenciais não são indicados para contagem seletiva de probióticos pois a morfologia da colônia nem sempre é uma característica fenotípica estável e por esse motivo meios seletivos são recomendados (CASTEELE *et al.*, 2006).

Os principais meios seletivos para enumeração de bifidobactérias em presença da cultura iniciadora descritos na literatura utilizam como base o meio ágar MRS adicionado de agentes inibidores. A composição destes meios seletivos está apresentada no Quadro 3. A função da cisteína na formulação de alguns meios de cultura é a redução do potencial de oxidação-redução do meio e consequentemente proporcionar condições anaeróbicas para o crescimento de bifidobactérias (ROY, 2001). Vários pesquisadores também avaliaram a troca da glicose na formulação do ágar MRS por outros açúcares, para enumeração seletiva de *Bifidobacterium*. Rybka & Kailasapathy (1996) ao avaliarem o meio M-MRS (Maltose-MRS), obtiveram altas porcentagens de recuperação de *B. breve*, *B. infantis* e *B. bifidum*, sendo a maltose indicada para a substituição da glicose na formulação do meio.

Apesar da variedade dos meios de cultura disponíveis na literatura, a escolha do meio para enumeração seletiva do probiótico, depende fortemente da matriz alimentar, do micro-organismo alvo e/ou linhagem do probiótico e também da composição e taxonomia das bactérias da cultura iniciadora presente no produto. Como consequência, a escolha do meio seletivo deve ser estabelecida caso-a-caso, não podendo ser padronizada para todas as aplicações (CASTEELE *et al.*, 2006).

QUADRO 3

Principais meios seletivos usados para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* na presença dos micro-organismos da cultura iniciadora

Designação	Agentes inibidores	Composição do meio g L ⁻¹	Referências
B-MRS	Sais biliares	Sais biliares1,5	Vinderola & Reinheimer, 2000. Talwalkar & Kailaspathy, 2004
G-MRS	Gentamicina	Gentamicina0,03	Lima <i>et al.</i> , 2009
GB-MRS	Sais biliares Gentamicina	Sais biliares0,2 Gentamicina.....0,03 Cisteína.....0,5	Lima <i>et al.</i> , 2009 Vinderola & Reinheimer, 1999
LP-MRS	Cloreto de lítio Propionato de sódio	Cloreto de lítio2,0 Propionato de sódio.....3,0 Cisteína1	Lima <i>et al.</i> , 2009
D-MRS	Dicloxacilina Cloreto de lítio	Dicloxacilina0,0005 Cloreto de lítio1,1 Cisteína0,5	Lima <i>et al.</i> , 2009 Vinderola & Reinheimer, 1999
NPNL-MRS	Ácido nalidíxico Sulfato de paromomicina Sulfato de neomicina Cloreto de lítio	Ácido nalidíxico0,75 Sulfato de paromomicina 0,01 Sulfato de neomicina0,005 Cloreto de lítio0,15	Vinderola & Reinheimer, 1999
BSM-MRS	Mupirocina	Mupirocina.....0,05 Cisteína.....0,5	Simpson <i>et al.</i> , 2004
M-MRS		Maltose.....20	Rybka & Kailaspathy, 1996

2.2.4 Efeitos benéficos à saúde humana atribuídos à ação de bifidobactérias

Diversos benefícios à saúde têm sido atribuídos às bactérias probióticas. Estudos indicaram potenciais benefícios à saúde relacionados as bifidobactérias como estabelecimento de microbiota saudável em prematuros, estimulação do sistema imune, redução do colesterol, redução da intolerância à lactose, prevenção de diarreia e prevenção do câncer (RUSSEL *et al.*, 2011). No Brasil, a maioria dos iogurtes e leites fermentados probióticos contêm as bactérias *L. acidophilus* e *B. animalis*. Como já citado anteriormente, os benefícios de saúde atribuídos às bactérias probióticas são altamente dependentes da linhagem (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Portanto, torna-se imprescindível a pesquisa de novas linhagens probióticas para desenvolvimento de novos produtos com o objetivo de atender à crescente demanda por produtos funcionais (GRANATO *et al.*, 2010).

2.2.5 *Bifidobacterium longum* 5^{1A}

Bifidobacterium é considerado um dos gêneros mais seguros para utilização em alimentos. O risco de infecção de consumidores saudáveis causado pela ingestão de produtos adicionados de bifidobactérias é extremamente baixo. Entretanto, como nenhuma bactéria viva pode ser considerada totalmente segura, uma vez que a interação com o hospedeiro é específica de cada linhagem, torna-se imprescindível a identificação de novas linhagens probióticas com claras evidências de segurança (resistência a antibióticos e/ou outros fatores de patogenicidade) e também benefícios à saúde (MEILE *et al.*, 2008).

Quatro espécies de bifidobactérias com potencial probiótico foram isoladas das fezes de crianças saudáveis - *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium pseudolongum* 119^{1A} e *Bifidobacterium bifidum* 162^{2A} - e caracterizadas no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do ICB, UFMG (GOMES, 2005). Para a seleção da linhagem de *Bifidobacterium* com maior potencial probiótico, dentre as quatro espécies isoladas, foram avaliados aspectos tecnológicos (velocidade de crescimento *in vitro* e tolerância ao oxigênio), de segurança (perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos), funcionais (perfil de hidrofobicidade da parede celular) e fisiológicos (atividade antagonista contra patógenos) para o desenvolvimento de alimentos probióticos. Dentre as quatro

espécies isoladas, *B. longum* 5^{1A} apresentou melhor crescimento *in vitro* e foi sensível a uma ampla relação de antimicrobianos, exceto a neomicina. Esta espécie também apresentou maior espectro de inibição de patógenos. Com relação à tolerância ao oxigênio, as quatro bifidobactérias comportaram-se de maneira similar. O perfil de hidrofobicidade da parede celular é uma medida qualitativa da capacidade de aderência do probiótico à mucosa intestinal. *B. bifidum* 162^{2A} apresentou a maior probabilidade de adesão ao epitélio intestinal pela alta hidrofobicidade demonstrada em relação às outras três espécies avaliadas. Adicionalmente, *B. longum* 5^{1A} instalou-se rapidamente no trato gastrointestinal de camundongos isentos de germes, atingindo níveis populacionais elevados nas fezes desses animais, indicando ser capaz de resistir a condições adversas do trato gastrointestinal (SOUZA, 2012). Essa espécie também demonstrou ser efetiva contra constipação em estudos clínicos com crianças e adolescentes (GUERRA *et al.*, 2011). Portanto, os resultados mostraram que entre as quatro espécies de bifidobactérias avaliadas, *B. longum* 5^{1A} apresentou o melhor potencial para ser usada como candidata ao uso como probiótico em alimentos funcionais (SOUZA, 2012).

Mazochi, (2009) avaliou a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} em iogurtes elaborados com leite de cabra. A contagem desta bactéria manteve-se entre 10⁷ e 10⁸ UFC.mL⁻¹ durante o período de 40 dias de armazenamento em temperatura de 4°C. Considerando-se a quantidade mínima de 10⁸ UFC de bactérias probióticas na recomendação diária do produto exigido pela legislação e a porção de 200 mL, em iogurtes de leite de vaca e bebidas lácteas fermentadas, a contagem mínima de 10⁶ UFC.mL⁻¹ não foi alcançada ao final de 28 dias de armazenamento (PEREIRA, 2012; SOUZA, 2012). Apesar da baixa estabilidade das células viáveis de *B. longum* 5^{1A}, o iogurte de leite de vaca adicionado desta linhagem mostrou-se efetivo na proliferação de células IgA⁺ no intestino delgado e grosso e proteção frente à infecção por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium em camundongos (SOUZA *et al.*, 2012). Portanto, para atendimento a legislação vigente, novas tecnologias devem ser exploradas para a produção de produtos com potencial probiótico empregando a linhagem de *B. longum* 5^{1A}.

2.3 Bebida láctea

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Bebida Láctea (BRASIL, 2005) esta bebida é definida como o produto lácteo resultante da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s), fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base láctea representa pelo menos 51% (massa/massa) do total de ingredientes do produto.

A bebida láctea fermentada, além de atender os requisitos para bebida láctea deverá ser fermentada mediante a ação de micro-organismos específicos e/ou adicionados de leite(s) fermentado(s) e que não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC g^{-1} , no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. Os valores exigidos para o grupo coliformes (30/35°C) e coliformes fecais (45°C) na bebida láctea fermentada estão apresentados no Quadro 5. Estes valores devem ser obtidos imediatamente após a fabricação do produto. O teor de proteínas de origem láctea deverá ser de 1,7 g/100 g da bebida (BRASIL, 2005).

QUADRO 4
Parâmetros microbiológicos para bebidas lácteas fermentadas

Microrganismos	Critério de aceitação	
Coliformes/mL (30/35°C)	n=5 m=10	c=2 M=100
Coliformes/mL (45°C)	n=5 m<3	c=2 M=10

n= número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote

c= número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M

m e M = limites de aceitação (UFC)

Fonte: BRASIL, 2005

A base utilizada para a produção de bebidas lácteas são fermentos compostos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*. (OLIVEIRA & DAMIN, 2003).

Estas bactérias promovem a acidificação do leite através da produção de ácidos orgânicos, especialmente ácido láctico. Produzem também ácido acético, etanol, compostos aromáticos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e muitas enzimas de importância. Desta forma, aumentam a vida de prateleira e a segurança do produto, melhoram a textura e contribuem para melhor aceitação do produto final (LEROY & VUYST, 2004).

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* crescem simbioticamente, interação conhecida como protocooperação. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* libera, a partir das proteínas lácteas, diversos aminoácidos e alguns peptídeos que estimulam o crescimento de *S. thermophilus*. Por sua vez, esta bactéria produz formiato durante o metabolismo da lactose e CO₂ a partir da ureia presente no leite. Os dois metabólitos estimulam o desenvolvimento do lactobacilo (ORDÓÑEZ, 2005). Segundo Settachaimongkon *et al.* (2014 a), a protocooperação entre os dois micro-organismos só é estabelecida quando na co-cultura utiliza-se linhagens não proteolíticas de *S. thermophilus* (St-Prt⁻). Os resultados desses pesquisadores sugerem que linhagens não proteolíticas de *S. thermophilus* (St-Prt⁻) beneficiam-se da atividade proteolítica da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, enquanto linhagens proteolíticas (St-Prt⁺) não são favorecidas por esta interação. A protocooperação resulta em contagem significativa das duas espécies de micro-organismos, rápida acidificação do leite, produção de quantidades expressivas de compostos voláteis e não voláteis desejáveis para obtenção de iogurtes com boas características sensoriais.

Algumas linhagens de *S. thermophilus* são capazes de produzir ácido láctico a partir do metabolismo da lactose até o pH do meio atingir 5,2. Para produtos com valores menores de pH, estas bactérias são utilizadas em co-cultura com outros micro-organismos. Entretanto, algumas linhagens apresentam grande capacidade de acidificação do leite e também alta atividade proteolítica. Linhagens com atividade proteolítica elevada (St-Prt⁺) crescem e acidificam mais rapidamente o leite (GALIA *et al.*, 2009; SHAHBAL *et al.*, 1993). Pesquisadores observaram que, ao final da fermentação do leite com culturas puras de *S. thermophilus*, a contagem de linhagens proteolíticas (St-Prt⁺) foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que linhagens não proteolíticas (St-Prt⁻) dessa bactéria. A velocidade de acidificação também foi duas vezes mais rápida em leite fermentado com linhagens proteolíticas de *S. thermophilus* (St-Prt⁺) (SETTACHAIMONGKON *et al.*, 2014 a).

O soro de leite, principal subproduto da indústria de laticínios, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de produtos lácteos devido ao seu alto valor nutritivo, sendo fonte de proteínas de alto valor biológico, tornando-se uma excelente fonte de proteína a um baixo custo (HÁ & ZEMEL, 2003). Durante a fabricação do queijo, a gordura e a caseína do leite são removidas, mantendo-se no soro as proteínas β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas, lactoferrina e transferrina, várias vitaminas hidrossolúveis, minerais e alto teor de lactose (PENNA *et al.*, 2009).

O soro pode ser classificado em três grupos: soro doce com acidez titulável entre 0,10 e 0,20% de ácido láctico, obtido em geral, a partir de queijos coagulados pela renina; soro meio ácido com acidez titulável entre 0,20 e 0,40%; soro ácido com acidez titulável acima de 0,40%. No Brasil, a produção de soro é quase que exclusivamente de soro doce (PENNA *et al.*, 2009).

A relação custo/benefício favorável é uma das principais razões para o uso do soro de leite em muitos alimentos, uma vez que os atributos qualitativos, como realce de sabor e a funcionalidade, justificam seu uso em qualquer tipo de fórmula (PENNA *et al.*, 2009). O soro apresenta uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 30 a 60g de O₂/L, representando um agente de poluição ambiental. No Brasil, o volume estimado da produção de queijos em 2011 foi de 867,1 mil toneladas o que resulta em aproximadamente 780 mil toneladas de soro de leite (PRODUÇÃO..., 2014). Desta forma, a bebida láctea é uma alternativa para a utilização do soro de leite, pois além de seu valor nutritivo, diminuiria o problema ambiental advindo do descarte do soro em cursos d'água.

Como já citado anteriormente o mercado de alimentos funcionais, especialmente de probióticos está em expansão, sendo o iogurte, no Brasil, o produto que mais desperta o desejo de compra do consumidor (FIESP & ITAL, 2010). A tecnologia de fabricação de bebidas lácteas é relativamente simples e o produto tem baixo custo (DAMIN *et al.*, 2009). Bebida láctea probiótica com elevada viabilidade de *B. longum* (10^8 UFC.mL⁻¹) após 21 dias de estocagem refrigerada e características sensoriais satisfatórias, foi desenvolvida por Zacarchenco & Massaguer-Roig (2004). A possibilidade de acesso à tecnologia pelos laticínios e a relativa simplicidade desta, torna o desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas com a adição de culturas probióticas bastante promissor (DAMIN *et al.*, 2009).

CAPÍTULO I

Influência de diferentes linhagens de
Streptococcus thermophilus isoladas de culturas
comerciais do iogurte na enumeração seletiva de
Bifidobacterium spp

RESUMO

Streptococcus thermophilus e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são microorganismos na produção de iogurtes e *Bifidobacterium* spp podem ser acrescentadas se propriedades probióticas forem esperadas. Em tais produtos, a enumeração de cada bactéria é uma tarefa difícil pois estas apresentam exigências nutricionais semelhantes. Por essa razão, não há método oficial e confiável para esta finalidade. O objetivo do presente estudo foi determinar o meio de cultura mais apropriado para a enumeração de quatro diferentes espécies de *Bifidobacterium* na presença de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolados de culturas comerciais e investigar a influência de linhagens distintas de *S. thermophilus* na escolha do meio. Dentre as onze amostras de *S. thermophilus* obtidas dessas culturas as quais foram submetidas a uma Reação em Cadeia da Polimerase baseado em Sequências Repetitivas (rep-PCR), nove apresentaram serem linhagens distintas. Para a enumeração seletiva das espécies de *Bifidobacterium*, os resultados foram influenciados pelas linhagens de *S. thermophilus* usadas, mas o meio MRS adicionado de sais biliares mostrou o melhor resultado para todas as espécies de *Bifidobacterium*.

Palavras-chave: *Bifidobacterium* spp, *Streptococcus thermophilus*, meio de cultura, seletividade

ABSTRACT

Streptococcus thermophilus and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* are microorganisms involved in the manufacture of yogurt, and *Bifidobacterium* spp. can be supplemented if probiotic properties are expected. In such products, enumeration of each bacterial component is a hard task since they have similar nutritional requirements. For this reason, there is still no official and reliable methodology for this purpose. The objectives of the present study were to evaluate the most appropriate culture medium for the enumeration of four different *Bifidobacterium* species in the presence of *S. thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from commercial cultures and investigate the influence of different strains of *S. thermophilus* on the choice of medium. Among eleven samples of *S. thermophilus* obtained from these cultures, and which were submitted to repetitive element sequence-based PCR (rep-PCR), nine showed to be distinct strains. For a selective enumeration of the *Bifidobacterium* species, results were influenced by *S. thermophilus* strain used, but a MRS medium containing bile salts showed the best results for all of the *Bifidobacterium* species.

Keywords: *Bifidobacterium* spp, *Streptococcus thermophilus*, culture media, selectivity

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a busca por produtos saudáveis tem aumentado consideravelmente. O mercado dos alimentos funcionais é dominado pelos produtos que influenciam a saúde intestinal e, dentre estes, os probióticos representam uma grande fatia desse mercado, especialmente as bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Leites fermentados e em especial o iogurte, contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover a saúde (SIRÓ *et al.*, 2008). Embora a contagem dos micro-organismos para garantia do efeito probiótico não esteja estabelecida de forma definitiva (RAEISI *et al.*, 2013), diversos estudos recomendam o mínimo de 10^6 UFC g^{-1} de células viáveis no produto final (SHAH, 2000; TRIPATHI & GIRI, 2014). Portanto, torna-se necessário a determinação do número de células viáveis do probiótico em produtos comerciais.

Uma ampla variedade de meios de culturas foi proposta na literatura para enumeração seletiva de bifidobactérias em presença da cultura do iogurte (CASTEELE *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2009; RYBKA & KAILASAPATHY, 1996; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004; VINDEROLA & REINHEIMER, 1999). Em alguns estudos foram utilizadas culturas iniciadoras comerciais distintas, mas a identificação das linhagens que compõem estas culturas e a influência destas na seleção do meio de cultura seletivo não foi estabelecida.

B. bifidum, *B. breve*, *B. longum* e *B. animalis* são as espécies de *Bifidobacterium* mais utilizadas para a produção de leites fermentados probióticos (ASHRAF & SHAH, 2011). Destaca-se o uso de *B. animalis subsp lactis* BB 12, pois características desejáveis tais como a não alteração na aparência, sabor e textura dos alimentos e manutenção da sua viabilidade durante a vida de prateleira são obtidas na produção de alimentos (MÖLLER & DE VRESE, 2004). Outro aspecto de suma importância é a procura por novas linhagens de *Bifidobacterium* com potencial probiótico, o que contribuirá no desenvolvimento de novos produtos funcionais não existentes no mercado e inovação tecnológica. De acordo com Vinderola e colaboradores (2011), o desafio hoje é cada vez mais específico: uma determinada linhagem, em um alimento específico, administrado durante um dado período de tempo é capaz de conferir um efeito benéfico específico à saúde.

As culturas iniciadoras disponíveis no mercado são utilizadas para fornecerem diversas características tecnológicas aos produtos fermentados como textura, sabor e viscosidade. Linhagens distintas dos micro-organismos, especialmente *S. thermophilus*, podem estar presentes em uma mesma cultura comercial ou entre culturas diferentes do mesmo fabricante para proporcionar características diferenciadas aos produtos. Giraffa e colaboradores (2001) identificaram uma ampla variedade de linhagens de *S. thermophilus* em diversos produtos de laticínios. Este fato deve ser considerado na escolha do meio de cultura, pois a resposta do meio é dependente da linhagem do probiótico (VINDEROLA *et al.*, 2011) associada a capacidade de inibição da cultura iniciadora.

Quatro espécies de bifidobactérias com potencial probiótico - *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium pseudolongum* 119^{1A} e *Bifidobacterium bifidum* 162^{2A} – foram isoladas das fezes de crianças saudáveis e caracterizadas no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (GOMES, 2005). Pereira (2012) avaliou a taxa de recuperação destas quatro espécies de *Bifidobacterium* em diversos meios de cultura seletivos recomendados na literatura. O presente estudo teve como objetivo avaliar:

1. A eficácia dos meios de cultura seletivos que apresentaram alta taxa de recuperação das bifidobactérias, definido por Pereira (2012), na enumeração seletiva de *Bifidobacterium* na presença de diferentes culturas iniciadoras.
2. A presença de linhagens distintas de *S. thermophilus* por rep-PCR nas culturas iniciadoras, seguida da análise da influência destas linhagens na enumeração seletiva de *Bifidobacterium*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Culturas microbianas

As culturas iniciadoras utilizadas foram classificadas em três grupos conforme apresentadas no Quadro 1: culturas comerciais liofilizadas mistas contendo os microorganismos *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; culturas comerciais liofilizadas puras de *Streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; culturas puras congeladas de *Streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. As culturas puras congeladas ST NCDO 1968 (SAT) e LB NCDO 1489 (LAT) foram adquiridas de Coleção de Cultura (Fundação André Tosello) e as demais foram isoladas de culturas comerciais.

As culturas puras congeladas de *S. thermophilus* foram mantidas a -80°C em ultra-freezer em caldo M17 (Difco, EUA) adicionado de 0,5% de lactose (p/v) e de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em caldo MRS (Acumedia, Lansing, EUA), ambas adicionadas de 20% (v/v) de glicerol estéril até o momento do uso. As culturas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foram descongeladas e ativadas empregando os mesmos caldos já descritos. Para isto, transferiu-se 1mL de cada cultura para 10 mL do respectivo caldo e incubou a 40°C por 24 horas.

As culturas classificadas como culturas comerciais liofilizadas, mistas ou puras, dos tipos DVS (direct vat system) ou DVI (direct-to-vat inoculation) foram preparadas diluindo-se assepticamente o conteúdo do sachê em 1 litro de leite (Molico, Nestlé, Brasil) reconstituído a 12% (p/v) previamente tratado a 100°C / 25 minutos, resfriado a 5°C, e em seguida distribuída em tubos de ensaios estéreis com tampas rosqueáveis e congelados a -18°C até o momento do uso. Os tubos foram descongelados e em seguida mantidos a 40°C por 30 minutos.

QUADRO 1
Origem e composição bacteriana das culturas congeladas e liofilizadas usadas neste estudo

Culturas mistas liofilizadas			
Culturas	Identificação das amostras	Espécies	Origem
YoFlex L 812 (DVS)	L 812	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Christian Hansen, Dinamarca
YoFlex Harmony 1.0 (DVS)	Harmony	<i>S. thermophilus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Christian Hansen, Dinamarca
Culturas puras liofilizadas			
LB 340 (DVI)	LB 340	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	DaniscoDupont, França
TA 40 (DVI)	TA 40	<i>S. thermophilus</i>	DaniscoDupont, França
Culturas puras congeladas			
ST NCDO 1968	SAT	<i>S. thermophilus</i>	Fundação André Tosello, Brasil
LB NCDO 1489	LAT	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Fundação André Tosello, Brasil
Isolados da cultura pura TA 40	SC1, SC2, SC4, SC5	<i>S. thermophilus</i>	DaniscoDupont, França
Isolados da cultura mista YoFlex 702	ST1, ST3, ST4, ST5	<i>S. thermophilus</i>	Christian Hansen, Dinamarca
Isolados da cultura mista YoFlex L 812	SB1	<i>S. thermophilus</i>	Christian Hansen, Dinamarca

2.2 Diferenciação das linhagens de *Streptococcus thermophilus*

Para diferenciação das linhagens de *S. thermophilus* foram isoladas cinco colônias identificadas como ST1, ST3, ST4, ST5 e ST6 da cultura mista YoFlex 702 da Christian Hansen e uma colônia, SB1, da cultura mista YoFlex L-812 do mesmo fabricante. Outras quatro colônias denominadas SC1, SC2, SC4 e SC5 foram isoladas da cultura pura TA 40 da DaniscoDupont. A colônia SAT foi isolada da cultura pura fornecida pela Fundação André Tosello. As culturas associadas à cada fabricante estão apresentadas no Quadro 1. A confirmação da identificação da espécie *S. thermophilus* isolado das culturas mistas da Christian Hansen foi realizada por meio de testes morfotintórias (Gram) e testes moleculares. Para isto, o DNA extraído das BAL (bactérias ácido lácticas) foi submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 16S do gene do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') segundo Lane (1991).

A diferenciação genotípica entre linhagens pertencentes a uma mesma espécie foi realizada pela metodologia descrita por Gevers e colaboradores (2001). Os isolados foram submetidos a uma Reação em Cadeia da Polimerase baseado em Sequencias Repetitivas (rep-PCR) utilizando o oligonucleotídeo (GTG)₅ como primer ((GTG)₅-PCR). Após amplificação os produtos foram resolvidos em gel de agarose (2,0%) e visualizados em transiluminador UV Easydoc 100 (BioAgency, São Paulo, Brasil), após coloração com brometo de etídio.

Os perfis de DNA obtidos pelo (GTG)₅-PCR foram analisados pelo programa BioNumerics V6.5 (AppliedMaths, Kortrijk, Bélgica). Os valores de similaridade genética calculadas pelo coeficiente de Pearson foram utilizados para gerar um dendrograma de similaridade pelo método UPGMA.

Após este procedimento os isolados ST3 e ST6, SC4 e SC5, SB1 e SAT foram selecionados para realização dos testes em meios de cultura seletivos para a enumeração de *Bifidobacterium*. As culturas comerciais liofilizadas também foram incluídas no teste de meio de cultura. Duas linhagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, LB 340 (DaniscoDupont) e LAT (Fundação André Tosello), foram introduzidas para complementação do teste do meio de cultura, uma vez que estes

micro-organismos são utilizados em associação com *S. thermophilus* na produção de leite fermentado.

2.3 Seleção do meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para avaliação da eficácia destes na enumeração seletiva das espécies *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *Bifidobacterium breve* 110^{1A}, *Bifidobacterium pseudolongum* 119^{1A}, *Bifidobacterium bifidum* 162^{2A} na presença de diferentes culturas iniciadoras estão descritos no Quadro 2. Esses meios foram escolhidos por apresentarem alta taxa de recuperação das quatro espécies de bifidobactérias avaliadas, como pode ser observado na Tabela 1, definido em estudo anterior por Pereira (2012).

QUADRO 2

Meios de cultura usados neste estudo para a avaliação da eficácia destes na enumeração seletiva de *B. longum* 5^{1A}, *B. breve* 110^{1A}, *B. pseudolongum* 119^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A} na presença de diferentes culturas iniciadoras

Meios	Agentes seletivos (g l ⁻¹)	Referências
B-MRS	Sais biliares0,5	*Vinderola & Reinheimer, 2000
	Cisteína.....1	*Talwalkar & Kailasapathy, 2004
G-MRS	Gentamicina.....0,02	*Lima <i>et al.</i> , 2009
LP-MRS	Cloreto de lítio.....2,0	Vinderola & Reinheimer, 2000
	Propionato de sódio.....3,0	Talwalkar & Kailasapathy, 2004
	Cisteína.....1 g	
M-MRS	Maltose.....20	Rybka & Kailasapathy, 1996

* A concentração dos agentes inibidores foi adaptada desta referência
Fonte: PEREIRA, 2012

A taxa de recuperação das bifidobactérias foi determinada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Taxa de recuperação} = \frac{\text{CMS}}{\text{CMR}} \times 100 \quad (1)$$

na qual CMS é a contagem dos micro-organismos em UFC mL⁻¹ no meio seletivo e CMR no meio de referência (BERNAL, 2004). O ágar MRS foi usado como meio de referência para a contagem de *Bifidobacterium* (PEREIRA, 2012).

Para elaboração dos meios seletivos, o ágar MRS foi usado como meio base adicionados dos seguintes inibidores: sais biliares (Difco nº.3, Detroit, E.U.A), gentamicina (Neoquímica, Goiás, Brasil), associação de cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e propianato de sódio (Sigma, St. Louis, EUA). Os inibidores sais biliares e gentamicina foram dissolvidos em água destilada e esterilizados por filtração (filtro Millipore, tipo HA, 0,45 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Cloreto de lítio e propianato de sódio foram adicionados ao ágar MRS e esterilizados à 121°C por 15 minutos. O meio modificado Maltose foi preparado utilizando-se todos os ingredientes do ágar MRS, com exceção da glicose que foi substituída em quantidades equivalentes pela maltose (Merck Darmstadt, Germany). Este açúcar foi dissolvido em água destilada, esterilizado por filtração e adicionado asepticamente ao meio autoclavado previamente resfriado a 50°C na concentração de 2 % (p/v).

TABELA 1

Contagem de células (\log_{10} UFC mL⁻¹) e taxa de recuperação (%) de *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} nos diferentes meios seletivos

Meio cultura	Contagem células / Taxa de recuperação de <i>Bifidobacterium</i> spp							
	<i>B. longum</i> 5 ^{1A}		<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}		<i>B. breve</i> 110 ^{1A}		<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	
	Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação
MRS	8.69 ^a		8.39 ^a		8.44 ^a		8.52 ^a	
B-MRS	8.38 ^a	96.43	7.92 ^a	94.32	8.38 ^a	99.33	8.31 ^a	97.57
LP-MRS	8.99 ^a	103.41	8.39 ^a	100	8.95 ^a	106.04	8.54 ^a	100.27
M-MRS	8.72 ^a	100.31	8.46 ^a	100.79	8.92 ^a	105.69	8.42 ^a	98.83
G-MRS	7.95 ^a	91.52	8.41 ^a	100.20	7.65 ^a	90.68	7.66 ^a	89.94

B: sais biliares e cisteína; G: gentamicina; LP: cloreto de lítio, propionato de sódio e cisteína; M: maltose

^{a, b} Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Dunnet ($p < 0.05$)

Fonte: PEREIRA, 2012

2.4 Análise quantitativa

As bactérias constituintes das culturas iniciadoras foram enumeradas nos meios de referência e também nos meios seletivos descritos no Quadro 2. O ágar MRS foi usado como referência para a contagem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e o meio M 17 adicionado de 0,5% lactose (p/v) para a contagem de *S. thermophilus*. O ágar MRS também foi usado para a contagem de bactérias lácticas totais (*S. thermophilus* + *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) em culturas mistas (Lima *et al.*, 2009).

Para a contagem das células viáveis das bactérias das culturas iniciadoras foi feita diluição seriada das culturas ativadas e plaqueamento nos referidos meios. Deste modo, 1mL de cada cultura ativada (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ou lácticas totais) foi adicionada à 9 mL de água peptonada estéril (0,1% p/v) e submetido a diluições seriadas decimal. As placas com os meios de referência foram incubadas a 40°C em estufa, por 48 horas em microaerofilia. As placas com os meios seletivos foram incubadas a 37°C, por 72 horas em anaerobiose usando gerador de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil).

A taxa recuperação dos micro-organismos foi determinada de acordo com a Equação 1.

2.5 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a diferença entre as médias das contagens ($\log \text{UFC mL}^{-1}$) foram obtidas através do teste de Tukey considerando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Discriminação genotípica das linhagens de *Streptococcus thermophilus*

A análise do dendograma gerado a partir do padrão de bandas obtido pela técnica de DNA *fingerprinting* demonstrou claramente a formação de dois clusters distintos, um contendo as amostras ST4, SAT, ST5 e SC4 e outro contendo as amostras ST1, ST6, SC2, SC5, SC1, ST3 e SB1 (Figura 1). As amostras no primeiro cluster exibiram significativa variação no número e na posição de bandas sendo assim, consideradas linhagens diferentes. No segundo cluster as amostras ST1, ST6; ST3 e SB1 também foram consideradas linhagens diferentes entre si. Já as amostras SC2, SC5 e SC1 apresentaram mínima diferença qualitativa e nenhuma variação quantitativa no padrão de bandas e, portanto, podem ser descritas como uma mesma linhagem. Logo, das onze amostras inicialmente obtidas, foram detectadas nove linhagens diferentes de *S. thermophilus*: ST4, SAT, ST5, SC4, ST1, ST6, ST3, SB1 e o grupo SC1, SC2 e SC5.

As amostras (SC2, SC5 e SC1) obtidas da mesma cultura comercial TA 40 da DaniscoDuPont, foram agrupadas como linhagens semelhantes e a amostra SC4 apesar de obtida do mesmo produto, foi inserida em outro cluster. Isto confirma a presença de diferentes linhagens pertencentes a espécie de *S. thermophilus* na mesma cultura comercial TA 40. O fabricante descreve este produto como uma mistura de linhagens selecionadas e cuidadosamente escolhidas e combinadas para atender às necessidades específicas.

As amostras ST3 e SB1 foram isoladas das culturas comerciais YoFlex 702 e YoFlex L 812, respectivamente, ambas do mesmo fornecedor (Christian Hansen). Estas amostras foram identificadas como linhagens distintas entre si. Estes dados confirmam a presença de diferentes linhagens de *S. thermophilus* em culturas comerciais distintas, porém do mesmo fabricante. A amostra SAT foi identificada como diferente de todas as linhagens estudadas.

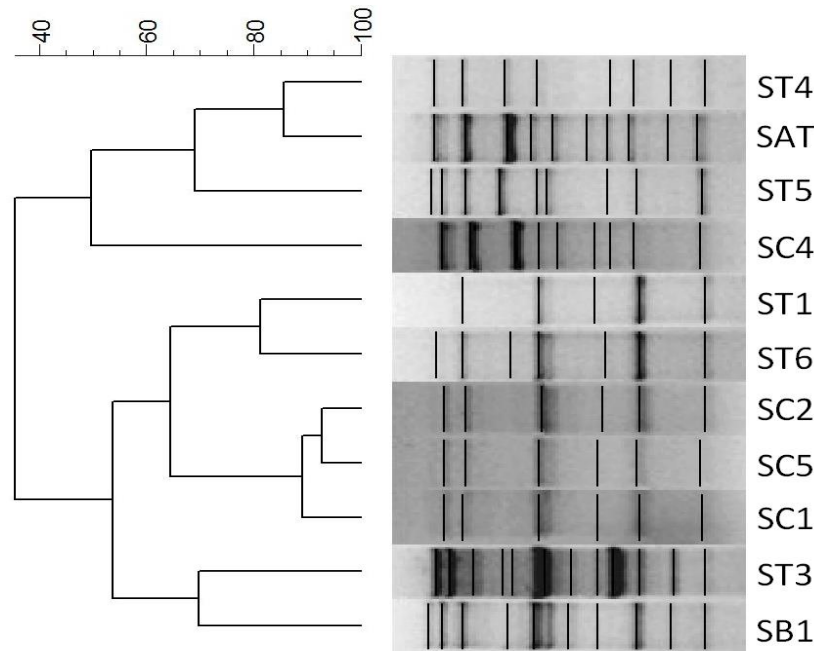


FIGURA 1: Dendrograma de amostras de *Streptococcus. thermophilus* isoladas de culturas comerciais

As amostras ST1, ST3, ST4 e ST5 foram isoladas da cultura mista YoFlex 702; amostra SB1 foi isolada da cultura mista YoFlex L812; amostras SC1, SC2, SC4 e SC5 foram isoladas da cultura pura TA 40

3.2 Recuperação dos micro-organismos da cultura iniciadora

Meios diferenciais, baseados na diferença da morfologia das colônias das bactérias para a contagem dos micro-organismos de interesse, também são descritos na literatura. Contudo, este método é muito subjetivo e o uso de meios seletivos é altamente recomendável (CASTEELE *et al.*, 2006). As contagens das espécies *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sejam culturas iniciadoras puras ou mistas, em diferentes meios seletivos estão apresentadas na Tabela 2. Os dados mostraram que o número das células viáveis em culturas puras ou mistas varia em função do meio empregado e da linhagem avaliada. Para inibição de *S. thermophilus* os meios B-MRS e M-MRS apresentaram os melhores resultados e para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* os meios B-MRS, LP-MRS e G-MRS. Para as bactérias da cultura mista L 812 houve redução na contagem de até 4 logs nos meios B-MRS e G-MRS e para a cultura Harmony de apenas 1,4 log no meio B-MRS, ambas do fabricante Christian Hansen.

TABELA 2
Contagem de células (\log_{10} UFC ml^{-1}) e taxa de recuperação (%) de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nos diferentes meios seletivos

Contagem de células/Taxa de recuperação de <i>S.thermophilus</i> e <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>											
Meios de cultura seletivos											
		M17	MRS	LP-MRS		Bile-MRS		M-MRS		G-MRS	
		Cont. células		Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação	Cont. células	Taxa recuperação
<i>S. thermophilus</i>	TA 40	8,19 ^a		7,02 ^{a,b}	86	*3,30 ^b	40	<1,00	0	7,60 ^a	93
	SC4	7,80 ^a		7,32 ^b	94	<1,00	0	<1,00-	0	6,49 ^c	83
	SC5	8,03 ^a		7,54 ^b	94	<1,00	0	<1,00-	0	6,95 ^c	87
	ST3	7,46		<1-	0	<1,00	0	<1,00-	0	<1,00	0
	ST6	8,43 ^a		6,57 ^b	78	<1,00	0	8,81 ^a	105	7,61 ^{a,b}	90
	SB1	9,16 ^a		7,19 ^b	78	7,18 ^b	78	9,10 ^{a,b}	99	7,30 ^{a,b}	80
	SAT	8,59 ^a		8,46 ^a	98	8,53 ^a	99	8,94 ^a	104	8,66 ^a	101
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	LB 340		6,72 ^a	<1,00	0	<1,00	0	6,03 ^a	90	<1,00	0
	LAT		9,09 ^a	7,29 ^b	80	7,80 ^{a,b}	86	7,70 ^{a,b}	85	<1,00	0
Culturas mistas	L 812		9,04 ^a	8,22 ^a	91	4,53 ^b	50	7,59 ^a	84	4,88 ^b	54
	Harmony		7,32 ^a	7,39 ^a	101	5,85 ^a	80	6,91 ^a	94	6,14 ^a	84

LP: cloreto de lítio, propionato de sódio e cisteína; B: sais biliares e cisteína; M: maltose; G: gentamicina

^{a, b} Médias na mesma linha seguidas por letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$)

* Colônias puntiformes

A contagem das linhagens SC4 e SC5 de *S. thermophilus* da mesma cultura, TA 40, foram semelhantes e das linhagens ST3 e ST6 da mesma cultura, YoFlex 702, foram divergentes. Todos os meios seletivos avaliados inibiram a amostra ST3, mas apenas o meio B-MRS inibiu a amostra ST6. Para as linhagens da cultura YoFlex L 812 os resultados também divergiram. No meio B-MRS, para a amostra SB1 houve redução na contagem de apenas 1 log em relação ao meio de referência e de aproximadamente 4 logs para a cultura L 812. Portanto, evidencia-se a relação entre a capacidade de inibição de *S. thermophilus* pelos meios de cultura e as linhagens desta bactéria presentes nas culturas comerciais.

A presença de várias linhagens de *S. thermophilus* nas culturas comerciais torna os produtos fermentados mais atrativos, pois estas apresentam vantagens tecnológicas para a elaboração desses alimentos. Muitas linhagens de *S. thermophilus* são produtoras de exopolissacarídeos que proporcionam textura e melhoram as características sensoriais dos produtos (FOLKENBERG *et al.*, 2005). Compostos voláteis que conferem aromas aos produtos fermentados se devem em grande parte ao tipo de cultura iniciadora usada. Além disto, a proporção de *S. thermophilus* para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* varia nas diferentes culturas comerciais o que proporciona taxas de pós acidificação distintas, sendo menor em culturas com maiores contagens de *S. thermophilus*. Culturas que fornecem menores taxas de pós acidificação são preferíveis para produtos contendo *Bifidobacterium*, pois estes probióticos são sensíveis à acidez. No entanto, cada linhagem presente nas culturas comerciais pode apresentar diferentes exigências nutricionais, o que dificulta a seleção de um meio universal para a enumeração do probiótico em alimento fermentado.

Na fabricação do iogurte, utiliza-se a combinação das bactérias lácticas *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para a fermentação. Portanto, torna-se imprescindível avaliar a taxa de recuperação de ambos os micro-organismos no mesmo meio de cultura. Como pode ser observado na Tabela 2, o meio B-MRS pode ser usado para enumeração seletiva das bifidobactérias estudadas quando se emprega a combinação das culturas puras de *S. thermophilus* TA 40, SC4, SC5, ST3 e ST6 com a cultura pura de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 ou também com a cultura mista L 812 pois, nesse meio, os micro-organismos das culturas iniciadoras apresentaram baixa taxa de recuperação. Apesar da inibição das bactérias não ter

sido completa no referido meio, com redução de 4 logs para TA 40 e L 812, as colônias apresentaram-se puntiformes. Portanto, o meio B-MRS apresentou o melhor resultado entre os meios avaliados, com baixas taxas de recuperação para ambos os microrganismos da cultura iniciadora, puras ou mistas. O mesmo foi relatado por Sohrabvandi e colaboradores (2012) quando avaliaram a eficácia do meio B-MRS para enumeração de bifidobactérias em presença da cultura do iogurte. Porém, no presente estudo, a concentração de sais biliares foi reduzida para manutenção da alta taxa de recuperação das linhagens de bifidobactérias pesquisadas. Contrariamente, Lima e colaboradores (2009) verificaram que não foi necessária a redução de sais biliares quando a linhagem de *Bifidobacterium animalis* BB12 foi utilizada. Deste modo, para a preparação do meio B-MRS, em um estudo preliminar, a concentração adequada de sais biliares deve ser determinada para cada linhagem probiótica avaliada.

O meio G-MRS pode ser empregado em produtos fermentados utilizando a combinação de *S. thermophilus* ST3 com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 e/ou LAT. Para a cultura mista Harmony não foi possível a escolha de um meio seletivo, uma vez que esta cultura iniciadora não foi inibida de modo satisfatório.

Vários estudos apontam o meio LP-MRS como seletivo para bifidobactérias na presença de cultura iniciadora. Pinto e colaboradores (2012) usaram este meio para contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB 12 em iogurte e Castro e colaboradores (2009) em bebidas lácteas fermentadas. Utilizando esse mesmo meio foram enumeradas outras espécies como *B. bifidum* (KRASAEKOOPT *et al.*, 2006), *B. longum* (SOUZA *et al.*, 2012) e *B. lactis* (KAILASAPATHY, 2006) em iogurte. O meio LP-MRS é indicado para avaliação como um possível meio seletivo para enumeração de bifidobactérias. No entanto, neste trabalho, o meio LP-MRS foi capaz de inibir apenas a linhagem de LB 340.

4. CONCLUSÃO

Na literatura é relatado que a escolha do meio seletivo para enumeração de *Bifidobacterium* na presença da cultura iniciadora é dependente das linhagens do probiótico presentes no produto. No entanto, neste estudo concluiu-se que a escolha do meio seletivo é também dependente das linhagens dos micro-organismos da cultura iniciadora. Adicionalmente, culturas iniciadoras comerciais podem conter várias linhagens de *S. thermophilus* em suas formulações com diferentes exigências nutricionais e sensibilidade à agentes inibidores, o que dificulta a escolha de um meio de cultura seletivo. Por esta razão, uma vez definido o meio para enumeração seletiva de uma determinada linhagem de *Bifidobacterium* na presença de uma cultura específica do iogurte, este resultado não poderá ser extrapolado para outras culturas, ainda que esta seja do mesmo fabricante. No presente estudo, o meio de cultura B-MRS apresentou o melhor resultado, para a contagem de espécies de *Bifidobacterium* na presença das linhagens das culturas iniciadoras estudadas, mas somente depois de se ajustar a concentração dos sais biliares.

CAPÍTULO II

Influência de diferentes métodos de processamento de bebidas lácteas fermentadas na viabilidade de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e BL05 durante a fermentação e o armazenamento

RESUMO

O mercado de alimentos e bebidas ligados à saúde e bem-estar está em franca expansão. Nesta categoria de produtos sobressaem-se os alimentos funcionais, e dentre estes, os probióticos. Bifidobactérias são amplamente utilizadas como probióticos em vários tipos de alimentos. Entretanto, fatores como interações com bactérias lácticas, condições de fermentação, momento de adição do probiótico e pH do produto afetam a viabilidade desses micro-organismos. A legislação brasileira exige a quantidade mínima de 10^8 UFC de células probióticas viáveis na recomendação diária do produto pronto para o consumo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade das linhagens de *B. longum* 5^{1A} e BL05 em bebidas lácteas fermentadas, obtidas por diferentes métodos de fermentação. As bebidas lácteas produzidas foram adicionadas de cultura de *Bifidobacterium* liofilizada ou congelada e fermentadas com diferentes culturas iniciadoras (co-cultura de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Lb 340) + *Streptococcus thermophilus* (St-TA40); *S. thermophilus* St-TA40; *S. thermophilus* St1). A adição das bifidobactérias se deu em dois momentos do processamento, no início e no final da fermentação. A atividade proteolítica das diferentes linhagens de *S. thermophilus* também foi analisada. A cultura St1 apresentou menor atividade proteolítica, menor capacidade de acidificação e conseqüentemente maior tempo de fermentação, bem como menor taxa de pós acidificação das bebidas lácteas fermentadas, em relação à cultura St-TA40. O emprego de cultura congelada e ativada em caldo MRS em relação à cultura liofilizada proporcionou maior viabilidade das células de *B. longum* BL05 durante a estocagem refrigerada. O momento mais adequado para adição das linhagens de *B. longum* foi no início da fermentação, pois neste grupo de bebidas, o tempo de fermentação foi significativamente menor ($p < 0,05$), em relação às acrescentadas de bifidobactérias no final da fermentação, nas bebidas produzidas com as culturas de *S. thermophilus*, ST-TA40 ou St1. Não houve alteração do tempo de fermentação e sobrevivência das bifidobactérias nas bebidas lácteas fermentadas com a co-cultura St-TA40+Lb340, independentemente do momento de adição das diferentes linhagens de *B. longum*. A linhagem de *B. longum* 5^{1A} mostrou-se menos resistente às condições de estresse que a linhagem BL05. Mesmo nas bebidas fermentadas com St1, de baixa

acidez, a contagem de 10^6 UFC.mL⁻¹ de *B. longum* 5^{1A} foi alcançada apenas até o 7º dia de estocagem, enquanto que para a linhagem BL05, esta contagem foi assegurada até o 21º dia. Além da acidez, outros fatores, como possivelmente o teor de oxigênio dissolvido no produto, contribuíram para a baixa viabilidade da linhagem 5^{1A} durante o período de armazenamento das bebidas lácteas.

Palavras-chave: *Bifidobacterium*, culturas iniciadoras, viabilidade, processamento, estocagem

ABSCTRAT

The market for food and beverage related to health and wellness is booming. In this product category, functional foods stand out, especially the probiotics. Bifidobacterias are widely used as probiotics in various types of foods. However, factors such as interactions with lactic acid bacteria, fermentation conditions, moment of addition of the probiotic and product pH affect the viability of these microorganisms. The Brazilian law requires the minimum amount of 10^8 UFC of viable probiotic cells in the daily recommendation of the product at the time of consumption. The present study aimed to evaluate the viability of strains of *B. longum* 5^{1A} and BL05 in fermented dairy beverages, obtained by different fermentation methods. Lyophilized or frozen *Bifidobacterium* culture was added to fermented dairy beverages produced with different compositions of starter cultures (co-culture of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Lb 340) + *Streptococcus thermophilus* (St-TA40); *S. thermophilus* St-TA40; *S. thermophilus* St1). The addition of bifidobacteria was done in two stages of processing, at the beginning and in the end of fermentation. The proteolytic activity of *S. thermophilus* strains was also analysed. The St1 strain showed lower proteolytic activity and lower acidification capacity, which resulted in a longer fermentation time, as well as in a lower rate of post acidification of fermented dairy beverages when compared to the St-TA40 culture. The use of the frozen culture activated in MRS broth compared to the use of the lyophilized culture provided higher cell viability of *B. longum* BL05 during refrigerated storage. The most appropriate time for addition of *B. longum* strains was at the beginning of fermentation, because the fermentation time was significantly lower ($p < 0.05$) in comparison with the time when bifidobacteria was added in the end of the fermentation, for beverages produced with the cultures of *S. thermophilus*, ST-TA40 or St1. However, the moment of addition of both strains of *B. longum* did not alter the fermentation time and the survival of the bifidobacteria in fermented dairy beverages with the co-culture St-TA40+Lb340. The *B. longum* 5^{1A} strain was less resistant to stress conditions than the strain BL05. Even in fermented beverages with St1, of low acidity, the count of 10^6 CFU.mL⁻¹ of *B. longum* 5^{1A} was only achieved until the 7th day of storage, whereas for BL05 strain, this count was maintained until the 21st day. Besides acidity, other factors such as dissolved oxygen

content in the product possibly contributed to the low viability of the 5^{1A} strain during the shelf life of fermented dairy beverages.

Keywords: *Bifidobacterium*, starter cultures, viability, processing, storage

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO / WHO, 2002). *Bifidobacterium* são micro-organismos amplamente utilizados como probióticos. Leites fermentados contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover a saúde. Produtos lácteos são indicados para adição de bactérias probióticas, pois apresentam vida de prateleira relativamente curta, são mantidos sob refrigeração, dispõem de todos os nutrientes para o crescimento de probióticos e são consumidos periodicamente (SIRÓ *et al.*, 2008). Bebida láctea fermentada é o produto resultante da mistura de leite e soro de leite, fermentada pela ação de cultivo de micro-organismos específicos. Neste contexto, o desenvolvimento de bebida láctea probiótica é uma alternativa para os laticínios sem que haja a necessidade de grandes investimentos.

A viabilidade e atividade de bifidobactérias podem ser afetadas durante todas as etapas do processamento e armazenamento dos alimentos. Ainda, a sobrevivência de *Bifidobacterium* durante a etapa de processamento não garante a sua viabilidade durante a estocagem (CHAMPAGNE *et al.*, 2005). Fatores como tipo de matriz, oxigênio dissolvido, acidez e pH, reidratação de células liofilizadas, interações com bactérias lácticas, temperatura de fermentação e armazenamento e tipo de embalagem afetam a viabilidade de probióticos (TRIPATHI & GIRI, 2014). *Bifidobacterium longum* de origem humana é ainda mais sensível às condições de estresse do que *B. animalis* ssp. *lactis*, subespécie mais utilizada em formulações probióticas (ABE *et al.*, 2009; MASCO *et al.*, 2005). É recomendável o uso de bactérias probióticas de origem humana em alimentos, uma vez que o efeito benéfico proporcionado pelo probiótico é maior quando o micro-organismo encontra-se em ambiente similar ao qual foi isolado (ANTUNES *et al.*, 2007; SAARELA *et al.*, 2000).

O pH dos alimentos parece ser o fator mais crítico para a estabilidade dos micro-organismos probióticos, especialmente bifidobactérias, durante o armazenamento (CHAMPAGNE *et al.*, 2005; SHIHATA & SHAH, 2002). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produz ácido láctico durante a estocagem refrigerada, processo conhecido como pós-acidificação, o que pode contribuir para a redução da

viabilidade de bifidobactérias. Uma estratégia para reduzir a taxa de pós acidificação nos produtos lácteos fermentados, é a retirada de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* do fermento ou o emprego de cultura iniciadora com alta proporção (28:1) de *S. thermophilus* para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (KNEIFEL *et al.*, 1993). Além do pH, outros fatores como o momento da adição das bifidobactérias (início ou final da fermentação), teor de oxigênio dissolvido no produto, tipo de embalagem, presença de H₂O₂ podem afetar a atividade e viabilidade de *Bifidobacterium* durante a fermentação e armazenamento do produto.

A grande maioria das culturas probióticas disponíveis no mercado estão na forma concentrada, sejam como culturas congeladas ou liofilizadas (KAILASAPATHY, 2013). A forma de preparação, ativação e estocagem dessas culturas deve ser adequada para melhoria da viabilidade dos micro-organismos probióticos durante a vida de prateleira dos alimentos (CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

Considerando-se a porção de 200 mL de bebida láctea (BRASIL, 2003b), e a exigência da quantidade mínima entre 10⁸ e 10⁹ UFC de células viáveis do probiótico na recomendação diária do produto para consumo (ANVISA, 2008), a contagem mínima de 10⁶ UFC. mL⁻¹ de células viáveis de bifidobactérias deve ser assegurada no alimento no momento do consumo. Portanto, métodos de processamento adequados que assegurem a contagem mínima de bifidobactérias durante a estocagem do produto devem ser estabelecidos.

A sinérese em leites fermentados é considerada um defeito primário e compromete a aceitabilidade destes produtos pelos consumidores. Alterações na formulação de bebidas lácteas, especialmente quando proporcionam baixos valores de pH, podem tornar o produto mais susceptível a sinérese (CASTRO *et al.*, 2009).

Objetivou-se, com a pesquisa, composta por cinco experimentos avaliar:

1. A atividade proteolítica de culturas distintas de *Streptococcus thermophilus* para definição da composição das diferentes culturas iniciadoras a serem utilizadas na fermentação das bebidas lácteas.
2. A influência do método de preservação de *B. longum* BL05 por congelamento ou liofilização na sua viabilidade e nos valores de pH de bebidas lácteas fermentadas durante o armazenamento. As bebidas foram fermentadas com culturas iniciadoras de composição e características diferenciadas: co-cultura de *S. thermophilus* St-TA40 + *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* Lb 340; cultura de *S. thermophilus* St-TA40; cultura de *S. thermophilus* St1. Em todas as bebidas, a cultura de *B. longum* BL05, congelada ou liofilizada, foi adicionada no final da fermentação.

3. A influência das diferentes culturas iniciadoras (descritas anteriormente) e o momento de adição – início ou final da fermentação - das linhagens de *B. longum* 5^{1A} e BL05 no tempo de fermentação das bebidas lácteas, na viabilidade das bifidobactérias e taxa de pós acidificação durante a estocagem refrigerada.
4. A viabilidade das bactérias da cultura iniciadora e das linhagens de *B. longum* 5^{1A} e BL05 e a taxa de pós acidificação das bebidas controles durante o período de estocagem e comparar com os resultados encontrados para as diferentes bebidas lácteas propostas neste estudo. As bebidas lácteas controles foram fermentadas apenas com as culturas iniciadoras (descrita anteriormente) ou com as linhagens de bifidobactérias.
5. A influência das diferentes culturas iniciadoras no índice de sinerése durante a estocagem refrigerada das bebidas lácteas adicionadas das linhagens de *B. longum* 5^{1A} e BL05 no final da fermentação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise e no Laboratório de Análises Físico-Químicas I do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

2.1 Matérias-primas

Foram empregados leite em pó integral (Itambé, Uberlândia, Brasil) obtido no comércio local, soro de leite em pó tipo doce doado pelo Laticínio Porto Alegre (Ponte Nova, Brasil) e estabilizante Meyprogen JO 767, composto por amido modificado, goma guar e gelatina, doado pela empresa DaniscoDupont (Sassenage, França).

Utilizaram-se três lotes de leite em pó e de soro de leite em pó.

2.2 Culturas microbianas

2.2.1 Culturas iniciadoras liofilizadas

Culturas puras liofilizadas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 (Lb 340) e *Streptococcus thermophilus* TA 40 (St-TA40), do tipo DVI “direct-to-vat inoculation” foram utilizadas. Os sachês contendo as culturas liofilizadas foram gentilmente cedidos pela DaniscoDupont (Sassenage, França).

2.2.2 Cultura iniciadora congelada

Foi empregada cultura pura congelada de *S. thermophilus* (St1) sendo esta bactéria isolada do fermento liofilizado comercial YoFlex 702 (Christian Hansen, Dinamarca). A confirmação da identificação da espécie foi realizada por meio de testes morfotintoriais (Gram) e testes moleculares realizados no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Para isto, O DNA extraído de *S. thermophilus* foi submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 16S do gene do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5´-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') segundo Lane (1991). Essa cultura foi mantida em caldo M17 (Difco, EUA) adicionado de 0,5% de lactose (p/v), a -80°C em ultra-freezer adicionado de 20% de glicerol estéril.

2.2.3 Cultura liofilizada de *Bifidobacterium longum*

Foi usada a cultura liofilizada do tipo DVI (direct-to-vat inoculation) de *Bifidobacterium longum* BL05 gentilmente cedida pela DaniscoDupont (Sassenage, França).

2.2.4 Culturas congeladas de *Bifidobacterium longum*

Também foram empregadas culturas puras congeladas de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Bifidobacterium longum* BL05, esta última isolada do fermento liofilizado comercial BL05 (DaniscoDupont, França). A linhagem de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} foi isolada de fezes de crianças saudáveis (GOMES, 2005) e identificada por testes morfotintórias (Gram), respiratórios e bioquímicos seguido de PCR Multiplex de acordo com Kwon e colaboradores (2005) e cedida pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do ICB- UFMG. As culturas puras congeladas de bifidobactérias foram mantidas a -80°C em ultra-freezer em caldo MRS (Acumedia, Lansing, EUA), adicionado de 20% de glicerol estéril.

2.3 Análises físico-químicas e microbiológicas das matérias-primas

Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas dos lotes de leite em pó integral com o objetivo de verificar se essa matéria-prima atendia aos padrões de identidade e qualidade exigidos pela legislação (BRASIL, 1996).

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram acidez titulável, teores percentuais de gordura e umidade, utilizando a metodologia recomendada por Brasil (2006). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para o controle microbiológico foram feitas as contagens de mesófilos aeróbios, coliformes totais e fecais, *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* spp de acordo com Brasil (2003).

Os laudos de controle de qualidade contendo as análises físico-químicas e microbiológicas dos lotes de soro de leite em pó foram fornecidos pelo laticínio. Entretanto, não há legislação que defina os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para o controle de qualidade e identidade de soro de leite em pó. Assim, os critérios de qualidade adotados para essa matéria-prima foram os mesmos do leite em pó.

2.4 Determinação da atividade proteolítica das linhagens de *Streptococcus thermophilus*

A determinação da atividade proteolítica das culturas de *S. thermophilus* St TA40 (St-TA40) e *S. thermophilus* (St1) em leite fermentado foi adaptado de CHARNEY & TOMARELLI (1947). Para isto, foram preparadas duas amostras de leites fermentados: uma produzida com a cultura de *S. thermophilus* St TA40 e a outra com St1. As fermentações foram realizadas a 37°C e interrompidas em pH 5,0. O extrato enzimático foi obtido por centrifugação a 4°C (centrifuga Sigma, modelo 2K15) de 1mL de cada leite fermentado a 2638xg durante 10 minutos. As primeiras amostras foram retiradas após 3 horas do início da fermentação de cada leite fermentado, e, as subsequentes, a cada duas horas. O tempo para retirada das amostras foi baseado na alteração de pH observada durante a fermentação de bebidas produzidas com cada cultura de *S. thermophilus* (St TA40 e St1) em testes anteriores.

O substrato (100 µL) contendo 2,5% de azocaseína (Vetec) em tampão acetato (50 mmol⁻¹), pH 5,5, foi incubado a 37°C e a reação foi iniciada com a adição de 100 µL extrato enzimático. Posteriormente, a reação foi interrompida após 30 minutos, com a adição de 800 µL de solução de ácido tricloroacético 5% (w/v). Essa mistura foi centrifugada sob refrigeração (4°C), a 2638xg, durante 10 minutos, e ao sobrenadante (500µL), foi adicionado 500 µL de solução de NaOH 0,5 M e a absorvância foi lida a 445 nm. O branco foi preparado pela adição de 800 µL de ácido tricloroacético ao substrato de azocazeína (100 µL), seguida da adição de 100 µL do extrato enzimático, incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi centrifugada nas

mesmas condições e à 500 µL do sobrenadante foi adicionado a mesma quantidade de solução de NaOH 0,5 M e a absorvância foi lida a 445 nm. Uma unidade de medida da atividade de protease foi definida como a quantidade requerida para liberar 1 µmol de peptídeos de azocaseína por mL do leite fermentado adicionado ao teste, por minuto, nas condições definidas.

2.5 Padronização e obtenção do inóculo para elaboração das bebidas lácteas fermentadas

2.5.1 Determinação do número de células viáveis nas culturas iniciadoras e nas culturas de *Bifidobacterium longum* para padronização do inóculo

2.5.1.1 Culturas iniciadoras liofilizadas

Para padronizar a proporção de cada cultura liofilizada para produção das bebidas lácteas foram feitas contagens do número de células viáveis UFC (unidades formadoras de colônias) por grama de liofilizado contido nos sachês conforme Antunes (2004). A contagem inicial foi determinada conforme descrito a seguir: pesagem de 0,1g de cada cultura liofilizada e suspensão em 9,9 mL de água peptonada (0,1%) estéril, repouso por 30 minutos para completa dispersão das células (diluição 10^{-2}), seguida de diluições decimais seriadas. Utilizou-se o meio Agar M17 (Difco, USA) adicionado de 0,5% de lactose (p/v) para o cultivo de *S. thermophilus* (St-TA40) e o Ágar MRS (Acumedia, Lansing, USA) para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 (Lb 340). As placas foram incubadas a 41°C por 48 horas, em microaerofilia.

2.5.1.2 Cultura iniciadora congelada

Para a contagem das células viáveis da cultura congelada de *S. thermophilus* (St1), essa foi descongelada e ativada em caldo M17 adicionado de 0,5% de lactose (p/v). Para isto, transferiu-se 1mL da cultura para tubo de tampa rosqueável contendo 10 mL do caldo o qual foi incubado em estufa a 41°C por 24 horas. A cultura ativada foi centrifugada por 15 minutos à 2792g. O sobrenadante foi descartado e a massa

celular foi adicionada a um frasco de tampa rosqueável contendo 100 mL de leite desnatado (12% p/v) (Molico, Nestlé, Brasil) tratado termicamente a 100°C por 25 minutos. O frasco foi incubado a 41°C por 12 horas e em seguida, 1mL deste leite fermentado foi adicionado à 9 mL de água peptonada (0,1%) estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas decimais, empregando-se o mesmo meio e as mesmas condições de incubação descritas para a cultura liofilizada de *S. thermophilus* (St-TA40).

2.5.1.3 Cultura de *Bifidobacterium longum* liofilizada

Pesou-se em condições assépticas 0,1g da cultura liofilizada de *B. longum* BL05 e ressuspendeu em 9,9 mL de água peptonada (0,1%) estéril, repouso por 30 minutos (diluição 10^{-2}), seguida de diluições decimais seriadas. Para a contagem das células, utilizou-se o meio MRS adicionado de cisteína (Synth) na concentração de 1 g.L⁻¹. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil).

2.5.1.4 Culturas de *Bifidobacterium longum* congeladas

Os microtubos (ependorfs) contendo as culturas congeladas de *B. longum* (BI 5^{1A} e BL05), foram descongeladas e as culturas ativadas, transferindo-se 1mL da cultura para tubos de tampas rosqueáveis contendo 10 mL de caldo MRS regenerado, mantendo-se *headspace* mínimo no tubo, conforme Pereira (2012). Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e após esse período 1mL de cada cultura ativada foi inoculada novamente em 10 mL de caldo MRS e mantidos por mais 24 horas a 37°C. Logo após, procedeu-se a diluições seriadas decimais empregando-se o mesmo meio e as mesmas condições de incubação descritas para a cultura liofilizada de *B. longum* (BL05).

2.5.2 Preparo das culturas para obtenção do inóculo

2.5.2.1 Culturas iniciadoras liofilizadas

Pesou-se em condições assépticas, quantidade suficiente do pó da cultura liofilizada de *S. thermophilus* TA 40 (St-TA40) para obtenção de $3 \cdot 10^{10}$ UFC. Em seguida, adicionou-se a cultura liofilizada em 300 mL de leite desnatado (Molico, Nestlé) reconstituído a 12% (p/v) tratado termicamente a 100°C por 25 minutos, obtendo-se uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹. Esta mistura foi mantida sob agitação durante 20 minutos e, em seguida, distribuída em tubos de ensaio estéreis de tampa rosqueáveis os quais foram congelados a -18°C até o momento de uso. Para a ativação das células, os tubos foram descongelados e mantidos a 41°C durante 30 minutos (CHAMPAGNE *et al.*, 2011). Adicionou-se 20 mL desse inóculo à 2,5 L da mistura básica (leite, soro e estabilizante), obtendo-se uma concentração de aproximadamente 10^6 UFC. mL⁻¹ de células de *S. thermophilus*, no início da fermentação da bebida láctea.

Para a cultura liofilizada de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LB 340 (Lb 340) utilizou-se o mesmo procedimento descrito acima para obtenção de $3 \cdot 10^8$ UFC e adição da cultura liofilizada em 300 mL de leite. Portanto, obteve-se para o inóculo uma concentração de aproximadamente 10^6 UFC. mL⁻¹. Foram acrescentados 20 mL desse inóculo a 2,5 L da mistura básica da bebida láctea, obtendo-se uma concentração inicial de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* de aproximadamente 10^4 UFC. mL⁻¹

2.5.2.2 Cultura iniciadora congelada

O microtubo contendo a cultura congelada de *S. thermophilus* St1 foi descongelado e a cultura foi ativada transferindo-se 1mL da mesma para tubo de tampa rosqueável contendo 10 mL de caldo M17 adicionado de 0,5 % de lactose (p/v). O tubo foi incubado a 41°C por 24 horas. A cultura ativada foi centrifugada por 15 minutos à 2792xg. O sobrenadante foi descartado e a massa celular foi adicionada a um frasco de tampa rosqueável contendo 100 mL de leite desnatado (12% p/v) (Molico, Brasil) tratado termicamente a 100°C por 25 minutos. O frasco foi incubado a

41°C por 12 horas. Foram adicionados 20 mL desse inóculo a 2,5 L da mistura básica da bebida. A contagem de *S. thermophilus* St1 no inóculo foi de aproximadamente 10^8 UFC. mL⁻¹, atingindo portanto, a concentração inicial de *S. thermophilus* de aproximadamente 10^6 UFC. mL⁻¹ na mistura básica.

2.5.2.3 Cultura de *Bifidobacterium longum* liofilizada

Pesou-se em condições assépticas, quantidade suficiente do pó da cultura liofilizada de *B. longum* BL05 para obtenção de 10^{11} UFC. Para isto o sachê foi colocado em temperatura ambiente por um período de 1 hora (CHAMPAGNE *et al.*, 2011) antes da pesagem. Em seguida, adicionou-se a cultura liofilizada em 100 mL de leite esterelizado (12% p/v), obtendo-se uma contagem de 10^9 UFC. mL⁻¹. Para ativação da bifidobactéria essa mistura foi mantida a 37°C durante 30 minutos. Foram então, adicionados 10 mL desse inóculo à 200 mL de bebida láctea envasadas em garrafas plásticas, alcançando uma contagem inicial de 10^8 UFC. mL⁻¹.

2.5.2.4 Culturas de *Bifidobacterium longum* congeladas

O número de células viáveis das culturas congeladas de *Bifidobacterium longum* (BI 5^{1A} e BL05) foi de aproximadamente 10^8 UFC. mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado para o preparo dos inóculos de cada linhagem de *B. longum*. A metodologia descrita a seguir foi adaptada de Pereira (2012). Antes de cada experimento, a cultura foi descongelada e ativada transferindo-se 1mL da cultura para tubos de tampas rosqueáveis contendo 10mL de caldo MRS regenerado e incubado a 37°C por 24 horas. Para a regeneração do caldo MRS, as tampas dos tubos foram parcialmente desatarraxadas e os tubos imersos (até aproximadamente 80% do seu volume) em água fervente por 10 minutos, seguido do resfriamento até temperatura ambiente. Em seguida, 2mL da cultura ativada foi transferida para tubos de ensaio com tampas rosqueáveis contendo 20mL de caldo MRS regenerado e novamente incubado a 37°C por 24 horas. Após este período foi feita uma nova transferência de 3mL da cultura ativada para frascos contendo 300 mL de caldo MRS regenerado o qual foi incubado na mesma condição descrita anteriormente. Em todas as transferências, manteve-se *headspace* mínimo nos tubos. O caldo foi então

centrifugado por 15 minutos a 2792xg. O sobrenadante foi descartado e à massa de células foram adicionados 30mL de solução salina (0,85% p/v) estéril e procedeu-se uma nova centrifugação. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 3 mL de leite desnatado (12% p/v) tratado termicamente obtendo-se o inóculo com uma concentração média de $2 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ para *B. longum* 5^{1A} e de $6,6 \cdot 10^{10}$ UFC.mL⁻¹ para *B. longum* BL05.

O inóculo de *B. longum* 5^{1A} ou de BL05 foi adicionado à mistura básica (leite, soro, estabilizante) no início da fermentação, juntamente com a cultura iniciadora ou logo após o término da fermentação. Para a produção das bebidas com adição das culturas de bifidobactérias no início da fermentação, transferiu-se 13 mL do inóculo de *B. longum* 5^{1A} e 10 mL do inóculo de *B. longum* BL05 para 2,5 L da mistura básica, obtendo-se assim uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ para ambas as linhagens de bifidobactérias. Nos tratamentos nos quais as bifidobactérias foram acrescentadas no final da fermentação, 1,0 mL de cada inóculo foi adicionado separadamente à 200 mL de bebida láctea envasada em garrafa plástica, obtendo-se aproximadamente uma contagem de 10^8 UFC.mL⁻¹ de cada linhagem das bifidobactérias.

2.6 Elaboração das bebidas lácteas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras

A metodologia de fabricação das bebidas lácteas foi adaptada de Pereira (2012) e Thamer & Pena (2006). O fluxograma com o resumo dos procedimentos adotados para a elaboração das bebidas lácteas está mostrado na Figura 1

Foram realizadas três repetições para cada tipo de bebida láctea elaborada. Considerando a mesma repetição, lotes iguais de leite em pó e também de soro em pó foram utilizados para a produção das diferentes bebidas. Já entre repetições distintas, foram utilizados diferentes lotes das matérias-primas, totalizando três lotes de leite em pó e três de soro em pó. As bebidas lácteas foram identificadas com números, indicando a combinação de culturas iniciadoras, linhagens de *B. longum* e momento de adição das bifidobactérias utilizadas na elaboração das diferentes bebidas lácteas (Quadro 1)

Utilizou-se para a produção das bebidas lácteas 70% de leite em pó e 30% de soro de leite em pó, ambos reconstituídos a 10% p/v. Foi adicionado estabilizante na

concentração de 0,5% (p/v) em relação ao volume final da bebida. O estabilizante foi incorporado ao volume total de soro reconstituído e esta mistura foi mantida sob agitação a 45°C durante 10 minutos para hidratação do estabilizante. Em seguida, à essa mistura foi adicionado o volume total de leite obtendo-se assim a mistura básica (leite, soro e estabilizante) a ser fermentada para a produção das bebidas lácteas. A mistura básica foi aquecida a 85°C por 30 minutos (SHIHATA & SHAH, 2002) em banho metabólico com agitação tipo Dubnoff (Solab) e em seguida resfriada até 37°C para adição das culturas iniciadoras, em condições assépticas.

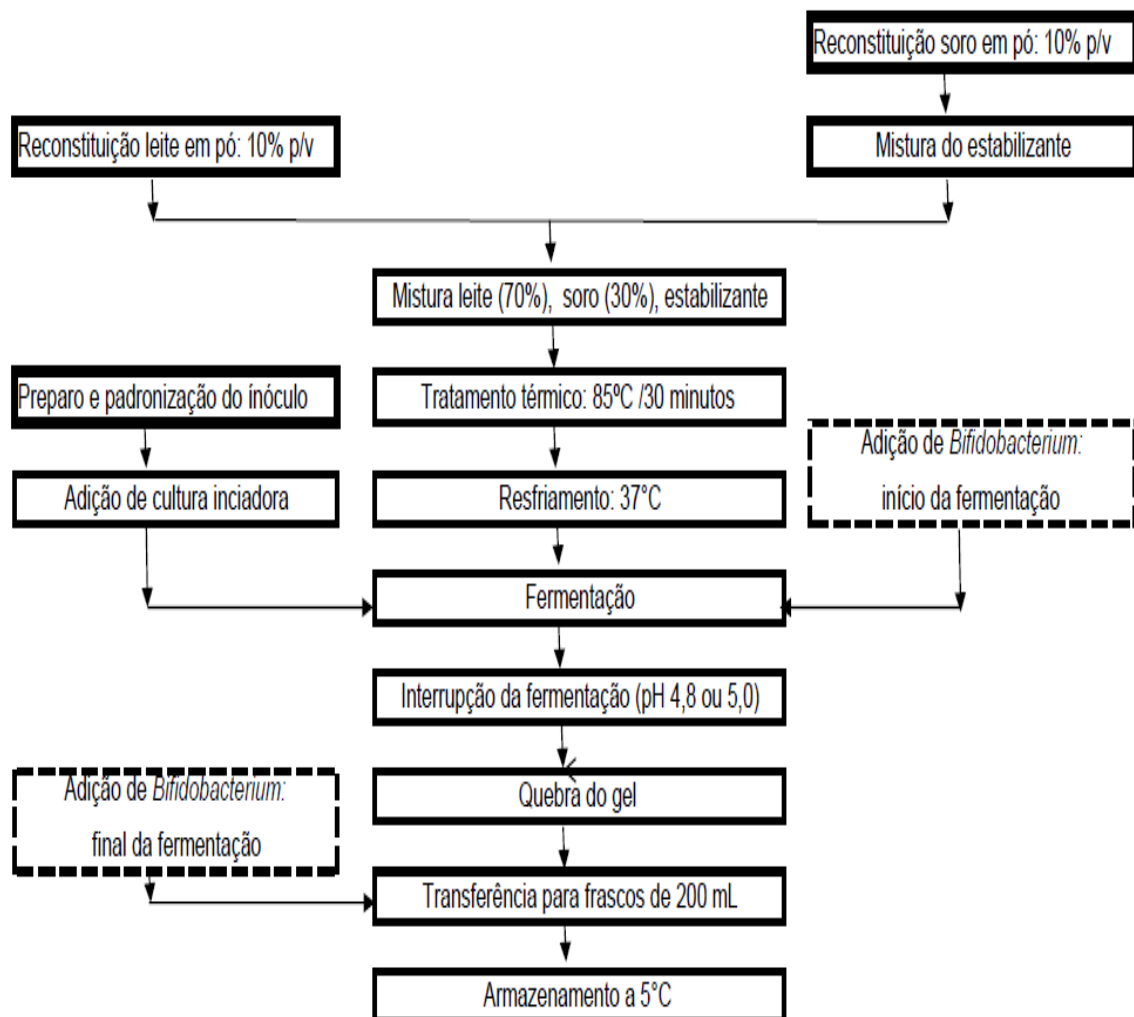


FIGURA 1: Fluxograma de elaboração das bebidas lácteas fermentadas

QUADRO 1

Composição, proporção das bactérias das culturas iniciadoras, linhagens de *Bifidobacterium longum* e momento de adição das bifidobactérias usadas para a elaboração das diferentes bebidas lácteas fermentadas

Bebidas	Cultura iniciadora	Linhagem de <i>B.longum</i>	pH de corte	Momento de adição da bifidobactéria: início ou final da fermentação
Bebida 1	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Lb 340)	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	4,8	Início
Bebida 2	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	4,8	Início
Bebida 3	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St1	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	5,0	Início
Bebida 4	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Lb 340)	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	4,8	Início
Bebida 5	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	4,8	Início
Bebida 6	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St1	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	5,0	Início
Bebida 7	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Lb 340)	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	4,8	Final
Bebida 8	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	4,8	Final
Bebida 9	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St1	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BI 5 ^{1A}	5,0	Final
Bebida 10	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40 10 ⁴ UFC.mL ⁻¹ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (Lb 340)	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	4,8	Final
Bebida 11	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	4,8	Final
Bebida 12	10 ⁶ UFC.mL ⁻¹ <i>S. thermophilus</i> St-TA40	10 ⁸ UFC.mL ⁻¹ BL05	5,0	Final

2.6.1 Fermentação

2.6.1.1 Adição das linhagens de *Bifidobacterium longum* no início da fermentação

A mistura básica foi transferida para frascos Erlenmeyer previamente autoclavados os quais foram inoculados com as culturas iniciadoras descritas no Quadro 1 e incubados em estufas BOD (Tecnal, modelo TE-391) a 37°C, temperatura indicada para fermentação com o uso de inóculo contendo *Bifidobacterium* (ABE *et al.*, 2009; SHAFIEE *et al.*, 2010) até atingir o pH de corte estabelecido para cada bebida. Os inóculos de cada linhagem de *B. longum* foram adicionados separadamente à mistura básica, juntamente com a cultura iniciadora. Para as bebidas fermentadas com a co-cultura St-TA40 + Lb 340 e a com a cultura St-TA40, a fermentação foi interrompida em pH próximo de 4,8. Para a bebida obtida com a cultura *S. thermophilus* ST1, a fermentação foi finalizada em pH próximo de 5,0. A diferença do pH corte foi baseada na hipótese (item 3.1 deste capítulo) de que a interrupção da fermentação em pH mais alto, associada a menor taxa de pós acidificação da cultura iniciadora (St1, definido na presente pesquisa), ocasionaria maior viabilidade das bifidobactérias durante a vida de prateleira. Em seguida as bebidas foram refrigeradas e a quebra do coágulo foi realizada em condições assépticas com bastão de vidro estéril. Após este procedimento, as bebidas foram distribuídas em garrafas plásticas de polietileno de 200mL previamente higienizadas com solução 200 ppm de cloro ativo. As garrafas foram então armazenadas a 5°C durante 28 dias

2.6.1.2 Adição das linhagens de *Bifidobacterium longum* no final da fermentação

A mistura básica foi transferida para frascos Erlenmeyers previamente autoclavados os quais foram inoculados com as culturas iniciadoras descritas no Quadro 1 e incubados em estufas BOD a 41°C até atingir o pH de corte estabelecido para cada bebida, o qual foi o mesmo descrito no procedimento anterior. Após o término da fermentação, as bebidas foram refrigeradas e a quebra do coágulo foi realizada em condições assépticas com bastão de vidro estéril. Após este procedimento as bebidas foram distribuídas em garrafas plásticas de polietileno de

200mL previamente higienizadas com solução 200 ppm de cloro ativo e adicionadas separadamente de cada linhagem de *B. longum* (BL05 e 5^{1A}). As garrafas plásticas foram armazenadas a 5°C durante 28 dias

2.7 Elaboração das bebidas lácteas controles

Denominou-se bebidas lácteas controles as bebidas fermentadas apenas com as culturas de *S. thermophilus*, (St-TA 40 ou St1) com a co-cultura (St-TA40 + Lb 340) e também as bebidas fermentadas somente com as linhagens de *B. longum* 5^{1A} ou BL05.

A composição dos inóculos de cada bebida controle e o pH de corte estão descritos no Quadro 2. As bebidas controles foram produzidas seguindo os mesmos procedimentos descritos para os outros tipos de bebidas descritas anteriormente.

Quadro 2
Composição das culturas usadas para a fermentação das bebidas controles e pH de interrupção da fermentação

Identificação das bebidas controles	pH de corte	Composição, contagem (UFC.mL ⁻¹) das culturas usadas para fermentação
St-TA40 + Lb 340	4,8	10 ⁶ <i>S. thermophilus</i> TA 40 10 ⁴ <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB 340
St-TA40	4,8	10 ⁶ <i>S. thermophilus</i> TA 40
St1	5,0	10 ⁶ <i>S. thermophilus</i> ST1
BI 5 ^{1A}	4,8	10 ⁸ <i>B.longum</i> 5 ^{1A}
BL05	4,8	10 ⁸ <i>B.longum</i> BL05

2.8 Análises microbiológicas para o controle de qualidade das bebidas lácteas fermentadas

Para o controle microbiológico, fez-se a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes após 24 horas de produção das bebidas lácteas fermentadas conforme exigido pela legislação (BRASIL, 2005).

Foi realizada também a contagem de bolores e leveduras nas bebidas lácteas fermentadas, a cada 7 dias, durante os 28 dias de armazenamento.

Todos os procedimentos para o controle microbiológico, incluindo contagem de bolores e leveduras, seguiram a metodologia oficial para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água (BRASIL, 2003a).

As análises de controle microbiológico foram realizadas nas bebidas pertencentes ao grupo de bebidas adicionadas das linhagens de *B. longum* no final da fermentação. Nas bebidas acrescentadas de bifidobactérias no início da fermentação, essas análises não foram realizadas, por se tratarem de produtos elaborados com mesmos lotes de matérias-primas e mesmo processamento, apenas variando o momento de adição das bifidobactérias e a temperatura de fermentação.

2.9 Estudo da vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas

Foram determinadas a viabilidade das linhagens de *B. longum* e das bactérias da cultura iniciadora nas diferentes bebidas produzidas, para verificação do atendimento à legislação (ANVISA, 2008; BRASIL, 2005), 24 horas após a fermentação e aos 7°, 14°, 21° e 28° dias de armazenamento. Foram também avaliados o pH e a acidez titulável das bebidas lácteas durante esses mesmos períodos.

2.9.1 Viabilidade das bactérias das culturas iniciadoras e de bifidobactérias

A contagem dos micro-organismos da cultura iniciadora foi realizada conforme descrito a seguir: bactérias lácticas totais (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *S. thermophilus*) foram determinadas no meio PCA-Leite e incubação em microaerofilia a 41°C por 48 horas e *S. thermophilus* em Agar M17 (Difco, USA) adicionado de 0,5% de lactose (p/v) em microaerofilia a 41°C por 48 horas (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999).

O meio Bile-MRS foi utilizado para a contagem de células viáveis de *B. longum* (BI 5^{1A} e BL05), definido em estudo anterior. As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C durante 72 horas. Para gerar condição de anaerobiose foram

utilizadas jarras de anaerobiose com gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac, Brasil).

Nas bebidas controles fermentadas separadamente com cada linhagem de *B. longum* ((BI 5^{1A} e BL05) a contagem de células viáveis foi realizada no meio MRS (Acumedia, Lansing, USA) adicionado de cisteína (1 g.L⁻¹). As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C durante 72 horas.

2.9.2 pH e acidez titulável

A determinação dos valores de pH foi realizada por leitura direta em potenciômetro modelo MPA210 (MS Tecnopon, Brasil) e a acidez expressa em porcentagem de ácido láctico determinada pelo método de titulação com solução de NaOH 0,1 N, usando como indicador a solução de fenolftaleína a 1% (BRASIL, 2006).

2.9.3 Susceptibilidade à sinérese

A susceptibilidade a sinérese foi medida pelo método descrito por Modler & Kalab (1983). A amostra (25-35g) foi centrifugada (Centrífuga refrigerada SIGMA 2K15) a 2638xg por 15 minutos. O sobrenadante límpido foi descartado e mediu-se a massa restante. A diferença entre as massas totais e do precipitado corresponde a sinérese, que foi expressa em porcentagem de massa (%m/m).

A sinérese foi medida nas bebidas lácteas fermentadas pertencentes ao grupo das bebidas adicionadas de bifidobactérias no fim da fermentação, durante o período de 28 dias de armazenamento.

2.10 Delineamento experimental e análise estatística

Para os experimentos realizados com o grupo de bebidas adicionadas de bifidobactérias no final da fermentação, nos quais foi estudado dois tipos diferentes de tratamentos – bebidas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras e dias de estocagem - o delineamento utilizado foi parcelas subdivididas e teste de Duncan ($p < 0,05$) para a comparação das médias. Nesse delineamento estão incluídos os resultados dos experimentos para determinação de pH e viabilidade de *B. longum*

BL05 liofilizada ou congelada nas bebidas durante 28 dias de estocagem e também resultados do índice de sinérese das bebidas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras durante o mesmo período de armazenamento. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para os experimentos realizados com os dois grupos de bebidas (adicionadas de bifidobactérias no início ou final da fermentação), nos quais foram estudados três tipos diferentes de tratamentos – bebidas fermentadas com diferentes culturas iniciadoras, momento distintos de adição das bifidobactérias e dias de estocagem - o delineamento utilizado foi parcelas sub subdivididas e teste de Duncan ($p < 0,05$) para a comparação das médias. Nesse contexto estão os resultados dos experimentos para determinação da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} e BL05, pH e acidez das diferentes bebidas lácteas propostas, em cada grupo de bebida. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Testes preliminares

Inicialmente foram produzidas duas bebidas lácteas utilizando como inóculos culturas de *S. thermophilus* (St1 ou St-TA40) e o pH foi medido durante 28 dias de armazenamento para avaliação da taxa de pós acidificação, ou seja, a diminuição do pH durante a estocagem refrigerada das bebidas. Nestes ensaios as fermentações foram interrompidas em pH 5,0, mais alto em relação ao pH de corte (4,8) das outras bebidas produzidas neste estudo. O objetivo desse teste foi escolher entre estas duas culturas de *S. thermophilus*, aquela que apresentasse menor taxa de pós acidificação durante a estocagem refrigerada das bebidas. A hipótese é que a interrupção (corte) da fermentação em um pH mais alto, associada a uma menor taxa de pós acidificação da cultura iniciadora, ocasionaria maior viabilidade das linhagens de *B. longum* durante a vida de prateleira das bebidas lácteas.

As alterações nos valores de pH das bebidas fermentadas até pH 5,0 com as diferentes culturas de *S. thermophilus* (St-TA40 e St1), durante o período de 28 dias de armazenamento estão apresentadas na Figura 2. A bebida fermentada com St1 apresentou menor taxa de pós acidificação, ou seja, menor decréscimo de pH em relação à bebida fermentada com St-TA40 a partir do 7º dia de armazenamento. Houve redução de 0,38 upH (unidades de pH) na bebida produzida com a cultura St1 e 0,62 upH na bebida produzida com St-TA40 ao final do período de estocagem. O tempo de fermentação foi de 4,7 horas para a bebida fermentada com a cultura St-TA40 e de 7,0 horas para a cultura St1. Portanto, a linhagem St1 apresentou menor taxa de acidificação durante a estocagem refrigerada das bebidas e foi escolhida para a produção das bebidas nas quais a fermentação foi interrompida em pH 5,0.

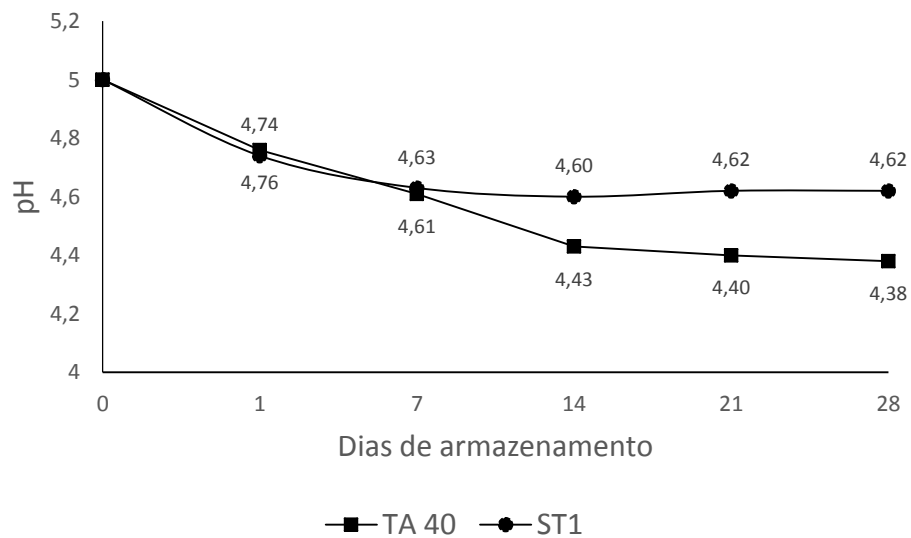


FIGURA 2: Variação nos valores de pH das bebidas lácteas fermentadas com as linhagens de *Streptococcus thermophilus* St1 e St-TA40 durante 28 dias de estocagem refrigerada a 5°C

Nestes ensaios verificou-se que o valor do pH de 4,8 para interrupção da fermentação dessas bebidas ocasionou maior sinérese do que em pH 5,0. (Figura 3). Portanto, este dado reforça a escolha do pH 5,0 para o corte da fermentação nessas bebidas.



FIGURA 3: Bebidas fermentadas com *Streptococcus thermophilus* St1 em diferentes valores de pH de interrupção da fermentação

3.2. Análises físico-químicas e microbiológicas das matérias-primas

3.2.1 Análises microbiológicas

Todos os resultados das análises microbiológicas dos lotes de leite em pó atenderam aos critérios exigidos pela legislação (BRASIL, 1996).

Os laudos dos lotes do soro de leite em pó fornecidos pelo Laticínio Porto Alegre estão apresentados no ANEXO A. Como não existe legislação para soro de leite em pó, os critérios usados foram os mesmos adotados para o leite em pó. Todos os resultados das análises microbiológicas estavam dentro dos padrões de qualidade exigidos por esta legislação (BRASIL, 1996).

3.2.2 Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas dos lotes de leite em pó utilizados neste estudo estão mostrados na Tabela 1.

TABELA 1
Resultados das análises físico-químicas dos lotes de leite em pó integral

Parâmetros	Parâmetros legais (BRASIL, 1996)	1º Lote	2º Lote	3º Lote
Matéria gorda (% m/m)	Maior ou igual a 26	26,5±0,25	26,1±0,13	26,2±0,11
Umidade (% m/m)	Máx 3,5	3,43±0,07	3,40±0,02	3,39±0,01
Acidez titulável (mL de NaOH 0,1N/10g de sólidos não gordurosos)	Máx 18	15,8±0,34	14,2±0,06	14,9±0,11

Todos os resultados dos parâmetros das análises físico-químicas dos lotes do leite em pó atenderam aos requisitos legais (BRASIL, 1996).

Os laudos do soro de leite em pó estão apresentados no ANEXO A. A composição média do soro de leite em pó tipo doce, compreende 3,0 a 3,5% de umidade, 12 a 15% de proteínas, 60 a 75% de lactose, 0,8 a 1,0% de gordura e 7,30 a 8,30% de cinzas (MIZUBUTI, 1994). A composição do soro varia de maneira

substancial, dependendo do tipo de leite utilizado e do queijo produzido (PENNA *et al.*, 2009), e por esta razão, pequenos desvios em relação aos teores de umidade e lactose foram observados no soro em pó empregado neste estudo. Ainda, o teor de cinzas foi menor, provavelmente devido ao fato do soro usado ser desmineralizado.

3.3 Atividade proteolítica das culturas de *Streptococcus thermophilus* utilizadas na elaboração das bebidas lácteas fermentadas

Os resultados da atividade proteolítica das culturas de *S. thermophilus* (St-TA 40 e St1) e decréscimo de pH durante a fermentação do leite, estão apresentados na Figura 4.

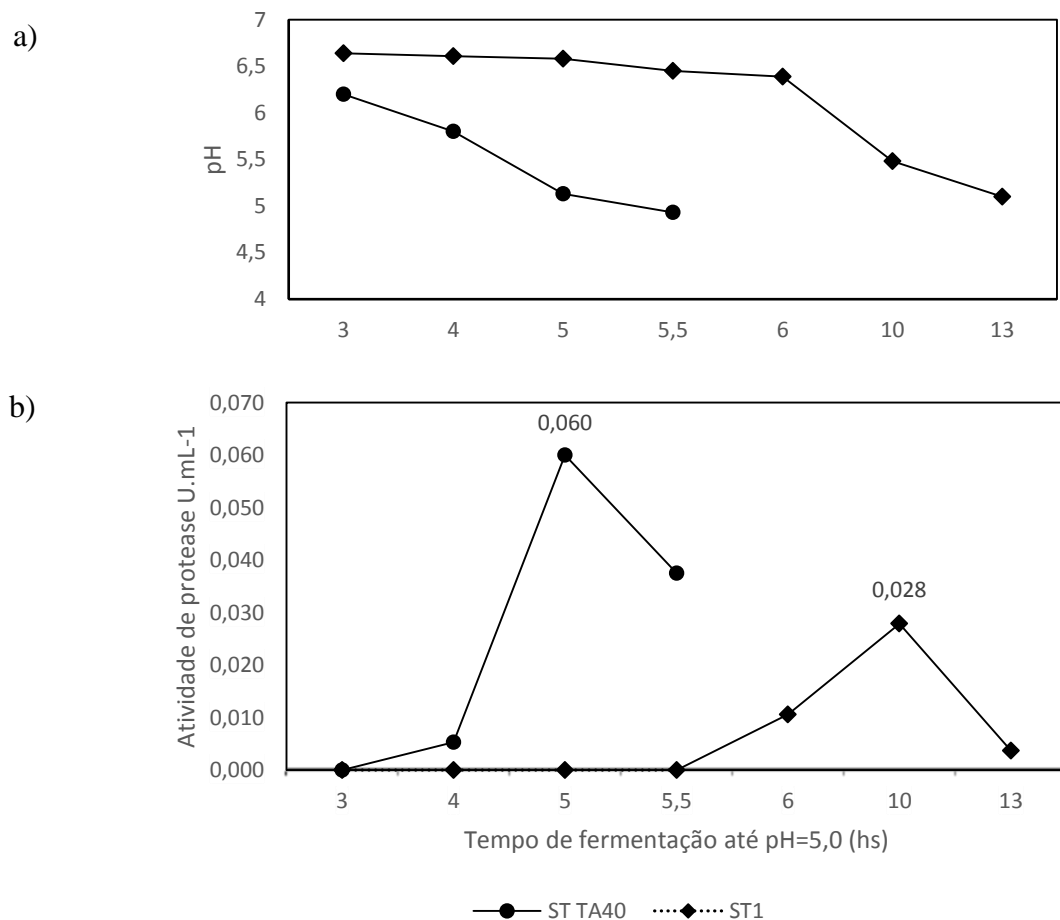


FIGURA 4: a) Decréscimo de pH em leites fermentados durante o tempo de fermentação do leite
b) Atividade proteolítica de *Streptococcus thermophilus* durante o tempo de fermentação do leite

Em geral, observa-se que a cultura de *S. thermophilus* St-TA40 apresentou maior atividade proteolítica que St1. A máxima atividade proteolítica da cultura St-TA40 foi observada em pH próximo de 5,0, após 5 horas de fermentação, e foi duas vezes superior à atividade da cultura St1, observada em pH próximo de 5,5, após 10 horas de fermentação. Culturas microbianas com alta capacidade proteolítica crescem mais rápido e acidificam mais rapidamente o leite (GALIA *et al.*, 2009; SHAHBAL *et al.*, 1993). Os dados obtidos corroboraram com essa hipótese.

Segundo Settachaimongkon e colaboradores (2014 a), a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação do leite por culturas puras proteolíticas de *S. thermophilus* foi duas vezes mais rápida do que culturas puras não proteolíticas de *S. thermophilus*. Em nosso estudo, a cultura de maior atividade proteolítica, St-TA40, também apresentou maior taxa de pós acidificação (Figura 2). Sugere-se que, quando se empregam culturas puras de *S. thermophilus*, a taxa de pós acidificação seja influenciada pela capacidade proteolítica do micro-organismo, sendo maior em produtos fermentados com culturas proteolíticas, podendo comprometer a viabilidade de bifidobactérias durante a estocagem refrigerada.

3.4 Viabilidade da linhagem de *Bifidobacterium longum* BL05 proveniente de cultura congelada ou liofilizada e variação de pH nas bebidas lácteas durante o armazenamento

As contagens médias de células viáveis no inóculo de *B. longum* BL05 das culturas congelada e liofilizada para o preparo das bebidas lácteas foram de $8,52 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$ e $8,18 \log_{10} \text{UFC.mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados da viabilidade dessa bactéria, durante 28 dias de estocagem das bebidas lácteas fermentadas estão apresentados na Tabela 2.

Observando a Tabela 2, verificou-se que a viabilidade de *B. longum* BL05 liofilizada reduziu consideravelmente a partir do 7º dia de estocagem sendo menor que 10^2UFC.mL^{-1} já no 14º dia de armazenamento em todas as bebidas. A viabilidade de *B. longum* BL05 congelada foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação à liofilizada na bebida 12 durante todo o período de estocagem, com exceção apenas do 1º dia.

TABELA 2

Viabilidade de *Bifidobacterium longum* BL05 congelada e liofilizada, adicionadas às diferentes bebidas lácteas fermentadas, durante o período de armazenamento

	Média das contagens de <i>B. longum</i> BL05 log (1+UFC.mL ⁻¹)				
	Período de armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
Bebida 10 ^C	8,02 ^{a,A}	7,44 ^{a,A,B}	7,00 ^{a,A}	1,60 ^{b,B}	1,35 ^{b,B}
Bebida 10 ^L	7,53 ^{a,A}	4,76 ^{b,C}	1,11 ^{c,C}	<1,00 ^{c,B}	<1,00 ^{c,B}
Bebida 11 ^C	8,42 ^{a,A}	7,66 ^{a,A,B}	4,67 ^{b,B}	<1,00 ^{c,B}	<1,00 ^{c,B}
Bebida 11 ^L	7,38 ^{a,A}	4,96 ^{b,C}	<1,00 ^{c,C}	<1,00 ^{c,B}	<1,00 ^{c,B}
Bebida 12 ^C	8,47 ^{a,A}	8,15 ^{a,A}	7,46 ^{a,A}	6,29 ^{a,b,A}	5,09 ^{b,A}
Bebida 12 ^L	7,79 ^{a,A}	5,90 ^{a,B,C}	1,28 ^{b,C}	<1,00 ^{b,B}	<1,00 ^{b,B}

Bebida 10: fermentada com co-cultura de St-TA40 + Lb 340; Bebida 11: fermentada com cultura St-TA40; Bebida 12: fermentada com cultura St1

^C Bebidas adicionadas da cultura congelada de *B. longum* BL05

^L Bebidas adicionadas da cultura liofilizada de *B. longum* BL05

Letras minúsculas distintas (a,b) na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento. Letras maiúsculas distintas (A,B,C) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas

Os valores de pH das diferentes bebidas lácteas fermentadas, adicionadas de *B. longum* BL05 proveniente da cultura congelada ou liofilizada estão mostrados na Tabela 3. Quando se compara o pH das bebidas fermentadas com o mesmo tipo de cultura iniciadora, observou-se mesma tendência de redução do pH, durante os dias de armazenamento. Porém, o valor de pH diminuiu de forma significativa em todas as bebidas adicionadas de *B. longum* congelada em relação àquelas adicionadas da bifidobactéria liofilizada.

A pós acidificação afetou diferentemente a viabilidade de *B. longum* BL05 liofilizada ou congelada nas bebidas durante a estocagem refrigerada. A contagem de bifidobactéria na bebida 12, adicionada da cultura congelada, foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação à contagem nas outras bebidas adicionadas da mesma cultura, a partir do 21º dia de armazenamento (Tabela 2). A bebida 12 apresentou a menor taxa de pós acidificação (diferença de pH=0,44 entre a interrupção da fermentação e final do armazenamento) (Tabela 3), em relação às outras bebidas, o que pode ter contribuído para maior viabilidade da bifidobactéria nessa bebida. Entretanto, em todas as bebidas adicionadas da cultura liofilizada de *B. longum* BL05,

a contagem da bifidobactéria reduziu drasticamente, em média 6,8 log a partir do 14º dia de estocagem, independente da taxa de pós acidificação. Portanto, a pós acidificação, não foi o fator principal responsável pela redução de viabilidade da bifidobactéria nas bebidas acrescentadas da cultura liofilizada.

Quanto a contagem da *B. longum* BL05 congelada, é provável, que a forma de ativação, com sucessivos repiques, tenha proporcionado melhores resultados de viabilidade da bifidobactéria nas bebida adicionadas da cultura congelada.

TABELA 3

Variação dos valores de pH durante o período de armazenamento das bebidas lácteas fermentadas, adicionadas de *Bifidobacterium longum* BL05 congelada e liofilizada

	pH das bebidas lácteas fermentadas					
	pH corte	Período de armazenamento (dias)				
		1	7	4	21	28
Bebida 10 ^C	4,8	4,57 ^{a,D}	4,42 ^{b,D}	4,35 ^{c,d,E}	4,32 ^{d,e,E}	4,27 ^{e,F}
Bebida 10 ^L	4,8	4,64 ^{a,C}	4,41 ^{b,D}	4,38 ^{b,D}	4,38 ^{b,D}	4,35 ^{b,D}
Bebida 11 ^C	4,8	4,55 ^{a,E}	4,35 ^{b,E}	4,32 ^{b,F}	4,30 ^{b,F}	4,29 ^{b,E}
Bebida 11 ^L	4,8	4,64 ^{a,C}	4,44 ^{b,C}	4,42 ^{b,C}	4,42 ^{b,C}	4,38 ^{b,C}
Bebida 12 ^C	5,0	4,67 ^{a,B}	4,61 ^{a,b,B}	4,58 ^{b,B}	4,55 ^{b,B}	4,56 ^{b,B}
Bebida 12 ^L	5,0	4,85 ^{a,A}	4,73 ^{b,A}	4,71 ^{b,A}	4,71 ^{b,A}	4,71 ^{b,A}

Bebida 10: fermentada com co-cultura de St-TA40 + Lb 340; Bebida 11: fermentada com cultura St-TA40; Bebida 12: fermentada com cultura St1

^C Bebidas adicionadas da cultura congelada de *B. longum* BL05

^L Bebidas adicionadas da cultura liofilizada de *B. longum* BL05

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento. Letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas

Em geral, em todas as bebidas, os melhores resultados quanto à viabilidade da *B. longum* BL0 foram obtidos para a cultura de bifidobactéria congelada. Abe e colaboradores (2009) também avaliaram a sobrevivência de *B. longum* BB536 liofilizada ou congelada em iogurtes durante a estocagem refrigerada (5°C). Nesse

estudo, a contagem de *B. longum* BB536 no iogurte elaborado com a cultura congelada foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação à cultura liofilizada durante todo o período de armazenamento, corroborando com os resultados da presente pesquisa. Porém, a contagem mínima exigida de 10^6 UFC.mL⁻¹ de *B. longum* BB536, liofilizada ou congelada, foi alcançada após quatro semanas de armazenamento. Esses pesquisadores adicionaram a bifidobactéria no início da fermentação, diferentemente do procedimento adotado no presente estudo, o que poderia ter contribuído para melhores resultados de viabilidade do probiótico a partir da cultura liofilizada. Outros pesquisadores também obtiveram melhores resultados de viabilidade de bifidobactéria em iogurtes adicionados de culturas liofilizadas no início da fermentação. Contagens maiores que 10^6 UFC. mL⁻¹ foram obtidas em iogurtes preparados com culturas liofilizadas de *B. animalis* subsp. *lactis* após 21 dias de estocagem (CASAROTTI *et al.*, 2014; SACCARO *et al.*, 2009).

Os resultados do presente estudo e de outros pesquisadores sugerem que além do tipo de cultura utilizada, congelada ou liofilizada, outros fatores, como por exemplo, o momento de adição do probiótico, no início ou final da fermentação podem influenciar na sobrevivência da bifidobactéria durante o período de estocagem. Adicionalmente, a forma de ativação também pode interferir na viabilidade do micro-organismo. A cultura congelada de *B. longum* BL05 foi ativada por meio de três transferências sucessivas para caldo MRS, o que pode ter contribuído para maior viabilidade das células durante o período de armazenamento. A cultura liofilizada foi ativada a 37°C durante 30 minutos, conforme recomendado por Champagne e colaboradores (2011) e a viabilidade de *B. longum* BL05 foi drasticamente reduzida durante o armazenamento das bebidas. Apesar do resultado de viabilidade não ter sido satisfatório com emprego de cultura liofilizada, as pesquisas descritas anteriormente (CASAROTTI *et al.*, 2014; SACCARO *et al.*, 2009) relataram que a exigência mínima de 10^6 UFC.mL⁻¹ pode ser alcançada com o uso de culturas liofilizadas, adicionadas no início da fermentação.

3.5 Influência da composição da cultura iniciadora e do momento de adição de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} ou BL05 no tempo de fermentação das bebidas lácteas

Os tempos de fermentação na produção das bebidas lácteas com diferentes culturas iniciadoras adicionadas das linhagens de *B. longum* em dois momentos do processo de fabricação - no início ou final da fermentação – estão apresentados na Tabela 4. No grupo das bebidas acrescentadas de bifidobactérias no final da fermentação, observa-se que quando utilizou-se a co-cultura St-TA40 + Lb 340 (bebidas 7 e 10) o tempo de fermentação apesar de menor, não foi significativamente diferente ($p > 0,05$) das bebidas fermentadas apenas com a cultura St-TA40 (8 e 11). O tempo de fermentação da bebida controle produzida com essa co-cultura também não foi diferente ($p > 0,05$) da bebida controle elaborada somente com a cultura St-TA40 (Figura 5), ou seja, a presença do micro-organismo *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* não reduziu de forma significativa o tempo de fermentação das bebidas. Por meio da protocooperação existente entre *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus* espera-se que o tempo de fermentação seja menor em leite fermentado com a co-cultura do que fermentado com cada micro-organismo isoladamente (PFEILER & KLAENHAMMER, 2007). Entretanto, Settachaiomomgkon e colaboradores (2014 a) concluíram que a protocooperação existente entre estas duas bactérias é menos intensa, a produção de ácidos orgânicos é menos acentuada e o tempo de fermentação é maior quando se utiliza na co-cultura linhagens proteolíticas de *S. thermophilus* em comparação com as culturas mistas contendo linhagens não proteolíticas deste micro-organismo. Em nossos estudos, a linhagem de *S. thermophilus* St-TA40 empregada na co-cultura apresentou alta atividade proteolítica (Figura 4), justificando a não redução do tempo de fermentação nas bebidas elaboradas com a co-cultura. Shihata & Shah (2002) obtiveram resultados semelhantes ao adicionar *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* à cultura do tipo ABT (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp e *S. thermophilus*), o qual não reduziu o tempo de fermentação em relação à iogurtes produzidos apenas com a cultura ABT. Segundo os autores, a linhagem de *S. thermophilus* presente na cultura era proteolítica, o que reforça a hipótese de que a probabilidade de protocooperação entre linhagens de *S. thermophilus* com alta atividade proteolítica e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* seja menor.

TABELA 4
Tempo de fermentação das bebidas lácteas produzidas com diferentes culturas iniciadoras

	Composição da cultura iniciadora	pH de interrupção (corte) da fermentação	Linhagem <i>B. longum</i>	Tempo de fermentação em horas	
				Bifidobactéria adicionada no início da fermentação	Bifidobactéria adicionada no final fermentação
Bebida 1 e 7	<i>S.thermophilus</i> TA 40 + <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB 340	4,8	<i>B.longum</i> 5 ^{1A}	4,39 ^{a,A,B}	4,53 ^{a,B}
Bebida 2 e 8	<i>S.thermophilus</i> TA 40	4,8	<i>B.longum</i> 5 ^{1A}	3,97 ^{b,B,C}	5,06 ^{a,B}
Bebida 3 e 9	<i>S.thermophilus</i> ST1	5,0	<i>B.longum</i> 5 ^{1A}	3,53 ^{b,B,C}	7,44 ^{a,A}
Bebida 4 e 10	<i>S.thermophilus</i> TA 40 + <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LB 340	4,8	<i>B.longum</i> BL 05	4,94 ^{a,A}	4,56 ^{a,B}
Bebida 5 e 11	<i>S.thermophilus</i> TA 40	4,8	<i>B.longum</i> BL 05	3,25 ^{b,C}	4,94 ^{a,B}
Bebida 6 e 12	<i>S.thermophilus</i> ST1	5,0	<i>B.longum</i> BL 05	3,83 ^{b,B,C}	7,11 ^{a,A}

Bebidas 1,2,3,4,5 e 6: bifidobactérias adicionadas no início da fermentação. Bebidas 7,8,9,10,11 e 12; bifidobactérias adicionadas no final da fermentação.

Letras minúsculas distintas (a,b) na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) do tempo de fermentação entre os momentos de adição das bifidobactérias. Letras maiúsculas distintas (A,B,C) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) do tempo de fermentação entre as diferentes bebidas

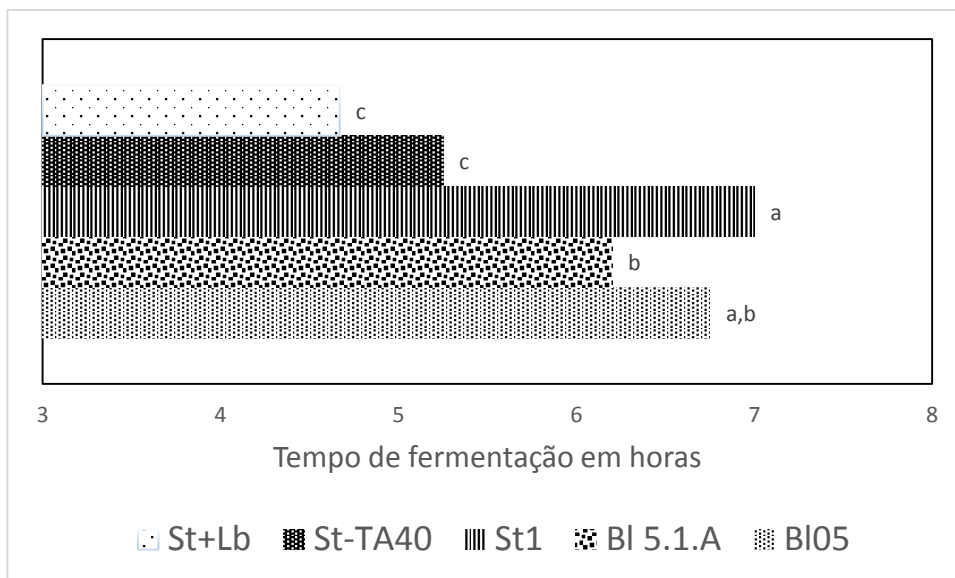


FIGURA 5: Tempo de fermentação das bebidas lácteas controles

St+Lb: bebida fermentada com co-cultura de St-TA40 + Lb 340; St-TA40: bebida fermentada com *S. thermophilus* St-TA40; BI 5^{1A}: bebida fermentada com *B. longum* 5^{1A}; BI 05: bebida fermentada com *B. longum* BI 05; St1: bebida fermentada com *S. thermophilus* St1. Letras distintas (a,b,c) indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre o tempo de fermentação das bebidas controles.

Considerando ainda o mesmo grupo de bebidas, as fermentadas com a cultura St1 (9 e 12), apresentaram tempo de fermentação significativamente maior (cerca de 3 horas) ($p < 0,05$) que as outras bebidas, apesar de a fermentação ter sido interrompida em pH mais alto (5,0). O tempo de fermentação da bebida controle fermentada com a cultura St1 também foi significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao tempo de fermentação das bebidas controles produzidas com as outras culturas iniciadoras (Figura 5). Linhagens de *S. thermophilus* com alta atividade de proteases crescem e acidificam mais rapidamente o leite (GALIA *et al.*, 2009; SHAHBAL *et al.*, 1993) do que linhagens com menor atividade proteolítica. O inóculo das bebidas produzidas com a cultura St1 é constituído de linhagem de *S. thermophilus* com baixa atividade proteolítica (Figura 4) em relação às linhagens constituintes da cultura comercial St-TA40, o que proporcionou a redução do tempo de fermentação das bebidas produzidas com esta última cultura.

No grupo de bebidas nas quais as bifidobactérias foram acrescentadas no início da fermentação, não houve alteração significativa no tempo de fermentação ($p > 0,05$) quando se compara as bebidas elaboradas com as mesmas culturas iniciadoras (bebidas 1 e 4; bebidas 2 e 5; bebidas 3 e 6). Não houve também redução no tempo

de fermentação quando se utilizou a co-cultura (bebidas 1 e 4) em relação à fermentada com cultura St-TA40 (bebidas 2 e 5), composta de linhagens proteolíticas de *S. thermophilus*. Este resultado corrobora com os achados de Settachaiomomgkon e colaboradores (2014a), uma vez que, no uso de co-culturas, a interação entre linhagens proteolíticas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii bulgaricus* é menos intensa e a acidificação do leite mais lenta. Além disso, no presente estudo a proporção de *S. thermophilus* para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi alta (100:1), o que pode ter contribuído para a não redução do tempo de fermentação.

Em todas as bebidas em que as bifidobactérias foram adicionadas no início da fermentação, verificou-se redução significativa no tempo de fermentação ($p < 0,05$) em relação às acrescentadas de bifidobactérias no final da fermentação, com exceção das bebidas produzidas com a co-cultura (1 e 7; 4 e 10). Estes resultados sugerem interação entre as linhagens de *B. longum* e as bactérias da cultura iniciadora, uma vez que o tempo de fermentação foi menor para a maioria das bebidas do primeiro grupo. Oliveira e colaboradores (2012) relataram claro efeito sinérgico entre *B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus* TA040. Diversos aspectos foram observados por esses pesquisadores, que reforçam a hipótese de interação entre estes dois micro-organismos: a concentração final (g de massa seca.L⁻¹) de ambos os micro-organismos (*B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*) e a liberação de galactose no meio foi significativamente maior ($p < 0,05$) no leite fermentado com co-cultura em relação ao leite fermentado com cada cultura isolada. Ainda, o tempo de fermentação foi menor para o leite fermentado com a co-cultura em relação ao tempo de fermentação com o leite fermentado com cada cultura isolada.

Considerando ainda a redução no tempo de fermentação entre as bebidas adicionadas de bifidobactérias no início e final da fermentação, observou-se que esta redução foi menos acentuada (cerca de 28%) entre as bebidas 2 e 8; 5 e 11, formuladas com linhagem proteolítica de *S. thermophilus* (St-TA40), em comparação com a diminuição entre as bebidas 3 e 9; 6 e 12 (cerca de 50%), formuladas com linhagem de *S. thermophilus* (St1) de menor atividade proteolítica. Entretanto, não houve mudança significativa no tempo de fermentação ($p > 0,05$) entre as bebidas 1 e 7; 4 e 10, formuladas com a cultura mista de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*, sendo ambos os micro-organismos proteolíticos. Portanto, sugere-se que a interação benéfica entre bifidobactérias e linhagens com menor atividade

proteolítica da cultura iniciadora, seja mais provável que com linhagens de maior atividade. Settachaimongkon e colaboradores (2014 b) também não observaram diferença significativa ($p > 0,05$) na alteração de pH durante a fermentação entre iogurte tradicional (fermentado com a co-cultura de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) e o mesmo iogurte adicionado de *B. animalis* subsp. *lactis* BB12, o que corrobora com a hipótese proposta. Segundo Champagne e colaboradores (2005), a adição de bactérias probióticas à cultura iniciadora de alta atividade proteolítica e rápida acidificação, podem inibir as bactérias probióticas, o que não promoveria uma interação benéfica entre estes micro-organismos.

Devido à baixa atividade proteolítica de *Bifidobacterium*, estas crescem lentamente em leite quando comparadas às bactérias do iogurte (SHIHATA & SHAH, 2000), além de produzirem menores quantidades da enzima β -galactosidase que degrada a lactose (PRASANNA *et al.*, 2014). As fermentações controle do presente estudo com as culturas de *Bifidobacterium longum* BL05 e 5^{1A} foram conduzidas com inóculo de 10^8 UFC.mL⁻¹ de células e apresentaram tempo de fermentação de 6,75 e 6,2 horas, respectivamente (Figura 5). No entanto, em testes utilizando nas fermentações as mesmas bifidobactérias com concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹ de células no inóculo, os tempos foram de 18 e 20 horas (dados não mostrados), para *B. longum* 5^{1A} e BL05, respectivamente confirmando que a concentração do inóculo de bifidobactérias interfere no tempo de fermentação. No presente trabalho, inóculos de 10^6 UFC.mL⁻¹ células também foram utilizados nas fermentações controles com as culturas iniciadoras de *S. thermophilus* (St-TA40 ou St1). Portanto, estes resultados confirmam a baixa atividade proteolítica das bifidobactérias, o que resulta em elevado tempo de fermentação do leite.

3.6 Vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas: Determinação do pH, acidez e viabilidade de *Bifidobacterium longum* BL05 e 5^{1A} e das bactérias das culturas iniciadoras

3.6.1 pH e acidez

Os valores de pH durante o período de estocagem refrigerada, das diferentes bebidas lácteas adicionadas de bifidobactérias no início ou no final da fermentação estão apresentados na Tabela 5. Observa-se que a partir do 7^o dia de armazenamento, o pH das bebidas acrescentadas de bifidobactérias no início da fermentação foi maior em relação ao pH das bebidas adicionadas de bifidobactérias no final da fermentação, com exceção da bebida 9. Dentro deste grupo de bebidas a diminuição do pH acentuou a partir do 7^o dia, e naquele esta redução foi mais evidente a partir do 21^o dia de estocagem. Uma hipótese a ser considerada, neste caso, é a possibilidade de inibição de linhagens de *S. thermophilus* pelas bifidobactérias, o que poderia retardar o processo de pós acidificação, promovido especialmente por bactérias da cultura iniciadora. Segundo Mattila-Sandholm e colaboradores (2002), bifidobactérias apresentam limitada capacidade de produção de ácidos orgânicos em baixas temperaturas, como por exemplo, na estocagem refrigerada. Fraca inibição de algumas linhagens de *S. thermophilus* por diferentes espécies de *Bifidobacterium* foi observados em testes de antagonismo realizados por Vinderola e colaboradores (2002). Em nosso estudo, houve redução de 0,6 e 1,3 log (dados não mostrados) na contagem média de *S. thermophilus* St-TA40 e St1, respectivamente, no 1^o dia de estocagem, nas bebidas adicionadas de bifidobactérias no início da fermentação em relação às acrescentadas de bifidobactérias no final da fermentação.

O pH das bebidas fermentadas com a co-cultura St-TA 40 + Lb 340, não diferiu significativamente ($p > 0,05$) das bebidas fermentadas apenas com a cultura St-TA 40, independentemente do momento de adição das bifidobactérias. Exceção apenas entre as bebidas 1 e 2 no 14^o dia e entre as bebidas 4 e 5 no 1^o dia, no grupo das bifidobactérias acrescentadas no início da fermentação.

TABELA 5
 Variação de pH das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de bifidobactérias no início ou final da fermentação durante o período de armazenamento

	pH das bebidas lácteas fermentadas				
	Período de armazenamento em dias				
	Bifidobactérias adicionadas no início da fermentação				
	1	7	14	21	28
Bebida 1	4,55 ^{a,C,x}	4,48 ^{a,C,x}	4,47 ^{a,D,x}	4,48 ^{a,C,x}	4,39 ^{b,C,x}
Bebida 2	4,56 ^{a,C,x}	4,55 ^{a,C,x}	4,56 ^{a,B,C,x}	4,46 ^{b,C,x}	4,47 ^{b,C,x}
Bebida 3	4,65 ^{a,B,x}	4,64 ^{a,B,x}	4,63 ^{a,B,x}	4,63 ^{a,B,x}	4,62 ^{a,B,x}
Bebida 4	4,53 ^{a,C,x}	4,53 ^{a,C,x}	4,49 ^{a,c,D,x}	4,50 ^{a,C,x}	4,40 ^{b,C,x}
Bebida 5	4,64 ^{a,B,x}	4,54 ^{b,C,x}	4,54 ^{b,C,D,x}	4,43 ^{c,C,x}	4,40 ^{c,C,x}
Bebida 6	5,02 ^{a,A,x}	5,01 ^{a,A,x}	4,98 ^{a,A,x}	4,94 ^{a,A,x}	4,95 ^{a,A,x}
	Bifidobactérias adicionadas no final da fermentação				
Bebida 7	4,59 ^{a,B,x}	4,36 ^{b,B,y}	4,34 ^{b,B,y}	4,34 ^{b,B,y}	4,31 ^{b,B,x}
Bebida 8	4,58 ^{a,B,x}	4,37 ^{b,B,y}	4,31 ^{b,B,y}	4,28 ^{b,B,y}	4,29 ^{b,B,x}
Bebida 9	4,68 ^{a,A,x}	4,63 ^{a,b,A,x}	4,62 ^{a,b,A,x}	4,62 ^{a,b,A,x}	4,59 ^{b,A,x}
Bebida 10	4,57 ^{a,B,x}	4,42 ^{b,B,y}	4,35 ^{b,c,B,y}	4,32 ^{c,B,y}	4,27 ^{c,B,y}
Bebida 11	4,55 ^{a,B,x}	4,35 ^{b,B,y}	4,32 ^{b,B,y}	4,30 ^{b,B,y}	4,29 ^{b,B,y}
Bebida 12	4,67 ^{a,A,y,y}	4,61 ^{a,b,A,y}	4,58 ^{b,A,y}	4,55 ^{b,A,y}	4,56 ^{b,A,y}

Bebidas 1 e 7: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 5^{1A}; Bebidas 2 e 8: cultura de St-TA40 + BI 5^{1A}; Bebidas 3 e 9: cultura de St1 + BI 5^{1A} Bebidas 4 e 10: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 05; Bebidas 5 e 11: cultura de St-TA40 + BI 05; Bebidas 6 e 12: cultura de St1 + BI 05. Letras minúsculas distintas (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento das bebidas. Letras maiúsculas distintas (A,B,C,D) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas dentro do mesmo dia e grupo. Letras diferentes (x,y) indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dois momentos de adição das bifidobactérias, considerando o mesmo tipo de bebida e dentro do mesmo dia

Segundo Kailasapathy e colaboradores (2008) para reduzir o problema da pós acidificação, pode-se usar cultura iniciadora sem a bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para a fermentação do leite.-No entanto, a retirada desse micro-organismo da cultura iniciadora não contribuiu para a redução da pós acidificação. Em nosso estudo, a cultura de *S. thermophilus* St-TA40 usada na co-cultura com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* também apresentou alta capacidade de acidificação, o que pode ter

contribuído para não redução do pH das bebidas com a retirada deste micro-organismo da co-cultura. Além disso, a proporção de *S. thermophilus* para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* usada na co-cultura foi alta (100:1) o que pode ter contribuído para variação mínima nos valores de pH entre os dois tipos de bebidas durante o período de armazenamento.

Os valores de pH das bebidas fermentadas com a cultura St1 (bebidas 3 e 6; 9 e 12), independentemente do momento de adição das bifidobactérias, apresentaram pequena variação durante os 28 dias de estocagem. Estes resultados estão relacionados com a menor capacidade de acidificação e menor atividade proteolítica da bactéria *S. thermophilus* St1. Como já relatado, micro-organismos que apresentam alta atividade proteolítica crescem e acidificam mais rapidamente o leite (GALIA *et al.*, 2009; SHAHBAL *et al.*, 1993).

As alterações nos valores de pH das bebidas lácteas controles durante os 28 dias de armazenamento estão apresentados na Figura 6. A mesma tendência em relação à diminuição de pH foi observada para as bebidas controles fermentadas com as bactérias da cultura iniciadora, sendo o maior valor de pH observado para a bebida fermentada com St1 e o menor com a co-cultura.

Nas bebidas controles fermentadas com *B. longum* BL05 ou 5^{1A}, os valores de pH praticamente não alteraram durante os 28 dias, exceção apenas para o pH da bebida com a *B. longum* 5^{1A} no 1º dia de armazenamento. Este resultado pode ser justificado pela capacidade limitada de produção de ácidos orgânicos pelas bifidobactérias em baixas temperaturas (MATTILA-SANDHOLM *et al.*, 2002).

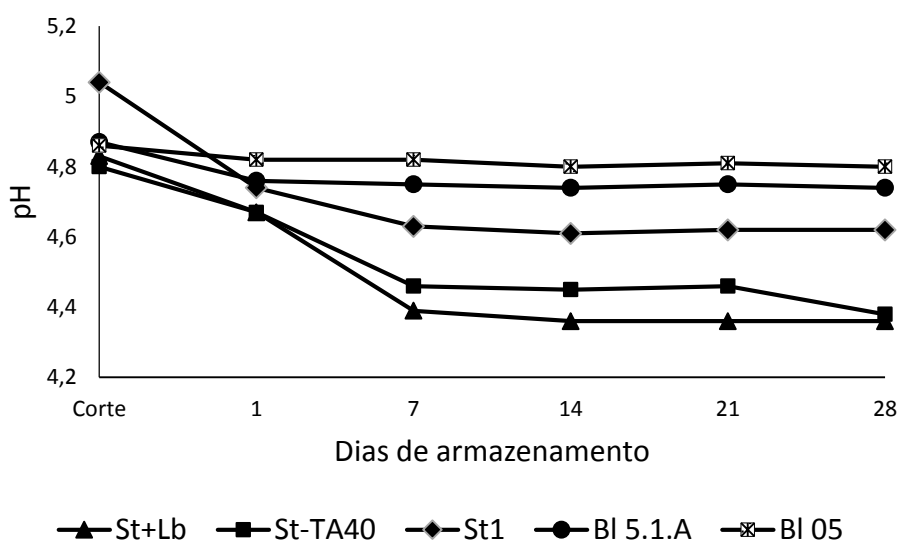


FIGURA 6: Mudança nos valores de pH das bebidas lácteas controladas durante o período de armazenamento

St+Lb: bebida fermentada com a co-cultura de St-TA40 + Lb 340; St-TA40: bebida fermentada com *S.thermophilus* St-TA40; St1: bebida fermentada com *S.thermophilus* St1; BI 5^{1A}: bebida fermentada com *B. longum* 5^{1A}; BI 05: bebida fermentada com *B. longum* BI 05

Os valores de acidez durante o período de estocagem refrigerada para as diferentes bebidas lácteas fermentadas adicionadas de bifidobactérias no início ou no final da fermentação estão apresentados na Tabela 6. Os maiores valores de acidez foram obtidos para as bebidas fermentadas com a co-cultura St-TA40 + Lb 340 e com a cultura St-TA40 independente do momento de adição de ambas as linhagens de *B. longum*. As menores variações e valores da acidez foram observadas para as bebidas fermentadas com a cultura St1 (bebidas 3 e "6; 9 e 12) devido a menor capacidade de acidificação da linhagem de *S. thermophilus* St1 associada ao maior pH de interrupção da fermentação destas bebidas.

A legislação brasileira sobre os padrões de identidade e qualidade das bebidas lácteas não estabelece valores de acidez para esses produtos (BRASIL, 2005).

TABELA 6
Variação da acidez das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium longum* BL05 e 5^{1A} no início ou final da fermentação, durante o período de armazenamento

Acidez titulável (% em ácido láctico) das bebidas lácteas fermentadas					
Período de armazenamento em dias					
Bifidobactérias adicionadas no início da fermentação					
	1	7	14	21	28
Bebida 1	0,65 ^{b,A,x}	0,69 ^{a,A,x}	0,70 ^{a,A,x}	0,70 ^{a,A,x}	0,72 ^{a,A,x}
Bebida 2	0,59 ^{b,B,x}	0,59 ^{b,B,x}	0,61 ^{a,b,B,x}	0,63 ^{a,B,x}	0,63 ^{a,B,x}
Bebida 3	0,57 ^{a,B,x}	0,56 ^{a,B,C,x}	0,58 ^{a,B,C,x}	0,58 ^{a,C,x}	0,58 ^{a,C,x}
Bebida 4	0,56 ^{c,B,C,x}	0,59 ^{b,B,x}	0,62 ^{a,b,B,x}	0,63 ^{a,B,x}	0,64 ^{a,B,x}
Bebida 5	0,53 ^{b,C,x}	0,54 ^{b,C,x}	0,57 ^{b,C,x}	0,61 ^{a,B,C,x}	0,62 ^{a,B,C,x}
Bebida 6	0,40 ^{b,D,x}	0,40 ^{b,D,x}	0,41 ^{b,D,x}	0,44 ^{a,D,x}	0,46 ^{a,D,x}
Bifidobactérias adicionadas no fim da fermentação					
Bebida 7	0,54 ^{b,A,B,x}	0,61 ^{a,A,x}	0,63 ^{a,A,x}	0,62 ^{a,A,x}	0,63 ^{a,B,x}
Bebida 8	0,53 ^{c,B,C,x}	0,61 ^{b,A,x}	0,63 ^{a,b,A,x}	0,63 ^{a,b,A,x}	0,67 ^{a,A,x}
Bebida 9	0,50 ^{a,C,D,x}	0,50 ^{a,B,x}	0,51 ^{a,B,x}	0,54 ^{a,B,x}	0,54 ^{a,C,x}
Bebida 10	0,57 ^{c,A,x}	0,62 ^{b,A,x}	0,66 ^{a,A,x}	0,66 ^{a,A,x}	0,66 ^{a,A,x}
Bebida 11	0,56 ^{b,A,B,x}	0,62 ^{a,A,x}	0,63 ^{a,A,x}	0,64 ^{a,A,x}	0,64 ^{a,A,B,x}
Bebida 12	0,47 ^{b,D,x}	0,51 ^{a,B,x}	0,51 ^{a,B,x}	0,51 ^{a,B,x}	0,51 ^{a,C,x}

Bebidas 1 e 7: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 5^{1A}; Bebidas 2 e 8: cultura de St-TA40 + BI 5^{1A}; Bebidas 3 e 9: cultura de St1 + BI 5^{1A} Bebidas 4 e 10: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 05; Bebidas 5 e 11: cultura de St-TA40 + BI 05; Bebidas 6 e 12: cultura de St1 + BI 05. Letras minúsculas distintas (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento das bebidas. Letras maiúsculas distintas (A,B,C,D) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas dentro do mesmo dia e grupo. Letras diferentes (x,y) indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dois momentos de adição das bifidobactérias, considerando o mesmo tipo de bebida e dentro do mesmo dia.

3.6.2 Viabilidade das linhagens de *Bifidobacterium longum*

As contagens de células viáveis de *B. longum* 5^{1A} (bebidas 1,2,3 / 7,8,9) e *B. longum* BL05 (bebidas 4,5,6 / 10,11,12) durante o período de estocagem refrigerada (5°C) das diferentes formulações das bebidas lácteas fermentadas, adicionadas das bifidobactérias no início ou final da fermentação estão apresentadas na Tabela 7.

A legislação brasileira (ANVISA, 2008) exige que a contagem dos microorganismos probióticos seja no mínimo de 10⁸ UFC na porção diária do produto pronto para o consumo. Considerando-se o consumo médio de uma porção de bebida láctea de 200 mL, a concentração de bifidobactérias deverá ser de 10⁶ UFC.mL⁻¹ durante a vida de prateleira do produto. Essa condição foi atendida até o 21º dia para a *B. longum* BL05 nas bebidas fermentadas com St1 (bebidas 6 e 12), independente do momento de adição desta bactéria. Para as demais bebidas a contagem das bifidobactérias foi assegurada até o 7º dia, com exceção da contagem de *B. longum* 5^{1A} que foi de 5,59log₁₀UFC mL⁻¹ na bebida 7.

A viabilidade de *B. longum* 5^{1A} foi semelhante nas bebidas (1 e 2; 7 e 8) fermentadas com a co-cultura St-TA40 + Lb 340 e com a cultura St-TA40, durante o período de estocagem, independente do momento da adição da bifidobactéria. Este resultado também foi verificado para a linhagem de *B. longum* BL05 nas bebidas 4 e 5; 10 e 11, fermentadas com as mesmas culturas. De maneira geral, a redução da contagem das bifidobactérias nessas bebidas ocorreu a partir do 14º dia de estocagem. Observou-se que a retirada da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da cultura iniciadora (bebidas 2,5; 8,11) não alterou a sobrevivência da *Bifidobacterium*. Resultados semelhantes foram relatados por Shihata & Shah (2002) ao adicionarem linhagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* à culturas do tipo ABT para a fermentação do iogurte. A contagem de *Bifidobacterium* foi semelhante nos iogurtes fermentados apenas com a cultura ABT e naqueles adicionados de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* durante 28 dias de armazenamento. Em nosso estudo, este resultado pode estar associado à elevada capacidade de acidificação da cultura de *S. thermophilus* (St-TA40) usada em conjunto com *L. delbrueckii* subsp. *bugaricus*, o que não proporcionou melhoria na viabilidade das bifidobactérias e diminuição da acidez, quando *L. delbrueckii* subsp. *bugaricus* foi retirado da co-cultura. Além disso, a proporção de *S. thermophilus* para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* foi alta (100:1) o

que não provocou alterações significantes entre os valores de pH das bebidas fermentadas com a co-cultura e com a cultura St.-TA40 (Tabela 5) durante o período de estocagem das bebidas.

TABELA 7

Viabilidade de linhagens de *Bifidobacterium longum* (5^{1A} e BI 05) em diferentes tipos de bebidas lácteas adicionadas destas bactérias no início e final da fermentação durante o período de armazenamento

	Média das contagens de bifidobactérias log (1+contagem UFC.mL ⁻¹)				
	Período de armazenamento (dias)				
	Bifidobactérias adicionadas no início da fermentação				
	1	7	14	21	28
Bebida 1	8,43 ^{a,A,x}	7,79 ^{a,A,x}	4,67 ^{b,B,x}	4,17 ^{b,B,x}	3,56 ^{.B,C,x}
Bebida 2	8,35 ^{a,A,x}	6,99 ^{a,b,A,x}	5,81 ^{b,c,B,x}	4,61 ^{c,B,x}	4,73 ^{c,A,B,x}
Bebida 3	8,19 ^{a,A,x}	7,09 ^{a,A,x}	5,04 ^{b,B,x}	4,18 ^{b,c,B,x}	2,54 ^{c,C,D,x}
Bebida 4	8,51 ^{a,A,x}	7,80 ^{a,A,x}	5,46 ^{b,B,x}	3,68 ^{c,B,x}	3,34 ^{c,B,C,x}
Bebida 5	8,20 ^{a,A,x}	7,38 ^{a,b,A,x}	5,75 ^{b,c,B,x}	4,11 ^{c,B,x}	1,08 ^{d,D,x}
Bebida 6	8,25 ^{a,A,x}	8,00 ^{a,A,x}	7,79 ^{a,A,x}	6,54 ^{a,b,A,x}	5,50 ^{b,A,x}
	Bifidobactérias adicionadas no final da fermentação				
Bebida 7	7,72 ^{a,A,x}	5,59 ^{b,C,y}	3,55 ^{c,D,x}	1,02 ^{d,C,D,y}	0,00 ^{d,C,y}
Bebida 8	7,31 ^{a,A,x}	5,97 ^{a,b,B,C,x}	4,62 ^{b,C,D,x}	2,52 ^{c,B,C,y}	1,83 ^{c,B,y}
Bebida 9	7,75 ^{a,A,x}	6,53 ^{a,b,A,B,C,x}	5,55 ^{b,B,C,x}	4,00 ^{b,B,x}	4,02 ^{b,A,x}
Bebida 10	8,02 ^{a,A,x}	7,44 ^{a,A,B,x}	6,94 ^{a,A,B,x}	1,60 ^{b,C,D,y}	1,35 ^{b,B,C,y}
Bebida 11	8,42 ^{a,A,x}	7,66 ^{a,A,B,x}	4,67 ^{b,C,D,x}	<1,00 ^{c,D,y}	< 1,00 ^{c,C,x}
Bebida 12	8,47 ^{a,A,x}	8,15 ^{a,A,x}	7,46 ^{a,b,A,x}	6,29 ^{b,c,A,x}	5,09 ^{c,A,x}

Bebidas 1 e 7: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 5^{1A}; Bebidas 2 e 8: cultura de St-TA40 + BI 5^{1A}; Bebidas 3 e 9: cultura de St1 + BI 5^{1A} Bebidas 4 e 10: co-cultura de St-TA40 + Lb 340 + BI 05; Bebidas 5 e 11: cultura de St-TA40 + BI 05; Bebidas 6 e 12: cultura de St1 + BI 05. Letras minúsculas distintas (a,b,c) na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento das bebidas. Letras maiúsculas distintas (A,B,C,D) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas dentro do mesmo dia e grupo. Letras diferentes (x,y) indicam diferença estatística pelo teste de Duncan ($p < 0,05$) entre os dois momentos de adição das bifidobactérias, considerando o mesmo tipo de bebida e dentro do mesmo dia.

Quando se compara a viabilidade das linhagens de *B. longum* quanto ao momento de adição das bifidobactérias nas bebidas fermentadas com a co-cultura St-TA40 + Lb 340 (bebidas 1,4 / 7,10) e com a cultura St-TA 40 (bebidas 2,5 / 8/11), os melhores resultados foram observados para o grupo de bebidas acrescentadas de bifidobactérias no início da fermentação. Nessas bebidas, após 21 dias de armazenamento, a contagem das bifidobactérias foi aproximadamente 3 log superior à contagem nas bebidas adicionadas de *B. longum* no final da fermentação. Estes resultados podem estar correlacionados com a estabilidade do pH nas bebidas adicionadas de *B. longum* no início da fermentação durante a estocagem. Observou-se na Tabela 5 que os valores de pH não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) nestas bebidas até o 14º dia, com exceção apenas da bebida 5. Já para as mesmas bebidas acrescentadas das linhagens de *B. longum* no final da fermentação, os valores de pH reduziram significativamente ($p < 0,05$) a partir do 7º dia de estocagem. Sugere-se, portanto, a adição de *Bifidobacterium* no início da fermentação em bebidas lácteas ao se usar cultura iniciadora do iogurte contendo linhagens proteolíticas de *S. thermophilus*. Esse procedimento proporcionou maior viabilidade das células de *Bifidobacterium* durante a estocagem refrigerada, porém, segundo Champagne e colaboradores (2005) a proporção dos micro-organismos deve ser estabelecida de forma cautelosa para evitar sabor desagradável causado pelo ácido acético produzido pelas bifidobactérias durante a fermentação. Hull e colaboradores (1984) também encontraram altas contagens de *L. acidophilus* em iogurtes adicionados do probiótico no início da fermentação em relação àqueles acrescentados da bactéria no final, após três semanas de estocagem refrigerada. No entanto, nas bebidas fermentadas com a linhagem de *S. thermophilus* (ST1), com menor capacidade de acidificação, o momento de adição das linhagens de *B. longum* BL05 e 5^{1A} não interferiu na viabilidade das bifidobactérias durante a estocagem refrigerada. Este resultado provavelmente se deve a estabilidade do pH das bebidas fermentadas com St1 (Tabela 5) durante o período de armazenamento das bebidas, independente do momento da adição das bifidobactérias.

Os melhores resultados quanto à viabilidade das bifidobactérias nas bebidas lácteas fermentadas, foram das bebidas 2 e 9 para a linhagem de *B. longum* 5^{1A} acrescentadas da bifidobactéria no início e final da fermentação respectivamente e para a linhagem de *B. longum* BL05 na bebida 6 e 12, independentemente do

momento da adição da bactéria. O maior pH de corte (5,0) associado à pequena variação nos valores de pH durante o armazenamento observado nas bebidas 9, 6 e 12, fermentadas com St1, contribuíram para maior viabilidade das bifidobactérias. Como pode ser observado na Tabela 5, os valores de pH dessas bebidas permaneceram mais elevado do que das outras bebidas durante todo o período de armazenamento, independente do momento de adição das linhagens de *B. longum*. Porém, mesmo que o melhor resultado de viabilidade da linhagem 5^{1A} tenha sido observado na bebida 9, fermentada com St1, de menor acidez, a contagem desta reduziu consideravelmente, não alcançando a contagem mínima exigida pela legislação. Este resultado pressupõe que a linhagem de *B. longum* 5^{1A}, além da acidez, é bastante sensível a outros fatores de estresse como por exemplo, taxa de oxigênio dissolvido no produto.

A linhagem de *B. longum* 5^{1A} mostrou-se menos resistente aos fatores de estresse que a linhagem BL05. Nas bebidas fermentadas com St1, a contagem das células de *B. longum* 5^{1A} (bebidas 3 e 9), foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação à contagem de *B. longum* BL05 (bebidas 6 e 12), a partir do 14^o dia de estocagem, independentemente do momento de adição das bifidobactérias. Na bebida 10, a contagem da bactéria BL05 manteve o nível desejado até o 14^o dia de estocagem, com redução de 1,58 log UFC mL⁻¹ nos valores desta, em relação à contagem inicial. Entretanto, na bebida 7 fermentada com o mesmo inóculo, houve uma redução de 4,46 log UFC mL⁻¹ na contagem de *B. longum* 5^{1A} durante o mesmo período de armazenamento. Nas bebidas controles fermentadas com *B. longum* BL05 ou 5^{1A}, a contagem da linhagem 5^{1A} foi acentuadamente menor do que de BL05 a partir do 7^o dia de estocagem (Figura 7), confirmando a menor resistência às condições de estresse da linhagem 5^{1A}.

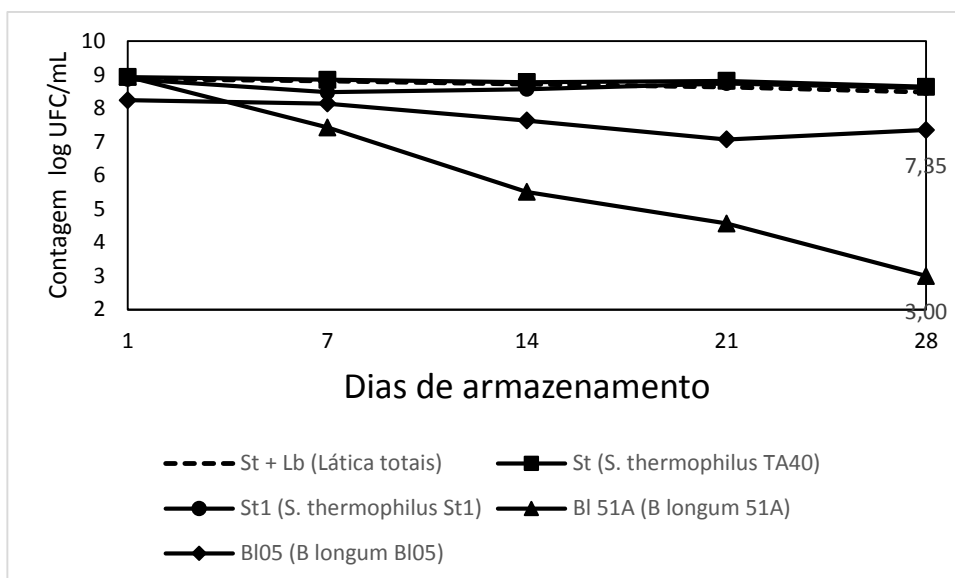


FIGURA 7: Contagem das bactérias (UFC. mL⁻¹) constituintes da cultura das bebidas lácteas controles durante o período de armazenamento

3.6.3 Viabilidade das bactérias das culturas iniciadoras

A viabilidade das bactérias da cultura iniciadora durante o período de armazenamento das diferentes bebidas lácteas está mostrada na Figura 8. O aumento do número total de bactérias lácticas foi semelhante nas bebidas fermentadas com a co-cultura de St-TA40 + Lb-340, independente do momento da adição das bifidobactérias. Resultado similar foi observado para o crescimento de *S. thermophilus* nas bebidas fermentadas com a cultura St-TA40. Entretanto, a contagem de *S. thermophilus* (St1) foi em média 1,22 log inferior nas bebidas 3 e 6, adicionadas de bifidobactérias no início da fermentação em relação às bebidas 9 e 12 acrescidas dos probióticos no final da fermentação. É provável que as bifidobactérias, quando adicionadas no início da fermentação, possam ter inibido o crescimento da linhagem de *S. thermophilus* St1, sendo que esta inibição é dependente da linhagem de *S. thermophilus* presente na fermentação. Vinderola e colaboradores (2002) observaram fraca inibição de algumas linhagens de *S. thermophilus* por diferentes espécies de *Bifidobacterium* em testes de antagonismo corroborando com essa hipótese.

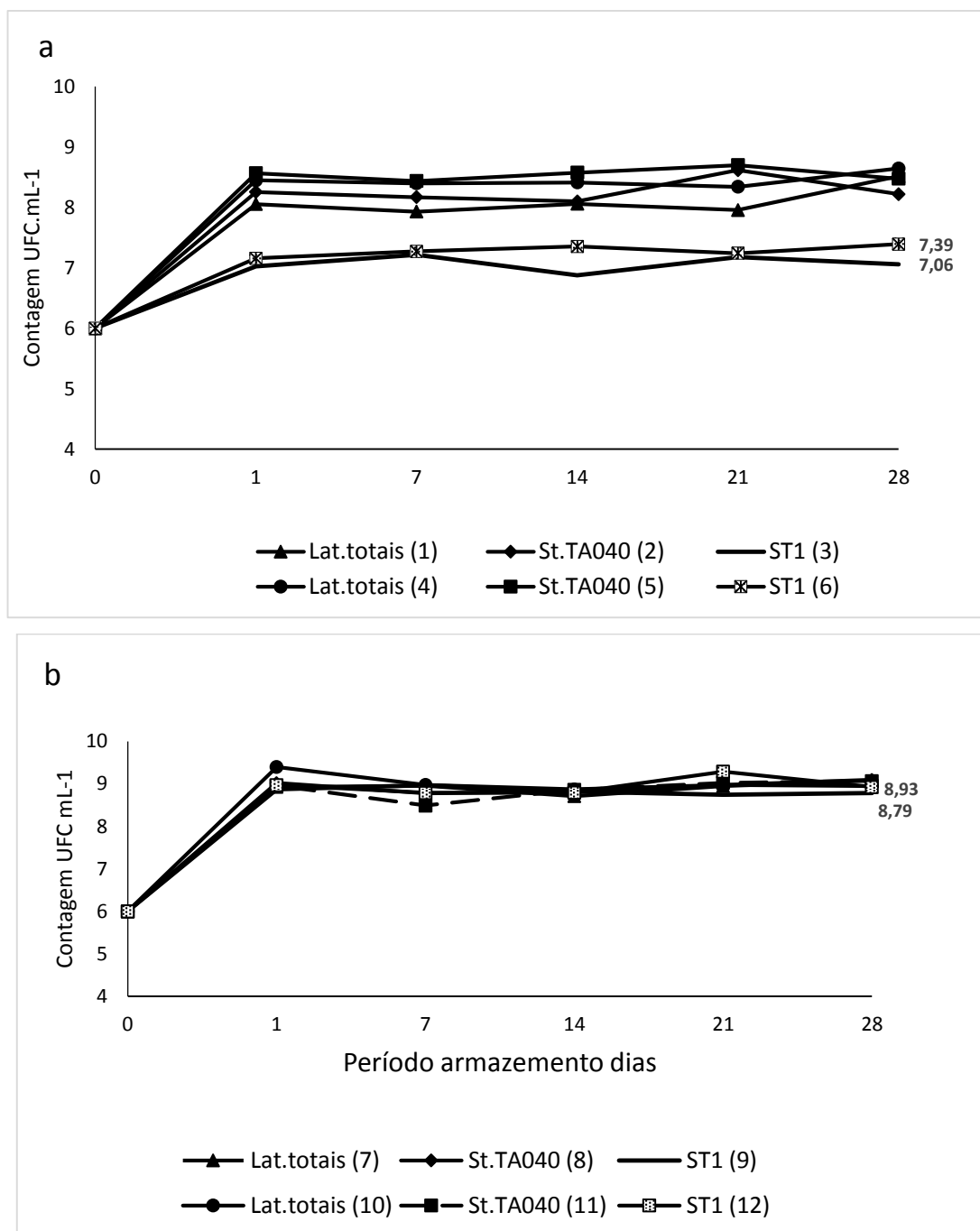


FIGURA 8: Viabilidade das bactérias da cultura iniciadora durante o período de armazenamento das diferentes bebidas lácteas fermentadas

Lat. totais 1,4,7,10: viabilidade de *S. thermophilus* St-TA40 + *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb 340 nas bebidas 1,4,7,10; St.TA040 (2,5,8,11): viabilidade de *S. thermophilus* St-TA 40 nas bebidas 2,5,8,11; St1 (3,6,9,12): viabilidade de *S. thermophilus* ST1 nas bebidas 3,6,9,12
 a) Bebidas adicionadas das bifidobactérias no início da fermentação.
 b) Bebidas adicionadas das bifidobactérias no final da fermentação

A contagem total de bactérias lácticas alcançou o mínimo de 10^6 UFC. mL⁻¹ exigido pela legislação (BRASIL, 2005), durante o período de estocagem para todos os tipos de bebidas lácteas fermentadas.

3.7 Susceptibilidade à sinérese

Os valores do índice de sinérese durante o período de estocagem das bebidas lácteas fermentadas acrescentadas das linhagens de *B. longum* no final da fermentação estão apresentados na Tabela 8. Apenas no 1º dia de armazenamento, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no índice de sinérese entre a bebida 7 e as bebidas 10 e 11. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores para bebidas lácteas probióticas elaboradas com a mesma porcentagem de soro entre o 7º e o 28º dia de armazenamento (CUNHA *et al.*, 2009; PEREIRA, 2012). Vários fatores podem estar relacionados no desprendimento do soro de leite ao longo do período de estocagem destacando-se a acidez da matriz alimentar. Penna e colaboradores (2006) afirmam que a sinérese é mais acentuada em produtos com baixos valores de pH, como iogurtes e bebidas lácteas. Adicionalmente, a interferência das bactérias da cultura iniciadora na formação do gel se dá pela alteração na acidez do meio ocasionada pela fermentação influenciada pelas linhagens e proporção dos micro-organismos constituintes dessa cultura (CASTILHO *et al.*, 2006). No presente estudo, como pode ser observado na Tabela 6, os valores de acidez das bebidas 7 e 10 (fermentadas com a co-cultura) não diferiram ($p > 0,05$) das bebidas 8 e 11 (fermentadas com St-TA40) e praticamente não alteraram durante o período de armazenamento. Os valores de acidez das bebidas 9 e 12 (fermentadas com St1), apesar de menor que as outras bebidas, não diferiram entre si e também não variaram ao longo período de armazenamento. Estes resultados podem ter contribuído para estabilidade do índice de sinérese durante a vida útil das diferentes bebidas lácteas produzidas.

TABELA 8
Índice de sinérese das diferentes bebidas lácteas adicionadas de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} ou BL05 no final da fermentação durante o período de armazenamento

Composição bebidas	Índice de sinérese (% m/m) bebidas lácteas fermentadas				
	Período de armazenamento (dias)				
	1	7	14	21	28
Bebida 7 St-TA40 + Lb 340 + BI 5 ^{1A}	17,11 ^{a,A}	15,99 ^{a,A}	16,53 ^{a,A}	16,32 ^{a,A}	16,30 ^{a,A}
Bebida 8 St-TA40 + BI 5 ^{1A}	16,13 ^{a,A,B}	16,05 ^{a,A}	16,02 ^{a,A}	16,28 ^{a,A}	15,96 ^{a,A}
Bebida 9 St1 + BI 5 ^{1A}	16,43 ^{a,A,B}	16,25 ^{a,A}	15,81 ^{a,A}	15,77 ^{a,A}	15,71 ^{a,A}
Bebida 10 St-TA40 + Lb 340 + BL05	15,60 ^{a,B}	16,51 ^{a,A}	16,56 ^{a,A}	15,92 ^{a,A}	16,07 ^{a,A}
Bebida 11 St-TA40 + BL05	15,87 ^{a,B}	15,60 ^{a,A}	16,39 ^{a,A}	16,47 ^{a,A}	15,94 ^{a,A}
Bebida 12 St1 + BL05	16,43 ^{a,A,B}	16,27 ^{a,A}	16,50 ^{a,A}	16,05 ^{a,A}	16,50 ^{a,A}

Letras maiúsculas distintas (A,B) na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Duncam ($p < 0,05$) entre as diferentes bebidas ($p < 0,05$).

Resultados divergentes foram obtidos por Prasanna e colaboradores (2013). Esses pesquisadores, diferentemente do nosso estudo, adicionaram linhagens de *B. longum* subsp. *infantis*, produtora de EPS (exopolissacarídeos) ao iogurte e o índice de sinérese foi significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao iogurte contendo somente as bactérias da cultura iniciadora. Segundo Lucey (2002) a sinérese aumenta devido ao enfraquecimento da rede proteica do gel com consequente perda de capacidade de aprisionamento da fase aquosa. Para fortalecimento do gel pode-se utilizar bactérias produtoras de EPS na elaboração de produtos lácteos, devido à capacidade do EPS ligar à água livre e modificar a estrutura do gel durante o processo de coagulação com redução da tendência à sinérese.

3.8 Análises microbiológicas das bebidas lácteas fermentadas

Os resultados das análises de coliformes a 30°C e 45°C das bebidas lácteas fermentadas atenderam aos critérios legais no primeiro dia de fermentação (BRASIL, 2005).

Embora a legislação não exija, a contagem de bolores e leveduras é um dos indicadores de qualidade do produto, pois altas contagens resultam na deterioração ou redução da vida útil do alimento. As contagens obtidas para esse grupo de micro-organismos foram menores que o limite de detecção do método ($< 10 \text{ UFC.mL}^{-1}$) em todas as bebidas produzidas.

4. CONCLUSÃO

Considerando-se a contagem mínima de 10^8 UFC de células viáveis de bactérias probióticas na porção do produto exigida pela legislação, e, a porção de 200 mL, a concentração de 10^6 UFC. mL⁻¹ de bifidobactéria, foi obtida até o 21º dia para *B. longum* BL05 nas bebidas lácteas fermentadas com *S. thermophilus* St1 (bebidas 6 e 12), independente do momento de adição dessa bactéria. Para as demais bebidas, essa exigência foi atendida até o 7º dia, com exceção da contagem de *B. longum* 5^{1A} que foi de $5,59 \log_{10} \text{UFC mL}^{-1}$ na bebida 7 quando essa cultura foi adicionada no fim da fermentação. Portanto, a linhagem de *B. longum* BL05 mostrou-se adequada para a produção de bebidas lácteas fermentadas com a cultura de *S. thermophilus* St1 e vida de prateleira de 21 dias.

Em relação ao momento de adição das bifidobactérias, o acréscimo das mesmas no início da fermentação proporcionou melhores resultados de viabilidade de ambas as linhagens de *B. longum* 5^{1A} ou BL05, nas bebidas fermentadas com a co-cultura St-TA40 + Lb 340 e com a cultura St-TA40, durante o período de estocagem. Nessas bebidas a contagem de células viáveis de *B. longum* foi em média 2,62 e 3,0 log superior para as linhagens 5^{1A} e BL05 respectivamente, no 21º dia de armazenamento quando se compara este grupo de bebidas àqueles acrescentados das bifidobactérias no final da fermentação. Para as bebidas lácteas fermentadas com a cultura St1, o momento de adição de ambas as linhagens das bifidobactérias não influenciou na viabilidade destas durante os 28 dias de armazenamento.

A retirada da bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* da cultura iniciadora praticamente não alterou os valores de pH das bebidas e a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} ou BL05 durante o período de armazenamento, em ambos os grupos de bebidas. Este resultado pode estar associado à elevada capacidade de acidificação da cultura de *S. thermophilus* (St-TA40) usada em conjunto com *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, o que não proporcionou melhoria na viabilidade do probiótico e diminuição da acidez quando *L. delbrueckii* subsp. *bugaricus* foi retirado da co-cultura.

Em geral, os melhores resultados de viabilidade de ambas as linhagens de bifidobactérias, foram obtidos quando as bebidas lácteas foram fermentadas com cultura de *S. thermophilus* St1, de menor atividade proteolítica. Nessas bebidas, a

taxa de pós acidificação (diferença entre o pH de corte e o pH após 28 dias de armazenamento) também foi consideravelmente menor em relação as demais bebidas: média de 0,46 para as bebidas fermentadas com a co-cultura, 0,44 para as fermentadas com *S. thermophilus* St-TA40 e 0,32 para as fermentadas com St1.

A linhagem de *B. longum* 5^{1A} mostrou-se menos resistente às condições de estresse que a linhagem de BL05. Ao final do período de 28 dias de armazenamento, as contagens nas bebidas controles foram de 3 log₁₀ UFC.mL⁻¹ e 7,35 log₁₀ UFC.mL⁻¹, para as linhagens BI 5^{1A} e BL05, respectivamente. Mesmo nas bebidas fermentadas com St1, de baixa acidez, a contagem de 10⁶ UFC.mL⁻¹ de *B. longum* 5^{1A} foi alcançada apenas até o 7^o dia de estocagem. Além da acidez, outros fatores, como possivelmente o teor de oxigênio dissolvido no produto, contribuíram para a baixa viabilidade da linhagem 5^{1A} durante o período de armazenamento das bebidas lácteas. Portanto, os resultados não foram satisfatórios para a produção de uma bebida láctea adicionada dessa linhagem de bifidobactéria.

A contagem mínima de 10⁶ UFC.mL⁻¹ das bactérias lácticas constituintes da cultura iniciadora exigida pela legislação foi assegurada durante o período de armazenamento em todas as bebidas lácteas obtidas.

Todas as bebidas lácteas atenderam aos critérios microbiológicos de qualidade exigidos pela legislação.

Todas as análises físico-químicas e microbiológicas atenderam aos padrões de qualidade exigidos pela legislação para os lotes de leite em pó.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

É imprescindível a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em bebidas lácteas fermentadas com o uso de culturas iniciadoras, uma vez que, a contagem mínima de 10^8 UFC do probiótico na porção do produto deve ser garantida no momento do uso. A escolha do meio seletivo é dependente das linhagens de todos os micro-organismos constituintes do produto. Como as culturas iniciadoras comerciais podem conter várias linhagens de *S. thermophilus* em suas formulações, uma vez definido o meio para enumeração seletiva de uma determinada linhagem de *Bifidobacterium* na presença de uma cultura iniciadora específica, este resultado não poderá ser extrapolado para outras culturas, ainda que estas sejam do mesmo fabricante. O meio de cultura Bile-MRS mostrou-se adequado para enumeração seletiva das linhagens de *B. longum* 5^{1A} ou BL05 na presença das bactérias das culturas iniciadoras estudadas, reduzindo a concentração de sais biliares em relação ao protocolo proposto na literatura.

A linhagem de *B. longum* 5^{1A} apresentou-se menos resistente às condições de estresse que a linhagem BL05. Esta linhagem mostrou-se adequada para a produção de bebidas lácteas fermentadas com a cultura de *S. thermophilus* St1, mantendo a contagem mínima de 10^6 UFC. mL⁻¹, durante 21 dias de armazenamento refrigerado. Entretanto, para a linhagem 5^{1A}, essa contagem foi mantida apenas até o 7º dia de estocagem, em todas as bebidas, não sendo, portanto, adequada para adição em bebidas lácteas fermentadas, pois a vida útil do produto seria curta. O momento mais adequado para adição das linhagens de *B. longum* foi no início da fermentação, pois nesse grupo de bebidas, o tempo de fermentação foi significativamente menor ($p < 0,05$), em relação às acrescentadas de bifidobactérias no final da fermentação, nas bebidas produzidas com as culturas de *S. thermophilus*, ST-TA40 ou St1. Além disso, no 1º grupo, a viabilidade das bifidobactérias foi significativamente maior ($p < 0,05$), após 21 dias de armazenamento, nas bebidas fermentadas com a co-cultura e com a cultura St-TA40. Cultura de *S. thermophilus* com menor atividade proteolítica, como por exemplo St1, é mais indicada para a produção de bebidas lácteas fermentadas com adição de *Bifidobacterium*. Bebidas produzidas com essa cultura iniciadora, apresentaram menor taxa de pós acidificação, e em geral, maior viabilidade das bifidobactérias ao final de 28 dias de armazenamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F.; TOMITA, S.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Effect of production conditions on the stability of a human bifidobacterial species *Bifidobacterium longum* in yogurt. *Letters in Applied Microbiology*, v.49, p.715-720, 2009.

ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Reviews*, v.23, p.37-46, 2010.

ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probióticos: agentes promotores de saúde. *Brazilian Society Food Nutrition*, v. 32, n. 3, p. 113-132, 2007.

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

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho 2008. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assunto+s+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas>. Acesso em: 12 de julho de 2012.

ASHRAF, R.; SHAH, N. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. *International Journal of Food Microbiology*, v.149, p.194-208, 2011,

BERNAL, O.L.M. *Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos*. 2004. 132f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2004.

BIBILONI, R., ZAVAGLIA, A.G., ANTONI, G.D. Enzyme-based most probable number method for the enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products. *Journal of Food Protection*, v.64, p.2001-2006, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 19 jul.2014

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62 de 23 de agosto de 2003a. Oficializa métodos analíticos oficiais microbiológicos para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 16 dez. 2011.

BRASIL Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003b. Aprova regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 16 dez. 2011.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 16 dez. 2011.

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 16 dez. 2011.

CASAROTTI, S.N.; MONTEIRO, D.A.; MORETTI, M. M. S.; PENNA, A. L. B. Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, v.59, p.67-75, 2014.

CASTEELE, S.V.; VANHEUVERZWIJN, T.; RUYSSSEN, T.; ASSCHE, P.V.; SWINGS, J.; HUYS, G. Evaluation of culture media for selective enumeration of probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria in combination with yoghurt or cheese starters. *International Dairy Journal* 16, 1470–1476, 2006.

CASTILHO, M.; LUCEY, J.A.; WANG, T.; PAYNE, F.A. Effect of temperature and inoculum concentration on gel microstructure, permeability and syneresis kinetics.cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal*, v.16, p.153–163, 2006.

CASTRO, F.P.; CUNHA, T.M.; OGLIARI, P.J.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDÊNCIO, E.S. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, p.993-997, 2009.

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P., SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, v.149, p.185–193, 2011.

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

CHARNEY, J.; TOMARELI, R, M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *The Journal of Biological Chemistry*, v.171, n. 2, p. 501-505, 1947.

CRUZ, A. G.; CASTRO, W. F.; FARIA, J. A. F.; BOLINI, H.M.A.; CELEGHINI, R.M. S.; RAICES, R. S. L. Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, v.51, n.2, p.723–728, 2013.

CRUZ, A.G.; FARIA, A.F.J.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, v.40, p.951–956, 2007.

CUNHA, T.M.; ILHA, E.C.; AMBONI, R.D.M.; BARRETO, P.L.M.; CASTRO, F. P. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.12, n. 1, p. 23-33, 2009.

DAMIN, M.R.; SIVIERI, K.; LANNES, S.C.S. Bebidas lácteas fermentadas e não fermentadas e seu potencial funcional. In: OLIVEIRA, M.N. *Tecnologia de produtos lácteos funcionais*. São Paulo: Atheneu, 2009. p.321-344.

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

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Evaluation of Media for Selective Enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79 (9), 1529-1536, 1996.

DOGI, C. A.; PERDIGÓN, G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. *Journal of Dairy Research*, v. 73, p.357–366, 2006.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FTZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G.C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* v.73, p.386S–392S, 2001.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). *Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada: FAO/WHO, 2002. 11p.

FACHIN, L.; MORVIA, J.; GÂNDARA, A.L.N.; VIOTTO, W.H. Evaluation of culture media for counts of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB 12 in yoghurt after refrigerated storage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.39, p.357-361, 2008.

FIESP (Federação das Indústrias do Estado de São Paulo); ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos). *Brasil Food Trends 2020*. São Paulo, 2010. Disponível em <http://www.brasilfoodtrends.com.br>. Acesso em: 25 jun.2014.

FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P. Functional foods: Planning and development. *Molecular Nutrition Food Research*, v.49, p.256-262, 2005.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, v.16, p.284-292, 2013.

FOLKENBERG, D.M.; DEJMEK, P.; SKRIVER, A.; IPSEN, R. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yoghurts produced with different starter cultures. *Journal of Texture Studies*, v.36, p.174–189, 2005.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. *International Dairy Journal* v.19, p.89–95, 2009.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, v. 205, p.31-36, 2001.

GIRAFFA, G.; PARIS, A.; VALCAVI, L.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Genotypic and phenotypic heterogeneity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, v.91, p.937-943, 2001,

GOMES, D. A. Estudo da diversidade da microbiota fecal humana com técnicas dependentes de cultivo e de biologia molecular. 2005. Tese (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SHAH, N.P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.9, p.455-470, 2010.

GUERRA, P.V., LIMA, L.N., SOUZA, T.C., MAZOCHI, V., PENNA, F.J., SILVA, A.M., NICOLI, J.R. AND GUIMARÃES, E.V. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal of Gastroenterology*, v.17, p.3916–3921, 2011.

HÁ, E.; ZEMEL, M.B. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.14, n.5, p.251-258, 2003.

HANSEN, R. Bifidobacteria have come to stay. *North European Dairy Journal*, v.3, p.1–6, 1985.

HULL, R.R.; ROBERTS, A.V., MAYES, J.J. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.39, n. 4, 1984.

IHSAN, B.; ARZU, K. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *International Journal of Dairy Technology*, v.61, p.270-276, 2008.

KAILASAPATHY, K. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits - a review. *International Journal of Fermented Foods*, v.2, n.1, p.1-17, 2013.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, L.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp *lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT – Food Science and Technology*, v.41, p.1317-1322, 2008.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT*, v.39, p.1221-1227, 2006.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.2682–2684, 2000.

KAWASAKI, S.; MIMURA, T.; SATOH, T.; TAKEDA, K.; NIIMURA, Y. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.10, p.6854–858, 2006.

KLAVER, F.A.M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A.H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Netherland Milk and Dairy Journal*, v.47, p.151-164, 1993.

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

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H.C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT*, v.39, p.177–183, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v.13, p.3-13, 2003.

KWON, H.S., YANG, E.H., LEE, S.H., YEON, S.W., KANG, B.H., KIM, T.V. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, v. 250, p.55-62, 2005.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: E. STACKEBRANDT & M. GOODFELLOW (Ed.) *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: Wiley, 1991, p.115-175.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.; SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, n.6, p.1303–1315, 2005.

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

LIMA, K.G.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 491-495, 2009.

LINDNER, J.D.; CANCHAYA, C.; ZHANG, Z.; NEVIANI, E.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V.; VENTURA, M. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: The molecular basis of stress response. *International Journal of Food Microbiology*, v.120, p.13–24, 2007.

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

MASCO, L., HUYS, G., DE BRANDT, E., TEMMERMAN, R., SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.221–230, 2005.

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

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; TANAKA, R.; FUKUDA, M.; OYAIZU, H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene targeted species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n.10, p.4506–4512, 1999 (Procurar).

MAZOCHI, V. *Produção de iogurte probiótico com leite de cabra adicionado de Bifidobacterium ssp.* 2009. 107f. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Engenharia de Alimentos, Centro Universitário de Belo Horizonte, Belo horizonte, 2009.

MEILE, L.; BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, v.126, p.316-320, 2008

METAANÁLISE. Brasil lidera crescimento do mercado de alimentos funcionais na AL. 2014. Disponível em: http://www.metaanalise.com.br/inteligenciademercado/index.php?option=com_content&view=article&id=9685:brasil-lidera-crescimento-do-mercado-de-alimentos-funcionais-na-al&catid=11:estrategias&Itemid=360. Acesso em: 23. Jun. 2014.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. *Semina: Ciências Agrárias*, v.15, n.1, p.80-94, 1994.

MODLER, H.W., KALAB, M. Microstructure of yogurt stabilized with milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v.66, p.430-437, 1983.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. *Engineering Life Sciences*, v.12, n.4, p.399-409, 2012.

MÖLLER, C.; DE VRESE, M. Review: probiotic effects of selected acid bacteria. *Milchwissenschaft*, v.59, p.597–601, 2004.

OLIVEIRA, R.P.S.; PEREGO, P.; OLIVEIRA, M.N.; CONVERTI, A. Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: the inulin effect. *Food Research International*, v.48, p. 21–27, 2012.

OLIVEIRA, N.M.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.1, p.172-176, 2003.

ORDÓÑEZ, J.A. *Tecnologia dos alimentos: alimentos de origem animal*. vol. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, v.9, p.43-52, 1999.

PALFRAMAN, R.J.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v.4, p.71–75, 2003.

PENNA, A.L.B.; ALMEIDA, K.E.; OLIVEIRA, M.N. Soro de leite: importância biológica comercial e industrial – principais produtos. In: OLIVEIRA, M.N. *Tecnologia de produtos lácteos funcionais*. São Paulo: Atheneu, 2009. p.251-276.

PENNA, A.L.B.; GURRAM, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Effect of high hydrostatic pressure processing on rheological and textural properties of probiotic low-fat yogurt fermented by different starter culture. *Journal of Food Process Engineering*, v.29, p.447–461, 2006.

PEREIRA, B.S. *Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado*. 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Departamento de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T.R. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology*, v.15, n.12, p.546-553, 2007.

PINTO, S.S.; FRITZEN-FREIRE, C.B.; MUNOZ, I.B.; BARRETO, P.L.M.; PRUDENCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C. Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. *J Journal of Food Engineering*, v.111, p.563–569, 2012.

PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Microbiological, chemical and rheological properties of low fat set yoghurt produced with exopolysaccharide (EPS) producing Bifidobacterium strains. *Food Research International*, v.51,p.15–22, 2013.

PRASANNA, P.H.P.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*, v. 55, p.247–262, 2014.

PRODUÇÃO de queijos no Brasil deve ultrapassar 1,0 milhão de toneladas em 2013. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/produo-de-queijos-no-brasil-deve-ultrapassar-10-milho-de-toneladas-em-2013-10677>. Acesso em: 21 nov.2014.

RAEISI, S.N.; OUOBA, L. I. I.; FARAHMAND, N.; SUTHERLAND, J.; GHODDUSI, H. B. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control*, v.34, p.691-697, 2013.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, v.27, p.1–11, 2010. (Procurar)

ROY, D. Technological aspects related to the use of Bifidobacteria in dairy products. *Le Lait*, v.85, 39–56, 2005.

ROY, D. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, v.69, p.167-182, 2001.

RUSSEL, D.A.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v 149, p. 88–105, 2011.

RYBKA, S.; KAILASAPATHY, K. Media for the enumeration of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 6, p.839-850, 1996.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, v.50, p.1-16, 2013.

SAARELA, M.; ALAKOMI, H. L.; MÄTTÖ, J.; AHONEN, A.M.; TYNKKYNNEN, S. Acid tolerant mutants of Bifidobacterium animalis subsp. lactis with improved stability in fruit juice. *LWT—Food Science and Technology*, v.44, n.4, p.1012–1018, 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; HATTO, J.; MATTILA SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v.84, n.3, p.197-215, 2000.

SACCARO, D.M.; TAMIME, A.; PILLEGGI, A.L.O.P.S.; OLIVEIRA, M.N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, n.3. p.397-404, 2009.

SANDERS, M. E.; GUARNER, F.; GUERRANT, R.; HOLT, P.R.; QUIGLEY, E.MM.; SARTOR, R.B.; SHERMAN, P.M.; MAYER, E. A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, v.62, p.787-796, 2013.

SETTACHAIMONGKOM, S.; NOUT, M.J.R.; FERNANDES, E.C.A.; HETTINGA, K.A.; VERYOORT, J.M.; VAN HOOIJDONK, T.C.M.; ZWIETERING, M.H.; SMID, E.J.; VAN VALENBERG, H.J.F. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, v.177, p. 29-36, 2014a.

SETTACHAIMONGKOM, S.; NOUT, M.J.R.; FERNANDES, E.C.A.; VAN HOOIJDONK, T.C.M.; ZWIETERING, M.H.; SMID, E.J.; VAN VALENBERG, H.J.F. The impact of selected strains of probiotic bacteria on metabolite formation in set yoghurt. *International Dairy Journal*, v.38, p.1-10, 2014b.

SHAFIEE, G.; MORTAZAVIAN, A.M.; MOHAMMADIFAR, M.A.; KOUSHKI, M.R.; MOHAMMADI, A.; MOHAMMADI, R. Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, n.12, p.1265-1274, 2010.

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

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, p. 894-907, 2000.

SHAHBAL, S.; HEMME, D.; RENAULT, P. Characterization of a cell envelope-associated proteinase activity from *Streptococcus thermophilus* H-Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.177-182, 1993.

SHIHATA, A.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.10, p.401-408, 2000.

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

SIMPSON, P.J.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C.; ROSS, R.P. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiololy Methods*, v.57, p.9-16, 2004.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E., BÉATA, K.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, v.51, p.456-467, 2008.

SLOVAKOVA, L.; DUSKOVA, D.; MAROUNEK, M. Fermentation of pectin and glucose, and activity of pectin-degrading enzymes in the rabbit caecal bacterium *Bifidobacterium pseudolongum*. *Letters in Applied Microbiology* v.35, p.126–130, 2002.

SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; DOLATKHAHNEJAD, M.R.; MONFARED, A.B. Suitability of MRS-bile agar for the selective enumeration of mixed probiotic bacteria in presence of mesophilic lactic acid cultures and yoghurt bacteria. *Iranian Journal of Biotechnology*, v.10, p.16-21, 2012.

SOUZA, T.C. *Avaliação do efeito protetor de bifidobactéria de origem humana na infecção experimental com Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium para o seu uso como probiótico em alimento funcional*. 2012. 144f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. *International Dairy Journal*, 4,143-149, 2004.

TANNOCK, G.W. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biology*, v.1, n.1, p.53-64, 1999.

TAVERNITI, V.; GUGLIELMETTI, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes and Nutrition*, v.6, p.261–274, 2011.

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

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, v.9, p.225–241, 2014.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, p.714-728, 2008.

VINDEROLA, C.G.; BINETTI, A.; BURNS, P.; REINHEIMER, J.A. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, v.2, p.1-6, 2011.

VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. A. Lactic acid bacteria: A comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, v.36, p.895–904, 2003.


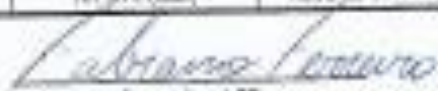
VINDEROLA, C.G.; MOUCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85, p.721-729, 2002.


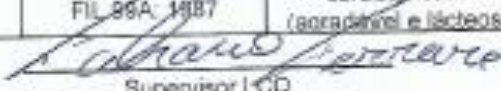
VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, v.10, p.271-275, 2000.


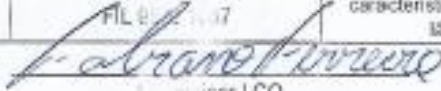
VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, v.9, p.497-505, 1999.

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

ANEXO A

Laudo NP1437LD4			
Produto: Soro de Leite em Pó Desmineralizado Marca: PORTO ALEGRE LATICÍNIOS PORTO ALEGRE IND E COM LTDA Avenida Maria Martins de Freitas 6000 - Porto Novo/RS - CEP: 95432-077 Tel: (0XX) 31 38193200 - Fax: (0XX) 31 38193216 - lq@laticiosportoalegre.com.br			
Data de Fabricação: 14/07/2013 Data de Validade: 14/07/2014 Data de emissão: 31/07/2013 Lote: 34 Cliente: AMIGTRAS Quantidade: 2,0 Kg			
Apresentação: Aspecto: Pó homogêneo e isento de materiais estranhos grumos e sem pontos pretos visíveis Embalagem: Primária: Sacos de polietileno termoselados Secundária: Sacos Kraft (20 kg) costurados Peso Líquido: 20 Kg			
Análise	Método	Resultado	Unidade
Aparência	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Sabor	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Umidade	FIL 25A: 1983	2,00	%
Proteína	FIL 20B: 1993	12,30	%
Gordura	FAO: 1979	0,50	%
Cinzas	AOAC 15 th : 1993	4,66	%
Ácidos	FIL 81: 1981	0,15	% de ácido láctico
Cloro	LANARA	1,46	%
Lactose	Cálculo	83,54	%
Peso Específico	Niro Altimeter	0,666	g/mL
PH (Sol. 10% a 30°C)	Adoffe Lutz	6,28	Faixa
Antibiótico	Enzimático	Ausente	Faixa
Alcaloide	Enzimático	Ausente	Faixa
Partículas Queimadas	AOAC boletim 910	A	Máx. B
Cont. Total Mesófilas	AOAC	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Bact. e Levaduras	Compact Dry	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Staphylococcus (seg. pres.)	AOAC	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Bacillus cereus	AOAC 15 th : 1990	< 1,0 x 10 ¹	UFC/g
Coliformes total	AOAC	< 1,0	UFC/g
Coliformes fecal	AOAC	< 1,0	UFC/g
E. coli	AOAC	Ausente	UFC/g
Salmonella sp	NT 074 (Biox)	Ausente em 250g	UFC/250g
 Supervisor LQ			

Laudo: 2208L02			
Produto: Soro de Leite em Pó Desmineralizado			
Marca: PORTO ALEGRE LATICÍNIOS PORTO ALEGRE IND E COM LTDA Avenida Mario Martins de Freitas 8000 - Ponte Nova/MG - CEP: 35432-077 Tel (0XX) 31 38193200 Fax (0XX) 31 38193215 lq@laticiniosportosalgre.com.br			
Data de Fabricação: 22/08/2013 Data de Validade: 22/08/2014 Data de emissão: 20/09/2013 LOTE: 02			
Apresentação: Aspecto: Pó homogêneo e isento de materiais estranhos grumos e sem pontos pretos visíveis. Embalagem: Primária: Sacos de polietileno termosoldados Secundária: Sacos Kraft (03 folhas) costurados Peso Líquido: 25 Kg			
Análise	Método	Resultados	Unidade
Aparência	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Sabor	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Umidade	FIL 28A: 1983	1,90	%
Proteína	FIL 20B: 1983	12,56	%
Gordura	FAO, 1978	0,50	%
Cinzas	AOAC 15 th , 1990	5,25	%
Acidez	FIL 81: 1961	0,14	% de ácido láctico
Cloreto	LANARA	1,58	%
Lactose	Cálculo	79,79	%
Peso Específico	Niro Atomizer	0,666	g/mL
	Adolfo Lutz	6,32	Faixa
Antibiótico	Enzimático	Ausente	Faixa
Aflatoxina	Enzimático	Ausente	Faixa
Partículas Queimadas	ADMI boletim 916	A	Máx. B
Cont. Total Mesófilas	AOAC	< 1,0 x 10 ⁴	UFC/g
Bolores e Leveduras	Compact Dry	< 1,0 x 10 ⁴	UFC/g
Staphylococcus coag.	AOAC	< 1,0 x 10 ⁴	UFC/g
Bacillus cereus	AOAC 15 th , 1990	< 1,0 x 10 ⁴	UFC/g
Coliformes total	AOAC	< 1,0	UFC/g
Coliformes fecal	AOAC	< 1,0	UFC/g
E. coli	AOAC	Ausente	UFC/g
Salmonella sp	NT 074 (Bax)	Ausente em 250g	UFC/250g
Odor e Sabor	FIL 99A: 1987	característico (azulado e lácteos)	característico
 Supervisor LQ			

Laudo Nº 0311L01			
Produto: Soro de Leite em Pó			
Marca: PORTO ALEGRE LATICÍNIOS PORTO ALEGRE IND E COM LTDA Avenida Mario Martins de Freitas - 8.000 - Ana Florência - Ponte Nova/MG - CEP: 35432-077 Tel (0**) 31 3819-3239 Fax (0**) 31 3819-3215 lq@laticiniosportoalegre.com.br			
Data de Fabricação:	03/11/2013	AMOSTRA	UFMG
Data de Validade:	03/11/2014	Quantidade:	2 Kg
Data de emissão:	05/11/2013 11:29		
Lote:	1		
Apresentação:	Aspecto: Pó homogêneo e isento de materiais estranhos grumos e sem pontos pretos visíveis. Embalagem: Primária: Sacos de polietileno termossoldados Secundária: Sacos Kraft (03 folhas) costurados Peso Líquido: 25 Kg		
Análise	Método	Resultados	Unidade
Aparência	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Sabor	FIL 99A: 1987	Característico	Faixa
Umidade	FIL 26A: 1993	1,99	%
Proteína	FIL 20B: 1993	12,35	%
Gordura	FAO, 19	1,00	%
Cinzas	AOAC 15 th , 1990	5,03	%
Acidez	FIL 81: 1981	0,15	% de ácido láctico
Cloreto	LANARA	2,35	%
Lactose	Cálculo	79,63	%
Peso Específico	Niro Atomic	0,666	%
PH (Sol. 10% a 20°C)	Adolfo L...	6,30	
Antibiótico	Enzimáti...	Ausente	Faixa
Aflatoxina	Enzimáti...	Ausente	Faixa
Partículas Queimadas	ADMI bolotas 118	A	Máx. B
Cont. Total Mesófilas	AOAC	< 1 x 10 ²	UFC/g
Bolores e Leveduras	Compact Dry	< 1 x 10 ¹	UFC/g
Staphylococcus coag. posit.	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
Bacillus cereus	AOAC 15 th , 1990	< 1 x 10 ²	UFC/g
Coliformes total	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
Coliformes fecal	AOAC	< 1 x 10 ¹	UFC/g
E. coli	AOAC	Ausente	UFC/g
Salmonella en	MT	Ausente em 250g	UFC/250g
Odor e Color	FIL 81: 1981	característico (agradável e lácteos)	característico
 F. Brandt-Vieira Engenheiro LCQ			