

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

BEATRIZ SILVA PEREIRA

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

Belo Horizonte, MG

2012

BEATRIZ SILVA PEREIRA

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

Dissertação 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 Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira
Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Faculdade de Farmácia

Belo Horizonte, MG

2012

P436s
Pereira, Beatriz Silva
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 / Beatriz Silva Pereira. – 2012.

108 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelyn de Souza Oliveira Lopes Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Bebida láctea – Teses. 2. Probiótico – Teses. 3. *Bifidobacterium* spp – Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. II. Nicoli, Jacques Robert III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

BEATRIZ SILVA PEREIRA

**“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”**

APROVADA EM 12 DE JUNHO DE 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Evelyn de A. Oliveira Lopes
Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES
Presidente da Comissão e Orientadora

Inayara A. Lacerta
Profa. Dra. INAYARA CRISTINA ALVES LACERDA

Jacques Robert Nicoli
Prof. Dr. JACQUES ROBERT NICOLI
Co-orientador

Marcelo Resende de Souza
Prof. Dr. MARCELO RESENDE DE SOUZA

AGRADECIMENTOS

A Deus por me impulsionar a trilhar novos caminhos, por cuidar de mim com tanto carinho e ser presença viva em minha vida.

Aos meus pais, Carlito e Olinda, pelo amor, por acreditarem em mim e me ajudarem a chegar até aqui. Minhas irmãs, Kelly, Raquel, e Sara e meus queridos cunhados Fernando e João, pela amizade única e pelo incentivo para alcançar meus sonhos. E aqueles que me fazem esquecer qualquer problema, meus amados sobrinhos, Pedro, Miguel e as Marias (Fernanda, Clara, Teresa e Letícia).

Ao Vinícius, pela paciência, por estar sempre ao meu lado e me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia.

A minha orientadora, Profa. Dra. Evelyn de Souza Lopes Oliveira, pela orientação, incentivo, amizade, disponibilidade e confiança em mim.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pela valiosa orientação, disponibilidade e atenção.

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

Ao Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza pela colaboração fundamental no início deste projeto e à Prof. Dr. Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna por disponibilizar o Laboratório de Análises Físico-químicas I do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) da Escola de Veterinária da UFMG.

Ao Prof. Gabriel Vinderola pelas contribuições e pela constante disponibilidade em ajudar.

Aos professores do Departamento de Ciência de Alimentos pela contribuição em minha formação científica, em especial ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pelo precioso auxílio no tratamento estatístico dos resultados, às Prof. Dra. Inayara Lacerda, Prof. Dra. Scheilla Vitorino, Prof. Dra. Renata Labanca e Prof. Dra. Raquel Linhares pela contribuição e sugestões valiosas nos testes microbiológicos e físico-químicos.

Ao Laticínio Verde Campo – Lavras – Minas Gerais, pela disponibilidade em nos enviar as amostras de soro e pelo respeito ao nosso trabalho.

A Luciana, pela amizade, companheirismo, auxílio, motivação, pelos bons momentos de estatística, enfim, obrigada por tudo. E minhas queridas companheiras do LAMIB (Andréa, Carla, Denise, Fernanda, Flávia, Letícia, Michelly e Roberta) pelas preciosas sugestões e pelo carinho.

A Natália Caldeira e Tássia, pela disponibilidade em me ensinar, pela paciência e pelo carinho.

As colegas de tantas repúblicas (Rose, Mara, Naiara, Carol Melo, Fabiane, Gabrieli, Carol e Marina). A presença de vocês me ajudou muito a crescer.

As estagiárias, Mariana e Karina pela responsabilidade e amizade. E aos funcionários do LAMIB (Ana Diolina, Elaine e Raimunda) e do DTIPOA (Marco Antônio) pela constante disponibilidade em ajudar. Obrigada Ana pela companhia até às 22hs.

A todos os colegas e funcionários do PPGCA que contribuíram na realização deste trabalho e tornaram os momentos mais agradáveis e alegres.

Nada te perturbe,
nada te amedronte.
Tudo passa.
Só Deus nunca muda.
A paciência tudo alcança;
A quem tem Deus, nada falta.
Só Deus basta.”

Teresa d'Ávila

RESUMO GERAL

A busca pela alimentação mais saudável, aliada ao aproveitamento do soro lácteo pelas indústrias de laticínios, torna favorável a elaboração de bebidas lácteas fermentadas com soro lácteo. As indústrias de laticínios visando à produção de alimentos funcionais têm adicionado culturas probióticas, que devem apresentar o mínimo de células viáveis de 10^6 UFC/g de produto no momento do consumo. Torna-se extremamente relevante avaliar métodos de quantificação destas linhagens probióticas. Neste trabalho avaliou-se a capacidade dos meios Gentamicina-MRS, Dicloxacilina-MRS, Bile-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS e LP-MRS para enumeração seletiva de diferentes linhagens de bifidobactérias (*B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}) na presença de culturas iniciadoras comerciais (L-812 e Harmony 1.0 – Christian Hansen) e estudou-se a viabilidade dos micro-organismos durante a vida de prateleira de bebidas lácteas fermentadas com cultura L-812, adicionadas de soro lácteo nanofiltrado. Durante o armazenamento (5°C, 28 dias) também foram monitorados a acidez, pH e sinérese. Dos meios estudados, G-MRS e Bile-MRS inibiram significativamente ($p < 0,05$) a cultura iniciadora L-812 e permitiram boa recuperação de células das linhagens probióticas, sem diferença estatística com o padrão. Porém, Bile-MRS garantiu melhor porcentagem de recuperação (> 94%) para *Bifidobacterium* spp. e foi o meio que mais inibiu a cultura iniciadora L-812, tendo sido este o meio escolhido para enumeração dos micro-organismos probióticos na presença da cultura L-812. No estudo da vida de prateleira, houve redução significativa do pH somente na primeira semana, passando de 4,8 (tempo 0) para 4,21 (7 dias). O teor de acidez aumentou apenas na bebida adicionada de *B. pseudolongum* 119^{1A} até o 14º dia e manteve-se estável até o 28º. Houve redução média de 6,05% nos índices de sinérese das quatro bebidas. A contagem de bactérias ácido-lácticas totais permaneceu acima de $8,0 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ durante todo período de armazenamento, atendendo a legislação. Quanto à viabilidade de *Bifidobacterium* spp, após o 7º dia, todas as linhagens estudadas já se encontravam com contagens inferiores a $6,0 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$. A bebida apresentou boa estabilidade durante o armazenamento, no entanto, outras variáveis devem ser exploradas a fim de encontrar uma matriz alimentar em que as linhagens probióticas se mantenham viáveis.

Palavras-chave: bebida láctea; probiótico; *Bifidobacterium* spp; meio de cultura

ABSTRACT

Production of fermented lactic beverages added with cheese whey has been favored by consumer's quest for healthy foods and by the use of whey in dairy industry. Dairy industry aiming functional foods production being added probiotics cultures, which should present the minimum counting of viable cells of 10^6 CFU.g⁻¹ of the product at the time of consumption. It is extremely important to evaluate methods for quantification of these probiotic strains. Culture media (Gentamicin-MRS, Dicloxaciline-MRS, Bile-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS and LP-MRS) were evaluated for ability to selective enumeration of different bifidobacteria strains (*B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A}, and *B. pseudolongum* 119^{1A}). Viability of *Bifidobacterium* strain, starter culture, and acidity, pH and syneresis were monitored during storage (5°, 28 days). G-MRS and Bile-MRS medium significantly inhibited ($p < 0,05$) L-812 starter culture and showed good probiotic strains recovery, without statistic difference to the standard medium (MRS). However, Bile-MRS showed the best *Bifidobacterium* recovery (94%) and the best inhibition of the starter culture (L-812). This was the medium used for enumeration of probiotic microorganisms in the presence of L-812 culture. In the shelf-life study, pH lowered significantly in the first week only, dropping from 4.8 (time 0) to 4.21 (7 days). Only beverage added with *B. pseudolongum* 119^{1A} had acidity increased on the 14th day, remaining stable until the 28th day. Syneresis has lowered 6.05% for the four lactic beverages. Lactic acid-bacteria count remained above 8.0 Log CFU.mL⁻¹ over time. For *Bifidobacterium* spp. viability, all the strains decreased from less than 6.0 log CFU.mL⁻¹ from the 7th day of analysis, allowing no probiotic beverage characterization. The lactic beverages showed good storage stability, although other variables are to be explored in order to find a food matrix in which probiotic strains remain viable.

Keywords: lactic beverage, probiotic, *Bifidobacterium* spp., culture media

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Critérios de seleção de <i>Bifidobacterium</i> spp. para uso como probióticos. Adaptada de GOMES & MALCATA, 1999.....	23
Figura 2 Fluxograma de produção das bebidas lácteas fermentadas	31
Figura 3 Processo de separação por membrana.....	33

CAPÍTULO I

Figura 1: Porcentagem de recuperação de células das linhagens de bifidobactérias e das culturas iniciadoras nos diferentes meios de cultura estudados em relação ao padrão MRS.....	49
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO II

Figura 1: Densidade óptica de <i>Bifidobacterium</i> spp. em caldo MRS, incubados em aerobiose, 37°C por 8hs.....	68
Figura 2: Contagem de células viáveis (log UFC.mL ⁻¹) de <i>Bifidobacterium</i> spp. versus tempo de crescimento.....	68
Figura 3: Alteração do pH durante 28 dias de armazenamento de bebidas lácteas fermentadas adicionadas das diferentes linhagens de bifidobactérias	79
Figura 4: Evolução da acidez (g/100g) durante a vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	80
Figura 5: Alteração da sinérese durante a vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	81
Figura 6: Evolução da população de bactérias ácido lácticas totais nas bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp. no período de 28 dias.....	85

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Parâmetros microbiológicos para bebidas lácteas fermentadas.....	24
Tabela 2 Composição físico-química de soro lácteo doce e ácido.....	27

CAPÍTULO I

Tabela 1: Referências bibliográficas dos meios e condições de cultivo das culturas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	44
Tabela 2: Contagens (Log UCF.mL ⁻¹) das linhagens de <i>Bifidobacterium</i> spp. e culturas iniciadoras nos diversos meios estudados.....	47

CAPÍTULO II

Tabela 1: Formulação da bebida láctea.....	62
Tabela 2: Teores percentuais médios de componentes físico-químicos dos quatro lotes de leite em pó integral.....	71
Tabela 3: Análises de controle para recebimento das amostras de soro lácteo.....	72
Tabela 4: Teores percentuais médios da composição química e das propriedades físico-químicas de quatro lotes de soro lácteo concentrado.....	73
Tabela 5: Teores percentuais médios de diferentes compostos de quatro lotes de bebida láctea fermentada elaborada com soro lácteo concentrado.....	75
Tabela 6: Contagens de coliformes totais e termotolerantes, micro-organismos mesófilos aeróbios, <i>Staphylococcus</i> coagulase (+) e pesquisa de <i>Salmonella</i> em leite em pó e soro lácteo concentrado.....	76
Tabela 7: Contagem de coliformes totais em bebidas lácteas fermentadas nos dia 1 e 28 da vida de prateleira.....	77
Tabela 8: Contagem de coliformes termotolerantes em bebidas lácteas fermentadas nos dias 1e 28 da vida de prateleira.....	77
Tabela 9: Contagem microbiológica de <i>Bifidobacterium</i> spp. em bebidas lácteas fermentadas durante o período de estocagem.....	86
Tabela 10: Perfil de pH durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	107
Tabela 11: Acidez titulável (g/100g) durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	107
Tabela 12: Sinérese% (m/m) durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	107
Tabela 13: Contagens das bactérias ácido lácticas totais nas bebidas lácteas fermentadas adicionadas das diferentes linhagens de bifidobactérias durante 28 dias de estocagem.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BL-MRS – Bile Man, Rogosa e Sharp
DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio
D-MRS – Dixcloxacilina Man, Rogosa e Sharp
DO – Densidade Ótica
DVS – *Direct Vat Set*
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO – *Food and Agriculture Organization*
FDA - *Food and Drug Administration*
FRV – Fator de Redução Volumétrico
G-MRS – Gentamicina Man, Rogosa e Sharp
GRAS – Geralmente Reconhecidas como Seguras
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
IDF – *International Dairy Federation*
LAB – *Lactic Acid Bacteria*
LP- MRS - *Lithium Propionate*-de Man, Rogosa & Sharpe
M-MRS - Maltose-de Man, Rogosa & Sharpe
MRS – de Man, Rogosa & Sharpe
NF – Nanofiltração
NMP – Número Mais Provável
NNLP- Ácido Nalidíxico, Sulfato de Neomicina, Cloreto de Lítio e Sulfato de
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
RS – Retentado de Soro
RTIQ - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
TPPY – Triptona, Proteose, Peptona, Yeast
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UHT – *Ultra High Temperature*
WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Probióticos	18
2.2 Produtos probióticos	20
2.3 O gênero <i>Bifidobacterium</i>	22
2.4 Caracterizações bioquímica e fisiológica das bifidobactérias	24
2.5 Bebida láctea	26
2.5.1 Matérias-primas	28
2.5.1.1 Leite	28
2.5.1.2 Soro lácteo	29
2.5.1.3 Cultura láctea	31
2.5.2 Processo de elaboração de bebidas lácteas	34
2.5.3 Filtração por membranas	35
2.6 Meios de cultura específicos para bifidobactérias	36
CAPÍTULO I ENUMERAÇÃO SELETIVA DE <i>Bifidobacterium</i> spp. NA PRESENÇA DE CULTURA INICIADORA	42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Culturas	46
2.2 Preparo e manutenção dos inóculos	46
2.3 Meios de cultura para contagem de <i>Bifidobacterium</i> spp.	47
2.4 Preparo dos meios de cultura	47
2.5 Avaliação dos diferentes meios de cultura	49

2.6 Análise estatística.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4. CONCLUSÕES	58
CAPÍTULO II VIDA DE PRATELEIRA DE BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS COM SORO LÁCTEO NANOFILTRADO E ADICIONADAS DE DIFERENTES LINHAGENS DE BIFIDOBACTÉRIAS	59
RESUMO	60
ABSTRACT	61
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAIS E MÉTODOS	64
2.1 Elaboração das bebidas lácteas fermentadas	64
2.1.1 Matérias-primas	64
2.1.2 Controle de qualidade das matérias-primas	64
2.1.3 Elaboração da bebida láctea fermentada	65
2.1.4 Preparo do inóculo.....	66
2.1.5 Fermentação	66
2.1.6 Acondicionamento e armazenamento	67
2.1.7 Ativação da cultura probiótica.....	67
2.1.8 Determinação da fase logarítmica das linhagens de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	68
2.1.9 Controle de qualidade das bebidas lácteas fermentadas	68
2.2 Estudo da vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas.....	69
2.2.1 Viabilidade das culturas iniciadora e probiótica	69
2.2.2 pH e acidez titulável.....	70
2.2.3 Suscetibilidade a sinérese	70
2.2.5 Análise estatística.....	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Determinação da fase logarítmica das linhagens de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	72
3.2 Análises físico-químicas para controle de qualidade das matérias primas e das formulações de bebidas lácteas fermentadas	74
3.2.1 Avaliação físico-química das matérias-primas.....	74
3.2.2 Avaliação físico-química das formulações de bebida láctea fermentada.....	78
3.3 Análises microbiológicas para controle de qualidade	80
3.3.1 Análises microbiológicas das matérias-primas	80

3.3.2 Análises microbiológicas das formulações de bebida láctea fermentada	81
3.4 Estudo da vida de prateleira de bebidas lácteas fermentadas	82
3.4.1 Análises físico-químicas	82
3.4.2 Viabilidade microbiana durante a vida de prateleira	88
3.4.2.1 Viabilidade de bactérias ácido-lácticas totais.....	88
3.4.2.2 Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> spp.....	90
4. CONCLUSÕES.....	95
CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
APÊNCIDE A	108

1. INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Organização da Agricultura e Alimentação (FAO) das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde (WHO) (KOMATSU et al., 2008). Segundo a FAO/WHO (2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Leites fermentados e iogurtes, que diferem quanto aos tipos de micro-organismos presentes, têm sido adicionados de culturas probióticas pela indústria para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. Estes são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover a saúde, mas há também sobremesas a base de leite, leite em pó destinado a recém-nascidos, sorvetes, manteiga, maionese, diversos tipos de queijos e alimentos de origem vegetal fermentados (SAAD, 2006, SIRO et al., 2008).

Bebida láctea tem sido usada como importante veículo para organismos probióticos (ALMEIDA et al., 2008). A produção de bebida láctea adicionada de soro lácteo em sua formulação vem ganhando um mercado muito grande, principalmente com o maior nível de informação sobre a importância do cálcio, a qualidade das proteínas, o papel dos componentes bioativos e das bactérias probióticas para a saúde, do custo do produto para o fabricante e do preço final para o consumidor (SANTOS, 2001).

O desenvolvimento de novas tecnologias capazes de solucionar o problema do descarte do soro lácteo pode trazer também benefícios econômicos, pois o soro é considerado uma importante fonte de proteína para consumo. As proteínas do soro possuem valor nutricional elevado, conferido pela presença de alto teor de aminoácidos essenciais. Para obtenção de soro concentrado, a indústria utiliza de tecnologias que empregam membranas semipermeáveis que separam os componentes do soro. A nanofiltração (osmose reversa livre) é um dos métodos empregados, na qual as membranas retêm todos os solutos de soro lácteo exceto a carga monovalente de íons. O permeado constituído de água, sais monovalentes e um pouco de ácido orgânico que imita a estrutura tetrahédrica da água (FELOWS, 2006).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez

que elas têm sido isoladas do trato gastrintestinal do humano saudável. Pode-se afirmar que, uma linhagem probiótica irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar ao qual foi isolado, visto que é geralmente hospedeiro-específica (SAARELA, et al., 2000). Portanto, as linhagens probióticas mais frequentemente empregadas em produtos lácteos são de origem humana, em função da boa capacidade de adaptação as necessidades fisiológicas do hospedeiro comparadas com linhagens de outros animais (GOMES & MALCATA, 1999).

Em 2001, a Comissão Tecno-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (Brasil, 1999), recomendou que um alimento funcional probiótico devesse apresentar uma concentração mínima de 10^6 UFC/g dentro do prazo de validade do produto. Em 2008, Agência Nacional de Vigilância Sanitária estipulou a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (ANVISA, 2008). Sendo assim, é necessário e extremamente relevante que sejam avaliados e implantados métodos de quantificação das espécies de maior interesse.

Diante da necessidade de quantificação simples e confiável de *Bifidobacterium* spp., para determinar o número inicial de bactéria probiótica depois da manufatura do produto, e também a determinação da viabilidade das células durante a estocagem sob refrigeração, bem como sua distribuição na cadeia produtiva, muitos meios de cultivos têm sido propostos, mas a maioria é insatisfatória na diferenciação das espécies (BERNAL, 2004). Monitorar o número de células viáveis de microrganismos probióticos nos alimentos em que os mesmos são incorporados é um parâmetro fundamental para assegurar a qualidade do produto que é comercializado com apelo terapêutico, entretanto, muitas vezes essa necessidade tem sido negligenciada em função da falta de padronização de métodos para enumeração (BOTELHO, 2005).

Um importante parâmetro na monitoração da viabilidade dos organismos nos produtos comercializados é a possibilidade de contar bactérias probióticas diferencialmente ou seletivamente. Muitas metodologias têm sido propostas nos últimos anos, entretanto, ainda não há um protocolo único oficial. A enumeração depende da linhagem probiótica, cultura iniciadora e agentes seletivos/diferenciais usados, sendo dificultada naqueles produtos que contêm muitas espécies de microrganismos, tornando-se impossível na presença de várias linhagens de uma mesma espécie.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho foi selecionar meio de cultura para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* spp. na presença de culturas iniciadoras e estudar a viabilidade das linhagens probióticas durante a vida de prateleira de bebidas lácteas fermentadas. Como objetivos específicos buscou-se avaliar a seletividade de 6 meios de cultura para *Bifidobacterium* spp. na presença de culturas iniciadoras; fazer a caracterização físico-química de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de soro de queijo nanofiltrado; caracterizar a estabilidade físico-química e microbiológica das bebidas lácteas durante 28 dias de estocagem refrigerada e estudar a viabilidade de *Bifidobacterium* spp. durante a vida de prateleira

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Probióticos

Os efeitos benéficos dos probióticos tiveram sua origem no começo do século XX, com o microbiologista russo Eli Metchnikoff, que propôs que propôs uma teoria sobre o prolongamento da vida baseado no consumo diário de leites fermentados pelos povos dos Bálcãs (FAO/WHO, 2001). Os experimentos de Metchnikoff levaram-no a acreditar que as bactérias ácido-lácticas conseguiriam estabelecer-se no trato intestinal e prevenir a multiplicação e até mesmo diminuir o número de bactérias putrefativas (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

O termo probiótico deriva de duas palavras gregas, “pros” e “bios”, que significam “pela vida”. Este termo foi introduzido pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965) para descrever as substâncias produzidas por um micro-organismo que estimulava o crescimento de outros. Desde então várias definições foram feitas para os probióticos, dependendo de seus efeitos sobre a saúde dos hospedeiros (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Parker (1974) designou, para o termo probióticos, a conotação de micro-organismo e substâncias que contribuem para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal. Posteriormente, Fuller (1989) modificou este conceito, introduzindo nova definição, que seria “suplemento alimentar constituído de micro-organismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro pelo equilíbrio da microbiota intestinal” (AMROUCHE, 2005). Salminen (1999) definiu probióticos como preparados de microrganismos, ou seus constituintes, que têm efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro.

A definição de probióticos no Brasil é “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde” (ANVISA, 2002).

Atualmente, a definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Organização da Agricultura e Alimentação (FAO) das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde (WHO) (KOMATSU et al., 2008). Segundo a FAO/WHO (2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Não se conhecem probióticos capazes de se instalar no trato digestivo do adulto, mesmo após sua ingestão prolongada, uma vez que a microbiota residente ainda que desequilibrada, impede essa colonização. Portanto, a ingestão diária de probiótico em quantidade adequada é indispensável para manter níveis elevados do micro-organismo no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado (MARTINS et al., 2005).

Vinderola & Reinheimer (2000), afirmam que, dependendo da linhagem empregada e do efeito benéfico desejado, um consumo de bactérias probióticas entre 10^8 a 10^{11} UFC/dia é o recomendável.

No Brasil, a Comissão Tecno-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos (Brasil, 1999) têm avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país. Em 2001, a referida Comissão recomendou que um alimento funcional probiótico devesse apresentar uma concentração mínima de 10^6 UFC/g dentro do prazo de validade do produto. De acordo com ANVISA (2008) a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante.

Apesar de algumas definições de probióticos focarem a importância de sua viabilidade, alguns trabalhos sugerem que micro-organismos não viáveis ou seus componentes podem exercer algum efeito benéfico (PENNER et al., 2005; KATARIA et al., 2009, SOUZA et al., 2012).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antimicrobianos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos; diminuição da população de patógenos pela produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes; modulação do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Embora ainda não comprovados, outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. São sugeridos, também, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, controle da colite induzida por rotavirus e por *Clostridium difficile*, prevenção de

infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (SHAH & LANKAPUTHRA, 1997; ZUBILLAGA et al., 2001; KAUR et al., 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008; GUERRA et al., 2011). Também foram obtidos dados positivos no tratamento de doenças inflamatórias intestinais (bolsite e colite ulcerativa) com bactérias probióticas (GIONCHETTI et al., 2000).

Culturas comerciais empregadas como probióticos incluem principalmente linhagens de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (KOMATSU et al., 2008; VASILJEVIC & SHAH, 2008). As investigações científicas mais recentes têm demonstrado clara e inequivocamente a relevância para a saúde de dois gêneros bacterianos candidatos a probióticos: *Bifidobacterium* (presentes na microbiota intestinal do cólon) e *Lactobacillus acidophilus* (presente na microbiota do intestino delgado) (KEMPKA et al., 2008).

O futuro aponta para o uso de probióticos, associados ou não a cultura tradicional, quer como agentes biotecnológicos, ou seja, que melhoram as características do produto tradicional quer como agentes terapêuticos, ou seja, microrganismos que promovem efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem (THAMER & PENNA, 2005).

2.2 Produtos probióticos

Os produtos probióticos disponíveis no mercado global podem ser divididos em: alimentos, suplementos e ingredientes. Alimentos probióticos representam a maior parcela (90,1%) das vendas totais. O mercado global de probióticos aumentou de US\$ 14,9 bilhões em 2007 para US\$ 15,9 bilhões em 2008 e, de acordo com estimativas, deve atingir 19,6 bilhões de dólares em 2013, o que corresponde a uma taxa de crescimento anual (TCA) de 4,3% (Agheyisi, 2008).

Os produtos lácteos funcionais têm apresentado crescimento de 40% ao ano; entretanto, os líderes no mercado de iogurtes probióticos apontam que esse tipo de produto só está presente em 7% dos lares brasileiros e que o consumo anual é de 6Kg ao ano por habitante, um volume muito pequeno, se comparado ao da França, onde o consumo anual é de 30Kg, ou ao da Argentina, com consumo de 16Kg por habitante (SALGADO & ALMEIDA, 2008).

Os microrganismos mais frequentemente utilizados nas preparações probióticas são as bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), as quais são encontradas em altos níveis no intestino do homem e de animais saudáveis e são consideradas pela *Food*

and Drug Administration (FDA) como aquelas Geralmente Reconhecidas como Seguras (“GRAS”). Fazem parte deste grupo algumas espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Além dessas, outros microrganismos probióticos estudados, tanto experimentalmente quanto clinicamente, incluem as bifidobactérias, propionibactérias, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus toyoi*, e a levedura *Saccharomyces boulardii* (SENOK, et al., 2005; MEILE et al., 2008).

A indústria de alimentos, especialmente o setor de laticínios, tem adicionado culturas probióticas para conferir propriedades funcionais aos seus produtos. Leites fermentados e iogurtes contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover a saúde, mas há também sobremesas a base de leite, leite em pó destinado a recém-nascidos, sorvetes, manteiga, maionese, diversos tipos de queijos e alimentos de origem vegetal fermentado (SAAD, 2006, SIRO et al., 2008).

No Brasil, dos diversos leites fermentados disponíveis no mercado, apenas alguns contêm no rótulo a identificação do microrganismo presente. Em geral, o fabricante limita-se a informar que o produto contém “fermentos lácteos”. No entanto, a linhagem de microrganismo presente no produto, bem como o número de células viáveis desta cultura, é que determina se este é ou não probiótico. A legislação deveria exigir que fosse veiculada essa informação no rótulo para assim permitir aos consumidores a escolha de produtos com linhagens potencialmente benéficas à saúde. Além disso, sem estas informações do fabricante, é impossível o controle de qualidade pelas agências governamentais de fiscalização (ANTUNES et al., 2007).

Vinderola, Bailo & Reinheimer (2000) afirmaram que a adição de bactérias probióticas ao leite fermentado é prática amplamente adotada pelos laticínios. Contudo, fatores como acidez do iogurte, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem condicionar a sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados.

Zacarchenco & Massaguer-Roig (2004) avaliaram três leites fermentados, separadamente por *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. Também foi estudado o leite fermentado pela mistura de volumes iguais dos leites fermentados separadamente por estes três microrganismos. Observou-se que, apesar de o leite fermentado contendo os três microrganismos

apresentar o maior abaixamento de pH, a contagem de *B. longum* 5^{1A} permaneceu acima de 10^8 UFC.mL⁻¹ após 21 dias de estocagem.

Saccaro (2008) estudou a inter-relação entre culturas iniciadoras e probióticas em leites fermentados a partir de culturas mistas. No produto fermentado a partir da mistura de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* houve elevação de um ciclo logarítmico na contagem de *B. lactis*, entre o primeiro e sétimo dia de análise. Para esta bactéria, o número de células viáveis permaneceu ligeiramente constante até o vigésimo primeiro dia de armazenamento, fornecendo valores acima 10^7 UFC.mL⁻¹.

Castro et al. (2009) avaliaram a influência de diferentes porcentagens de soro lácteo e oligofrutose nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas simbióticas. Observou-se que o conteúdo de soro lácteo e oligofrutose não influenciaram na contagem de bactérias probióticas. A contagem de microrganismos probióticos manteve-se em 10^6 UFC.mL⁻¹, atendendo o valor mínimo satisfatório de viabilidade de células, uma vez que a dose terapêutica diária mínima é de 10^8 a 10^9 UFC/100g de produto.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) estabelece que para um produto probiótico apresentar a alegação de que promove a saúde, a quantidade mínima viável da cultura deve estar situada na faixa de 10^8 – 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Considerando que resolução da ANVISA (2003) estabelece a porção de bebida láctea como equivalente a 200mL do produto pronto para consumo.

Nesse caso, é necessário e extremamente relevante que sejam avaliados e implantados métodos de quantificação das espécies de maior interesse.

2.3 O gênero *Bifidobacterium*

O gênero pertence ao Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Bifidobacteriales e Família Bifidobacteriaceae. A maioria das espécies foi isolada principalmente do trato digestivo de mamíferos (LEAHY et al., 2005).

São conhecidas aproximadamente 30 espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, sendo pelo menos 11 destas 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 bifidobactérias são habitantes naturais do intestino humano e animal. O trato digestivo de um recém-nascido é rapidamente colonizado por bactérias oriundas da vagina durante o parto. Após um mês, a microbiota no intestino do bebê será ocupada por 80% de bifidobactérias e essa população parece ser relativamente estável até idade adulta, quando começa seu declínio. Sua população é influenciada pela dieta, antimicrobianos estresse etc (BERNAL, 2004).

Com o decorrer dos anos de vida, a população intestinal de bifidobactérias tende a diminuir gradativamente. Em crianças, chega a mais de 80%, enquanto que em adultos representa 20% das bactérias entéricas. Além disso, o perfil das espécies constituintes muda *B. infantis* e *B. breve*, tipicamente infantis, são substituídas por *B. adolescentis* em adultos, enquanto *B. longum* persiste ao longo da vida (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

As bifidobactérias diferem das bactérias lácticas homo e heterofermentativas na forma de fermentação da glicose, a qual ocorre pela via frutose-6-fosfato, produzindo ácido acético e ácido láctico na forma L(+) na proporção molar de 3:2, respectivamente, e 5 moles de ATP, a partir de dois moles de glicose. A presença de frutose-6- fosfato-fosfocetolase (F6PPK) distingue o gênero de outros do grupo. Essa enzima quebra a frutose-6- fosfato em acetil-fosfato e eritrose-4-fosfato, sendo o único gênero bacteriano de origem intestinal que apresenta essa via fermentativa conhecida como “via bífida”. Todas as espécies fermentam glicose, galactose, frutose e lactose, com exceção de *B. gallicum* que não utiliza lactose (MODLER, McKELLAR & YAGUCHI, 1990).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas do trato gastrintestinal do humano saudável. Pode-se afirmar que, uma linhagem probiótica irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar ao qual foi isolado, visto que é geralmente hospedeiro-específica (SAARELA, et al., 2000). Portanto, as linhagens probióticas mais frequentemente empregadas em produtos lácteos são de origem humana, em função da boa capacidade de adaptação as necessidades fisiológicas do hospedeiro comparadas com linhagens de outros animais (GOMES & MALCATA, 1999).

Para uso em alimentos, as linhagens devem ser selecionadas com base nos processos tecnológicos, visto que as bactérias probióticas devem exibir resistência às etapas da preparação do alimento. Muitas bifidobactérias, adicionadas aos produtos lácteos, podem morrer após exposição ao ácido (durante ou após sua fermentação), ao

oxigênio durante a distribuição e estocagem refrigerada, e/ou ao ácido estomacal humano após ingestão (MAUS & INGHAM, 2003).

Dentre os microrganismos probióticos mais usados, *L. acidophilus* é mais tolerante a condições ácidas do que *Bifidobacterium* spp., na qual o crescimento é significativamente retardado em pH abaixo de 5,0 (MATSUMOTO et al., 2004). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* é mais tolerante a condições ácidas e, preferencialmente usada em produtos probióticos.

Bifidobacterium spp. são geralmente mais sensíveis à presença de oxigênio do que *L. acidophilus*. Oxigênio pode afetar de duas maneiras as culturas probióticas: indiretamente pela produção de peróxido de hidrogênio, a partir do metabolismo de *L. bulgaricus* em presença de oxigênio e, diretamente, através do acúmulo intracelular desta substância (DAVE & SHAH, 1997). *B. infantis*, *B. breve* e *B. longum* apresentaram-se mais tolerantes à presença de oxigênio (GOMES & MALCATA, 1999). Entretanto, *B. lactis* é a espécie mais utilizada em aplicações probióticas, já que o crescimento deste probiótico após a fermentação produziu produtos com maior estabilidade durante a estocagem (MATTO et al., 2006).

2.4 Caracterizações bioquímica e fisiológica das bifidobactérias

As bifidobactérias são caracterizadas por serem microrganismos Gram-positivo, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, anaeróbios estritos com morfologia celular variável (GOMES; MALCATA, 1999; SUN; GRIFFITHS, 2000). Elas são organismos heterofermentativos com produção de ácido acético e láctico na proporção de 3:2, sem geração de CO₂, exceto durante a degradação do gluconato, e capazes de utilizar a glicose, galactose, a lactose e a frutose como fontes de carbono (GOMES; MALCATA, 1999). A temperatura ótima para crescimento oscila entre 37 e 41° C e o pH entre 6 e 7 (GOMES; MALCATA, 1999).

As bifidobactérias produzem a enzima frutose-6-fosfato fosfoquetolase, que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato. Esta enzima é utilizada como uma ferramenta na identificação do gênero, entretanto, não permite a distinção no nível de espécie (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

A grande maioria das culturas probióticas é originária do intestino saudável humano ou animal. Assim sendo, estas culturas são capazes de compor a microbiota do hospedeiro, ainda que temporariamente, depois de consumidas. *Bifidobacterium*

spp. estão presentes no intestino delgado onde ácido láctico produzido ajuda a inibir o crescimento de organismos indesejáveis como *E. coli* (AWAISHEH; HADDADIN; ROBINSON, 2005).

Dentre os efeitos benéficos à saúde proporcionados pelos probióticos, as bifidobactérias são conhecidas por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitamina B, inibirem a multiplicação de patógenos, reduzirem a concentração de amônia e colesterol no sangue e ajudarem a restabelecer a microbiota normal após tratamento com antibióticos. Assim sendo, esses microrganismos são comumente utilizados em intervenções dietéticas que visam à melhoria da saúde dos indivíduos (LEAHY et al., 2005).

A viabilidade e atividade de culturas probióticas podem ser afetadas durante todas as etapas do processamento bem como de armazenamento. Em geral, microrganismos probióticos são muito sensíveis a condições ambientais como atividade de água, potencial redox (presença de oxigênio), temperatura de armazenamento, presença de microrganismos competidores, acidez e presença de inibidores microbianos (NaCl, H₂O₂) (GOMES & MALCATA, 1999; VASEILJEVIC & SHAH, 2008). A Figura 2 resume os critérios para a seleção de *Bifidobacterium* empregada na produção de produtos lácteos probióticos.

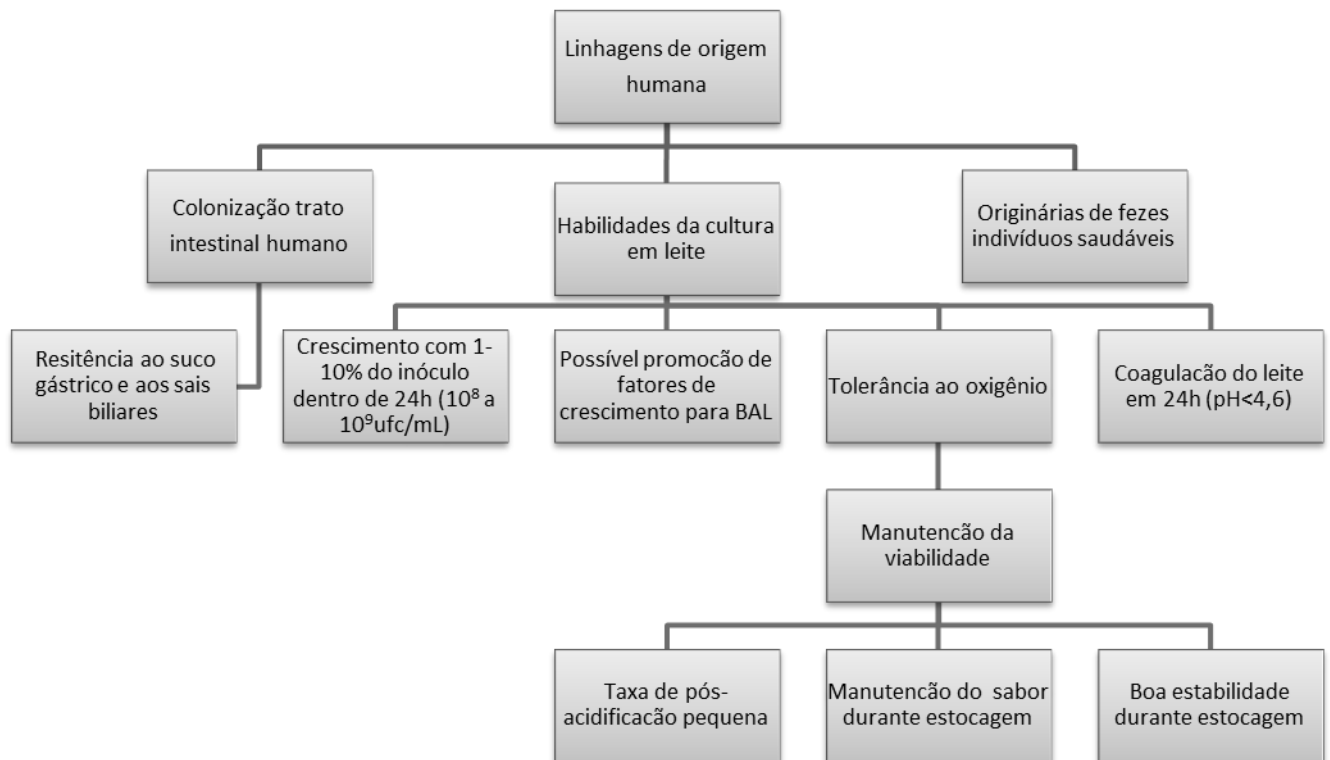


Figura 1: Critérios de seleção de *Bifidobacterium* spp. para uso como probióticos. Adaptada de GOMES & MALCATA, 1999.

2.5 Bebida láctea

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de 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% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto.

A bebida láctea fermentada deverá ser fermentada mediante a ação de microrganismos 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, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade.

O regulamento técnico estabelece também parâmetros microbiológicos, coliformes totais e termotolerantes (Tabela 1), e físico-químicos (BRASIL, 2005).

Tabela 1: Parâmetros microbiológicos para bebidas lácteas fermentadas

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

A formação de ácido láctico em produtos fermentados é desejável, pois este é um conservante natural, o que torna o produto biologicamente seguro, além de favorecer a digestibilidade dos componentes do leite (OLIVEIRA, 2006). A acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados e é um dos fatores que limita sua aceitação (THAMER & PENA, 2006).

A aceitação de produtos lácteos fermentados deve-se, em grande parte, às características organolépticas de aroma e consistência conferidas pela utilização de culturas lácticas apropriadas (THAMER & PENA, 2006).

O valor do pH tem sua importância relacionada também com o aspecto visual do produto final durante sua conservação em temperaturas baixas (THAMER & PENA, 2006). Como o pH interfere na viabilidade da microbiota probiótica em leites fermentados, com o decréscimo deste, ocorre uma redução nas contagens de células viáveis de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* durante a estocagem refrigerada de iogurtes (VINDEROLA, 2000).

Pós-acidificação de iogurte pode ser prevenida antes da adição das culturas probióticas, diminuindo a temperatura de armazenamento para menos que 3-4°C e melhorando a capacidade tampão do iogurte pela adição de concentrado protéico de soro (KAILASAPATHY & RYBKA, 1997).

A procura do consumidor brasileiro por produtos mais saudáveis, inovadores, seguros e de prática utilização, aliada à consolidação dos produtos no mercado, contribuíram para o crescimento de bebidas lácteas, fazendo com que estas ganhassem popularidade (SANTOS & FERREIRA, 2001).

2.5.1 Matérias-primas

Na elaboração da bebida láctea fermentada utiliza-se leite, soro lácteo e cultura iniciadora. Faz-se a fermentação da base láctea com cultura denominada láctica tradicional para iogurte, constituída de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (TEBALDI, 2005).

Na fabricação da bebida láctea é prática comum a adição de leite em pó desnatado à base composta de leite fluido e soro lácteo. Essa adição tem como principal objetivo aumentar o conteúdo de sólidos, melhorando as propriedades de corpo e textura do produto final. A adição de estabilizantes como hidrocolóides e caseinato de sódio é feita visando a melhoria da consistência e redução da sinérese (DIAS, 2008).

2.5.1.1 Leite

O leite apresenta-se como emulsão líquida em que a fase contínua é formada por água e substâncias hidrossolúveis e a fase interna ou descontínua, constituída principalmente por, micelas de caseína e glóbulos de gordura. O leite de vaca é composto principalmente por água, aproximadamente 4,8% de lactose, 3,2% de proteína, 3,7% de gordura, 0,19% de nitrogênio não proteico e 0,7% de cinzas (SGARDIERI, 2005).

As proteínas do leite podem ser classificadas em dois grupos: as caseínas e as proteínas do soro. As caseínas se encontram em suspensão no leite na forma de micelas, que são agrupamentos de várias moléculas de caseína ligadas a íons como o fosfato de cálcio. Normalmente, esta proteína permanece estável durante a pasteurização, entretanto, quando o leite sofre acidificação ocorre desestruturação das micelas e conseqüente formação de coágulo. Diferentemente das caseínas, proteínas do soro são insensíveis às coagulações ácidas. Portanto, quando ocorre a coagulação das caseínas com a gordura formando coalho, as proteínas do soro e boa parte da lactose permanecem em solução (SGARBIERE, 1996).

Para produção de iogurte, o binômio tempo e temperatura recomendado é de 83°C por 30 minutos para pasteurização. Além da inocuidade proporcionada pela pasteurização, os efeitos do tratamento térmico englobam: desnaturação parcial das proteínas do soro, podendo criar novas ligações e união entre si mesmas ou com

outros componentes do leite. As β -lactoglobulinas (proteínas do soro) podem formar agregados ou depositar-se nas micelas da caseína, unindo-se covalentemente com moléculas da κ -caseína, aumentando a viscosidade; redução da quantidade de oxigênio dissolvido, criando-se condições de microaerofilia favoráveis para o crescimento do cultivo iniciador; liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular provenientes da desnaturação das proteínas do soro, passíveis de estimular o desenvolvimento dos microrganismos iniciadores (ORDÓÑEZ, 2005).

2.5.1.2 Soro lácteo

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea define soro como líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005). O soro lácteo é composto de, aproximadamente, 93% de água, 5% de lactose; 0,7 a 0,9% de proteína; 0,3% de gordura e 0,53% de sais minerais (TEIXEIRA et al., 2005). As principais proteínas do soro são a β -lactoglobulina (58%) e a α -lactalbumina, enquanto imunoglobulinas, soralbumina e proteose-peptonas são encontradas em menor quantidade (PESCUMA et al., 2008). Estes autores demonstraram a potencialidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* para crescer e degradar as proteínas principais do soro lácteo reconstituído, com maior degradação de α -lactalbumina.

O soro representa de 85-90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijos, retendo ao redor de 55% dos nutrientes do leite (ALMEIDA, 2001). As proteínas do soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais, exceto os aromáticos (Fenilalanina, tirosina) que atendem as recomendações para todas as idades. Apresentam altas concentrações de triptofano, cisteína, leucina e lisina. As proteínas do soro lácteo são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo (SGARBIERI, 2004).

Existem dois tipos de soro lácteo, o soro doce e o soro ácido. Sua composição e classificação dependem do processo tecnológico realizado na obtenção do soro em questão (Tabela 2). Quando obtido a partir da coagulação enzimática da caseína, é denominado soro doce. Queijos como Minas Frescal, Mussarela, Prato e Cheddar são exemplos de queijos produzidos pela coagulação enzimática que tem como produto o tipo de soro doce. Quando o soro é obtido da coagulação ácida, é denominado soro.

Esse soro pode ser obtido da fabricação de requeijão e queijo cottage (TEIXEIRA, 2002).

Tabela 2: Composição físico-química de soro doce e ácido

Parâmetro	Soro doce	Soro ácido
pH	6,3	4,6
Proteínas (%)	0,82	0,75
Lipídeos %	0,07	0,03
Lactose %	4,77	4,71
Ácido Láctico %	0,15	0,55
Cinzas %	0,53	0,69

Fonte: Antunes (2004)

Do ponto de vista biológico, o soro é um dos resíduos mais poluentes, tendo uma demanda bioquímica de oxigênio entre 30.000 e 60.000 ppm (MACHADO et al., 2002). Em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia no sistema de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (ANDRADE & MARTINS, 2002).

Sabendo-se que a lactose é responsável pela alta demanda biológica de oxigênio do soro, diversos processos fermentativos têm sido propostos como alternativa para reduzir o problema de desperdício e disposição do soro lácteo. Tanto o soro quanto o permeado de soro (produto resultante da produção de proteínas do soro) ou a lactose podem ser utilizados diretamente como substrato para o crescimento microbiano visando à obtenção de produtos de maior valor agregado, tais como: proteínas unicelulares, alcoóis (etanol, butanol), ácidos orgânicos (láctico, acético, propiônico e cítrico), vitaminas e biopolímeros (goma xantana) (YANG & SILVA, 1995).

No Brasil, o volume estimado de queijo produzido para o ano de 2008 foi de 640.000 toneladas, o que corresponde a uma produção de, aproximadamente, 5.760.000 toneladas de soro (EMBRAPA, 2008). Devido a grande oferta de soro lácteo no Brasil, baixo custo, características nutricionais e visando reduzir seu potencial poluidor, o soro torna-se uma importante matéria prima na produção de bebida láctea.

As propriedades funcionais dos produtos de soro são de grande importância para os fabricantes de produtos lácteos fermentados com características probióticas ou nutracêuticas (THAMER & PENA, 2006).

Alteração na composição da bebida láctea como conteúdo de soro pode afetar a suscetibilidade à sinérese bem como a acidez. Em leites fermentados, a sinérese é considerada o principal defeito, sendo um fator limitante na aceitação do produto pelo consumidor (KAILASAPATHY, 2006). A acidez também pode comprometer a aceitabilidade do produto pelo consumidor como também afetar a viabilidade das bactérias probióticas em bebidas lácteas (THAMER & PENA, 2006; VINDEROLA & REINHEIMER, 2003).

De acordo com Almeida, Bonassi e Roça (2001) a relação leite-soro na produção de bebida láctea é um pouco aleatória. Estes mesmos autores observaram que a elevação nos teores de soro (30 - 50%) ocasionou redução nos teores de proteína, gordura e extrato seco. Sendo as bebidas lácteas produzidas com 30% de soro as que apresentaram maior viscosidade.

2.5.1.3 Cultura láctica

Cultura láctica ou cultura iniciadora pode ser definida como uma preparação microbiana de um grande número de células, contendo no mínimo um microrganismo, a ser adicionado no material cru, proporcionando a fermentação do produto (LEROY & VUYST, 2004). A base utilizada para a produção de bebidas lácteas são fermentos compostos de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* (OLIVEIRA & DAMIN, 2003).

As bactérias do ácido láctico (BAL) compreendem um grupo composto por vários gêneros, dentro do Filo Firmicutes, Classe Bacilli, que apresentam alguns fenótipos em comum: são Gram positivo, geralmente imóveis, não produzem esporos, quase sempre catalase negativo e anaeróbios aerotolerantes. Uma importante diferença dentre os subgrupos das BAL são os produtos formados durante a fermentação dos carboidratos. Um grupo, denominado de homofermentativo, produz ácido láctico como único ou principal produto, enquanto o outro grupo, denominado heterofermentativo, produz etanol, CO₂ e lactato em quantidades equimolares (JAY, 2005). Em geral são mesófilicas, mas podem crescer em baixas temperaturas como 5°C ou altas como 45°C, em situações específicas. A maioria das linhagens cresce em pH 4 a 4,5. São pouco proteolíticas e lipolíticas e requerem aminoácidos pré-formados, purina, pirimidina e vitaminas do complexo B para seu crescimento (JAY, 2005).

Lactobacillus é incluído no grupo das BAL, contendo espécies substancialmente diferentes em características fenotípicas, bioquímicas, fisiológicas e genotípicas. É um

gênero classicamente composto por espécies homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. Apresentam-se na forma de bastonetes ou cocobacilos Gram positivo, ocorrem isolados, aos pares ou formando cadeias curtas, são microaerófilos e fastidiosos. Não formam esporos e são catalase negativo. Crescem numa faixa de temperatura entre 2 e 53°C. São acidúricos ou acidofílicos, produzindo pH 4,0 em alimentos contendo carboidratos fermentáveis (CRISPIM, 2008). As espécies encontradas em alimentos tem crescimento facilitado quando o ambiente em que se encontram é rico em CO₂ (FRANCO & LANDGRAF, 2004). O *L. bulgaricus* apresenta-se em forma de bastonetes, unidos em cadeias longas, com crescimento ótimo entre 45°C a 50°C (SABOYA, 1997).

Streptococcus são células esféricas ou ovais, com 1µm de diâmetro em cadeias ou em pares. São Gram positivo, anaeróbio facultativo, imóveis, não formadores de esporos e a temperatura ótima de crescimento varia entre 40 – 50°C. São principalmente homofermentativos utilizando a glicose para a produção de ácido láctico (L+) (ROBINSON, 2002). Algumas amostras de *S. thermophilus* sintetizam exopolissacarídeos, polímeros bastante úteis na produção de leites fermentados firmes, responsáveis pela manutenção da textura e da viscosidade adequadas mesmo após a fermentação (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

As bactérias da cultura iniciadora estabelecem uma relação entre si. Logo após a inoculação, *S. thermophilus* cresce primeiro – tem a capacidade de desdobrar a lactose a pH mais neutro. Com o seu crescimento, o ácido láctico é acumulado no meio, abaixando parcialmente o pH e lançando ao meio algumas substâncias aminadas originadas da proteína do soro, que vão estimular o desenvolvimento de *L. bulgaricus*. Este, por sua vez, passa a crescer, abaixa ainda mais o pH e lança ao meio aminoácidos, como glicina, histidina e valina, que estimulam o crescimento de *S. thermophilus*. Até aí, tem-se uma simbiose. Com o passar do tempo, cada vez mais ácido láctico é acumulado no meio. O pH chega a certo ponto que passa a inibir *S. thermophilus*. *L. bulgaricus*, por ser mais resistente à acidez, aumenta em número e sobrepuja *S. thermophilus*. No final do processo, tem-se um número bem maior de *L. bulgaricus* que de *S. thermophilus*. *Lactobacillus*, no início, cresce mais devagar, mas permanece mais viável por um tempo bem maior que *S. thermophilus*. Este, por sua vez, cresce mais rapidamente no início do processo, mas, devido à sensibilidade à acidez, é sobrepujado por *Lactobacillus* (FERREIRA, 2005).

O emprego de *L. bulgaricus* em iogurte pode afetar a sobrevivência de bactérias probióticas como *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* devido à produção de ácido (pós-acidificação) e peróxido de hidrogênio. Entretanto, devido a sua natureza proteolítica, *L. bulgaricus* pode liberar aminoácidos essenciais como valina, glicina e histidina necessários ao crescimento de bifidobactérias. Ainda, *S. thermophilus* pode estimular o crescimento de probióticos devido ao consumo de oxigênio (SHIHATA & SHAH, 2002).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não pertencem à microbiota intestinal, não são resistentes à bile e conseqüentemente não sobrevivem a passagem através do trato gastrintestinal, portanto não são consideradas como probióticas. No entanto, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrintestinal e melhoramento da digestão da lactose devido a presença de enzima β -galactosidase nas células das bactérias tradicionais de iogurte (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Em geral, os probióticos são adicionados aos alimentos sem participar do processo de fermentação e sem praticamente modificar sua concentração durante a elaboração do produto (VINDEROLA et al., 2011a). Souza (2012) observou perda da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} quando adicionado antes da fermentação, com redução de aproximadamente 1,5 log.

Como as bifidobactérias produzem, durante a fermentação, ácidos acético e láctico, a taxa de 3:2, seu desenvolvimento excessivo pode gerar produtos com sabor “a vinagre”, dificultando a aceitação do produto pelos consumidores (Zacarchenco & Massaguer-Roig, 2004). A prática de inoculação direta é viável em termos práticos para a indústria, uma vez que se adiciona, em um só momento, a cultura iniciadora juntamente com a cultura probiótica. Entretanto, as indústrias de leites fermentados optam por adicionar a bifidobactéria após o final do preparo do iogurte e, em seguida, refrigeram o produto. Assim, a bifidobactéria estará presente em baixíssima atividade fermentativa, produzindo quantidades irrisórias de ácido acético, o que poderia alterar o sabor do iogurte.

Quando é usada somente linhagem probiótica para fermentar o leite, o pH mantém-se acima de 5,4 depois de 20 horas a 42°C; quando a cultura probiótica é usada na presença de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, em 6 horas o pH fica abaixo de 4,5 e a sobrevivência da bactéria láctica é muito boa, porém, em alguns casos, o número de bactérias diminui durante a vida de prateleira (SAXELIN et al., 1999).

2.5.2 Processo de elaboração de bebidas lácteas

O processo de elaboração das bebidas lácteas segue as operações básicas para obtenção do iogurte. Os procedimentos adotados podem ser resumidos no fluxograma apresentado na Figura 2 (THAMER & PENA, 2006; SACCARO, 2008).



Figura 2: Fluxograma de produção das bebidas lácteas fermentadas.
Adaptado de (THAMER & PENA, 2006; SACCARO, 2008).

A pasteurização tem como objetivo eliminar patógenos, bacteriófagos e outros microrganismos capazes de competir com o fermento lácteo, o que favorece o crescimento dos microrganismos que serão inoculados. O tratamento térmico resulta em menos sinérese e mais firmeza do coágulo, sensibiliza as proteínas do soro e os íons cálcio, aumentando a coagulação (AQUARONE, LIMA & BORZANI, 1983).

O resfriamento é realizado para que a temperatura do leite fique ideal para o recebimento do fermento. Essa temperatura é de geralmente 42 a 43°C, podendo variar de 40 a 45°C. O resfriamento pode ser feito com retirada do aquecimento deixando-se passar água fria, ou com banho de gelo. Nesta etapa deve-se assegurar que seja mantida a assepsia evitando contaminações. Após o resfriamento, o fermento preparado anteriormente é adicionado em concentrações que variam de acordo com o fermento utilizado. Deve ser realizada uma homogeneização por poucos minutos antes

da fermentação para que não se formem grumos. A incubação ou fermentação deve ser realizada a temperatura constante entre 40 e 42°C. Com as condições todas acertadas, a fermentação tem tempo médio de 3 a 4 horas. A fermentação tem seu fim quando atingido o pH 4,6 (ponto isoelétrico da caseína) ou até que a acidez atinja de 85 a 90°D (AQUARONE, LIMA & BORZANI, 1983).

O resfriamento posterior à incubação (fermentação) se dá com a intenção de conter o crescimento da cultura inoculada. Este resfriamento pode interferir na consistência do produto final. Assim, se realizado antes do tempo correto, pode deixar o produto mole, sem acidez, sabor e aroma característico. E, se realizado após o tempo correto, o produto se torna muito ácido e com grandes chances de dessorar (AQUARONE, LIMA & BORZANI, 1983).

2.5.3 Filtração por membranas

A filtração por membranas é um processo destinado a separar e/ou concentrar partículas sólidas de um fluido mediante uma membrana porosa (BRENNAN et al., 1998). A microfiltração, a ultrafiltração, a nanofiltração e a osmose reversa constituem os principais processos que empregam membranas. A eficiência de cada um desses processos varia em função do diâmetro médio dos poros das membranas (Figura 1), da pressão, velocidade, vazão, temperatura, tempo do processo, tipo de matéria-prima, Fator de Redução Volumétrico (FRV), fluxo do permeado, qualidade final do produto obtido e o tipo de membrana (Prudêncio 2006).

Em qualquer processo de separação, é importante conhecer o *cut-off*, que corresponde à massa molar da partícula que fica 90% retida pela membrana. Este limite molar de exclusão determina a retenção das espécies moleculares e o fluxo relativo à velocidade com que se pode efetuar a concentração. Os componentes de maior massa molar e que excedem o tamanho dos poros da membrana permanecem retidos denominando-se concentrado ou retentado, enquanto o que ultrapassa a membrana e que contém as moléculas menores é chamado de filtrado ou permeado (GEANKOPLIS, 2003).

Nanofiltração (NF) caracteriza-se por ter uma escala de interrupção do peso molecular de aproximadamente 100 a 1000Da. As membranas de NF retêm todos os solutos de soro lácteo exceto a carga monovalente de íons. É capaz de remover os íons, o que contribui para pressão osmótica permitindo pressões de operação bem

menores do que as requeridas na osmose reversa. O permeado composto de água, sais monovalentes e um pouco de ácido orgânico que imita a estrutura tetraédrica da água (Rosenberg, 1995). Na nanofiltração do soro lácteo é possível concentração e retirada de cinzas.

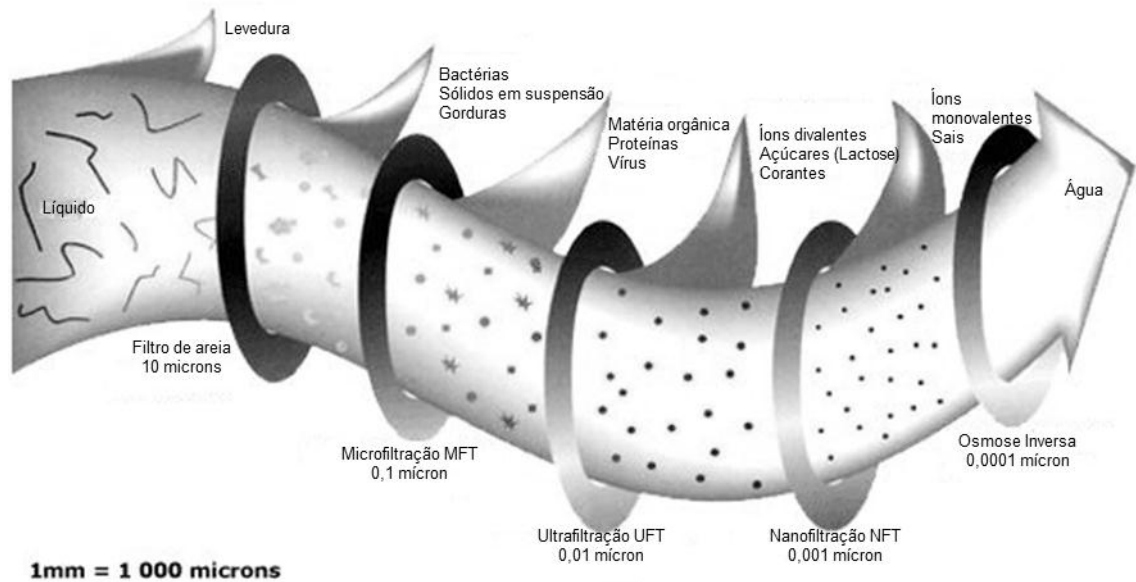


Figura 3: Processo de separação por membranas.

Fonte: T.I. A, 2012.

O retentado de soro lácteo (RS) é um concentrado proteico de alto valor biológico e tem sido aplicado na elaboração de iogurtes, queijos e outros derivados lácteos, resultando em produtos diferenciados, de alto valor nutricional, considerados de grande aceitabilidade pelo consumidor (CASTRO & GERLA, 2005).

Suaréz et al. (2008) estudaram a capacidade de desmineralização de soro e permeado de leite ultrafiltrado pelo processo de nanofiltração, utilizando uma membrana com características similares as utilizadas no presente estudo. Os autores identificaram capacidade de retenção de proteínas de quase 100% e de 99,5% de lactose para o soro analisado. A retenção de lactose para o permeado de leite ultrafiltrado variou entre 97 e 99%. O grau de remoção de sais minerais foi maior no permeado de leite ultrafiltrado devido ao menor teor de proteínas deste.

2.6 Meios de cultura específicos para bifidobactérias

A falta de um método padrão para a enumeração de *Bifidobacterium* spp. na presença de culturas do iogurte é um fator que dificulta em muito a otimização da

tecnologia de fabricação de iogurtes probióticos e o controle da sua eficácia como agente terapêutico. Os meios de cultura usados se dividem em seletivos e diferenciais. Meios seletivos são baseados na ação de um ou mais antimicrobianos que inibem o desenvolvimento das culturas do iogurte (por exemplo, meio MRS-NNLP e MRS-LP) ou na seleção do desenvolvimento de *Bifidobacterium* spp. pelo uso de um carboidrato que usualmente não é fermentado pelas culturas do iogurte (por exemplo, a maltose no meio M-MRS). Meios diferenciais se baseiam no uso de corantes especiais que diferenciam as colônias de *Bifidobacterium* spp. das colônias das culturas do iogurte (FACHIN, 2003).

Diante da necessidade de quantificação simples e confiável tanto de *Bifidobacterium* como de *Lactobacillus*, para determinar o número inicial de bactéria probiótica depois da manufatura do produto, e também a determinação da viabilidade das células durante a estocagem em refrigeração bem como sua distribuição em cadeia, muitos meios de cultivos têm sido propostos, mas a maioria é insatisfatória na diferenciação das espécies (BERNAL, 2004). Monitorar o número de células viáveis de microrganismos probióticos nos alimentos em que os mesmos são incorporados é um parâmetro fundamental para assegurar a qualidade do produto que é comercializado com apelo terapêutico, entretanto, muitas vezes essa necessidade tem sido negligenciada em função da falta de padronização de métodos (BOTELHO, 2005).

Tradicionalmente, as bactérias ácido-lácticas são contadas em ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe), mas este meio não é seletivo para enumeração de microrganismos probióticos quando culturas não probióticas estão presentes. Um isolamento eficaz depende da formulação do meio, condições de fermentação, tempo, temperatura e atmosfera de incubação, bem como sobre o tipo de produto alimentar em análise (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999, 2000; ROY, 2001; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004).

Os meios de cultura para enumeração de bactérias lácticas em bio-iogurtes podem ser divididos, segundo Lourens-Hattingh & Viljoen (2001), em três grupos: (a) meios gerais que permitem contagem total de colônias sem diferenciá-las em gênero ou espécie, como por exemplo, o ágar (MRS); (b) meios formulados para contar seletivamente um gênero, como por exemplo, o ágar Neomicina-Ácido Nalidíxico-Cloreto de Lítio-Sulfato de Paramomicina (NNLP) para isolamento de *B. bifidum* ou o ágar M-17, para *S. thermophilus*; (c) meios diferenciais que permitem a enumeração de quatro tipos de bactérias através de características visuais distintas (cor e forma da

colônia), como por exemplo, o ágar *Tryptona-Proteose-Peptona-Yeast extract* com corante azul da Prússia (TPPY ágar).

Alguns parâmetros deveriam ser considerados para uma seleção adequada do meio de cultura para bifidobactéria (ROY, 2001):

- a) suprimento nutritivo e de substâncias de crescimento
- b) baixo potencial de oxi-redução
- c) manutenção do valor de pH durante crescimento

Lapierre; Undeland; Cox (1992) mostraram que bifidobactérias, exceção para *B. longum*, tiveram bom crescimento no meio composto por propionato de sódio e cloreto de lítio (LP ágar). O meio foi preparado adicionando-se duas partes de cloreto de lítio e três partes de propionato de sódio ao ágar LCL antes da esterilização. A concentração de cloreto de lítio e propionato de sódio utilizada mostraram não inibir o crescimento de bifidobactérias. Em contraste, as linhagens de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* e a maioria das linhagens de *Streptococcus* foram completamente inibidas. Algumas linhagens mesofílicas resistiram às concentrações de cloreto de lítio e propionato de sódio. Recomenda-se, portanto, a incubação à 40°C para prevenir o crescimento dessas linhagens. O procedimento mostrou-se ser simples e confiável para isolar e enumerar bifidobactérias de produtos lácteos fermentados.

Em 2000, Vinderola & Reinheimer conseguiram contar, em produtos lácteos fermentados, *B. bifidum* provenientes de uma mistura de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, em ágar LP-MRS sendo os únicos organismos capazes de crescerem e recuperarem bem as células neste meio. O meio utilizado para enumeração de bifidobactérias (LP-MRS) foi composto de 0,2% de cloreto de lítio e 0,3% de propionato de sódio demonstrado anteriormente como eficaz por Lapierre; Undeland; Cox (1992). Houve uma adaptação do meio com substituição de LCL pelo meio base MRS.

Também Castele et al. (2006) adaptando o meio com adição de cisteína, visando redução do potencial de oxirredução do meio, conseguiram inibir as culturas lácticas e contar seletivamente bifidobactéria.

Lambin & German (1969), citados por Cox, Dooley e Beumer (1990) relatam que cloreto de lítio foi útil para inibir bactérias fermentadoras de lactose. Embora o cloreto de lítio seja usado comumente em microbiologia, seu mecanismo de ação sobre as células bacterianas ainda é pouco entendido (LAPIERRE; UNDELAND & COX, 1992).

No trabalho de Vinderola & Reinheimer (1999), o meio BL-MRS (LIM, HUH e BAEK, 1995) contendo bile (Oxgall) e gentamicina, formulado para enumeração seletiva de bifidobactérias em produtos lácteos fermentados com a presença de lactobacilos e estreptococos, foi inibitório para crescimento de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, permitindo o crescimento de *B. bifidum* quando a incubação se deu em condições de anaerobiose. Também Lima et al. (2009) não obtiveram crescimento das culturas starter em BL-MRS (agar suplementado com 1.5 g/L de sais de bile) e as culturas de *B. animalis* cresceram igualmente bem tanto nesse meio quanto em LP-MRS, a 37°C ou 42°C em anaerobiose.

Os sais biliares são usados para inibir o crescimento de micro-organismos não intestinais (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

O meio Maltose-de Man & Rogosa, Sharpe (M-MRS) foi desenvolvido como um meio seletivo para o isolamento de *L. acidophilus* de iogurtes. Durante as análises foi notado que *Bifidobacterium* spp., principalmente *B. breve*, *B. bifidum* e *B. infantis*, poderiam se desenvolver em ágar M-MRS devido à capacidade de algumas linhagens em fermentar a maltose (RYBKA & KAILASAPATHY, 1996). Dave & Shah (1997) usaram com sucesso este meio para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* spp. (*B. bifidum* 1900 e 1901, *B. longum* 35 1941 e 20097, *B. adolescentis* 1920, *B. pseudolongum* 20099, *B. breve* 1930 e *B. infantis* 1912) em iogurtes. Lima et al. (2009) recomendam o plaqueamento em M-MRS para distinguir culturas probióticas de culturas iniciadoras, sendo as condições de incubação em anaerobiose, a 37°C ou 42°C

A substituição de glicose no meio MRS por maltose ou trealose foi testada por Lima et al. (2009). Não houve crescimento da cultura do iogurte, indicando que a glicose é essencial para seu crescimento. O efeito desta substituição no desenvolvimento de *B. animalis* variou de acordo com o açúcar, com aparecimento de colônias apenas no ágar maltose-MRS, confirmando o resultado encontrado por Vinderola & Reinheimer (1999).

Dave & Shah (1996) propuseram o uso do meio MRS-NNLP, associando os antimicrobianos NNLP (ácido nalidíxico, sulfato de neomicina, cloreto de lítio e sulfato de paramomicina) ao meio MRS para a contagem seletiva de *Bifidobacterium* em iogurtes. Componentes NPNL são amplamente utilizados para a enumeração seletiva de bifidobactérias. Sulfato de neomicina e ácido nalidíxico são incluídos como inibidores do crescimento de micro-organismos Gram positivo e bacilos Gram negativo,

respectivamente, e também cloreto de lítio é usado como agente seletivo em enumeração de bifidobactérias (ROY, 2001). A preparação de NPNL consome bastante tempo, mas no trabalho de Castelle (2006), mostrou ser o meio mais seletivo para enumeração de bifidobactéria, sendo, no entanto, a concentração dos agentes NPNL reduzidas,, como sugerido por Vinderola & Reinheimer (1999) para a preparação do meio.

Neomicina, paramomicina e gentamicina são antimicrobianos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos. São ativos frente a células bacterianas em crescimento. A entrada destas drogas nas células é O₂ dependente, fato que explica a resistência natural das bactérias anaeróbias estritas. A ação bactericida dos aminoglicosídeos se deve a dois fatores: inibem a síntese proteica e provocam erros de leitura do RNAm (MURRAY et al. 2000).

Lima et al. (2009) usaram G-MRS com concentração de gentamicina de 0,003% e não obtiveram crescimento de colônias de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus* (cultura comercial mista) em nenhuma das condições de incubação (aerobiose/anaerobiose, 37°C / 42°C), mas observaram desenvolvimento de colônias de *B. animalis* Bb12 em anaerobiose nas duas temperaturas analisadas.

Quanto ao uso de dicloxacilina na elaboração de meio seletivo, a presença deste na concentração de 2µg/mL em MRS inibiu o crescimento de bactérias de iogurte e não alterou a capacidade de bifidobactéria crescer neste meio (LIMA et al., 2009). Sozzi et al. (1990) também recomendaram a adição de 2µg/mL dicloxacilina para inibir as principais linhagens de *Lactobacillus* e *Streptococcus* presentes em leites fermentados. Sendo que esta concentração utilizada do antibiótico foi testada em 35 linhagens de bifidobacterias, provando não ser inibitória para as mesmas.

Dicloxacilina pertence ao grupo das penicilinas resistentes a penicilinases que atuam na parede celular de bactérias provocando sua lise. Sua ação é semelhante as penicilinas naturais que são ativas contra a maioria de estreptococos e anaeróbios Gram positivo (MURRAY et al. 2000).

Bernal (2004) para avaliar a potencialidade de meios de cultura na contagem de bifidobactéria e lactobacilos calculou a porcentagem de recuperação relacionando o número de células contadas no meio teste em relação às contadas em meio MRS, como descrito a seguir:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{Contagem (UFC/mL) no meio em estudo}}{\text{Contagem (UFC/mL) em agar MRS}} \times 100$$

Em muitos casos, a diferenciação entre as espécies baseia-se fortemente em diferenças na morfologia da colônia, que nem sempre é uma característica fenotípica estável para identificar e quantificar os organismos probióticos em um produto. Por esta razão, os meios de isolamento, com propriedades verdadeiramente seletivas são preferenciais para a enumeração seletiva em uma base rotineira (CASTEELE et al., 2006).

A Federação Internacional de Laticínios publicou um regulamento (ISSO 29981/IDF 220:2010) para enumeração seletiva de bifidobactéria em produtos lácteos. A seletividade seria alcançada pela adição de antimicrobiano, mupirocina ao meio de cultura, promovendo a inibição das bactérias iniciadoras do iogurte (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* e *L. bulgaricus*) e mesofílicas (*L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus*). Devido ao elevado custo do antimicrobiano e a impossibilidade de generalizar para todas as linhagens de probióticos e culturas iniciadoras utilizadas, esta metodologia tornou-se inviável.

CAPÍTULO I

ENUMERAÇÃO SELETIVA DE *BIFIDOBACTERIUM* SPP. NA PRESENÇA DE CULTURA INICIADORA

RESUMO

Para monitorar a concentração de probióticos viáveis em alimentos durante a vida de prateleira, métodos simples e de baixo custo são desejáveis. Buscou-se avaliar a capacidade dos meios de cultura Gentamicina-MRS, Dicloxacilina-MRS, Bile-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS e LP-MRS para enumeração seletiva de diferentes linhagens de bifidobactérias na presença de culturas iniciadoras comerciais (L-812 e Harmony 1.0 - Christian Hansen) compostas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Buscou-se o meio que permitiria boa recuperação de células das linhagens probióticas, quando comparados ao meio padrão (MRS) e que inibisse o crescimento das culturas iniciadoras. Utilizou-se a técnica de plaqueamento em superfície e as placas incubadas em anaerobiose, 37°C por 72h. O meio D-MRS inibiu todas as culturas testadas, sendo o único capaz de inibir a cultura iniciadora Harmony 1.0. O meio NNLP-MRS foi estatisticamente diferente do padrão ($p < 0,05$) para as quatro linhagens de bifidobactéria e não restringiu o crescimento das culturas iniciadoras. Maltose e LP-MRS não apresentaram nenhuma seletividade. Já os meios G-MRS e Bile-MRS inibiram significativamente ($p < 0,05$) a cultura iniciadora L-812 com reduções nas contagens de 3,49 e 3,85 ciclos logarítmicos, respectivamente. Porém, Bile-MRS garantiu melhor recuperação ($> 94\%$) para todas as linhagens de bifidobactéria, ao contrário de G-MRS que permitiu recuperação apenas de 45,4% de *B. breve* 110^{1A} e 90% de *B. pseudolongum* 119^{1A}. Nenhum dos meios testados foram seletivos para *Bifidobacterium* spp., pois todos permitiram o crescimento das culturas iniciadoras testadas, mas Bile-MRS pôde ser usado para enumeração de bifidobactéria na presença das linhagens que constituem a cultura iniciadora L-812, pois colônias desta só eram observadas em diluições $\leq 10^{-3}$. Não se deve esperar, contudo que os meios seletivos ou diferenciais funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse nas condições utilizadas.

Palavras chave: *Bifidobacterium* spp., meio de cultura, enumeração seletiva

ABSTRACT

Simple and cheap methods are desirable to monitor viable probiotics concentration in foods during shelf-life. Culture media (Gentamicina-MRS, Dicloxacilina-MRS, Bile-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS and LP-MRS) have been evaluated for ability to selective enumeration of different bifidobacteria strains in presence of commercial starter cultures (Harmony 1.0 and L-812), consisting in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. The medium should provide good cell recovery of probiotics strains, similarly standard medium (MRS), and inhibit starter cultures growth. Enumeration was carried out using spread plate technique; plates were incubated anaerobically at 37°C for 72h. D-MRS medium inhibited all cultures and was the only capable of inhibiting starter culture Harmony 1.0. Medium NNLP-MRS demonstrated statistical difference from standard ($p < 0,05$) for all bifidobacteria strains and has not restricted starter cultures growth. Maltose and LP-MRS showed no selectivity. Starter culture concentration L-812 dropped to 3.49 and 3.85 log cycles in G-MRS and Bile-MRS medium, respectively. However, Bile-MRS showed better recovery (>94%) for all bifidobacterias strains than G-MRS, which recovered only 45.5% of *B. breve* 110^{1A} and 90% of *B. pseudolongum* 119^{1A}. None of the tested media presented selectivity for *Bifidobacterium* spp., since starter cultures grew in all of them. But Bile-MRS could be used for bifidobacteria enumeration with strains of starter culture L-812, since colonies could be seen at low dilutions ($< 10^{-3}$). One should not expect effectiveness from selective media in all situations. Medium choice has to consider case to case the strains of each species of interest.

Keywords: *Bifidobacterium* spp., culture media, selective enumeration

1. INTRODUÇÃO

A definição de probióticos reconhece a capacidade de micro-organismos vivos exercerem efeito benéfico sobre a saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002). A partir do momento em que são incorporados a um alimento, o controle microbiológico da sua viabilidade celular deve ser usado para acompanhar sua funcionalidade (VINDEROLA et al. 2011).

Um fator a considerar na avaliação de produtos probióticos é o fato de que as evidências não demonstram, claramente, a colonização do intestino pelas bifidobactérias administradas oralmente. Nesse caso, para que os benefícios de longo prazo à saúde possam ocorrer, faz-se necessário uma ingestão contínua destes probióticos na dieta, através de alimentos ou suplementos alimentares. Vinderola & Reinheimer (2000), afirmam que, dependendo da linhagem empregada e do efeito benéfico desejado, um consumo de bactérias probióticas entre 10^8 e 10^{11} UFC/dia é o recomendável.

Um importante parâmetro na monitoração da viabilidade dos organismos nos produtos comercializados é a habilidade de contar bactérias probióticas. A enumeração das mesmas torna-se difícil devido a presença de vários outros tipos de microrganismos no produto (ANTUNES, 2007).

Diante da necessidade de determinação de *Bifidobacterium* spp. na presença de culturas iniciadoras, muitos meios de cultivo têm sido propostos. Entretanto, nenhum meio apresenta resultados que possam ser generalizados quando a enumeração seletiva ou diferencial de *Bifidobacterium* spp. for necessária. A seletividade do meio de cultura vai depender do tipo das linhagens da iniciadora e de bifidobactéria, além da matriz alimentar.

Assim como descrito na literatura, no momento em que se pretende aplicar uma metodologia que sugere um meio seletivo em um estudo com probióticos, é necessário verificar sua seletividade. Por isso neste estudo avaliou-se a seletividade dos meios de cultivo Gentamicina-MRS, Dicloxacilina-MRS, Bile-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS e LP-MRS para enumerar *Bifidobacterium* spp. na presença de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* das culturas iniciadoras comerciais L-812 e Harmony 1.0, usando como meio de controle o MRS puro.

No entanto, não é possível recorrer a um protocolo único e oficial válido para contagem seletiva de todas as linhagens atualmente utilizadas em alimentos

probióticos. Isto é devido principalmente à resposta linhagem-específica para diferentes meios de cultura (VINDEROLA et al., 2011).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Culturas

Foram utilizadas culturas puras de *Bifidobacterium* spp. (*B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}), cedidas pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG. As linhagens foram isoladas de fezes de crianças saudáveis e identificadas por testes morfotintoriais, respiratórios e bioquímicos, seguidos de PCR-Multiplex. As culturas foram fornecidas em caldo-MRS contendo 10⁹ UFC.mL⁻¹ e congeladas a -80°C.

Foram utilizadas as culturas lácteas comerciais YF-L812 e Harmony 1.0 (DVS – Christian Hansen Lab., Horsholm, Denmark) compostas de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

2.2 Preparo e manutenção dos inóculos

Para os testes de seleção de meio de cultura, as linhagens de *Bifidobacterium* spp. armazenadas em freezer a -80°C foram ativadas adicionando 1mL da solução estoque descongelada em 10mL de caldo MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) regenerado. O caldo inoculado foi incubado a 37°C/24h e após este período 1mL do caldo crescido foi inoculado em 10mL de caldo MRS regenerado e mantidos por mais 24h a 37°C. Os tubos de ensaio foram incubados em aerobiose, mantendo espaço superior mínimo nos mesmos. Em seguida, foram feitas diluições seriadas dos cultivos e realizado o plaqueamento nos meios em estudo.

A cultura comercial é de uso direto e, seguindo a metodologia de Thamer & Penna (2006), foi dissolvida assepticamente em um litro de leite (12% m/v) tratado termicamente (100°C/25min) e resfriado a 5°C, para em seguida ser distribuída em frascos estéreis. Os frascos, com aproximadamente 15mL do inóculo, foram mantidos

em congelador, à temperatura de -18°C e, na ocasião de uso, foram descongelados e seguiu-se com as diluições seriadas.

2.3 Meios de cultura para contagem de *Bifidobacterium* spp.

Foi feita uma avaliação comparativa dos meios de cultura com o intuito de verificar aquele que permitiria um desenvolvimento do maior número de células viáveis possíveis de *Bifidobacterium* spp. e maior inibição das culturas iniciadoras. Os meios utilizados neste trabalho para isolar *Bifidobacterium* spp. na bebida láctea seguiram metodologia descrita na literatura conforme indicado na Tabela 1 deste capítulo. Todos os meios foram incubados a 37°C / 72h, em jarras de anaerobiose, usando gerador de anaerobiose comercial Anaerobac (Probac - Brasil).

Tabela 1: Referências bibliográficas dos meios e condições de cultivo das culturas de *Bifidobacterium* spp.

Meio de Cultura	Referência
Gentamicina-MRS	Adaptado de Lima et al. (2009)
Dicloxacilina-MRS	Adaptado de Lima et al. (2009); Sozzi et al. (1990)
Bile-MRS	Adaptado de Viderola & Reinheimer (1999); Lima et al. (2009)
NNLP-MRS	Matin & Chou (1992) citados por Vinderola & Reinheimer (1999)
Maltose-MRS	Rybka & Kailasapathy (1996); Lima et al. (2009)
LP-MRS	Lapierre et al. (1992) adaptado por Castele et al. (2006)

Foi verificado o comportamento das quatro linhagens puras de *Bifidobacterium* spp. e das duas culturas iniciadoras, constituídas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, em cada meio de cultura. Foi procedida contagem total das culturas puras nos meios estudados e o resultado expresso em Log UFC.mL^{-1} .

2.4 Preparo dos meios de cultura

Gentamicina – MRS: ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi esterilizado à 121°C por 15 minutos e adicionado de Gentamicina (NeoQuímica, Goiás,

Brasil) na concentração de 0,002% (Adaptado de LIMA et al. 2009). A concentração de gentamicina foi determinada em testes preliminares (resultados não apresentados).

Dicloxacilina – MRS: ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi esterilizado à 121°C por 15 minutos. Ao meio foram adicionados dicloxacilina (Sigma, St. Louis, EUA) (0,25 µg/mL), cloreto de lítio (1,11g/L) e cisteína (0,5g/L), todos esterilizados em membrana de filtro de 0,22 µm (Millipore®, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) (Adaptado de Lima et al., 2009 e Sozzi, 1990).

Bile-MRS: Ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi esterilizado à 121°C por 15 minutos e suplementado com 0,5 g/L de sais de bile (Merck, Darmstadt, Germany), esterilizado com membrana de filtração de 0,22µm e adicionado de 1% de cisteína 10% (Synth, LabSynth, Diadema, Brasil) (VINDEROLA & REINHEIMER 99; LIMA et al., 2009). Testes preliminares indicaram a concentração de 0,5g/L de sais biliares como o ideal para garantir boa recuperação de células de *Bifidobacterium* spp. e inibição de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em cultura comercial.

NNLP-MRS: Ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi esterilizado à 121°C por 15 minutos. Os agentes inibidores (cloreto de lítio 0,015%, ácido nalidíxico (Sigma) 0,075%, sulfato de neomicina 0,0005% (Sigma) e sulfato de paromomicina (Sigma) 0,001% foram dissolvidos em água destilada (aproximadamente 4 % do volume total do ágar). Previamente, ácido nalidíxico foi dissolvido em metade da quantidade de água e acrescentado NaOH 0,1mol/L em gotas até dissolvê-lo. Este foi incorporado ao restante de água com os demais reagentes e esterilizados por filtração, em membrana com poro de 0,22µm de diâmetro (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999).

Maltose-MRS: Os ingredientes para a composição normal do ágar MRS, com exceção do ágar e da glicose, foram suspensos em 1 litro de água destilada e o pH ajustado para 6,6. Após o ajuste do pH, foram adicionados 10g de ágar e a mistura esterilizada em autoclave à 121°C por 15 minutos. Para a preparação da solução de maltose, 25g de maltose (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram dissolvidos em 50mL de água destilada. A solução foi esterilizada em filtro 0,45 µm (Millipore®). Quatro mL da solução de maltose foram adicionados em 100 mL de ágar base à temperatura de aproximadamente 50°C. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada, sem agitação excessiva, para evitar incorporação de ar (DAVE & SHAH 1996; LIMA et al. 2009).

LP-MRS: Ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi usado como meio base e acrescido de compostos inibitórios, sendo 0,002 g/mL de cloreto de lítio (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,003 g/mL de propionato de sódio (Sigma)

(LAPIERRE et al., 1992). O meio foi esterilizado à 121°C por 15 minutos e adicionado de 0,1% (p/v) de cisteína estéril por filtração (CASTEELE et al., 2006).

2.5 Avaliação dos diferentes meios de cultura

De cada amostra das culturas probióticas ativadas foram feitas diluições decimais em água peptonada a 0,1% (p/v). Determinou-se em testes prévios as diluições que permitiriam a contagem das colônias. A partir das diluições selecionadas, 0,1mL foi transferido para a superfície de placas de Petri, contendo os diferentes meios testados, pelo método de plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, seguindo temperatura e tempo de incubação indicado pela literatura, como citado acima na Tabela 1 deste capítulo.

Ágar MRS (Acumedia, Lansing, Michigan, USA) foi usado como padrão para comparar a recuperação de células nos meios seletivos testados. A precisão dos métodos foi determinada pela comparação entre a contagem de bactérias obtidas nos meios seletivos e de referência. Após transformação logarítmica dos resultados para normalizar a distribuição, as contagens obtidas em ambos os meios foram comparadas. A pureza das culturas nas placas foi monitorada através de coloração de Gram e observação da morfologia celular em microscópio (Olympus CBA, Melville, USA) com objetiva de imersão (aumento 100x).

2.6 Análise estatística

Os testes com cada meio de cultura foram repetidos três vezes, sendo que em cada repetição foram feitas placas em duplicata de duas diluições distintas. Placas contendo 25 a 250 colônias foram enumeradas e o resultado expresso em log UFC.mL⁻¹.

Foi feito o teste de comparação de médias de Dunett ($p < 0,05$) para verificar diferença no crescimento dos micro-organismos nos ágares estudados em comparação com o ágar padrão MRS.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 deste capítulo detalha as contagens (log UFC.mL⁻¹) microbiológicas de cada cultura probiótica nos diversos meios estudados.

Tabela 2: Contagens (log UFC.mL⁻¹) das linhagens de *Bifidobacterium* spp. e culturas iniciadoras nos diversos meios estudados

	MRS	G-MRS	D-MRS	BILE-MRS	NNLP-MRS	MALTOSE-MRS	LP-MRS
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	8,35 ± 0,72 ^a	7,95 ± 0,99 ^a	0 ± 0,00 ^b	8,38 ± 0,51 ^a	0 ± 0,00 ^b	8,72 ± 0,20 ^a	8,99 ± 0,49 ^a
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	8,41 ± 0,38 ^a	8,41 ± 0,04 ^a	2,5 ± 3,54 ^b	7,92 ± 0,45 ^a	0 ± 0,00 ^c	8,46 ± 0,29 ^a	8,39 ± 0,19 ^a
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	8,42 ± 0,30 ^a	3,83 ± 3,68 ^b	0 ± 0,00 ^c	8,38 ± 0,73 ^a	2,66 ± 3,76 ^b	8,92 ± 0,48 ^a	8,95 ± 0,51 ^a
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	8,49 ± 0,40 ^a	7,66 ± 0,87 ^a	0 ± 0,00 ^b	8,31 ± 0,21 ^a	0 ± 0,00 ^b	8,42 ± 0,63 ^a	8,54 ± 0,32 ^a
YF L-812	8,38 ± 0,75 ^a	4,89 ± 0,61 ^b	0 ± 0,00 ^c	4,53 ± 0,69 ^b	7,82 ± 0,61 ^a	7,58 ± 1,12 ^a	8,22 ± 0,39 ^a
YF Harmony 1.0	7,3 ± 0,22 ^a	6,14 ± 1,33 ^a	0 ± 0,00 ^b	5,85 ± 1,32 ^a	6,45 ± 0,73 ^a	6,91 ± 0,17 ^a	7,39 ± 0,18 ^a

^{a, b, c} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (*Dunnet* p<0,05).

O meio MRS utilizado como padrão garantiu contagens de bifidobactéria sempre acima de 8,0 Log UFC.mL⁻¹. Este é o meio de escolha para enumeração de bactérias ácido-lácticas e organismos probióticos em produtos lácteos, sendo efetivo quando bifidobactéria é o único micro-organismo presente (ASHRAF & SHAH, 2011). Dave e Shah (1996) mostraram excelente recuperação de bifidobactéria em ágar MRS. A seletividade deste meio pode ser melhorada pela adição de agentes específicos. Mais frequentemente os inibidores são utilizados em combinação com outros compostos para aumentar a especificidade para bifidobactéria e inibir o crescimento das bactérias ácido-lácticas.

Os meios de cultura G-MRS, Bile-MRS, Maltose-MRS e LP-MRS foram os que apresentaram melhores contagens de células quando comparados com o padrão MRS, sem diferença significativa (p<0,05). Exceto para *B. breve* 110^{1A}, que demonstrou ter seu crescimento inibido na presença de gentamicina, apresentando redução de 4,59 ciclos logarítmicos em sua contagem, comparada ao padrão.

As contagens de *Bifidobacterium* spp. foram significativamente diferentes do padrão MRS nos meios D-MRS e NNLP-MRS. Estes meios inibiram o crescimento das linhagens probióticas, principalmente para *B. longum* 5^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} que não apresentaram desenvolvimento de colônias em ambos os meios. Já *B. bifidum* 162^{2A} teve crescimento limitado em D-MRS, com redução de 5,91 ciclos logarítmicos e

em NNLP-MRS nenhuma colônia desta foi observada. Ao contrário, *B. breve* 110^{1A} não se desenvolveu em D-MRS e foi parcialmente inibido em NNLP-MRS, com contagens de 5,76 log menores que o padrão.

Assim como as linhagens probióticas, as linhagens de L-812 tiveram crescimento estatisticamente diferente do padrão no meio D-MRS, onde nenhum desenvolvimento de colônia foi observado. G-MRS e Bile-MRS também inibiram ($p < 0,05$) esta cultura com reduções nas contagens de 3,49 e 3,85 ciclos logarítmicos, respectivamente. Os demais meios foram semelhantes ao padrão, permitindo boa recuperação de células.

Por sua vez, as linhagens de Harmony 1.0 apresentaram diferença estatística do padrão MRS apenas no meio D-MRS, onde nenhuma colônia foi observada. Nenhum dos outros meios estudados foi capaz de inibir o crescimento desta cultura e ao mesmo tempo permitir boa recuperação das linhagens probióticas, fato que tornou esta cultura iniciadora inviável para o presente estudo.

Pode-se observar que o meio D-MRS, com a formulação utilizada neste trabalho não foi efetivo para contagem de culturas iniciadoras, compostas de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*, nem para *Bifidobacterium* spp., indicando que a proporção de dicloxacilina utilizada teve grande poder inibitório sobre as culturas estudadas.

NNLP-MRS permitiu o crescimento das culturas iniciadoras (L-812 e Harmony 1.0) sem nenhuma inibição no desenvolvimento das colônias, com contagens estatisticamente semelhantes aos padrões. Além disso, foi um meio que inibiu as linhagens probióticas, tornando-o inviável para este estudo que visa encontrar um meio seletivo para *Bifidobacterium* spp. e inibitório para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Maltose-MRS e LP-MRS garantiram ótima recuperação de células para as linhagens probióticas, mas por outro lado em nada inibiram o crescimento das culturas iniciadoras testadas. Mostrando que os agentes seletivos destes meios não foram eficazes para impedir o crescimento das linhagens das culturas comerciais L-812 e Harmony 1.0.

G-MRS apresentou boa recuperação de células (Figura 1) quando comparado ao padrão para as linhagens probióticas, exceto para *B. breve* 110^{1A}. Porém, não inibiu significativamente *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* presentes na cultura Harmony 1.0., mas inibiu parcialmente estes mesmos micro-organismos da cultura L-812, com redução de aproximadamente 3,5 ciclos logarítmicos, indicando que apesar de as culturas iniciadoras serem compostas pelas mesmas espécies, as linhagens são

diferentes. Considerando estes dados, G-MRS poderia ser utilizado para contagem de *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} na presença das linhagens que constituem a cultura L-812.

Como indicado na Tabela 2 a contagem de L-812 em G-MRS foi de $4,89 \pm 0,61$ log UFC.mL⁻¹ que representa 58% de recuperação de células (Figura 1) quando comparado ao ágar padrão. Baixas contagens indicam aparecimento de colônias em baixas diluições, neste caso nas diluições $<10^{-4}$. Ou seja, G-MRS só seria efetivo para contar colônias de *Bifidobacterium* spp. em diluições $\geq 10^{-4}$. Só será possível contar as bactérias probióticas se estas estiverem em altas concentrações.

Outro meio que apresentou características semelhantes ao G-MRS foi o Bile-MRS, que não mostrou diferença estatística do MRS padrão para as culturas probióticas, inibiu parcialmente L-812 e, assim como os demais meios, não foi capaz de inibir o crescimento de Harmony 1.0. No entanto, Bile-MRS demonstrou menor capacidade de recuperação de células da cultura L-812, 54% como apresentado na Figura 1, o que favoreceria a enumeração de *Bifidobacterium* spp. na presença desta cultura comercial.

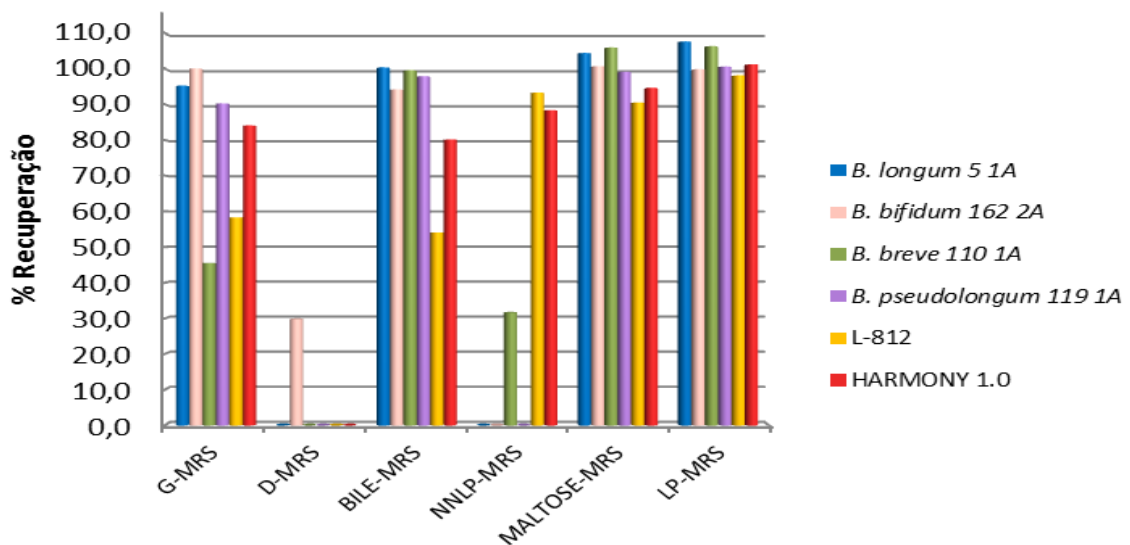


Figura 1: Porcentagem de recuperação de células das linhagens de bifidobactérias e das culturas iniciadoras nos diferentes meios de cultura estudados em relação ao padrão MRS.

Ambos os meios, G-MRS e Bile-MRS, apresentaram comportamento semelhante quanto à inibição parcial de L-812; porém, Bile-MRS por ter demonstrado menor recuperação de células de L-812 e melhor capacidade de recuperação de células (>94%) para todas as linhagens probióticas, como pode ser visto na Figura 1, foi o

meio escolhido para enumeração de *Bifidobacterium* spp. na presença da cultura iniciadora L-812 deste estudo. Assim como ressaltado para G-MRS, a enumeração de bifidobactéria em Bile-MRS foi possível em diluições $\geq 10^{-3}$, pois abaixo destas já se observava colônias da cultura iniciadora.

Em sua revisão, Roy (2001) ressaltava que em muitos casos a enumeração de bifidobactéria em baixas diluições está sujeita a interferência de colônias puntiformes de *S. thermophilus* e que geralmente os meios seletivos para bifidobactérias controlam o crescimento de bactérias ácido-lácticas em diluições maiores que 10^{-5} .

Há preocupação de que alguns meios que contêm sais biliares ou antimicrobianos possam restringir o crescimento de *Bifidobacterium* spp. e que as contagens obtidas não sejam representativas do número real de células viáveis presentes no produto (ASHRAF & SHAH, 2011). Dave & Shah (1996) encontraram baixa recuperação de *Bifidobacterium* spp. em Bile-MRS, para concentrações de 2g/L de sais biliares e não observaram crescimento de *L. bulgaricus* neste meio. No presente estudo, porém, a concentração de sais biliares foi reduzida (0,5g/L) e garantiu bom crescimento de bifidobactéria sem diferença estatística com o padrão. Sais biliares são usados para inibir o crescimento de micro-organismos não intestinais (DAVE & SHAH, 1996; VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

Ashraf & Shah (2011) afirmam que bifidobactérias crescem bem em NNLP-MRS, e que este é usualmente utilizado como meio de referência para isolamento destas culturas em produtos lácteos. Sulfato de neomicina e ácido nalidíxico são agentes seletivos para inibir o crescimento de bastonetes Gram positivo e Gram negativo, respectivamente. Cloreto de lítio é uma substância comumente usada em microbiologia; porém seu mecanismo de ação sobre as células bacterianas ainda é pouco conhecido (ROY, 2001). Shah (2000) sugeriu que baixas concentrações de cloreto de lítio impedem o crescimento de culturas iniciadoras de iogurtes e queijo.

Vinderola & Reinheimer (1999) linhagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram capazes de se desenvolver em baixas concentrações em ágar NNLP-MRS. No presente estudo, altas contagens destes micro-organismos foram observadas neste ágar. Dave & Shah (1996) obtiveram bom desempenho do ágar NNLP-MRS para a contagem de *Bifidobacterium* spp. em iogurte e usaram este ágar para a contagem de *Bifidobacterium* em um trabalho posterior.

Ravula & Shah (1998) encontraram pobre recuperação de *B. pseudolongum* e *B. adolescentis* em NNLP-MRS sugerindo testes com culturas puras de bifidobactéria neste meio antes de utilizá-lo para enumeração na presença de culturas de iogurte.

Van de Castele et al. (2006) indicaram NNLP-MRS e LP-MRS para enumeração seletiva de *Bifidobacterium* em iogurtes e queijo em combinação com culturas iniciadoras.

No que diz respeito à resistência a antimicrobianos, Tharmaraj & Shah (2003) afirmam que espécies do gênero *Bifidobacterium* spp. são relativamente resistentes à gentamicina, ácido nalidíxico e neomicina. Neste estudo, foi possível confirmar a relativa resistência de bifidobactéria a gentamicina; porém se apresentaram muito sensíveis aos componentes seletivos de NNLP-MRS.

No meio Maltose-MRS, tanto *Bifidobacterium* spp. quanto culturas iniciadoras mostraram altas contagens de células. Rybka & Kailasapathy (1996) relataram que algumas linhagens de *L. bulgaricus* podem fermentar a maltose e, além disso, a presença de outros substratos no meio, como o extrato de carne, pode favorecer o desenvolvimento desta espécie. Por outro lado, Lima et al. (2009) não observaram crescimento de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus* (cultura comercial mista) neste meio. Dave & Shah (1996) relatam excelente recuperação de células de *Bifidobacterium* spp. (*B. bifidum* 1900 e 1901, *B. longum* 1941 e 20097, *B. adolescentis* 1920, *B. pseudolongum* 20099, *B. breve* 1930 e *B. infantis* 1912) neste ágar, assim como observado neste trabalho. Porém os autores não observaram crescimento das bactérias do iogurte, o que não retrata o encontrado no presente estudo.

Zacarchenco (2003) também não identificou o meio M-MRS como seletivo para bifidobactéria, tendo sido observado crescimento de *S. thermophilus* no mesmo.

Sozzi et al. 1990, examinando a atividade de antimicrobiano para testes de isolamento e contagem de bifidobactérias (35 espécies) em produtos fermentados identificaram a menor concentração mínima inibitória de dicloxacilina para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (1,5µg/mL) quando comparado com bifidobactéria (3,0 µg/mL), o que tornou este antimicrobiano viável para os testes pretendidos pelos autores.

Lima et al. (2009) compararam a capacidade de crescimento de culturas probióticas e não-probióticas em vinte e um meios e indicaram Dicloxacilina-MRS (ABC-MRS, correspondente a mesma formulação do meio D-MRS deste estudo) como a melhor formulação para contagem de *B. animalis*, sem desenvolvimento de *S.*

thermophilus ou *L. bulgaricus* da cultura comercial mista. Os autores adicionaram altas concentrações de dicloxacilina (2 µg/mL) e incubação a 42°C, enquanto no presente estudo a quantidade foi bem menor, 0,25µg/mL e incubação a 37°C e inibiu drasticamente todas as culturas. De acordo com Murray et al. (2000), dicloxacilina é ativa contra estreptococos e anaeróbios Gram positivo, agindo na célula através de lise da parede celular, o que pode explicar os resultados encontrados neste trabalho.

O meio Dicloxacilina-MRS é utilizado pela Christian Hansen (2007) para contagem de *Bifidobacterium* BB-12 em leites fermentados, sendo a concentração do antimicrobiano de 0,5µg/mL. A empresa reconhece a limitação do método de que algumas linhagens de *S. thermophilus* podem crescer no meio e indica a necessidade de verificar por microscopia a identidade da colônia.

Lima et al. (2009) usaram G-MRS com concentração de gentamicina de 0,003% e não obtiveram crescimento de colônias de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus* (cultura comercial mista) em nenhuma das condições de incubação (aerobiose/anaerobiose, 37°C / 42°C), mas observou desenvolvimento de colônias de *B. animalis* Bb12 em anaerobiose nas duas temperaturas analisadas. No presente trabalho, usou-se gentamicina na concentração de 0,002% que inibiu o crescimento de *B. breve* 110^{1A}, demonstrando que a sensibilidade a este antimicrobiano pode ser linhagem específica. Já as linhagens das culturas iniciadoras não foram inibidas (Harmony 1.0) ou apenas parcialmente inibidas (L-812) com esta concentração do antimicrobiano.

A resistência de bifidobactérias a gentamicina pode ser explicada pela inibição do transporte do antimicrobiano na célula bacteriana, já que a entrada desta droga na célula é O₂ dependente. Isso explica a resistência natural das bactérias anaeróbias estritas a este antimicrobiano (MURRAY et al. 2000). Ammor et al. 2007, ressaltam ainda que o baixo valor de pH do meio MRS (pH 6,2± 0,2) pode diminuir a atividade de alguns antimicrobianos como os aminoglicosídeos, grupo do qual a gentamicina faz parte. Isso pode ter influenciado na resistência das bactérias ácido-lácticas a este antimicrobiano, visto que estas tiveram crescimento pouco inibido no meio gentamicina-MRS.

Payne et al. (1999) obtiveram baixa porcentagem de recuperação (<1%) de *B. longum* em LP-MRS ao variar a técnica de plaqueamento (superfície ou *pour plate*) ou a temperatura de incubação (37°C ou 40°C) e também de *B. adolescentis* (57%), mas obteve maior porcentagem para *B. bifidum* (121,8%) a 37°C com plaqueamento em superfície neste meio. Além disso, obtiveram significativa recuperação de células da

cultura de iogurte, concluindo que LP-MRS não é um meio adequado para enumeração das linhagens probióticas por eles estudadas. Em Lima et al. (2009), nenhuma contagem de *S. thermophilus* ou *L. bulgaricus* (cultura comercial mista) em LP-MRS foi obtida nas condições de incubação estudadas (aerobiose/anaerobiose, 37°C / 42°C), mas teve bom desenvolvimento de colônias de *B. animalis* Bb12.

Zacarchenco (2003) obteve crescimento de *S. thermophilus* utilizando a mesma formulação de LP-MRS deste estudo. Duplicando a proporção de cloreto de lítio e propionato de sódio a autora demonstrou inibição deste micro-organismo inclusive em baixas diluições. As concentrações dos agentes inibitórios de LP-MRS propostas pela autora foram testadas no presente estudo, no entanto, inibiram completamente as linhagens de *Bifidobacterium* spp. e permitiram alta porcentagem de recuperação de células para a cultura Harmony 1.0 em testes preliminares (dados não apresentados).

Cisteína é considerada como fonte de nitrogênio, essencial para bifidobactéria, com função adicional de melhorar as condições anaeróbias do meio de cultura por reduzir o potencial redox (PAYNE et al. 1999). No entanto, o efeito de cisteína sobre o crescimento de *B. animalis* Bb12 em placas incubadas em aerobiose não foi evidenciado por Lima et al., (2009), indicando que a presença de cisteína não substitui a incubação em anaerobiose.

Payne et al. (1999) estudaram a recuperação de células em MRS modificado (adição de L-cisteína HCl) utilizando dois métodos de plaqueamento e obtiveram melhor porcentagem de recuperação, 117%, 59% e 92%, respectivamente para *B. bifidum*, *B. longum* e *B. adolescentis*, com plaqueamento em superfície.

Em Lima et al. (2009), a presença de sais biliares nas concentrações de 1,5g/L e 0,2g/L (adicionado de 0,5g/L de cisteína) inibiram o crescimento de bactérias de iogurte. Vinderola et al. (2000), estudando a sobrevivência da microbiota probiótica de iogurtes na Argentina, relataram que ao usar o ágar Bile-MRS na enumeração de *L. acidophilus* era necessária a incubação em aerobiose, a fim de restringir o crescimento de *Bifidobacterium*. Ou seja, este meio também pode ser utilizado para enumerar bifidobactéria em anaerobiose em produtos lácteos na ausência de *L. acidophilus*.

Bactérias ácido-lácticas têm necessidade de crescer em meio tamponado, exigindo pH acima de 5,7 (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999). Todos os meios usados no presente trabalho apresentaram pH final entre 6,0 e 6,6.

Nenhum dos meios testados foi seletivo para *Bifidobacterium* spp., pois todos permitiram o crescimento das culturas iniciadoras, exceto para D-MRS que foi inibitório para o desenvolvimento de todas as culturas.

A escolha final do meio e do método deve considerar o tipo de alimento, as espécies ou linhagens a se enumerar, bem como a natureza dos gêneros competidores. Assim, não se deve esperar, segundo Shah (2000), Roy (2001) e Lourens-Hattingh & Viljoen (2001) que os meios seletivos ou diferenciais funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse na situação.

4. CONCLUSÕES

Os meios Dicloxacilina-MRS, NNLP-MRS, Maltose-MRS e LP-MRS mostraram-se inadequados para contagem seletiva das linhagens de bifidobactérias na presença das culturas iniciadoras de iogurte (Harmony 1.0 e L-812).

Os meios Gentamicina-MRS e Bile-MRS foram os únicos capazes de inibir o crescimento da cultura iniciadora L-812, mesmo que parcialmente e, ao mesmo tempo, permitir boa recuperação de células das linhagens de bifidobactérias.

Considerando que o meio Bile-MRS foi o que melhor inibiu as linhagens que compõem a cultura L-812, foi o escolhido para prosseguir os experimentos.

Não se deve esperar, contudo que os meios testados neste trabalho funcionem em todas as situações. Eles devem ser avaliados para as linhagens de cada espécie de interesse.

CAPÍTULO II

VIDA DE PRATELEIRA DE BEBIDAS LÁCTEAS
FERMENTADAS COM SORO LÁCTEO NANOFILTRADO E
ADICIONADAS DE DIFERENTES LINHAGENS DE
BIFIDOBACTÉRIAS

RESUMO

A capacidade de probióticos exercerem efeito benéfico sobre a saúde do consumidor é obtida quando eles permanecem viáveis numa matriz alimentar. Foram produzidas bebidas lácteas com soro nanofiltrado, fermentadas com cultura láctica comercial L-812 (Christian Hansen) adicionadas de *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}. Durante o armazenamento (5°C, 28 dias) foram monitoradas a viabilidade das linhagens, o perfil de pH, a acidez e a sinérese. Na vida de prateleira houve redução significativa do pH somente na primeira semana, passando de 4,8 (tempo 0) para 4,21 (sete dias). A acidez aumentou apenas na bebida adicionada de *B. pseudolongum* 119^{1A} até o 14º dia e manteve-se estável até o 28º. Houve redução média de 6,05% nos índices de sinérese das quatro bebidas. A contagem de bactérias ácido-lácticas totais permaneceu acima de 8,0 log UFC.mL⁻¹ durante todo período de armazenamento, para as quatro bebidas analisadas, atendendo a legislação. Aumento significativo das mesmas foi observado entre o 1º e 7º dias nas bebidas com *B. bifidum* 162^{2A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}, o que pode explicar o aumento de acidez na bebida com *B. pseudolongum* 119^{1A}. Quanto à viabilidade de *Bifidobacterium* spp, até o 7º dia de armazenamento, apenas *B. breve* 110^{1A} se encontrava com contagens >6,0 log UFC.mL⁻¹, permitindo caracterizar esta bebida como funcional. Neste mesmo período, as formulações adicionadas das demais linhagens de bifidobactéria já se encontravam com contagens inferiores a 6,0 log UFC.mL⁻¹. As bebidas lácteas apresentaram boa estabilidade durante o armazenamento, no entanto, a cultura láctica utilizada pode ter influenciado diretamente na sobrevivência das espécies de *Bifidobacterium* spp., pois *Lactobacillus bulgaricus*, presente nesta cultura, é capaz de crescer lentamente em baixas temperaturas levando a pós acidificação da bebida. Assim, outras variáveis devem ser exploradas a fim de encontrar uma matriz alimentar em que as linhagens se mantenham viáveis.

Palavras-chave: bebida láctea, *Bifidobacterium* spp., viabilidade, vida de prateleira

ABSTRACT

Probiotics benefit consumer's health as far as it stays viable in food matrix. Fermented lactic beverages have been produced with concentrated cheese whey by nanofiltration and commercial starter culture YF-L812 (Christian Hansen), added with *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} and *B. pseudolongum* 119^{1A}. During storage (5°C, 28 days) have been monitored the viability of the *Bifidobacterium* strain, starter culture and acidity, pH and syneresis. During shelf-life, pH lowered significantly in the first week only, dropping from 4.8 (time 0) to 4.21 (7 days). Only the beverage added with *B. pseudolongum* 119^{1A} had acidity increased on the 14th day, remaining stable until the 28th day. Syneresis has lowered 6.05% for the four lactic beverages. Lactic acid bacteria counting remained above 8.0 Log CFU.mL⁻¹ over time and significant increase between the 1th and the 7th days in the beverages added with *B. bifidum* 162^{2A} and *B. pseudolongum* 119^{1A}, explaining the increased acidity in the beverage added with *B. pseudolongum* 119^{1A}. Just *B. breve* 110^{1A} stayed viable for 7 days; counting remained above 6,0 log UFC.mL⁻¹, allowing its probiotic beverage characterization until one week later. The remaining strains stayed below 6.0 log UFC.mL⁻¹, in the same period. The lactic beverage showed good storage stability, although the starter culture may have influenced the viability of the probiotic, which is little tolerant to acid media. *L. bulgaricus*, also present in the culture, grows in low temperatures causing beverage post-acidification. Therefore, other variables are to be explored in order to find a food matrix to keep *Bifidobacterium* strain viable.

Keywords: Lactic beverage, *Bifidobacterium* spp., viability, shelf life

1. INTRODUÇÃO

A busca por produtos saudáveis não é recente, mas talvez nunca se tenha investido tanto na divulgação de alimentos funcionais como nos últimos anos. Produtos fermentados a base de leite são considerados alternativas para os consumidores que buscam estilo de vida saudável, considerados de alto valor nutritivo (TEBALDI, 2005).

Probióticos são comumente adicionados em produtos fermentados. *Bifidobacterium* spp. é uma espécie probiótica muito utilizada neste tipo de alimento para consumo humano devido aos benefícios significativos para a saúde associados à ingestão da mesma (ROSS, 2005).

Porém, o sucesso da adição de culturas probióticas é dependente das espécies e linhagens usadas, das interações metabólicas com bactérias lácticas, das condições de fermentação, do pH do produto, da presença de oxigênio e da temperatura de estocagem (VINDEROLA et al., 2000).

Há necessidade de observar se os bio-produtos fermentados contêm número mínimo satisfatório de células ativas no momento do consumo de, pelo menos, 10^6 UFC.mL⁻¹ devido a dose mínima terapêutica diária ser de $10^8 - 10^9$ células viáveis em 100g do bio-produto fermentado (GOMES & MALCATA, 1999). A legislação brasileira fixa o limite mínimo em 10^6 UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2005).

A produção de bebida láctea probiótica vem ganhando um mercado muito grande, principalmente com o maior nível de informação sobre a importância do cálcio, a qualidade das proteínas, o papel dos componentes bioativos e das bactérias probióticas para a saúde. Além de ser um produto de baixo custo para o fabricante e para o consumidor.

A utilização de soro lácteo na elaboração de bebidas lácteas constitui uma forma racional de aproveitamento desse produto secundário que apresenta excelente valor nutritivo. O soro oriundo da produção de queijo representa um grande volume para os laticínios. Grande parte desse volume é destinada à alimentação animal ou à produção de derivados do soro como a ricota. Devido à sua composição, principalmente o teor de lactose, o soro lácteo causa um grande impacto ambiental, caso descartado sem tratamento, devido a sua elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). (ALMEIDA, et al., 2001).

Pode-se também agregar valor ao soro lácteo por meio da nanofiltração (NF), um tipo de separação por membranas, na qual os componentes do soro de maior

massa molar e que excedem o tamanho dos poros da membrana permanecem retidos denominando-se concentrado ou retentado, enquanto o que ultrapassa a membrana e que contém as moléculas menores é chamado de filtrado ou permeado (GEANKOPLIS, 2003).

O retentado de soro lácteo (RS) é um concentrado proteico de alto valor biológico e tem sido aplicado na elaboração de iogurtes, queijos e outros derivados lácteos, resultando em produtos diferenciados, de alto valor nutricional e funcional, considerados de grande aceitabilidade pelo consumidor (CASTRO & GERLA, 2005).

Neste contexto, o desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada, adicionada de culturas probióticas e soro lácteo nanofiltrado pode ser uma alternativa bastante inovadora para o aproveitamento do soro pelas indústrias lácteas, sem a necessidade de grandes investimentos ou de grandes mudanças na rotina de fabricação. Assim, as indústrias também diminuem o desperdício, a poluição ambiental, gerando novos recursos e, principalmente, melhoram o valor nutritivo deste produto.

Objetivou-se nesta parte do trabalho elaborar bebidas lácteas com adição de soro nanofiltrado de queijo, fermentadas com cultura láctea comercial e adicionadas de diferentes linhagens de bifidobactérias. Foi feita também a caracterização físico-química e microbiológica das bebidas produzidas, bem como a determinação da viabilidade das linhagens de bifidobactéria ao longo do armazenamento refrigerado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Biocatálise e de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG e 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 Elaboração das bebidas lácteas fermentadas

2.1.1 Matérias-primas

Foram empregados neste trabalho quatro lotes diferentes de leite em pó integral (Itambé, Belo Horizonte / MG) e de soro lácteo doce nanofiltrado (Laticínio Verde Campo, Lavras / MG). A membrana de nanofiltração empregada neste estudo é da marca KOCH, do tipo cartucho em espiral, de natureza orgânica composta de poliamida, limite de corte 200 Da, pressão de operação entre 200 a 400 psi e temperatura de operação entre 5 a 50°C.

Também, na elaboração das bebidas lácteas fermentadas, foi utilizado açúcar refinado adquirido do comércio local de Belo Horizonte, estabilizante Meyprogen JO 767 (Danisco) composto de amido modificado, goma guar e gelatina, cultivo lácteo comercial YF-L812 (DVS – Christian Hansen Lab., Horsholm, Denmark) composta de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e quatro espécies de *Bifidobacterium* spp. (*B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}), cedidas pelo Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG.

2.1.2 Controle de qualidade das matérias-primas

A determinação da qualidade físico-química e microbiológica dos lotes de leite em pó integral e soro concentrado de queijo tiveram como objetivo caracterizá-los e, conseqüentemente garantir o controle de qualidade da produção das bebidas lácteas fermentadas.

Foram feitas, em triplicata, as seguintes análises físico-químicas: determinações de pH, acidez titulável, gordura, proteína, lactose, extrato seco total e desengordurado, cinzas e cloretos. Além de medidas para controle de qualidade no recebimento das amostras de soro concentrado (densidade, grau Brix, amido, cloreto, água oxigenada e formol) (Brasil, 2006). Para o controle microbiológico, foram realizadas, em duplicata, as análises de contagem global de mesófilos aeróbios (UFC.mL⁻¹), pesquisas de coliformes totais e fecais (NMP.mL⁻¹), *Staphylococcus* coagulase (+) e *Salmonella* preconizados no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leite em pó (Brasil, 1996). Todos os procedimentos seguiram as metodologias contidas em Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (Brasil, 2003).

2.1.3 Elaboração da bebida láctea fermentada

Foram produzidos quatro lotes das bebidas lácteas fermentadas. A metodologia de fabricação das bebidas lácteas foi adaptada de Thamer & Pena, 2006 e Saccaro, 2008.

Leite em pó integral foi reconstituído a 12% (p/v) de sólidos totais e homogeneizado com auxílio de agitador magnético.

Foram utilizados estabilizante e açúcar nas concentrações de 0,5% (p/v) e 8% (p/v), respectivamente, em relação ao volume final de bebida. Inicialmente, o estabilizante foi incorporado em um terço da quantidade de açúcar, polvilhado no volume total de leite e deixado hidratar por 10 minutos, sob agitação, a aproximadamente 45°C. Por fim, o restante de açúcar foi incorporado à mistura. Esta mistura (leite, açúcar e estabilizante) foi aquecida a 83°C por 30 minutos em banho termostático.

O conteúdo de soro foi constante, sendo 50% em relação ao teor de leite. As amostras de soro lácteo concentrado ao chegarem ao laboratório foram analisadas quanto ao pH, acidez titulável e grau brix. Em seguida, foram submetidas a tratamento térmico de 65°C por 30 minutos.

A Tabela 1 apresenta a formulação da bebida láctea

Tabela 1: Formulação da bebida láctea

Componentes	Quantidade
Soro lácteo concentrado	50% (v/v)
Leite em pó integral reconstituído a 12% (p/v) de sólidos totais	50% (v/v)
Açúcar	8% (p/v)
Estabilizante	0,5% (p/v)

2.1.4 Preparo do inóculo

Foi utilizada a cultura iniciadora liofilizada comercial YF-L812 (DVS – Christian Hansen Lab., Horsholm, Denmark) contendo as bactérias termofílicas *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* com proporção variando entre 80 – 90% de *S. thermophilus* e 10 – 20% de *L. bulgaricus* (informação do fabricante). A cultura comercial é de uso direto e, seguindo a metodologia de Thamer e Penna (2006), foi dissolvida assepticamente em um litro de leite (12% m/v) previamente tratado a 100°C/25min e resfriado a 5°C, para em seguida ser distribuída em frascos estéreis. Os frascos foram mantidos em congelador, à temperatura de -18°C, e na ocasião de uso foi descongelado e a cultura inoculada diretamente na mistura dos ingredientes para iniciar a fermentação láctea. Utilizou-se a proporção de 2% (v/v) de inóculo na elaboração das bebidas.

2.1.5 Fermentação

A mistura (leite, soro, açúcar e estabilizante) foi transferida para frascos de Erlenmeyers previamente autoclavados (121°C/15 min) e inoculados com 2% (v/v) da cultura iniciadora, em condições assépticas e em seguida armazenados em estufa BOD a 40°C. A fermentação ocorreu até a mistura atingir o valor de pH próximo de 4,8, que correspondia a aproximadamente 5h de fermentação, obtendo-se coágulo de aspecto firme e sem dessora. Em seguida as bebidas foram transferidas para geladeira para resfriamento, visando interromper o processo fermentativo. Após resfriamento, as bebidas foram levadas para a câmara de fluxo laminar, na qual foi realizada a quebra do coágulo, movimentando-se os frascos manualmente. Em seguida, a bebida foi porcionada em frascos de 200mL para receber o inóculo contendo as diferentes linhagens de *Bifidobacterium* spp.

Foram produzidas quatro bebidas distintas com as diferentes linhagens da bactéria probiótica (*B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}).

2.1.6 Acondicionamento e armazenamento

As bebidas lácteas foram envasadas manualmente em frascos plásticos de polietileno de 200mL, compostos de resina de polietileno de alta densidade e armazenados a 5°C durante 28 dias.

2.1.7 Ativação da cultura probiótica

As linhagens de *Bifidobacterium* spp. utilizadas neste trabalho, *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}, foram isoladas e caracterizadas em estudos anteriores no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. As linhagens foram isoladas de fezes de crianças saudáveis e identificadas por testes morfotintoriais, respiratórios e bioquímicos, seguido de PCR-Multiplex, de acordo com Kwon et al. (2005). Foi testada a velocidade de crescimento de 124 linhagens por turbidimetria e as que apresentaram maior velocidade de crescimento foram submetidas ao teste de aerotolerância. Das linhagens estudadas, as que apresentaram os melhores resultados aos testes realizados foram as utilizadas no presente trabalho.

Das linhagens de *Bifidobacterium* spp., fornecidas em Eppendorf com caldo MRS contendo 10⁹ UFC.mL⁻¹, foram feitos estoques e mantidos no mesmo meio adicionado de 20% (v/v) de glicerol e armazenadas em freezer -80°C.

O preparo do inóculo das linhagens probióticas foi realizado segundo metodologia de Mazochi (2009), com adaptações. Antes de cada experimento, 100µL de cultura de *Bifidobacterium* spp. foram ativadas em 10mL de caldo MRS regenerado e incubadas a 37°C, em aerobiose por 24 horas. Após 24 horas, 2mL das culturas que apresentaram crescimento foram transferidos para 20mL de caldo MRS regenerado e novamente incubadas a 37°C, em aerobiose por 24 horas. Foi feita uma nova transferência após 24 horas de 3mL do caldo para frascos contendo 300mL de caldo MRS regenerado e incubadas a 37°C, em microaerofilia por 24 horas. Em todas as transferências, manteve-se espaço superior mínimo nos frascos.

Após este período, as culturas que apresentaram crescimento foram centrifugadas (Centrifuga refrigerada SIGMA 2K15, Osterode, Alemanha) por 10 minutos à 2792g. O sobrenadante foi descartado e à massa de células foram adicionadas 30mL de água destilada estéril regenerada e procedida uma nova centrifugação por 10 minutos à 2792g. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 3,0mL de leite estéril regenerado (12%p/v) constituindo o inóculo, obtendo-se uma concentração de *Bifidobacterium* spp. 10^{10} UFC.mL⁻¹. Por fim, 1,0mL do inóculo foi adicionado em frascos de 200mL contendo a bebida láctea fermentada, obtendo-se aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹.

2.1.8 Determinação da fase logarítmica das linhagens de *Bifidobacterium* spp.

Com o objetivo de identificar o final da fase logarítmica das linhagens de bifidobactérias e padronizar o número de células a serem inoculadas na bebida láctea fermentada, fez-se uma curva de crescimento a partir de um cultivo de 300mL de caldo MRS.

As linhagens passaram por duas ativações subsequentes em caldo-MRS antes de iniciar a determinação da densidade óptica (DO) e contagem de células (UFC.mL⁻¹). Na primeira ativação, 1000µL da cultura congelada a -80°C foram transferidos para 10mL de caldo-MRS regenerado, mantendo *head-space* mínimo no tubo, e mantido a 37°C/24h em aerobiose. Após incubação, 2000µL do caldo foram inoculados em 20mL de caldo MRS regenerado nas mesmas condições anteriores. Após 24 horas, fez-se a leitura da DO e calculou-se o volume (mL) necessário do inóculo para obter uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,1 em 300mL de meio de cultura. Uma alíquota foi retirada após a inoculação, tempo zero do ensaio, e determinou-se a absorbância a 600nm em espectrofotômetro UV-160A (FEMTO) e a contagem de células viáveis por plaqueamento em ágar MRS. As placas foram incubadas em anaerobiose por 72 horas a 37°C. O cultivo foi mantido em estufa a 37°C em aerobiose e o crescimento celular monitorado periodicamente em intervalos de 4 horas fazendo-se a leitura da absorbância e da contagem de células (UFC.mL⁻¹) até 48 horas de crescimento (adaptado de SOUZA et al., 2008).

2.1.9 Controle de qualidade das bebidas lácteas fermentadas

Foram realizadas análises físico-químicas para caracterização das bebidas lácteas. As análises foram realizadas logo após o término de fabricação das bebidas, não estando incluídas no estudo de vida de prateleira deste produto.

As determinações de extrato seco total e desengordurado, proteína, lipídeo, lactose, acidez titulável, cinzas e cloretos das bebidas lácteas foram feitas segundo metodologias oficiais descritas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2006). Para o controle microbiológico, fez-se a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes, utilizando o método do Número Mais Provável (NMP) (BRASIL, 2003). Essas análises foram realizadas nos 1º e 28º dias da vida de prateleira.

2.2 Estudo da vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas

Foi determinada a viabilidade das culturas probióticas e lácticas totais (cultura iniciadora) nas bebidas produzidas para verificação do atendimento a legislação (BRASIL, 2005; ANVISA, 2008), 24 horas após a fermentação e aos 7º, 14º, 21º e 28º dias de armazenamento. Foram também avaliados o pH, acidez titulável e sinérese durante a vida de prateleira das bebidas lácteas.

2.2.1 Viabilidade das culturas iniciadora e de bifidobactéria

Para a contagem dos micro-organismos presentes na cultura, iniciadora utilizou-se o meio PCA-Leite em microaerofilia, a 37°C / 48horas (VINDEROLA & REINHEIMER, 1999). Para a contagem de *Bifidobacterium* spp., utilizou-se o meio Bile-MRS, que foi o meio selecionado por apresentar melhor desempenho em relação a capacidade de recuperação das células das quatro linhagens probióticas e inibir o crescimento em placa de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Após as diluições seriadas, uma alíquota de 0,1mL das diluições apropriadas foi inoculada, em duplicata, aos meios selecionados utilizando-se a técnica de semeadura em superfície. Em seguida as placas de PCA-Leite e Bile-MRS foram incubadas em microaerofilia (37°C / 48horas) e anaerobiose (37°C / 72h), respectivamente. A condição de anaerobiose foi desenvolvida pela incubação das placas em jarras de anaerobiose com gerador Anaerobac (Probac, Brasil). Placas contendo ente 30 e 300

colônias foram enumeradas e as unidades formadoras de colônias por mililitro de produto foram calculadas. De acordo com Saccaro (2008), a seletividade dos meios de cultura pode ser confirmada através de observação microscópica da aparência das células nas colônias.

2.2.2 pH e acidez titulável

A determinação dos valores de pH foi realizada em potenciômetro modelo MPA210 (MS Tecnocon, Brasil), calibrando-se o aparelho com soluções tampão (pH 4,0 e pH 7,0) a temperatura ambiente (BRASIL, 2006).

A acidez expressa em gramas de ácido láctico/L foi determinada pelo método de titulação com solução de NaOH 0,1 N, usando como indicador a solução de fenolftaleína a 1% (BRASIL, 2006).

2.2.3 Suscetibilidade a sinérese

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

2.2.4 Análise estatística

Os experimentos das análises físico-químicas e microbiológicas durante a vida de prateleira foram submetidos ao delineamento blocos ao acaso, com arranjo em parcelas subdivididas. Cada lote de bebida láctea fermentada representou um bloco, a adição das diferentes linhagens de *Bifidobacterium* spp. foram consideradas as parcelas e os tempos de armazenamento (1, 7, 14, 21 e 28) as subparcelas. Para comparação das médias utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e havendo diferença estatística significativa entre as médias empregou-se o teste de *Tukey* ($p < 0,05$) ou teste de *Duncan* ($p < 0,05$).

Para as análises físico-químicas das matérias-primas (leite e soro concentrado) e da bebida láctea fermentada empregou-se o delineamento inteiramente casualizado. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) para avaliar diferença entre os lotes de cada amostra e, quando necessário, seguiu-se com teste de comparação de médias de *Tukey* ($p < 0,05$).

Os testes foram realizados utilizando as ferramentas de análises de dados disponíveis no Excel 2010 (MOS, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da fase logarítmica das linhagens de *Bifidobacterium* spp.

A fim de padronizar o número de células presentes no inóculo de *Bifidobacterium* spp., fez-se o cultivo de cada linhagem para se obter a curva de crescimento e determinar o tempo final da fase logarítmica. As Figuras 1 e 2 ilustram o crescimento microbiano das diferentes linhagens.

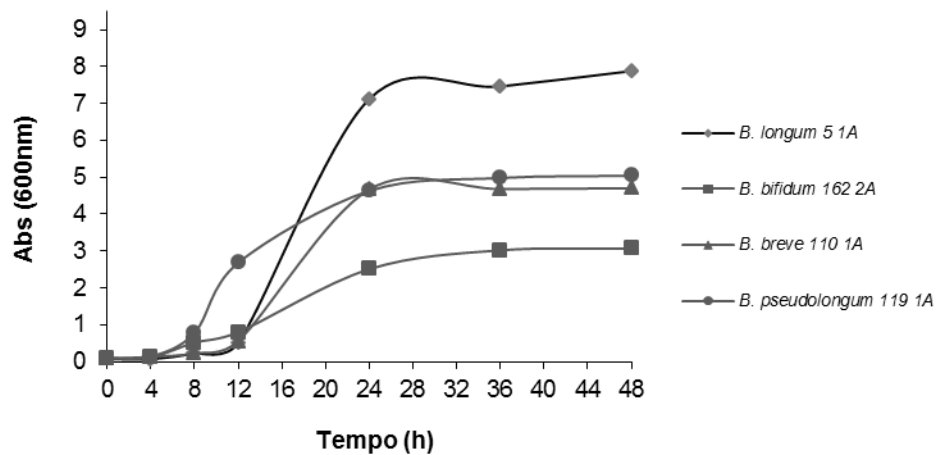


Figura 1: Densidade óptica de *Bifidobacterium* spp. em caldo MRS, incubados em aerobiose, 37°C por 48hs.

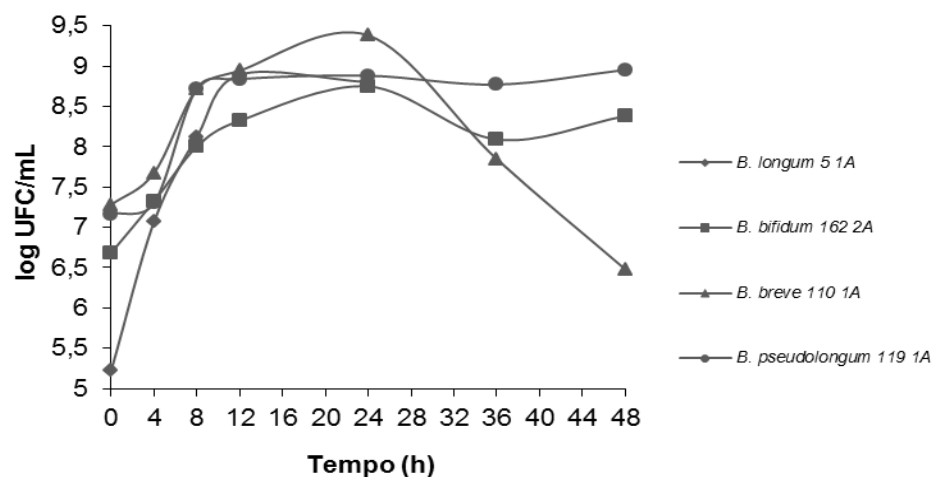


Figura 2: Contagem de células viáveis (log UFC.mL⁻¹) de *Bifidobacterium* spp. versus tempo de crescimento.

As determinações da densidade óptica, como pode ser visto na Figura 1, demonstraram crescimento bem distinto entre as linhagens de *Bifidobacterium* spp., principalmente entre *B. longum* 5^{1A} e *B. bifidum* 162^{2A} que apresentaram D.O. máximas de 7,88 e 3,06, respectivamente. Já as linhagens de *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} atingiram valores de D.O. mais semelhante entre si, com valor máximo de 4,70 e 5,04, respectivamente.

Observando as curvas de densidade óptica, tem-se que todas as linhagens atingiram o final da fase logarítmica com aproximadamente 24 horas (Figura 1).

Ao analisar a Figura 2 deste capítulo, percebe-se que com 12 horas, *B. longum* 5^{1A} atingiu o final da fase logarítmica com a maior concentração de células observada (8,89 log UFC.mL⁻¹) e leve redução até o tempo 24 horas (8,79 log UFC.mL⁻¹). Após 24 horas de incubação, não se obteve contagem em placa nas diluições selecionadas (10⁻⁴ e 10⁻⁵), impossibilitando caracterizar o perfil de crescimento a partir deste período. Supõe-se que a concentração de células a partir do tempo de 24 horas esteja abaixo de 5,0 log UFC.mL⁻¹.

Comparando a curva de D.O com a contagem em placa, com 12 horas a densidade óptica de *B. longum* 5^{1A} ainda estava muito baixa e só atingiu o fim da fase log com 28h. E como demonstrado na Figura 2, com 12h *B. longum* 5^{1A} já está com o máximo de células.

Quanto à *B. bifidum* 162^{2A}, este apresentou perfil de crescimento mais lento dentre as quatro linhagens analisadas, com valor máximo do número de células de 8,74 log UFC.mL⁻¹ após 24h (Figura 2). Houve decréscimo a partir de então, voltando a subir a concentração entre 36 horas e 48 horas.

Pela curva de crescimento, observou-se que *B. breve* 110^{1A} demonstrou a maior concentração de células comparada com as demais. Sendo o maior valor encontrado de 9,38 log UFC.mL⁻¹ com 24 horas. No entanto, esta linhagem apresentou a queda mais brusca na quantidade de células a partir desse período, chegando em 48 horas com contagem de 6,47 log UFC.mL⁻¹.

Por fim, tem-se o perfil de crescimento de *B. pseudolongum* 119^{1A} que atingiu alta contagem de células no menor tempo, com 8 horas de cultivo (8,72 log UFC.mL⁻¹) e apresentou dois momentos de aumento na concentração de células, o primeiro com 24 horas (8,88 log UFC.mL⁻¹), seguido de ligeira queda e subindo novamente para 8,95 log UFC.mL⁻¹ com 48 horas.

Ao comparar os dois gráficos, tem-se que as culturas apresentaram maior densidade óptica à medida que aumentaram a concentração de células. Em geral, a partir de 24 horas as culturas demonstraram comportamento diferente. A medida de D.O. manteve-se praticamente estável enquanto a concentração de células tendeu a cair, exceto para *B. pseudolongum* 119^{1A}, que permaneceu sem grandes variações até o último tempo analisado (48 horas).

Pelos resultados encontrados, pode-se dizer que o tempo de 24 horas apresentou contagens elevadas de células para as quatro linhagens estudadas, podendo ser considerado como tempo de crescimento preferencial para inoculação das linhagens nas bebidas lácteas fermentadas elaboradas neste estudo.

3.2 Análises físico-químicas para controle de qualidade das matérias primas e das formulações de bebidas lácteas fermentadas

3.2.1 Avaliação físico-química das matérias-primas

Nas Tabelas 2 e 4 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas (proteína, lactose, lipídeo, acidez titulável, extrato seco total e desengordurado, cinzas e cloretos) de quatro lotes de leite em pó e soro lácteo concentrado, utilizados durante a produção dos quatro lotes de bebida láctea fermentada.

Na tabela 2 estão mostrados os valores para leite em pó integral. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite em pó (RTIQ) (BRASIL, 1996), os teores de gordura de todos os lotes estão dentro dos padrões estabelecidos para leite integral, que é maior ou igual a 26%(m/m), exceto no lote 1 que apresentou teor de gordura 1,35% menor que o estabelecido pela legislação.

A partir dos resultados de extrato seco total, obtêm-se os teores de umidade das amostras. Estas estão de acordo com os valores estabelecidos pelo RTIQ de leite em pó, que estabelece o máximo de umidade para leite em pó integral de 3,5% (m/m). Todos os lotes apresentaram teor de umidade dentro do estabelecido, sendo o lote 1 o que apresentou maior teor (3,23% m/m).

Como pode ser verificado na Tabela 2, os resultados percentuais de acidez titulável estão apresentados de forma diferente à estabelecida na legislação (BRASIL,

1996), devido à técnica utilizada no presente trabalho (BRASIL, 2006). A legislação estabelece que a acidez titulável para leite em pó integral deve ser de no máximo 18mL de NaOH 0,1N para 10g de sólidos não gordurosos (SNG).

Neste trabalho, o volume médio de NaOH 0,1N utilizado foi de 7,8mL para cada 5g de leite em pó analisado, que corresponde a 3,55g de sólidos não gordurosos. Extrapolando para 10g de SNG o volume de NaOH usado seria de 21,97, ultrapassando 3mL do permitido pela legislação.

Os parâmetros proteína, lactose, cinzas e cloretos não têm padrões estabelecidos no RTIQ de leite em pó. No entanto, os resultados dessas variáveis, juntamente com os demais, permitem verificar que a composição físico-química dos quatro lotes analisados foi bastante semelhante, indicando uma padronização do leite em pó utilizado durante o experimento. A falta de padronização poderia comprometer os resultados físico-químicos das bebidas lácteas fermentadas produzidas, o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, também os resultados microbiológicos.

As variações observadas nos valores de lactose podem ser atribuídas à metodologia de quantificação da mesma, que exige experiência com a técnica de titulação a quente para identificação exata do ponto de viragem.

Tabela 2: Teores percentuais médios de componentes físico-químicos dos quatro lotes de leite em pó integral

Parâmetros (g/100g)	Leite em pó				Médias
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	
Proteína	28,65 ± 0,71	27,62 ± 0,62	28,06 ± 0,47	26,56 ± 2,44	27,72 ± 0,76
Lactose	29,89 ± 1,9 ^{ab}	34,21 ± 1,27 ^a	29,77 ± 1,48 ^{ab}	27,15 ± 0,60 ^b	30,25 ± 2,53
Gordura	25,65 ± 0,12	26,34 ± 0,35	26,12 ± 0,15	26,15 ± 0,18	26,06 ± 0,25
Acidez Titulável	1,34 ± 0,02 ^{ab}	1,29 ± 0,06 ^b	1,44 ± 0,03 ^a	1,42 ± 0,02 ^a	1,37 ± 0,06
EST	96,77 ± 0,04 ^a	96,89 ± 0,04 ^b	97,25 ± 0,02 ^c	97,30 ± 0,02 ^c	97,05 ± 0,23
ESD	71,12 ± 0,08	70,55 ± 0,34	71,13 ± 0,15	71,15 ± 0,21	70,99 ± 0,25
Cinzas	5,97 ± 0,02	5,96 ± 0,11	6,11 ± 0,27	5,92 ± 0,00	6,00 ± 0,07
Cloretos	1,27 ± 0,07	1,30 ± 0,02	1,32 ± 0,01	1,30 ± 0,01	1,3 ± 0,02

^{a,b,c} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$). Demais médias são estatisticamente semelhantes.

A tabela 3 apresenta as análises de controle físico-químico das amostras de soro lácteo concentrado no dia do recebimento no laboratório. Os quatro lotes apresentaram ausência de amido, cloreto, água oxigenada e formol, indicando ausência de fraude ou adulteração. A presença desses compostos implicaria em uma

ameaça séria contra a saúde do consumidor e poderia prejudicar os processos fermentativos.

O grau brix é acompanhado no laticínio fornecedor do soro lácteo para certificar o grau de concentração após a nanofiltração. Esse parâmetro foi determinado no momento de recebimento das amostras de soro para certificar sobre a homogeneidade das mesmas que foram utilizadas para elaboração das bebidas lácteas fermentadas. As variações observadas no grau Brix se devem a problemas técnicos na membrana utilizada na operação de nanofiltração durante o desenvolvimento deste trabalho, o que gerou nos dois últimos lotes um grau brix mais baixo, indicando amostras de soro menos concentradas que as anteriores.

Tabela 3: Análises físico-químicas de controle para recebimento das amostras de soro

	pH	°Brix (20°C)	Densidade (g/mL) (15°C)	Amido	Cloreto	Água Oxigenada	Formol
1ª Repetição	6,35	13,5	1,053	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2ª Repetição	6,53	13,0	1,051	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3ª Repetição	6,40	12,5	1,051	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4ª Repetição	6,38	12,5	1,048	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

A tabela 4 apresenta valores referentes a composição e as propriedades físico-químicas do soro lácteo concentrado pelo processo de nanofiltração. Os parâmetros abaixo analisados não têm referência na legislação. Não há padrões oficiais para inspeção do soro atualmente disponíveis no Brasil.

Cunha et.al (2009) encontraram os seguintes valores para soro líquido de queijo minas frescal: sólidos totais 6,10 % (m/m), proteínas 0,66% (m/m), lipídeos 0,16% (m/m), carboidratos 4,74 % (m/m), cinzas 0,53% (m/m). Ao comparar estes valores com os valores obtidos para o soro concentrado por nanofiltração, observa-se que o soro lácteo concentrado utilizado neste trabalho encontra-se com teores de proteína, sólidos totais e lactose aproximadamente duas vezes superior ao soro comum.

As concentrações de lactose e proteína foram, respectivamente, 1,7 e 2 vezes superiores quando comparadas com os dados da literatura para soro doce comum. Suárez et al. (2009) observaram 100% de retenção de proteína em soro doce nanofiltrado e aproximadamente 99,5% para lactose. Isso indica que o grau de concentração do soro nanofiltrado utilizado neste estudo é aproximadamente de 1,7 a 2

vezes. Tal fato se confirma também quando os sólidos totais são analisados, demonstrando valores duas vezes superiores ao soro comum.

Houve grande variação nos teores de gordura, sendo os quatro lotes analisados estatisticamente diferentes entre si. Isto se deve aos tipos de queijo produzidos no dia da coleta no laticínio. O soro enviado para o processo de nanofiltração é uma mistura de todos os soros oriundos dos queijos produzidos no laticínio. Assim, a composição do soro dependerá do tipo de queijo produzido.

Para o teor de cinzas, observou-se baixa capacidade de concentração do processo de nanofiltração, uma vez que ao comparar o valor médio obtido (0,68%) com os teores citados na literatura para soro doce 0,53% (ANTUNES 2004, CUNHA et al., 2009 E SUÁREZ et al., 2009), apenas um ligeiro aumento foi observado, demonstrando maior permeabilidade da membrana de nanofiltração para os sais minerais.

Devido ao baixo peso molecular, cloreto é o ânion que mais facilmente atravessa a membrana, justificando os baixos teores encontrados para o mesmo. Fato também observado por Suárez et al. (2009) ao estudarem a desmineralização de soro doce por nanofiltração, que apresentou alta permeabilidade para cloretos.

Tabela 4: Teores percentuais médios da composição química e das propriedades físico-químicas de quatro lotes de soro lácteo concentrado

Parâmetros (g/100g)	Soro Concentrado				
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Médias
Proteína	1,70 ± 0,04 ^a	1,62 ± 0,02 ^{ab}	1,54 ± 0,03 ^b	1,54 ± 0,01 ^b	1,6 ± 0,06
Lactose	8,14 ± 0,26 ^a	8,74 ± 0,19 ^b	6,58 ± 0,03 ^c	6,94 ± 0,09 ^c	7,60 ± 0,87
Gordura	0,59 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^b	0,30 ± 0,02 ^c	0,44 ± 0,01 ^d	0,39 ± 0,13
Acidez Titulável	0,35 ± 0,00 ^a	0,30 ± 0,00 ^b	0,17 ± 0,00 ^c	0,17 ± 0,01 ^c	0,24 ± 0,08
EST	13,50 ± 0,04 ^a	12,39 ± 0,01 ^b	11,97 ± 0,03 ^c	11,95 ± 0,07 ^c	12,45 ± 0,63
ESD	12,91 ± 0,04 ^a	12,15 ± 0,02 ^b	11,68 ± 0,05 ^c	11,51 ± 0,07 ^d	12,06 ± 0,54
Cinzas	0,76 ± 0,01 ^a	0,72 ± 0,01 ^a	0,64 ± 0,01 ^b	0,62 ± 0,04 ^b	0,68 ± 0,06
Cloretos	0,16 ± 0,00 ^a	0,18 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,00 ^{ab}	0,17 ± 0,01 ^{ab}	0,17 ± 0,00

^{a,b,c} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

3.2.2 Avaliação físico-química das formulações de bebida láctea fermentada

Considerando o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea (BRASIL, 2005), a definição para as bebidas formuladas neste trabalho se

enquadra em bebida láctea fermentada com açúcar. Sendo assim, as bebidas produzidas devem cumprir o requisito físico-químico de teor mínimo de proteína de origem láctea de 1,0 (g/100g). Todos os lotes das bebidas elaboradas se enquadram neste parâmetro. Os teores encontrados estão entre 2,25 e 2,42 vezes, acima do determinado pela legislação.

Thamer e Penna (2006) ao variarem a proporção de soro lácteo entre 45 e 55% encontraram valores de proteína entre 2,46 e 1,93 %, respectivamente. As bebidas lácteas obtidas por Oliveira (2006) com 50% de soro obtido da produção de queijo Minas frescal apresentaram 1,65% (m/m) de proteína. O teor de proteínas encontrado para as bebidas analisadas neste trabalho foi de $2,33 \pm 0,06\%$ (m/m), indicando que a concentração do soro pela nanofiltração acarretou a obtenção de uma bebida com maior teor de proteínas consideradas de alto valor biológico.

Outro parâmetro estabelecido pela legislação é o teor mínimo de 2,0g/100g de matéria gorda láctea. Neste requisito, nenhum dos lotes apresentou o teor exigido, sendo o valor máximo encontrado no lote 4, de 1,67 (g/100g). Tal fato poderia ser atribuído ao reduzido teor de gordura do soro lácteo concentrado, que representa 50% da formulação da bebida. Oliveira (2006), verificando as características de bebidas lácteas fermentadas preparadas com três concentrações de soro obtido da produção de queijo Minas frescal (10, 30 e 50%) concluiu que à medida que se eleva a proporção de soro em relação ao leite, o teor de gordura diminui.

O mesmo autor encontrou, para bebidas preparadas com 50% de soro doce, valores de gordura (1,6%) semelhantes aos encontrados neste estudo. Para corrigir o teor de gordura, visando enquadrá-la a legislação, o ideal seria alterar a formulação da bebida láctea fermentada reduzindo a proporção de soro lácteo concentrado em relação ao teor de leite. Por outro lado, Brasil (2007) classifica, em função do teor de gordura na base láctea, os leites fermentados como parcialmente desnatados quando o máximo de 2,9% de gordura é encontrado no produto. Assim, as bebidas lácteas fermentadas formuladas neste trabalho podem ser enquadradas nesta categoria, atribuindo-se a elas o apelo terapêutico de bebidas lácteas com teor reduzido de gordura.

A concentração média de lactose encontrada nas bebidas deste estudo foi de $4,88 \pm 0,06\%$, valor próximo ao encontrado por Almeida (2001) de 4,66% ao elaborar bebidas com 50% de soro doce e fermentadas por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Percebe-se com esse dado que apesar de o processo de nanofiltração ter dobrado a

concentração de lactose no soro, este aumento não foi capaz de provocar alterações no teor deste componente na bebida láctea. Deve-se ressaltar que durante o processo fermentativo as bactérias ácido lácticas utilizam preferencialmente a lactose como substrato.

Silva et al. (1997) obtiveram teor de carboidratos pela diferença entre sólidos totais e o somatório de gordura, proteínas e cinzas e encontraram 13,66%. Thamer & Pena (2006) encontraram concentração entre 12,93% e 16,27%, sendo os maiores valores para bebida com maiores teores de soro que é rico em lactose. Seguindo a mesma metodologia de Silva et al. (1997), os teores médios de carboidratos totais da bebida analisada neste estudo seria de 13,71%, próximo ao encontrado pelo mesmo autor.

Neste estudo, o valor médio de acidez encontrado foi de 0,64%. Thamer & Penna (2006) encontraram valores de acidez de 0,44% a 0,50% para bebidas com proporção de soro entre 45% e 55%. As diferenças nos valores de acidez, em produtos distintos, podem estar relacionadas ao tipo e à concentração de cultura láctea utilizada, à atividade desta cultura, ao valor estabelecido para finalizar a fermentação, à quantidade de soro lácteo utilizado na elaboração das bebidas lácteas, assim como ao tempo de armazenamento (Caldeira, 2010).

O teor médio de sólidos totais encontrado nas bebidas foi de 18% (m/m), valor próximo ao encontrado por Thamer & Penna (2006) de 17% (m/m) para bebidas lácteas fermentadas com formulação semelhante a utilizada neste estudo (50% de soro doce, 7% de açúcar e 50% de leite em pó desnatado (12%*m/v*). Estes autores utilizaram cultura mista de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*.

Quanto aos demais parâmetros analisados, a legislação não especifica padrões.

Tabela 5: Teores percentuais médios de diferentes compostos de quatro lotes de bebida láctea fermentada elaborada com soro lácteo concentrado

Bebida Láctea					
Parâmetros (g/100g)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Médias
Proteína	2,33 ± 0,16	2,42 ± 0,03	2,25 ± 0,11	2,32 ± 0,05	2,33 ± 0,06
Lactose	5,55 ± 0,30 ^a	5,47 ± 0,04 ^a	4,32 ± 0,02 ^b	4,17 ± 0,05 ^b	4,88 ± 0,64
Gordura	1,47 ± 0,14	1,66 ± 0,02	1,64 ± 0,02	1,67 ± 0,02	1,61 ± 0,08
Acidez Titulável	0,64 ± 0,00	0,64 ± 0,01	0,63 ± 0,00	0,64 ± 0,00	0,64 ± 0,00
EST	18,90 ± 0,07 ^a	18,33 ± 0,05 ^b	17,92 ± 0,07 ^c	18,03 ± 0,04 ^c	18,29 ± 0,38
ESD	17,44 ± 0,20 ^a	16,67 ± 0,06 ^b	16,28 ± 0,08 ^c	16,36 ± 0,03 ^{bc}	16,69 ± 0,46
Cinzas	0,65 ± 0,02	0,63 ± 0,05	0,63 ± 0,03	0,64 ± 0,02	0,64 ± 0,00
Cloretos	0,14 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00

^{a,b,c} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$). Demais médias são estatisticamente semelhantes.

3.3 Análises microbiológicas para controle de qualidade

3.3.1 Análises microbiológicas das matérias-primas

A tabela 6 apresenta os resultados das contagens de coliformes totais e termotolerantes, micro-organismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus coagulase (+)* e pesquisa de *Salmonella* para leite em pó integral e soro lácteo concentrado.

Todas as análises para o controle microbiológico dos quatro lotes de leite em pó integral indicaram ausência de *Salmonella* e *Staphylococcus coagulase (+)* e as contagens de coliformes totais e termotolerantes foram $< 0,3$ NMP.mL⁻¹. Micro-organismos mesófilos aeróbios não apresentaram colônias, sendo que a menor diluição plaqueada foi a 10⁻¹. Portanto, todos os leites em pó analisados atenderam aos requisitos estabelecidos na legislação (BRASIL, 1996) e apresentaram qualidade microbiológica adequada.

A qualidade do leite em pó utilizado é resultado das Boas Práticas de Fabricação aplicadas na indústria, as quais garantem a qualidade sanitária e conformidade do produto final com o regulamento técnico específico.

Atualmente no Brasil, não existem padrões oficiais para inspeção do soro. De acordo com as análises realizadas neste trabalho, todos os lotes de soro demonstraram ausência de coliformes e *Salmonella*. E o tratamento térmico ao qual o

soro lácteo foi submetido, permitiu uma contagem máxima de mesófilos aeróbios de $1,8 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹.

Tabela 6: Contagens de coliformes totais e termotolerantes, micro-organismos mesófilos aeróbios, *Staphylococcus* coagulase (+) e pesquisa de *Salmonella* em leite em pó e soro lácteo concentrado

	Leite em pó				Soro concentrado de queijo tratado termicamente			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Coliformes 35°C (NMP.mL ⁻¹)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Coliformes a 45°C (NMP.mL ⁻¹)	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Mesófilos aeróbios (UFC.mL ⁻¹)	0	0	0	0	0	1x10 ³	1,8x10 ⁴	9x10 ³
<i>Staphylococcus</i> spp. (coag. + / g)	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	*	*	*	*
<i>Salmonella</i> spp./ 25g ou mL	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.	Aus.

* Não analisado; Neg. – Negativo; Aus. – Ausente

3.3.2 Análises microbiológicas das formulações de bebida láctea fermentada

A tabela 7 apresenta os resultados da contagem de coliformes totais e termotolerantes para os quatro lotes de bebidas lácteas fermentadas.

Observou-se que o NMP de coliformes totais para os quatro lotes de bebidas estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, que é no máximo 10 coliformes/mL a 35°C e 5 coliformes/mL a 45°C. Apenas na bebida adicionada de *B. pseudolongum* 119^{1A} no 28º dia de estocagem, foi verificada contagem de coliformes totais de 10; porém, ainda dentro dos padrões.

Tabela 7: Contagem de coliformes totais em bebidas lácteas fermentadas nos dia 1 e 28 da vida de prateleira

	Coliformes 35°C (NMP.mL ⁻¹)							
	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4	
	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	< 0,3	1,1	0,43	0,74	< 0,3	< 0,3	< 0,3	3,0
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	< 0,3	<0,3	0,43	2,7	< 0,3	< 0,3	< 0,3	6,1
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	< 0,3	1,1	0,43	1,5	< 0,3	2,7	< 0,3	6,1
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	< 0,3	0,3	0,43	2,0	< 0,3	0,72	< 0,3	10,0

Em relação aos coliformes termotolerantes, todas as contagens foram zero. Mostrando que as bebidas lácteas fermentadas apresentam qualidade higiênico-sanitária adequada para serem comercializadas.

Tabela 8: Contagem de coliformes termotolerantes em bebidas lácteas fermentadas nos dias 1e 28 da vida de prateleira

	Coliformes 45°C (NMP.mL ⁻¹)							
	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4	
	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia	1º dia	28º dia
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3

3.4 Estudo da vida de prateleira de bebidas lácteas fermentadas

3.4.1 Análises físico-químicas

Nas figuras abaixo estão apresentados os resultados de pH, acidez titulável e sinérese das quatro bebidas lácteas fermentadas produzidas com cada uma das linhagens de bifidobactéria.

As diferentes linhagens de *Bifidobacterium* spp. utilizadas não influenciaram ($p < 0,05$) em nenhum dos parâmetros físico-químicos analisados durante a vida de prateleira das bebidas produzidas, que pode ser explicado pelo fato de as linhagens de bifidobactérias não terem sobrevivido nas bebidas lácteas fermentadas durante o armazenamento.

Apesar das bebidas lácteas terem sido refrigeradas quando atingido pH 4,8, os valores de pH encontrados nos quatro lotes de bebida láctea, antes da adição das linhagens de bifidobactéria, variaram entre 4,72 e 4,83. A fermentação continua muito lentamente durante o resfriamento, assim, iniciando-se o resfriamento em pH igual a 4,8, evita-se o abaixamento excessivo do pH (THAMER & PENNA, 2006).

Considerando a interrupção da fermentação em pH 4,8, já no primeiro dia de armazenamento todas as bebidas tiveram redução no pH, alcançando valores entre 4,3 e 4,4 (Tabela 10, APÊNDICE A).

Os resultados da determinação do pH durante o período de estocagem a 5°C mostram pouca variação a partir do sétimo dia, sem diferença estatística ($p < 0,05$),

como pode ser observada na Figura 3, com valor médio de 4,25 durante o armazenamento para maioria das bebidas analisadas, tendo sido observado diferença ($p < 0,05$) apenas do primeiro para os demais dias.

A redução do pH na primeira semana pode estar relacionada ao crescimento das bactérias ácido lácticas, que do primeiro para o sétimo dia apresentaram aumento na contagem total (Tabela 13, APÊNDICE A), apesar deste crescimento ter sido diferente ($p < 0,05$) apenas nas bebidas adicionadas de *B. bifidum* 162^{2A} e *B. pseudolongum* 119^{1A}.

Oliveira (2006), elaborou bebidas lácteas fermentadas, utilizando cultura de iogurte, com 50% de soro doce oriundo da produção de queijo Minas frescal e encontrou pH de 4,20 no sétimo dia de estocagem a 4°C, semelhantes aos valores encontrados neste estudo

Segundo Ferreira (1996), o evento da pós-acidificação pode ocorrer durante a estocagem do produto em temperaturas mais baixas, sendo caracterizada pela diminuição do pH devido a produção de ácido láctico por micro-organismos que sobrevivem bem ao armazenamento refrigerado, que é o caso de *L. bulgaricus*.

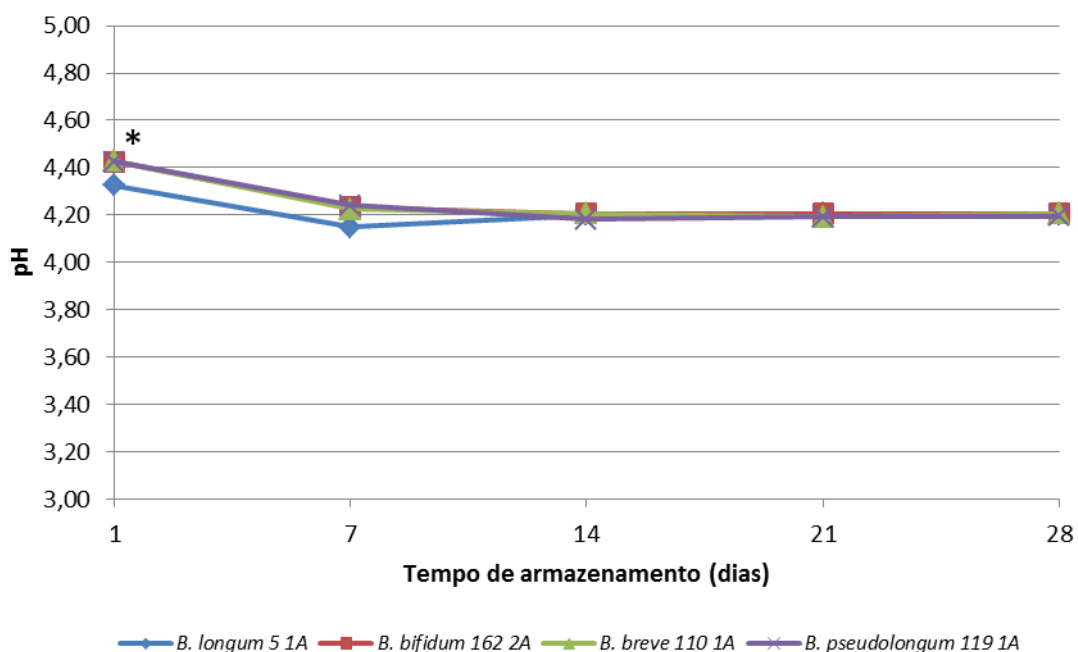


Figura 3: Alteração do pH durante 28 dias de armazenamento de bebidas lácteas fermentadas adicionadas das diferentes linhagens de bifidobactérias.

*Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$).

Vários podem ser os fatores responsáveis pelas alterações nos valores de pH em diferentes produtos: tipo e porcentagem de cultura utilizada, a atividade desta

cultura, o valor de pH estabelecido para finalizar a fermentação, a quantidade de soro lácteo utilizada na elaboração das bebidas lácteas, assim como o tempo de armazenamento. (THAMER & PENNA, 2006). Esses autores, ao analisarem bebidas lácteas obtidas com diferentes concentrações de soro lácteo doce, observaram que quanto maior o teor de sólidos totais, menor a acidez titulável. Ainda ressaltam que proteínas, citratos, fostatos e lactatos são tamponantes, por isso mais sólidos totais afetam acidez.

Na figura 4 está representado o comportamento da acidez das bebidas lácteas obtidas ao longo dos dias de armazenamento.

A quantidade de ácido láctico ao longo dos dias de estocagem não sofreu alteração ($p < 0,05$), exceto para bebida adicionada de *B. pseudolongum* 119^{1A}, que teve aumento significativo no 14º dia, coincidindo com o dia de menor valor de pH observado. Tal fato está diretamente relacionado ao crescimento das bactérias ácido-lácticas totais (Tabela 13, APÊNCIDE A) que aumentaram o número de células até o 7º dia, demonstrando atividade metabólica das mesmas.

As atividades metabólicas das culturas iniciadoras provocam mudanças específicas nas características químicas dos produtos fermentados (SACCARO, 2008). A pós-acidificação, por definição, é a produção de ácido láctico durante a refrigeração e estocagem de produtos lácteos fermentados. *L. bulgaricus* é o principal responsável pela pós-acidificação dos iogurtes. Mas, por outro lado, contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico do iogurte (ANTUNES, 2004).

Não houve variação ($p < 0,05$) de acidez quando as diferentes linhagens de bifidobactéria são comparadas entre si (Tabela 11, APÊNCIDE A).

Não existe padrão para acidez titulável no RTIQ de Bebida Láctea para bebidas lácteas fermentadas. No entanto, o RTIQ de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), preconiza como acidez titulável mínima o valor de 0,6g de ácido láctico/100g para leites fermentados. Esse valor de acidez é necessário para garantir a inibição do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes que porventura sobrevivam ao tratamento térmico e que poderiam alterar o produto durante o armazenamento (MAZOCHI, 2010). Considerando este parâmetro, todas as bebidas lácteas estão adequadas (Tabela 11, APÊNCIDE A).

A formação de ácido láctico em produtos fermentados é desejável, pois este é um conservante natural, o que torna o produto biologicamente seguro, além de favorecer a digestibilidade dos componentes do leite (OLIVEIRA, 2006).

Como visto anteriormente, todas as bebidas apresentaram diferença ($p < 0,05$) de pH do primeiro para o sétimo dia de estocagem, no entanto, nenhuma diferença foi identificada na acidez neste mesmo período, exceto para bebida adicionada de *B. pseudolongum* 119^{1A}.

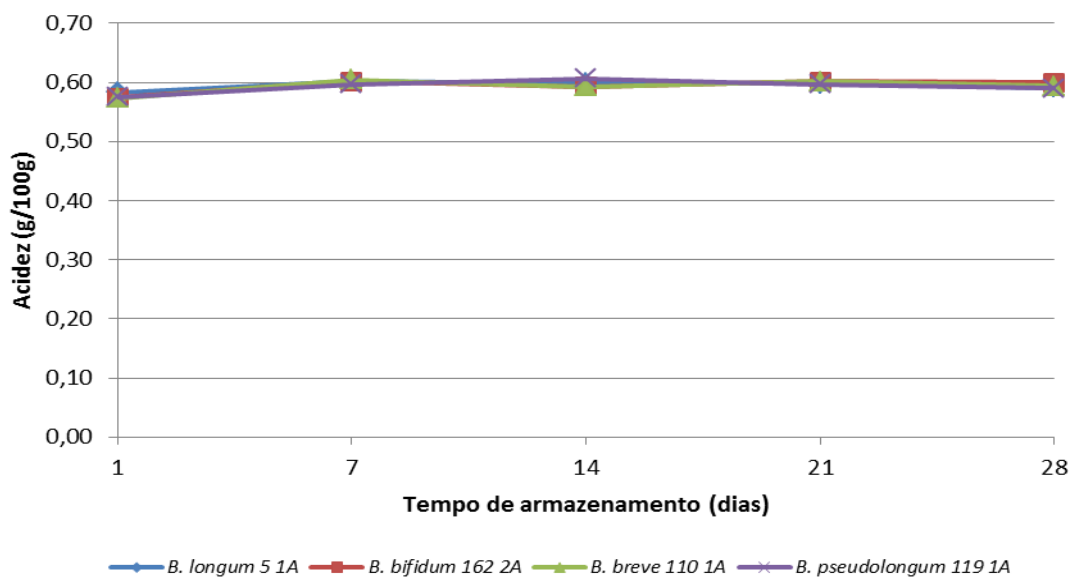


Figura 4: Evolução da acidez (g/100g) durante a vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp.

A sinérese não sofreu alteração quando as diferentes linhagens de *Bifidobacterium* spp. são comparadas entre si. No entanto, analisando os dias de armazenamento observou-se uma tendência de redução da sinérese do primeiro ao vigésimo oitavo dia, como pode ser visto na Figura 5, sendo a maior diferença observada do primeiro para os demais dias.

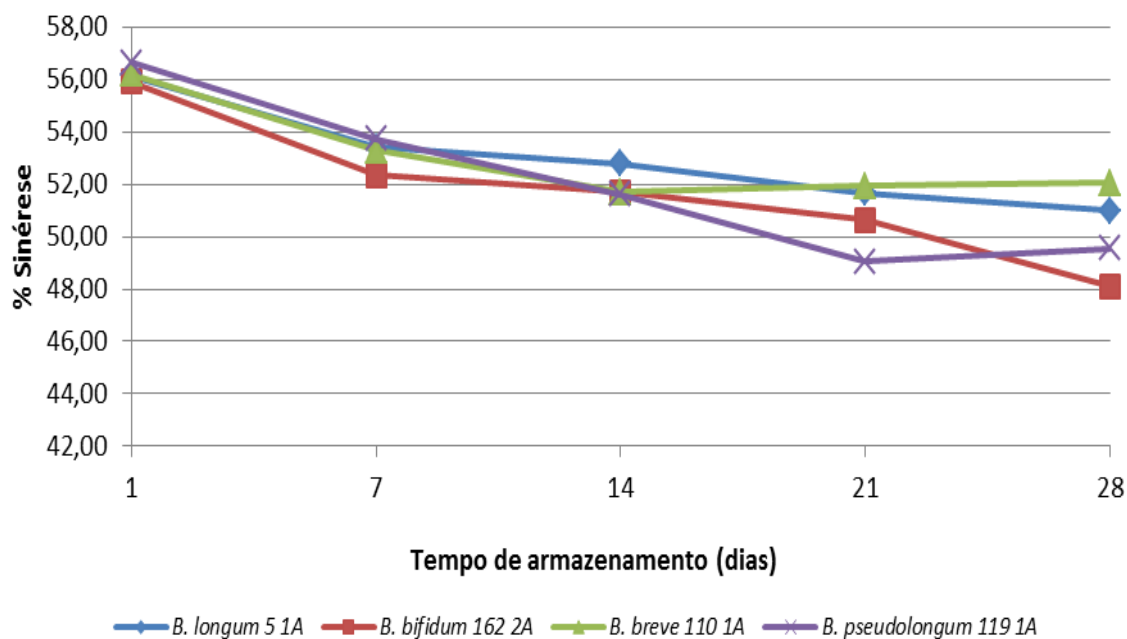


Figura 5: Alteração da sinérese durante a vida de prateleira das bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp.

Para bebidas adicionadas de *B. longum* 5^{1A} e *B. breve* 110^{1A}, a redução nos índices de sinérese ($p < 0,05$) aconteceu do 1º para o 14º dia e permaneceu estável até o último dia de análise. Período que coincide com estabilização do pH para estes dois tipos de bebida, indicando que a partir do momento que houve estabilização do pH houve também maior estabilidade dos géis lácteos.

Para as bebidas adicionadas de *B. bifidum* 162^{2A}, o desprendimento de soro foi maior ($p < 0,05$) no primeiro dia de análise. Com diferença estatística entre o 1º e 7º dia. A partir deste período, manteve-se estável até o 21º dia e apresentou redução significativa na última semana de análise. Também para esta bebida, variações adicionais foram observadas apenas no pH do primeiro para o sétimo dia de análise.

Nas bebidas adicionadas de *B. pseudolongum* 119^{1A}, a redução na sinérese foi significativa entre o primeiro e décimo quarto dia. A partir do décimo quarto dia, manteve-se estável, sem diferença ($p < 0,05\%$) até o fim da vida de prateleira, como apresentado na Figura 5 e na Tabela 12 (APÊNCIDE A). Para esta bebida, outras alterações foram observadas no pH (redução do primeiro para sétimo dia), na acidez (aumentou no 14º dia) e na concentração de bactérias ácido-lácticas (aumento do primeiro para sétimo dia). Isso mostra que o aumento da atividade metabólicas das bactérias até o sétimo dia reduziu o pH provocando rearranjo nas moléculas de caseína e fortalecendo a estrutura dos géis com redução nos índices de sinérese.

Castilho et al. (2006) sugerem que maiores concentrações de culturas iniciadoras tendem a diminuir a sinérese. Ela é influenciada pelas linhagens e pela proporção delas, pois as alterações na acidez do meio ocasionadas pela fermentação influenciam a formação do gel de caseína com uma estrutura de rede regular.

De modo geral, a sinérese média das bebidas sofreu uma redução significativa de 6,05% (m/m) ao longo do tempo de armazenamento. Entre os lotes não foi observada diferença ($p < 0,05$) indicando homogeneidade entre os mesmos.

Sinérese está relacionada à rede proteica e consiste na expulsão gradativa do soro causada pela instabilidade de géis lácteos, após o processo de fermentação (CASTILLO et al., 2006). González-Martínez et al. (2002) relatam que um gel com estrutura mais aberta e, portanto, susceptível à sinérese, formar-se-á em um leite fermentado que contiver maior teor de proteínas do soro e menor teor de caseína, devido a redução das interações intermoleculares. Penna et al. (2006) ainda afirmam que este comportamento é mais acentuado em produtos com baixos valores de pH, como por exemplo, os iogurtes e as bebidas lácteas.

Comparando os índices de sinérese deste trabalho (Tabela 12, APÊNDICE A) com os resultados da literatura, percebe-se que a porcentagem de desprendimento de soro neste estudo foi mais elevada. Esse maior valor de sinérese está relacionado à proporção de soro na formulação da bebida (50%) e ao fato de ser um soro concentrado, que apresentou valor médio de proteína (1,6%) duas vezes superior ao teor de proteína de um soro doce comum (0,8%). Ou seja, é uma bebida com menor teor de caseína, com maior teor de proteínas de soro e, portanto, apresenta uma estrutura de gel mais aberta e mais susceptível à sinérese.

Cunha et al. (2009) ao estudar a sinérese em bebidas lácteas fermentadas com cultura láctea contendo *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, *L. acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 e com diferentes teores de soro lácteo doce obtiveram maiores índices de sinérese (46,5%) naquelas contendo 50% de soro em sua formulação. De acordo com os autores, bebidas com menores teores proteicos, portanto maiores proporções de soro tendem a apresentar maior sinérese.

No presente estudo, observou-se redução da sinérese na primeira semana para todas as bebidas analisadas e estabilização para aquelas adicionadas de *B. longum* 5^{1A} e *B. bifidum* do 7^o ao 28^o dia. Isto poderia ser devido à atividade metabólica das culturas iniciadoras e à diminuição na pressão líquida da matriz proteica, causando a diminuição ou a estabilidade da sinérese (GULER-AKIN & AKIN, 2007).

Cunha et al. (2009) também não observaram variação nos índices de sinéreses do 7º ao 28º dia para bebidas lácteas fermentadas contendo 50% de soro doce.

Por outro lado, Antunes (2004) ao avaliar a influência da adição de concentrado proteico de soro lácteo nas propriedades de iogurtes desnatados, também observou que tanto a quantidade quanto a qualidade das proteínas (proporção proteínas do soro/caseína) influenciaram na sinérese. Menores dessoragens foram encontradas em iogurtes com maiores fortificações de concentrado proteico de soro. Ainda ressalta que a β -lactoglobulina tem maior capacidade de reter água comparada às outras proteínas lácteas.

Ou seja, apesar da maior proporção de proteínas de soro lácteo favorecer índices de sinérese mais elevados, como os encontrados neste estudo, as mesmas podem proporcionar maior estabilidade neste índice durante a vida de prateleira, tendo em vista a capacidade de β -lactoglobulina na retenção de água.

Vários fatores podem estar envolvidos no desprendimento de soro lácteo ao longo do armazenamento, tais como o tratamento térmico das proteínas do soro em temperaturas $>60^{\circ}\text{C}$ melhorando a firmeza dos géis (BRITTEN & GIROUX, 2001), o uso de cultura iniciadora produtora de exopolissacarídeos, que tem alta capacidade de se ligarem com a água aumentando a retenção da mesma em iogurtes (AMATAYAKUL et al., 2006), a adição de sacarose para adoçar produtos lácteos aumentando os sólidos totais e reforçando a rede de gel (LEE & LUCEY, 2010).

Lee & Lucey (2010) ressaltam que a maioria dos produtos de iogurte são adoçados e que a utilização de sacarose aumenta os sólidos totais da mistura e, reforça a rede de gel.

3.4.2 Viabilidade microbiana durante a vida de prateleira

3.4.2.1 Viabilidade de bactérias ácido-lácticas totais

O comportamento das bactérias ácido-lácticas totais nas amostras de bebida lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp. é mostrado na Tabela 13 (APÊNDICE A). A população de bactérias ácido-lácticas totais foi semelhante ($p < 0,05$) nos quatro tipos de bebidas quando as diferentes linhagens de *Bifidobacterium* spp. são comparadas entre si.

Analisadas separadamente houve diferença ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento nas bebidas adicionadas de *B. bifidum* 162^{2A} e de *B. pseudolongum*

119^{1A} pelo teste de médias de Duncan (Tabela 13, APÊNDICE A). Em ambas amostras, a concentração de células aumentou significativamente na primeira semana e manteve os valores estáveis até o 28º dia. Este comportamento, como discutido anteriormente afetou os valores de acidez, pH e sinérese de ambas bebidas nos respectivos dias com alteração.

Percebe-se que a contagem de bactérias ácido lácticas totais permaneceu alta durante todo o tempo de armazenamento, acima de 10^8 UFC.mL⁻¹, como mostrado na Figura 6, atendendo aos valores estabelecidos pela legislação. Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, Instrução Normativa nº16 de 23 de agosto de 2005 (BRASIL, 2005), a contagem total de bactérias lácticas viáveis em bebidas lácteas fermentadas deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, durante todo prazo de validade.

Andrade (2010), ao avaliar as características microbiológicas de bebidas lácteas fermentadas comerciais disponíveis no mercado de Belo Horizonte/MG, observou contagens totais de bactérias ácido-lácticas viáveis acima de $8,0 \log$ UFC.mL⁻¹, demonstrando também valores bem superiores ao estabelecido pela legislação.

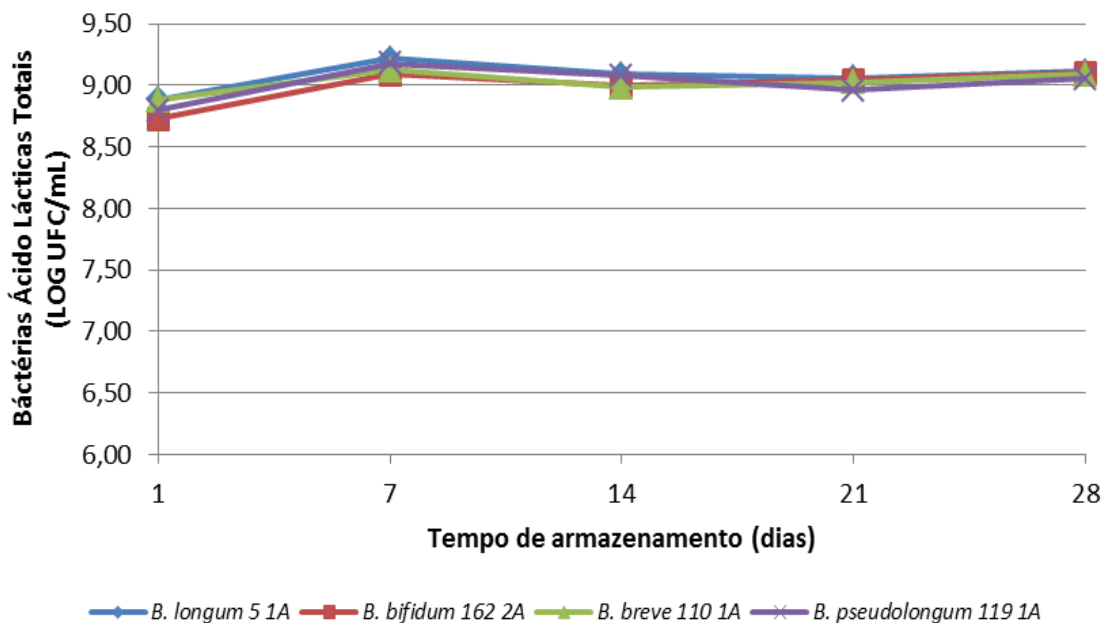


Figura 6: Evolução da população de bactérias ácido lácticas totais nas bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp. no período de 28 dias.

3.4.2.2 Viabilidade de *Bifidobacterium* spp.

Na tabela 9 encontra-se a concentração média das linhagens de *Bifidobacterium* spp. nas bebidas lácteas fermentadas durante 28 dias de armazenamento a 5°C.

Observou-se que a sobrevivência das linhagens de bifidobactérias foi muito baixa, chegando a sete dias com contagens inferiores a 6,0 logUFC.mL⁻¹. Exceto para *B. breve* 110^{1A} que permaneceu viável até sete dias. Porém a partir do décimo quarto dia de análise já estava com concentrações inferiores ao estabelecido na legislação que fixa o limite mínimo de células viáveis em derivados lácteos probióticos em 6,0 log UFC.mL⁻¹ (BRASIL, 2005).

Para manter a confiança em produtos probióticos é importante demonstrar boa sobrevivência das bactérias durante a vida de prateleira. A fim de garantir o efeito benéfico no organismo humano a contagem de células viáveis deve ser acima de 6,0 Log UFC.mL⁻¹, fornecendo uma dose diária de 10⁶ a 10⁹ de bactérias viáveis (VINDEROLA, BAILO & REINHEIMER, 2000).

Tabela 9: Concentração (log UFC.mL⁻¹) de *Bifidobacterium* spp. em bebidas lácteas fermentadas durante o período de estocagem

	1º dia	7º dia	14º dia
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	8,22 ± 1,01	< 6,0	< 6,0
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	6,54 ± 0,52	< 6,0	< 6,0
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	8,78 ± 0,20	6,38 ± 0,09 [#]	< 6,0
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	7,95 ± 0,85	< 6,0	< 6,0

Média e desvios padrão das determinações realizadas em quatro lotes.

[#] Média e desvio padrão das determinações realizadas em três lotes.

A quantidade mínima de probióticos viáveis deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo (ANVISA, 2008). Considerando a ingestão diária de uma porção da bebida láctea fermentada, que equivale a 200mL do produto (ANVISA, 2003), apenas no primeiro dia as linhagens de *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} poderiam ter algum efeito terapêutico no organismo humano e para *B. breve* 110^{1A}, o efeito poderia se estender até o 7º dia. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal, capazes de garantir a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente, foram observadas com doses de 100g de produto alimentício contendo 10⁸ a 10⁹ UFC de microrganismos probióticos (VINDEROLA & REINHEIMER, 2003).

A queda de pH do tempo zero (4,8) para o dia um (valor médio de 4,4) e posteriormente para o sétimo dia (valor médio de 4,21), pode ser o principal fator responsável pela baixa viabilidade das linhagens de *Bifidobacterium* spp. Lankaputhra e Shah (1995), ao estudarem a sobrevivência de nove linhagens de *Bifidobacterium* spp. em condições ácidas (pH 1.5 – 3.0), concluíram que a tolerância dessas à acidez é linhagem específica.

Martin & Chou (1992) relataram que pH de 5.5 – 5.6 foi determinado por ser o mínimo de sobrevivência de algumas espécies de bifidobactéria e que, em geral, a maioria das estirpes são sensíveis a valores de pH abaixo de 4,6. Por aplicação prática, valores de pH no produto final devem se manter acima de 4,6 para prevenir o declínio nas populações de bifidobactéria (LAROIA & MARTIN, 1991).

Dave & Shah (1997) também afirmam que a queda de pH abaixo de 4,3 durante o armazenamento afeta grandemente a viabilidade de bifidobactérias.

Dos vários estudos de sobrevivência dos microrganismos probióticos realizados por diversos pesquisadores, existe consenso geral de que produtos com acidez elevada conduzem a maior perda de viabilidade do que produtos com baixa acidez, sendo necessário efetuar seleção cuidadosa das estirpes a utilizar.

Segundo Kneifel et al. (1993), excessiva acidificação é devido principalmente a crescimento de linhagens de *L. bulgaricus* em baixos valores de pH e temperaturas de refrigeração. A acidificação pós-produção pode ser prevenida de forma limitada pelo uso de culturas com baixa pós-acidificação.

Além da acidez dos produtos e da acidez produzida durante a estocagem refrigerada, o nível de oxigênio e sua permeabilidade através das embalagens, a sensibilidade às substâncias produzidas pelas bactérias do iogurte e a falta de nutrientes no leite, são fatores responsáveis pela perda de viabilidade dos microrganismos probióticos (SHAH, 2001).

Mazochi et al. (2010) elaboraram iogurtes probióticos com leite de cabra usando as mesmas linhagens de cultura iniciadora e de *Bifidobacterium* spp. deste estudo. Os autores encontraram boa viabilidade das culturas probióticas, acima de 10^6 UFC.mL⁻¹ após 40 dias (5°C), com acidez de 0,64g de ácido láctico/100g, estável durante todo armazenamento. Além de diferir quanto ao tipo de leite utilizado, Mazochi et al. (2010) adicionaram as linhagens de bifidobactéria ao iogurte 24 horas após a fermentação, o que pode ter interferido na sobrevivência das mesmas. Os autores não apresentam os valores do pH de corte da fermentação nem a evolução do mesmo durante o

armazenamento, impossibilitando fazer uma análise comparativa de alteração de pH durante a vida de prateleira com a viabilidade das linhagens probióticas.

De modo geral, esse fato mostra que a matriz alimentar em que os micro-organismos são inseridos pode ter papel decisivo na viabilidade e funcionalidade durante a manufatura do produto e na proteção das células para o consumo.

Guerra et al. (2011), utilizando a formulação de iogurte probiótico com leite de cabra, conforme descrito por Mazochi et al. (2010), para o tratamento de constipação, observaram a efetividade de *B. longum* 5^{1A} contra constipação em crianças em experimentação clínica.

Particularmente, para *B. bifidum* BBI em iogurtes, Vinderola, Bailo & Reinheimer, 2000, indicaram que a viabilidade variou em função das culturas iniciadoras comerciais utilizadas. Estes fatos sugerem que existe uma relação estreita entre a viabilidade de um probiótico, a cultura iniciadora utilizada na fermentação e as características do produto.

Souza et al. (2012) ao tentarem aumentar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} em leites fermentados fizeram variações na cultura iniciadora, no teor de sólidos e na temperatura de fermentação. Eles obtiveram menor redução da viabilidade nos leites fermentados com maior teor de sólidos e nas temperaturas de fermentação próximas de 37°C. Indicando que estes fatores juntos podem ser variáveis tecnológicas as serem trabalhadas a fim de otimizar a sobrevivência de bifidobactéria. No entanto, o tempo de viabilidade de *B. longum* 5^{1A} foi inferior a sete dias em todas as culturas iniciadoras testadas e a maior acidificação foi observada nos leites fermentados com a cultura comercial YF-L812 e 903.

Ranadheera (2010) relatou que a adição de substâncias como proteína de soro lácteo em iogurtes pode aumentar a viabilidade de alguns micro-organismos probióticos devido à manutenção da capacidade tampão do iogurte. Também Martin-Diana et al. (2003) afirmam que adição de concentrado proteico de soro influenciou significativamente melhorando a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 no leite de cabras fermentado durante o armazenamento refrigerado.

Isso indica que a adição do soro lácteo nanofiltrado utilizado no presente estudo não influenciou na viabilidade das linhagens de bifidobactéria.

Outra forma sugerida para controle e redução da pós-acidificação seria a redução da temperatura de armazenamento (3 – 4°C) (KAILASAPATHY & RYBKA,

1997). Eles ressaltam também sobre a capacidade de tamponamento pela adição de concentrado proteico de soro lácteo.

Rybka (1994) afirma que a presença de *L. bulgaricus* é o fator principal responsável pela perda da viabilidade de *Bifidobacterium* spp. Quando *L. bulgaricus* foi excluído da fermentação, houve menor redução de pH durante o armazenamento. Isso pode ser prevenido usando culturas ABT (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*). Além disso, este último possui alta habilidade de utilizar o oxigênio, o que resulta na depleção do oxigênio dissolvido no meio, contribuindo para viabilidade de bifidobactérias (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001).

Por outro lado, Dave & Shah (1997) relatam que a inibição de bifidobactéria em iogurtes não é devida a ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio (produzido por *L. bulgaricus*). A inibição destes micro-organismos está presumivelmente ligada a efeitos antagônicos entre as bactérias iniciadoras. Eles sugerem que *S. thermophilus* pode ter efeito inibitório contra bifidobactéria e que a presença de *L. bulgaricus* poderia favorecer o crescimento das mesmas por ser um micro-organismo proteolítico liberando aminoácidos que poderiam ser usados para crescimento de organismos probióticos. Bifidobactérias não são proteolíticas e requerem aminoácidos livres.

Na tentativa de melhorar a viabilidade em longo prazo das estirpes probióticas, diversos estudos executam novas metodologias, que englobam quer a substituição do vetor alimentar quer a proteção de estirpes sensíveis ao ácido por microencapsulação com acetatoftalato de celulose ou com alginato de cálcio (Gomes & Malcata, 1999).

Contudo, é importante ressaltar que, nos últimos anos, existem evidências de certas alterações na funcionalidade, isto é, na magnitude qualitativa e quantitativa do efeito benéfico de uma estirpe, sem modificações nos níveis de células viáveis (GRZESKOWIAK et al. 2011; VINDEROLA et al. 2011). Sendo assim, a contagem de células viáveis reflete parcialmente a capacidade funcional da estirpe.

Kataria (2011) afirma que os benefícios à saúde pelo consumo de micro-organismos probióticos podem ser alcançados sem estar associado ao consumo do micro-organismo vivo. Tal fato foi observado por Souza (2012) ao avaliar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} em leites fermentados com diferentes culturas iniciadoras, incluindo a utilizada neste estudo, e a capacidade da linhagem em proteger camundongos contra infecção por *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium. A linhagem probiótica perdeu viabilidade durante armazenamento refrigerado (5°C / 28dias), porém

os leites fermentados contendo *B. longum* 5^{1A} foram efetivos contra infecção por *Salmonella*.

Outro ponto a ser discutido é que em recente revisão, Vinderola et al. (2011a) apresentam alguns estudos indicando que as condições de produção e armazenamento de produtos podem modificar as respostas das linhagens probióticas em relação a sua capacidade de aderir ao epitélio intestinal ou a sua capacidade imunomoduladora, afetando sua funcionalidade sem alterações na viabilidade celular. Isto demonstra mais uma vez que a contagem de células viáveis nem sempre será o suficiente para garantir a funcionalidade de uma estirpe.

A estabilidade de bifidobactéria liofilizada em sucos de frutas e leite desnatado foi investigada por Saarela et al. (2006). Eles não encontraram alterações na viabilidade celular durante o armazenamento refrigerado, mas, apesar de boa estabilidade, a tolerância das células a acidez e sais biliares diminuiu.

Surgem, portanto, novos desafios. Monitorar a funcionalidade de microorganismos probióticos em alimentos desde o momento da produção até o consumo por meio de metodologias convencionais e ferramentas complementares como marcadores de funcionalidade de membrana celular, testes de resistência às barreiras intestinais, estudo de modelos *in vivo* e para avaliar os efeitos funcionais do microorganismo independente do número de células viáveis no momento do consumo (VINDEROLA et al., 2011a).

4. CONCLUSÕES

As matérias primas utilizadas neste trabalho apresentaram qualidades físico-química e microbiológica adequadas à legislação. Porém viu-se a necessidade de revisão no binômio de pasteurização do soro lácteo concentrado, tendo em vista a sobrevivência de aeróbios mesófilos ao tratamento térmico empregado.

As bebidas lácteas fermentadas se adequaram aos padrões da legislação, exceto para gordura, e apresentaram elevado teor proteico. Além disso, todas as bebidas tiveram boa estabilidade físico-química durante o período de armazenamento. No entanto, as bebidas lácteas fermentadas não se mostraram adequadas para manutenção da viabilidade das diferentes linhagens de bifidobactéria que, permaneceram viáveis apenas no primeiro dia de análise, exceto para *B. breve* 110^{1A} viável até o sétimo dia. A queda de pH observada do tempo 0 até o dia 7, resultante do crescimento das culturas iniciadoras, pode ter sido o principal responsável pela rápida perda da viabilidade das linhagens probióticas.

Desta forma, a matriz alimentar utilizada neste trabalho precisa ser reformulada com intuito de favorecer a sobrevivência de *Bifidobacterium* spp. Esta reformulação está relacionada principalmente ao tipo de cultura iniciadora a ser utilizada para fermentação das bebidas, que garanta baixa pós-acidificação.

CONCLUSÕES INTEGRADAS E SUGESTÕES

O meio de cultivo Bile-MRS mostrou-se adequado para enumeração de *B. longum* 5^{1A}, *B. bifidum* 162^{2A}, *B. breve* 110^{1A} e *B. pseudolongum* 119^{1A} na presença das linhagens que constituem a cultura iniciadora L-812. Estes resultados, contudo não podem ser extrapolados para outras culturas iniciadoras, mesmo que compostas pelas mesmas espécies utilizadas neste trabalho. Torna-se necessário avaliar a seletividade do meio para as linhagens de cada espécie de interesse.

A bebida láctea fermentada adicionada de soro concentrado e *Bifidobacterium* spp. apesar de ter apresentado composição adequada a legislação e ter um diferencial de elevado teor de proteínas de alto valor biológico, não foi adequada para manutenção da viabilidade das diferentes linhagens de bifidobactérias utilizadas.

Propõe-se para os próximos estudos variações na matriz alimentar, como substituição do leite de vaca pelo de cabra ou utilização de culturas ABT (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*). Outra forma de manter a viabilidade de *Bifidobacterium* spp. em produtos lácteos seria o uso de técnicas de microencapsulação.

Além disso, para avaliar os efeitos benéficos dos probióticos sem estar associados ao consumo dos micro-organismos vivos, sugere-se monitorar a funcionalidade das linhagens através de outros métodos, como por exemplo, os indicados por Vindelora et al. (2011a): testes de resistência às barreiras intestinais, marcadores de funcionalidade de membrana celular e estudo de modelos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHEYISI, R. The probiotics market: Ingredients, supplements. Foods: BCC Research, 2008. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/probiotics-market-ingredients-foods-fod035c.html>>. Acesso em 23 de abril de 2012.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI I. A.; ROÇA R. O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo minas frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 187-192, 2001.

ALMEIDA, K.E.; TAMINE, A.Y.; OLIVEIRA, M.N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. *Food Science and Technology*, v 41, p.311-316, 2008.

AMMOR, M.S.; BELEN FLOREZ, A.; MAYO B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, v.24, p. 559-570, 2007.

ANDRADE, R.L.P.; MARTINS, J.F.P. Influência da adição de fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n.3, p.249-253, 2002.

ANDRADE, E. H. P. *Qualidade físico-química, microbiológica e detecção de soro lácteo por cromatografia líquida de alta eficiência em bebidas lácteas fermentadas*. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

ANTUNES, A. E. C. *et al.* Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol.27, n.1, p.83-90, 2007.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC n.2 de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substancias biotivas e probioticos isolados com alegação de propriedade funcional e ou de saúde. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 de julho de 2010.

ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 dez. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9058>>. Acesso em: 26 de junho de 2012.

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://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 12 de Janeiro de 2012.

AQUARONE, E.; LIMA, U.; BORZANI, W. *Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. Série Biotecnologia, v.5. Editora Blucher, 227p. 1983.

AWAISHEH, S.S.; HADDADIN, M.S.Y; ROBINSON, R.K. Incorporation of selected nutraceuticals and probiotic bacteria into a fermented milk. *International Dairy Journal*. v. 15, p. 1184-1190, 2005.

BARRETO, G. P. M. *et al.* Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 6, p. 119-126, 2003.

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.

BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro*. 2005. 244f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria 146, de 07 de abril de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite em pó. Brasília, DF, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. O Ministério da Saúde institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento de Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. *Diário Oficial*, Brasília, 14 maio 1999. Seção 2.

BRASIL Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n. 62 de 23 de agosto de 2003. Oficializa métodos analíticos oficiais microbiológicos para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 16 de dezembro 2011.

BRASIL Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n. 16 de 23 de agosto de 2005. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade da bebida láctea. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de julho 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146 de 07/03/2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Brasília, 1996. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 26 de julho 2011.

BRASIL Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução normativa n. 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: 11 julho 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18164>>. Acesso em 18/03/2012.

BRINK, J.; LANGTON, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Simultaneous analysis of the structural and mechanical changes during large deformation of whey protein isolate/gelatin gels at the macro and micro levels. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 21, n. 3, p. 409-419, 2007.

CASTRO, B. N.; GERLA, P. E. Hollow fiber and spiral cheese whey ultrafiltration: minimizing controlling resistances. *Journal of Food Engineering*, v. 69, p. 495-502, 2005.

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 beverage: study using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, v.42, p.993-997, 2009.

CHRISTIAN HANSEN. Alternative method for enumeration of *Bifidobacteria* in fermented milk products – Guideline. Technical bulletin – p.12. 2007.

CRISPIM, S. M. Bactérias do ácido láctico recuperadas de “massa de puba”: quantificação, isolamento, identificação molecular e pesquisa de substâncias antagonistas. 2008. 64f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

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

DAVE, R.L.; SHAH, N.P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.1529-1536, 1996.

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

DIAS, MARINA C. *Utilização de diferentes substratos e culturas lácteas comerciais empregadas na produção de bebidas lácteas*. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Produção mundial de queijos – 2000/2008 Disponível em:

<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industrias/tabela0423.php>. Acesso em: 28 março 2012.

FACHIN, L. *Contagem de Bifidobacterium animalis BB 12 e efeito da adição de Propionibacterium freudenreichii PS-1 e do tratamento térmico do leite sobre o desenvolvimento de Bifidobacterium animalis BB 12 em iogurte*. 2003. 119 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, 2003.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. Cordoba, Argentina: Expert Consultation Report, p.1–34, 2002.

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

FRANCO, B. D, G. M.; LANDGRAF M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, , 2004, p. 10-11.

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

GEANKOPLIS, C. J. *Transport Processes and Separation Process Principles*. 4 ed. Prentice HALL, 2003

GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; VENTURI, A.; CAMPIERI, M.; Probiotics in infective diarrhea and inflammatory bowel disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.15, p. 489-493, 2000.

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

GONZÁLEZ-MARTINEZ, C.; BECERRA, M.; CHÁFER, M.; ALBORS, A.; CAROT, J. M.; CHIRALT, A. Influence of substituting milk powder for whey powder on yogurt quality. *Trends in Food Science and Technology*, v.13, n. 9-10, p. 334-340, 2002.

GUERRA, P.V.; LIMA, L.N.; SOUZA, T.C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F.J.; SILVA, A.M.; NICOLI, J.R. AND GUIMARAES, 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.

GURGEL, M. S. C. C. A. *Teor de tirosina como parâmetro de qualidade e avaliação das alterações físico-químicas do iogurte*. 1994. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, 1994.

GÜLER-AKIN, M. B.; AKIN, M. S. Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chemistry*, Oxford, v. 100, p. 788-793, 2007.

GRZESKOWIAK, L., ISOLAURI, E., SALMINEN, S. AND GUEIMONDE, M. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition* v.1055, 887-94, 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, p.251-258, 2003.

HARTEMINK, R. et al. Raffinose-Bifidobacterium (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 27, p. 33-43, 1996.

IDF (International Dairy Federation). Recommendations for the hygienic manufacture of milk and milk based products. *Bulletin of the IDF*.n.292, p.3-32, 1993.

IDF (International Dairy Federation). ISO 29981/IDF 220:2010 – Milk products – Enumeration of presumptive bifidobactéria – Colony count technique at 37°C degrees. Disponível em: <http://www.fil-idf.org> Acesso em: 12/08/2010.

JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. 6.ed. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.131-147.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Their therapeutic potential and survival in yogurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v.52, p.28–35, 1997.

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

KATARIA , J.; NAN, L.; WYNN, J.L.; NEU, J. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition Review*, v.67, 546–550, 2009.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. v.15, p.1-91, 2002.

KEMPKA et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28(Supl.), p.170-177, 2008.

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

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

LAMBIN, S.; GERMAN, A. Précis de microbiologie. Masson & Cie, Paris, v.1, p.70,1969 citado por COX, L. D., DOOLEY, e BEUMER R. Effect of lithium chloride and other inhibitors on the growth of *Listeria* spp. *Food Microbiology*. v.7, p.311, 1990.

LANKAPUTHRA, W.E.V., SHAH, N.P. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*. v.30, p.113-118, 1995.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. *Journal of Dairy Sciences*. V.75, p. 1192 – 1196, 1992.

LAROIA, S.; MARTIN, J. H. Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cultured Dairy Products Journal*, v. 2, 13–21, 1991.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; van SIDEREN, D. Getting better with bifidobactéria. *Journal of Applied Microbiology*, v98, 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*, v.42, p.491-495, 2009.

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

MACHADO, R.M.G; FREIRE, V.H.; SILVA, P.C.; FIGUEREDO, D.V.; FERREIRA, P.E. Controle ambiental nas pequenas e médias indústrias de laticínios. *Projeto Minas ambiente*. SEGRAC, p.223, 2002.

MAGENIS, R. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; CERQUEIRA Jr., N. G.; OLIVEIRA, R. V. B.; SOLDI, V.; BENEDET, H. D. Compositional and physical properties of yogurt manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 41, p. 560-568, 2006.

MARTIN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELAEZ, C.; REQUENA, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 27–833. NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLLI, J.R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v.5, p.1-13, 2005.

MATTO, J.; ALAKOMI, H.L.; VAARI, A.; VIRKAJARVI, I.; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, v.16, p.1029-1037, 2006.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, v.93, p.109-113, 2004.

MAUS, J.E.; INGHAM, S.C. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold and acid-tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied and Microbiology*, v. 95, p.146-154, 2003.

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

METCHNIKOFF, I.I. The prolongation of life: *Optimistic studies* (reprinted edition 1907). New York, NY, USA: Springer. 360p, 2004.

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

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

MODLER, H.W.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. Canadian Institute. *Food Science and Technology Journal*, v. 23, p. 29041, 1990.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. *A microbiologia médica*, 3ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A., p.135-141, 2000.

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo. *Ciência Hoje*, v.28, p.34-38, 2000.

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, p.172-176, 2003.

OLIVEIRA, V. M.; CORTEZ, M. A. S.; FREITAS, M. Q.; FRANCO, R. M. Avaliação sensorial de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v. 13, p. 67-70, 2006.

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

OSTLIE, M.N.; TREIMO, J.; NARVHUS, J.A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *International Dairy Journal*, v.15, p. 989–997, 2005.

PAULA, J. C. J., *Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite*. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

PAYNE, J.F., MORRIS, A. E. J., & BEERS, P. Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp in milk. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 353–358, 1999.

PENNER, R; FEDORAK, R.N.; MADSEN, K.L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal disease. *Current opinion in Pharmacology*, v.5, p.596-603, 2005.

PESCUMA, M.; HÉRBET, E.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*, v. 25, p.442-451, 2008.

PRUDÊNCIO, I. D. *Propriedades físicas de queijo Petit Suisse elaborado com retentado de soro de queijo e estabilidade de antocianinas e betalaínas adicionadas*. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

RAVULA, R.R.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques* v.12, p.819–822, 1998.

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

ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology handbook*. 3ªed. New York. 765 p.,2002.

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

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p. 1-16, 2006.

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

SAARELA M., VIRKAJARVI I., ALAKOMI H. L., SIGVART-MATTILA P.; MATTO J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal*, v.16, p. 1477–1482, 2006.

SABOYA, L.V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 176 – 184, 1997.

SACCARO, D.M. *Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado*. 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALMINEM, S. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, v.10, p. 107-110, 1999.

SANTOS, J.P.V.; FERREIRA, C.L.LF. Alternativas para o aproveitamento de soro de queijo nos pequenos e médios laticínios. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.56, n3, p.44-50, 2001.

SALGADO, J.M.; ALMEIDA, M.A. Mercado de alimentos funcionais - Desafios e tendências, 2008. In: Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais. Artigos científicos. Citado por FLORENCE, Ana Carolina Rodrigues. Perfil tecnológico de cepas de bifidobactéria em cultura pura e em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* em leites orgânico e convencional. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-07072009-093910/>>. Acesso em: 07/05/2012.

SAXELIM, M. et al. The technology of probiotics. *Food Science and Technology*, v.10, p.387-392, 1999.

SCHEREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definitions. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.364S-364S, 2001.

SENOK, A.C.; ISMAEEL, A.Y.; BOTTA, G.A. Probiotics: facts or myths. *Clinical Microbiological*, v.11, p.958-966, 2005.

SGARBIERE, V.C. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Varela, 1996.

SGARBIERE, V.C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro de leite. *Revista de Nutrição*. v.17, p. 397-409, 2004.

SGARBIERE, V.C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.8, n.1, p.43-56, 2005.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.in yogurt. *International Dairy Journal*, v.7, p.349-356, 1997.

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

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science e Technology*, v.10, p.411-417, 1999.

SILVA, M.R.; FERREIRA, C.L.L.F.; COSTA, N.M.B.; MAGALHÃES, J. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificado com ferro. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XVIII, 2001, Juiz de Fora. *Anais...Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 2001.p.7.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KAPOLNA, B.;LUGASI, A. Functional foods. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. *Appetite*, v.51, p.456-467, 2008.

SOUZA, T. C. *Produção in vitro e in vivo de poliaminas por Lactobacillus delbrueckii UFV-H2b20 e Saccharomyces cerevisiae UFMG 905 em camundongos gnotobióticos*. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

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.

SOZZI, T.; BRIGIDI, P.; MIGNOT, O.; MATTEUZZI, D. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of Bifidobacteria from dairy products. *Le Lait*, v.70, p.357–361, 1990.

TABASCO, R. et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. *International Dairy Journal*, v.17, p.1107-1114, 2007.

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*, vol. 14, p.143–149, 2004.

TEBALDI, V.M.R. *Elaboração de bebida láctea de soro de ricota e extrato solúvel de soja*. 2005. 79 f. Dissertação, Mestrado (Ciência dos Alimentos), Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

TEIXEIRA, S.M.B. *Elaboração de bebida láctea fermentada utilizando soro de ricota*. 2002. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

TEIXEIRA, V.Q.; CORTEZ, M.A.S.; SILVA, C.; PLATTE, C.S.; SILVA, A.C.O. Soro de queijo: percepção do mercado consumidor em relação a sua utilização. *Revista do Instituto de laticínios Candido Tostes*. v.60, p. 428-421, 2005.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. vol. 41, p.393-400, 2005.

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, p.589-595, 2006.

T.I.A. Techniques Industrielles Appliquees. Bollene, France. Disponível em www.tia.fr. Acesso em 05 jan 2012.

VAN DE CASTEELE, S.; VANHEUVERZWIJN, T.; RUYSSENA, T.; VAN ASSCHE, P.; 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* . vol.16, p.1470–1476, 2006.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff of bioactives. *International Dairy Journal*. V.18, p.714-728, 2008.

VENTURA, M.; van SINDEREN, D.; FITZGERALD, G.F.; ZINK, R. Insight into taxonomy, genetics and physiology of bifidobactéria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.86, p.205-223, 2004.

VIEGAS, R.P. et al. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 62, p. 460-467, 2010.

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

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

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

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

VINDEROLA, G.; BURNS, P.; REINHEIMER, J. Technology and stability of probiotic and prebiotic cheeses. In: Shah, N.P., da Cruz, A.G.; Faria, J.A.F. Probiotic and Prebiotic Foods Technology, Stability and Benefits to Human Health, New Science, pp. 169–202, 2011b.

YANG, S. T.; SILVA, E. M. Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate milk lactose. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 2541-2562, 1995.

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

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; BIOCH, C.; CARO, R.; BIOCH, J.B. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*, v.21, p.569-579, 2001

APÊNCIDE A

CAPÍTULO II

Tabela 10: Perfil de pH durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp.

Dias	pH					
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	Média
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	4,32 ± 0,16 ^A	4,15 ± 0,11 ^B	4,20 ± 0,03 ^B	4,20 ± 0,02 ^B	4,20 ± 0,04 ^B	4,22 ± 0,06
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	4,43 ± 0,07 ^A	4,23 ± 0,03 ^B	4,21 ± 0,04 ^B	4,21 ± 0,02 ^B	4,21 ± 0,03 ^B	4,25 ± 0,09
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	4,43 ± 0,08 ^A	4,22 ± 0,04 ^B	4,21 ± 0,03 ^B	4,19 ± 0,02 ^B	4,21 ± 0,03 ^B	4,25 ± 0,09
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	4,42 ± 0,07 ^A	4,24 ± 0,04 ^B	4,18 ± 0,05 ^B	4,19 ± 0,02 ^B	4,19 ± 0,04 ^B	4,25 ± 0,09
Média	4,40 ± 0,04 ^A	4,21 ± 0,04 ^B	4,20 ± 0,01 ^B	4,20 ± 0,01 ^B	4,20 ± 0,01 ^B	

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

Tabela 11: Acidez titulável (g/100g) durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp.

Dias	Acidez Titulável (g/100g de ácido láctico)					
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	Média
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	0,58 ± 0,03 ^A	0,60 ± 0,03 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,59 ± 0,02 ^A	0,59 ± 0,01
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	0,57 ± 0,03 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,59 ± 0,01 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,60 ± 0,01 ^A	0,59 ± 0,01
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	0,57 ± 0,03 ^A	0,60 ± 0,02 ^A	0,59 ± 0,01 ^A	0,60 ± 0,01 ^A	0,59 ± 0,01 ^A	0,59 ± 0,01
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	0,57 ± 0,03 ^A	0,60 ± 0,02 ^{AB}	0,61 ± 0,03 ^B	0,60 ± 0,02 ^{AB}	0,59 ± 0,01 ^{AB}	0,59 ± 0,01
Média	0,58 ± 0,00 ^A	0,56 ± 0,00 ^B	0,60 ± 0,01 ^B	0,60 ± 0,00 ^B	0,59 ± 0,00 ^B	--

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

Tabela 12: Sinérese% (m/m) durante 28 dias de estocagem de bebidas lácteas fermentadas adicionadas de *Bifidobacterium* spp.

Dias	Sinérese % (m/m)					
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	Média
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	56,15±0,50 ^A	53,39±2,51 ^{AB}	52,79±1,27 ^B	51,66±2,41 ^B	50,98±1,29 ^B	52,99 ± 1,79
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	55,92±1,19 ^A	52,33±1,57 ^B	51,69±1,40 ^B	50,65±1,00 ^{BC}	48,12±1,09 ^C	51,74 ± 2,54
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	56,19±1,73 ^A	53,29±1,79 ^{AB}	51,71±2,99 ^B	51,94±2,33 ^B	52,06±2,38 ^B	53,04 ± 1,67
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	56,63±1,42 ^A	53,73±1,24 ^{AB}	51,60±2,75 ^{BC}	49,04±3,53 ^C	49,53±2,13 ^C	52,10 ± 2,81
Média	56,22±0,26 ^A	53,18±0,52 ^B	51,95±0,49 ^{BC}	50,82±1,14 ^{CD}	50,1z±1,49 ^D	

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

Tabela 13: Contagens das bactérias ácido lácticas totais nas bebidas lácteas fermentadas adicionadas das diferentes linhagens de bifidobactérias durante 28 dias de estocagem

Dias	Bactérias Ácido Lácticas Totais (Log UFC.mL ⁻¹)					
	1º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia	Média
<i>B. longum</i> 5 ^{1A}	8,88 ± 0,46 ^A	9,22 ± 0,25 ^A	9,09 ± 0,25 ^A	9,06 ± 0,17 ^A	9,11 ± 0,13 ^A	9,07 ± 0,11
<i>B. bifidum</i> 162 ^{2A}	8,73 ± 0,53 ^A	9,09 ± 0,17 ^B	9,00 ± 0,16 ^{AB}	9,04 ± 0,17 ^{AB}	9,10 ± 0,12 ^{AB}	8,99 ± 0,14
<i>B. breve</i> 110 ^{1A}	8,88 ± 0,45 ^A	9,13 ± 0,16 ^A	8,98 ± 0,14 ^A	9,02 ± 0,24 ^A	9,09 ± 0,12 ^A	9,02 ± 0,09
<i>B. pseudolongum</i> 119 ^{1A}	8,80 ± 0,50 ^A	9,17 ± 0,30 ^B	9,08 ± 0,07 ^{AB}	8,96 ± 0,22 ^{AB}	9,05 ± 0,15 ^{AB}	9,01 ± 0,13
Média	8,82 ± 0,06 ^A	9,15 ± 0,05 ^B	9,04 ± 0,05 ^{AB}	9,02 ± 0,04 ^{AB}	9,09 ± 0,02 ^B	

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).