

Roane Pena Viegas

**LEITES FERMENTADOS PROBIÓTICOS PRODUZIDOS A PARTIR DE
BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E ADICIONADOS DE CONCENTRADO
PROTÉICO DE SORO LÁCTEO: CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.
Orientador: Marcelo Resende de Souza

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2008

Ficha catalográfica

Assinaturas

Agradecimentos

A Deus.

Aos meus pais pelo amor, incentivo, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. À Biça e Paulo pela torcida e presença.

Ao Tadeu pelo amor e imensa ajuda e por estar sempre ao meu lado.

Ao Professor Marcelo, meu exemplo profissional, agradeço pela orientação perfeita e por todo carinho.

À Professora Mônica pela oportunidade e confiança.

À Fátima pela amizade e ajuda durante a realização do experimento.

A todos os professores do Departamento, em especial, Professora Cláudia pelo apoio e amizade e Professora Silvana.

A todos do Laboratório, principalmente Marco Antônio e Maura, pela ajuda indispensável.

A todos os colegas de mestrado, em especial, à Andréia pela ajuda nas análises sensoriais.

Aos Professores da Banca de dissertação pelas sugestões e presença.

Ao Professor Leorges pelo fornecimento do concentrado protéico de soro.

Ao Danilo, pela ajuda na estatística.

SUMÁRIO

	RESUMO	16
	ABSTRACT	17
1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1.	Leites fermentados	19
2.2.	Probióticos	20
2.2.1.	Histórico	20
2.2.2.	Definição e características desejáveis	21
2.2.3.	Efeitos benéficos	21
2.3.	O gênero <i>Lactobacillus</i>	22
2.3.1.	Características gerais	22
2.3.2.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	23
2.4.	O gênero <i>Weissella</i>	25
2.4.1.	Taxonomia	25
2.4.2.	Morfologia	27
2.4.3.	Características de cultivo	27
2.4.4.	Metabolismo	28
2.4.5.	Isolamento e Identificação	28
2.4.5.1.	Isolamento	28
2.4.5.2.	Identificação	30
2.4.6.	<i>Weissella confusa</i>	31
2.5.	O concentrado protéico de soro lácteo (CPS)	32
2.5.1.	Características gerais	32
2.5.2.	Propriedades funcionais	33
2.5.3.	Efeito em leites fermentados	33
3.	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1.	Controle de qualidade do leite em pó desnatado	35
3.2.	Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído, com ou sem a adição de concentrado protéico de soro e tratado termicamente	35
3.3.	Microorganismos	35
3.4.	Curvas de Fermentação / Crescimento	35
3.5.	Preparo dos leites fermentados	36
3.6.	Análises laboratoriais dos leites fermentados	36
3.6.1.	Avaliação físico-química dos leites fermentados	36
3.6.2.	Avaliação microbiológica dos leites fermentados	37
3.6.2.1.	Enumeração dos microorganismos ácido-lácticos	37
3.6.2.2.	Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	37
3.6.2.3.	Pesquisa de bolores e leveduras	37
3.7.	Avaliação sensorial dos leites fermentados	37
3.8.	Análise Estatística	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1.	Controle de qualidade do leite em pó desnatado	38
4.2.	Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído, com ou sem a adição de concentrado protéico de soro e tratado termicamente	39
4.3.	Curvas de Fermentação / Crescimento	39
4.3.1.	pH	39

4.3.2.	Acidez Titulável	42
4.3.3.	Enumeração das bactérias ácido-láticas	43
4.4.	Avaliação físico-química dos leites fermentados	45
4.4.1.	pH	45
4.4.2.	Acidez Titulável	47
4.4.3.	Teor de Proteína	49
4.4.4.	Teor de Gordura	50
4.4.5.	Teores de Umidade e Extrato Seco Total	50
4.5.	Avaliação microbiológica dos leites fermentados	52
4.5.1.	Enumeração dos microorganismos ácido-láticos	52
4.5.2.	Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes	54
4.5.3.	Pesquisa de bolores e leveduras	55
4.6.	Avaliação sensorial dos leites fermentados	55
4.6.1.	Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos	55
4.6.2.	Teste de aceitação pela escala não estruturada	57
5.	RESUMO DOS RESULTADOS	59
6.	CONCLUSÕES	60
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9.	ANEXOS	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Designação de espécies de <i>Lactobacillus</i> e <i>Leuconostoc</i> para o novo gênero <i>Weissella</i>	26
Tabela 2 -	Características morfológicas de espécies do gênero <i>Weissella</i>	27
Tabela 3 -	Composição típica de produtos derivados do soro lácteo	33
Tabela 4 -	Teores percentuais médios de componentes físico-químicos e acidez titulável de quatro lotes de leite em pó desnatado	38
Tabela 5 -	Resultados médios de quatro repetições de pH de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	46
Tabela 6 -	Resultados médios percentuais de quatro repetições de acidez titulável de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	47
Tabela 7 -	Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de proteína de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	49
Tabela 8 -	Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de umidade de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	51
Tabela 9 -	Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de extrato seco total de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	52
Tabela 10 -	Contagens médias (UFC/g) em ágar MRS, de quatro repetições de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem	52

Tabela 11 -	Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C	55
Tabela 12 -	Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados esterilizados, fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Requisitos físico-químicos oficiais para inspeção de leites fermentados (Brasil, 2007)	20
Quadro 2 -	Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados (Brasil, 2007)	20
Quadro 3 -	Produtos comerciais contendo amostras de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
Quadro 4 -	Características metabólicas de espécies do gênero <i>Weissella</i>	29
Quadro 5 -	Seqüência de aminoácidos da estrutura peptidoglicana da parede celular e a composição de bases do DNA (mol %) de espécies do gênero <i>Weissella</i>	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Árvore filogenética mostrando as inter-relações entre os membros do gênero <i>Weissella</i> com outras bactérias ácido-láticas	26
Figura 2 -	Fluxograma simplificado da produção do concentrado protéico de soro	32
Figura 3 -	Médias de três repetições de pH durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA), <i>Weissella confusa</i> (WC) e as duas culturas (LA+WC), sem e com concentrado protéico de soro (CPS)	40
Figura 4 -	Médias de três repetições de acidez titulável (%) durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA), <i>Weissella confusa</i> (WC) e as duas culturas (LA + WC), sem e com concentrado protéico de soro (CPS)	42
Figura 5 -	Médias de três repetições das contagens (log UFC/g) microbianas durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (LA), <i>Weissella confusa</i> (WC) e as duas culturas (LA + WC) sem e com concentrado protéico de soro (CPS)	44

LISTA DE ABREVIATURAS

A.	<i>Aerococcus</i>
%	Porcentagem
µL	Microlitros
APT	all purpose tween
<i>B. bifidum</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. breve</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
C.	<i>Carnobacterium</i>
CO ₂	dióxido de carbono
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPS	concentrado protéico de soro
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
IN	Instrução Normativa
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>L.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>L.</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
LA c	Leite fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> com CPS
LA s	Leite fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> sem CPS
LA+WC	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> associados
LA+WC c	Leite fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> com CPS
LA+WC s	Leite fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> sem CPS
Leite LA	Leite desnatado esterilizado acrescido de sacarose a 8% e fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Leite LA+WC	Leite desnatado esterilizado acrescido de sacarose a 8% e fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i>
Leite WC	Leite desnatado esterilizado acrescido de sacarose a 8% e fermentado por <i>Weissella confusa</i>
ml	Mililitro
MRS	Man, Roggosa e Sharpe
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NMP	número mais provável
°C	Graus Celsius
<i>P.</i>	<i>Pediococcus</i>
PIS	proteína isolada de soro

RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
S.	<i>Streptococcus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC	unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V.	<i>Vagococcus</i>
W.	<i>Weissella</i>
<i>W. confusa</i>	<i>Weissella confusa</i>
WC c	Leite fermentado por <i>Weissella confusa</i> com CPS
WC s	Leite fermentado por <i>Weissella confusa</i> sem CPS
WPC	whey protein concentrate

ANEXOS

Anexo 1 -	Modelo da Ficha Sensorial utilizada nas análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10 °C	67
Anexo 2 -	Fotografia do coágulo formado e o seu desprendimento da parede do frasco	68
Anexo 3 -	Médias de três repetições do tempo de fermentação de leites desnatados esterilizados adicionados de <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e as duas culturas associadas sem e com concentrado protéico de soro	69
Anexo 4 -	Resultados máximos e mínimos do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C	70
Anexo 5 -	Resultados máximos e mínimos do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados fermentados por <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Weissella confusa</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Weissella confusa</i> simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C	70

RESUMO

A produção de leites fermentados no Brasil baseia-se na utilização de microorganismos iniciadores, comercializados por empresas estrangeiras. Existe um grande potencial para a utilização de bactérias fermentadoras da lactose isoladas a partir de produtos lácteos artesanais brasileiros, como o queijo de coalho. O presente trabalho teve como objetivos elaborar leites fermentados a partir de bactérias ácido-lácticas, isoladas de queijo de coalho produzido em Pernambuco, Brasil; avaliar a habilidade das bactérias *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus*, isoladas ou em associação, em fermentar o leite e resultar em produtos finais com características sensoriais distintas; avaliar a viabilidade dessas culturas, bem como as características físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados durante 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C; avaliar a aceitação dos leites fermentados sem e com concentrado protéico de soro, em dois tempos distintos, dez e 40 dias de estocagem sob refrigeração e estudar o efeito da adição de concentrado protéico do soro no tempo de fermentação do leite por estas bactérias ácido-lácticas. As curvas de fermentação obtidas a partir dos resultados de pH, acidez titulável e contagem das culturas lácticas indicaram valores de acidez titulável (%) mais altos e de pH mais baixos nos leites fermentados por *Lactobacillus acidophilus* e contagens adequadas do ponto de vista probiótico e superiores à legislação brasileira em todos os leites fermentados elaborados. Os leites fermentados por *Weissella confusa*, independentemente da adição de CPS, apresentaram tempo de fermentação maior, enquanto que os leites fermentados pelas duas culturas associadas apresentaram tempo de fermentação menor. Todos os leites fermentados elaborados, independentemente da adição de CPS, apresentaram durante 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C concentrações adequadas de microorganismos viáveis (10^8 UFC/g). Durante as análises sensoriais, os provadores não identificaram diferença no sabor entre os leites fermentados acrescidos ou não de CPS ($p>0,05$). Aos 10 e 40 dias de estocagem a 8-10°C, os leites fermentados por *Lactobacillus acidophilus* apresentaram melhor aceitação ($p<0,05$) pelos provadores. A associação das culturas de bactérias ácido-lácticas utilizadas mostrou-se potencialmente mais vantajosa na elaboração de futuros produtos comerciais, sem a necessidade de adicionar CPS e podendo ser estocados a 8-10°C por 40 dias.

Palavras chave: leites fermentados, probióticos, *Weissella confusa*, *Lactobacillus acidophilus*, concentrado protéico de soro, tempo de fermentação, análises sensoriais

ABSTRACT

The manufacture of fermented dairy products in Brazil is based on the use of starter cultures, which are commercialized by foreign companies. In spite of that, there is a great potential to exploit indigenous lactic acid bacteria, isolated from artisanal dairy products. Therefore, this work was carried out in order to produce fermented milks using lactic acid bacteria, isolated from “coalho cheese” artisanally made of raw milk in Pernambuco state, Brazil. *Weissella confusa* and *Lactobacillus acidophilus* strains, isolated from that food and previously tested according to some probiotic features were used isolatedely or in association to ferment milk, supplemented or not by whey protein concentrate (WPC). The viability of both cultures as well as the physical-chemical and microbiological characteristics of the fermented milks stored at 8-10°C were studied during 40 days. The obtained products were also submitted to a sensorial evaluation on days 10th and 40th after their preparation. Fermentation profiles plotted from results of pH, titratable acidity (%), and bacterial counts showed higher values of titratable acidity and lower values of pH in products fermented by *Lactobacillus acidophilus*. Desirable counts of microorganisms, considering their probiotic potential and higher than the minimum required by the Brazilian legislation, were recorded in all fermented milks throughout time. Products obtained by *Weissella confusa* demanded a longer fermentation time, irrespectively of WPC adding; while those fermented by both bacteria required shorter times of production. All the products showed minimum counts of viable bacteria at 10⁸CFU/g throughout the 40 days of storage at 8-10°C. WPC adding did not cause variation in the flavor of the obtained products (p>0.05). Flavor of *Lactobacillus acidophilus* fermented milk was considered better on day 10th and 40th. Indeed, the results pointed to a future probability of producing fermented milks using the tested cultures, preferably in association and without WPC adding, presenting a shelf life around 40 days if properly refrigerated.

Key-words: fermented milks, probiotics, *Weissella confusa*, *Lactobacillus acidophilus*, whey protein concentration, fermentation, sensorial analysis

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, diferentes leites fermentados têm sido encontrados à venda no mercado, incluindo produtos contendo microorganismos probióticos. A palavra grega probiótico significa “em favor da vida”. Atualmente, a definição mais aceita para probióticos é a seguinte: “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Joint FAO/WHO, 2002).

Estudos têm mostrado muitos benefícios para as pessoas que consomem os leites fermentados contendo microorganismos probióticos. Os principais benefícios são: prevenção de infecções intestinais e diarreias; efeitos anti-carcinogênicos; redução dos níveis de colesterol; e melhor digestão da lactose, principalmente por pessoas intolerantes à ela (Gilliland, 1989; Kailasapathy e Rybka, 1997; Gomes e Malcata, 1999 e Hattingh e Viljoen, 2001).

Segundo Gomes e Malcata (1999), o uso de *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados tornou-se comum no fim de 1970, como resultado do aumento dos conhecimentos a respeito da taxonomia e ecologia dessa bactéria. Segundo Shah (2000), vários produtos empregando esse microorganismo probiótico já estão bem estabelecidos no mercado.

O gênero *Weissella* foi estabelecido para abranger *Leuconostoc paramesenteroides* e alguns *Lactobacillus* heterofermentadores, que são filogeneticamente muito próximos (Collins *et al.*, 1993). Atualmente, esse gênero é composto por dez espécies: *Weissella confusa*, *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thailandensis*, *Weissella viridescens*, *Weissella cibaria* e *Weissella kimchii* (Björkroth *et al.*, 2002 e Nam *et al.*, 2002). A classificação desse

gênero é recente, pois a filogenia dessas bactérias só foi esclarecida em 1990 (Collins *et al.*, 1993). No entanto, pode-se citar esse novo gênero entre as bactérias ácido-láticas de importância nos alimentos que, recentemente, têm sido associado a vários produtos fermentados. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de descobrir novos probióticos, e o gênero *Weissella* tem sido estudado como uma possibilidade. Recentemente, alguns trabalhos mostraram a possibilidade de desenvolver probióticos a partir de alguns representantes desse grupo, como a *Weissella confusa* e a *Weissella kimchii*, para prevenção de gastrites por *Helicobacter pylori* e infecções ginecológicas nas mulheres, respectivamente (Nam *et al.*, 2002 e Lee, 2005).

A produção de leites fermentados no Brasil baseia-se na fermentação do leite utilizando microorganismos iniciadores, comercializados por empresas estrangeiras. No entanto, existe um grande potencial para a utilização de bactérias fermentadoras da lactose isoladas a partir de produtos lácteos artesanais brasileiros, como o queijo de coalho. Guedes Neto (2004) e Guedes Neto *et al.* (2005) demonstraram efeitos probióticos (antagonismo *in vitro* contra microorganismos indesejáveis e sensibilidade a antimicrobianos) de bactérias ácido láticas isoladas de queijo de coalho produzido em Pernambuco. Assim, o desenvolvimento de leites fermentados a partir destas bactérias pode viabilizar registros de patentes, além de estimular a elaboração de produtos novos, com potencial probiótico para o consumo humano.

Durante a produção de leites fermentados, algumas culturas de bactérias ácido-láticas, consideradas iniciais dentro desse processo precisam da incorporação de alguns micronutrientes. O concentrado protéico de soro é capaz de fornecer

aminoácidos essenciais e peptídeos e, com isso, reduzir o tempo de fermentação, além de aumentar a viabilidade das bactérias probióticas (Dave e Shah, 1998). A adição do concentrado protéico de soro em leites fermentados foi capaz de aumentar as contagens de *Lactobacillus acidophilus* La5, demonstrando alta qualidade sensorial desses leites durante o armazenamento sob refrigeração (Bozanic *et al.*, 2004).

Portanto, a utilização de novas culturas lácticas probióticas, como a *Weissella confusa*, aliada ao desenvolvimento de novas tecnologias de produção de leites fermentados, como a adição de novos ingredientes, podem propiciar aumento de rendimento para as indústrias e lançamento de produtos fermentados brasileiros, com maior potencial funcional.

Os objetivos deste trabalho foram: elaborar leites fermentados a partir de bactérias ácido-lácticas, isoladas de queijo de coalho produzido em Pernambuco, Brasil; avaliar a habilidade das bactérias ácido-lácticas *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus*, isoladas ou em associação, em fermentar o leite e resultar em produtos finais com características sensoriais distintas; avaliar a viabilidade dessas culturas, bem como as características físico-químicas e microbiológicas dos leites fermentados durante 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C; avaliar a aceitação dos leites fermentados sem e com concentrado protéico de soro, elaborados a partir das bactérias ácido-lácticas *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus*, em dois tempos distintos, dez e 40 dias de estocagem sob refrigeração; estudar o efeito da adição de concentrado protéico do soro no tempo de fermentação do leite por estas bactérias ácido-lácticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leites fermentados

A origem dos leites fermentados data de longo tempo, não sendo possível uma precisa definição de seu aparecimento. No início do século XX, a partir de estudos de Metchnikoff, no *Institute Pasteur* (Paris – França), as pesquisas começaram a associar a produção dos leites fermentados com o metabolismo de microorganismos lácteos. A partir destas descobertas, várias culturas lácticas foram isoladas e caracterizadas, bem como o processo de fermentação passou a ser controlado e padronizado pelas indústrias (Robinson, 1991).

“Entende-se por leites fermentados, os produtos obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microorganismos específicos.” Incluem-se entre os tipos de leites fermentados o iogurte, o leite acidófilo, o Kefir, o Kumys e a coalhada (Brasil, 2007).

Os ingredientes obrigatórios para a produção dos leites fermentados são: leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura, cultivos de bactérias lácticas e/ou cultivos de bactérias lácticas específicas. Os ingredientes opcionais permitidos são: leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra do leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos e outros ingredientes não lácteos numa proporção máxima de 30% do produto final (Brasil, 2007). Segundo os Padrões de Identidade e Qualidade dos leites fermentados (Brasil, 2007), os fermentos lácticos utilizados devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade.

Os requisitos mínimos de contagens de bactérias lácticas totais exigidos pela legislação brasileira são 10^7 UFC/g no iogurte, leite acidófilo, Kefir e Kumys e 10^6 UFC/g no leite fermentado ou cultivado e na coalhada. Quando menciona-se o uso de

bifidobactérias, a contagem mínima deverá ser 10^6 UFC/g. Os requisitos físico-químicos e microbiológicos, segundo a

legislação brasileira, encontram-se nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1: Requisitos físico – químicos oficiais para inspeção de leites fermentados

Matéria gorda láctea (g/100g) Norma FIL 116 A:1987				Acidez (g de ácido lático/100g) Norma FIL 150:1991	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado		
Min. 6,0	3,0 a 5,9	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Min. 2,9

Fonte: Brasil (2007)

Quadro 2: Critérios microbiológicos oficiais para inspeção de leites fermentados

Microorganismos	Critério de aceitação	Norma
Coliformes/g (30°C)	N=5 c=2 m=10 M=100	FIL73A:1985
Coliformes/g (45°C)	N=5 c=2 m<3 M=10	APHA 1992c.24
Bolores e leveduras/g	N=5 c=2 m=50 M=200	FIL94B:1990

Fonte: Brasil (2007)

2.2. Probióticos

2.2.1. Histórico

A utilização de microorganismos benéficos ao homem data de milhares de anos atrás. Apesar de serem utilizados empiricamente, bactérias e leveduras estavam presentes nos primeiros alimentos fermentados descobertos, provavelmente, leites fermentados, os quais já eram mencionados no Antigo testamento da Bíblia, em Gênesis 18:8, citado por Kroeger *et al.* (1989) e Fuller (1992). Posteriormente, Plínio, um historiador romano, recomendou o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites, em 76 a.C. (Robinson, 1991).

Ao longo da história, o processamento de queijos, leites fermentados (como iogurte e kefir) foram sendo melhorados e, a partir dos estudos de Elia Metchnikoff (1845-1916) em 1907, pode-se, pela primeira vez, traçar uma relação entre a fermentação do

leite e o papel das bactérias e leveduras acidificantes (Jay, 1996).

Outro pesquisador que forneceu importante contribuição ao uso de probióticos foi Tissier. Em 1906, ele recomendou a administração de bifidobactérias para crianças com diarreia, postulando que estas bactérias poderiam competir com as bactérias indesejáveis no intestino, eliminando-as e tornando-se o microorganismo intestinal dominante (Ballongue, 1993).

Adicionalmente, estudos realizados na tribo Maasai (Tanzânia – África) demonstraram que nativos que ingeriam elevadas quantidades de carnes vermelhas, mas que consumiam grandes quantidades do *Kule Naoto* (leite fermentado local, com a presença de *Lactobacillus plantarum*), raramente tinham problemas de hipercolesterolemia. O fato foi explicado pela habilidade das bactérias deste alimento desconjugarem sais biliares no intestino,

evitando sua absorção e utilização para síntese de colesterol, produzindo efeito hipocolesterolêmico (Jay, 1996).

2.2.2. Definição e características desejáveis

Richard Parker, em 1960, utilizou pela primeira vez o termo probiótico, com o significado de “a favor da vida”, de acordo com a origem grega do termo. Lilley e Stillwell (1965) utilizaram este termo para descrever substâncias secretadas por um microorganismo que estimula o crescimento de outro. Posteriormente, Fuller (1989) modificou este conceito, introduzindo nova definição, que seria “suplemento alimentar constituído de microorganismos vivos capazes de beneficiar o hospedeiro pelo equilíbrio da microbiota intestinal”. Salminen (1999) definiu probióticos como preparados de microorganismos, ou seus constituintes, que têm efeito benéfico sobre a saúde e o bem estar do hospedeiro.

Atualmente, a definição de probióticos utilizada pela Organização Mundial de Saúde e Organização de Agricultura e Alimentos é a seguinte: “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Joint FAO/WHO, 2002).

Para que um microorganismo seja selecionado e utilizado na preparação de produtos probióticos para seres humanos e de outros animais ele precisa possuir características importantes. Estas incluem: serem produzidos em ampla escala; permanecerem estáveis e viáveis durante a estocagem; serem capazes de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (acidez gástrica e sais biliares) e nele sobreviver, preferencialmente, aderindo-se à mucosa; produzir efeito benéfico ao hospedeiro (atividade antimicrobiana contra patógenos; reduzir a adesão de patógenos; apresentar atividade hidrolítica sobre sais

biliares e contribuição nutricional); modular a atividade imunológica e a produção de toxinas, e não ser patogênico (Fuller, 1989; Joint FAO/WHO, 2003).

A adesão às células do hospedeiro pode ser uma característica desejável dos candidatos a probióticos, uma vez que possuindo esta habilidade, seus efeitos podem ser mantidos por longo período, sem a necessidade da contínua administração dos microorganismos, como acontece com aqueles que não permanecem no hospedeiro. A hidrofobicidade da superfície da célula microbiana é uma característica que indica seu potencial de adesão às mucosas, sendo que elevados valores indicam maior habilidade de adesão (Gusils *et al.*, 1999).

De acordo com FAO/WHO (2002), os microorganismos utilizados como probióticos apresentam relação espécie-específica com o hospedeiro; devem ser identificados genotípica e fenotipicamente, e precisam ter seus efeitos sobre a saúde investigados, a fim de se constatar a segurança do microorganismo. Devido ao grande interesse em utilizar bactérias como probióticos ou como culturas iniciais na elaboração de produtos lácteos, a identificação precisa desses microorganismos até o grau de espécie é considerada um pré-requisito para a seleção de novas amostras de bactérias isoladas (Moreira *et al.* 2005).

2.2.3. Efeitos benéficos

O consumo de leites fermentados está bastante ligado às características terapêuticas desses produtos. Para garantir esses efeitos, o produto fermentado deve conter, no momento do consumo, no mínimo 10^6 UFC/g de bactérias probióticas, pois a dose diária mínima recomendada está entre 10^8 e 10^9 UFC. Dessa forma, se 100g do leite fermentado contendo entre 10^6 a 10^7 UFC/g fossem consumidos diariamente, a

dose diária mínima igual a 10^8 - 10^9 UFC seria atendida (Rasic e Kurmann, 1983; citado por Gomes e Malcata, 1999). Para que um microorganismo possa exercer a sua ação probiótica em um determinado habitat, é necessário que o mesmo esteja em nível populacional adequado, por isso, a recomendação da dose diária mínima de consumo. Segundo, Nicoli (1995) para que tais efeitos ocorram, deve haver no trato gastrointestinal pelo menos, 10^7 UFC/g de conteúdo intestinal.

Várias pesquisas têm mostrado muitos benefícios para os consumidores de leites fermentados contendo probióticos. Os principais benefícios nutricionais e terapêuticos, já relatados, foram: prevenção de infecções intestinais, prevenção de diarreias, efeitos anti-carcinogênicos, redução dos níveis de colesterol e melhor digestão da lactose, principalmente por pessoas intolerantes à ela, devido aos níveis menores de lactose nesses produtos fermentados. Todos esses benefícios foram muito bem revisados por vários autores como Gilliland (1989), Kailasapathy e Rybka (1997), Gomes e Malcata (1999) e Hattingh e Viljoen (2001).

O interesse pelos efeitos terapêuticos dos leites fermentados contendo lactobacilos e outras bactérias ácido-láticas nas desordens gastrointestinais de humanos e outros animais ocorre há muitos anos (Shahani e Chandan, 1979). A atividade antibacteriana dos lactobacilos contra microorganismos patogênicos é atribuída às substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por esses microorganismos (bacteriocinas), ao ácido lático e outros ácidos orgânicos e à produção de peróxido de hidrogênio (González *et al.*, 1993). *Lactobacillus* spp. são predominantemente isolados no ecossistema vaginal de mulheres saudáveis. Esses microorganismos têm efeito protetor contra a colonização de microorganismos patogênicos, devido principalmente à

toxicidade do peróxido de hidrogênio produzido pelos lactobacilos (Ocana *et al.*, 1999 e Beigi *et al.*, 2005).

Leites fermentados podem apresentar maiores níveis de aminoácidos livres e vitaminas em relação aos leites não fermentados (Gomes e Malcata, 1999). A proporção maior de aminoácidos livres nesses produtos deve-se à atividade proteolítica das culturas lácticas, que digere parcialmente as proteínas durante a fermentação. Os teores de vitaminas mais altos no produto final podem ser observados porque algumas culturas têm a capacidade de sintetizar vitamina B e ácido fólico durante a fermentação (Buttriss, 1997).

Outras aplicações terapêuticas ou profiláticas, já descritas, incluem tratamento de hipersensibilidade alimentar, alergias, dermatites atópicas, candidíase vaginal, infecções do sistema gênito-urinário inferior ou respiratório superior (Ouweland e Salminen, 1998 e Salminen, 1998).

2.3. O gênero *Lactobacillus*

2.3.1. Características gerais

Os representantes do gênero *Lactobacillus* possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum. Eles são bastonetes Gram-positivo, catalase negativa, imóveis, não formadoras de esporos, sem citocromo, microaerófilos, nutricionalmente exigentes, tolerantes à acidez, com metabolismo estritamente fermentativo, sendo o ácido lático o principal produto do seu metabolismo de carboidratos (Robinson, 1991; Jay, 1996).

Em relação ao metabolismo fermentativo, as espécies do gênero *Lactobacillus* podem ser classificadas como: homofermentativas obrigatórias (convertem hexoses em ácido lático via Embden-Meyerhof Parnas, sendo incapazes de utilizar as pentoses);

heterofermentativas facultativas (fermentam hexoses em ácido láctico, e no caso de algumas espécies e sob certas circunstâncias, em ácidos láctico, acético e fórmico e etanol, sendo capazes de fermentar pentoses em ácidos láctico e acético) e heterofermentativas obrigatórias (utilizam hexoses para obter ácidos láctico e acético, etanol e dióxido de carbono; e pentoses para obter ácidos láctico e acético) (Jay, 1996 e Vandame *et al.* 1996).

Os lactobacilos são naturalmente encontrados em *habitats* ricos, como vegetais, grãos e na microbiota do trato gastrointestinal, trato respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais (Kandler e Weiss, 1986 e Salminen, 1998).

O gênero *Lactobacillus* é reconhecido como um grupo de microorganismos seguro para serem utilizados em alimentos (Lee e Salminen, 1995). Por isso, são também parte da microbiota de muitos alimentos fermentados, como queijo, iogurte, kefir, salame, polvilho, azeitonas, *pickles*, molhos ácidos, etc (Jay, 1996).

Entre os microorganismos do gênero *Lactobacillus*, a espécie *Lactobacillus acidophilus* é considerada uma das amostras mais utilizadas em produtos lácteos contendo probióticos (Gomes e Malcata, 1999).

2.3.2. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus é um bastonete Gram-positivo que pode ocorrer isolado, assim como em pares ou em cadeias curtas. O tamanho típico é 0,6 – 0,9 µm de largura e 1,5 – 6,0 µm de comprimento. Este microorganismo é considerado homofermentador obrigatório, quanto ao seu metabolismo (Vandame *et al.* 1996), não contém citocromos e, por isso, é benzidina negativo. Além disso, é um microorganismo microaerófilo, tanto que o

crescimento superficial em meio sólido é, geralmente, favorecido pela anaerobiose, pela redução da pressão de oxigênio ou manutenção de 5 a 10% de CO₂. A maioria das amostras de *Lactobacillus acidophilus* pode fermentar amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose, trealose e esculina (Robinson, 1991).

O crescimento do *Lactobacillus acidophilus* pode ocorrer em temperaturas como 45°C, embora o crescimento ótimo seja em torno de 35-40°C. A tolerância de *Lactobacillus acidophilus* ao ácido varia de 0,3% até 1,9%, sendo que o pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 5,5-6,0 (Gomes e Malcata, 1999). Ainda de acordo com os mesmos autores, ao revisarem as condições de cultivo exigidas por essa espécie para um efetivo crescimento da mesma, observaram um requerimento complexo de nutrientes como carboidratos fermentáveis; proteínas e produtos da degradação de proteínas; vitaminas do complexo B; derivados do ácido nucléico; ácidos graxos livres insaturados; e alguns minerais, como magnésio e manganês.

Atualmente, vários produtos fermentados comerciais (Quadro 3) são elaborados a partir dessa cultura e o consumo desses alimentos está, geralmente, relacionado às suas propriedades probióticas. Suskovic *et al.* (1997) avaliaram as propriedades probióticas da amostra *Lactobacillus acidophilus* M92 e observaram atividade antibacteriana contra alguns microorganismos patogênicos e tolerância alta dessa amostra ao sais biliares e às condições de acidez no trato gastrointestinal. Foi encontrada descrita na literatura consultada, a capacidade que o *Lactobacillus acidophilus* possui em inibir o crescimento de *Candida albicans*, tendo, por isso, efeito preventivo nas candidíases vaginais (Ouwehand e Salminen, 1998). Foi verificado, também, que leites fermentados utilizando *Lactobacillus acidophilus* e

Lactobacillus casei associados podem ser utilizados na prevenção e tratamento de infecções intestinais e no restabelecimento da microbiota intestinal normal após longos períodos de tratamento com antibióticos via oral (González *et al.*, 1993). As amostras *Lactobacillus acidophilus* LC1 e NFCO1748 foram descritas apresentando como efeitos probióticos: aumento da imunidade, prevenção de diarreias e constipação e promoção do equilíbrio da microbiota intestinal (Lee e Salminen, 1995).

De acordo com os Padrões de Identidade e Qualidade de leites fermentados (Brasil, 2007), o leite fermentado obtido pela fermentação exclusiva de cultivos de *Lactobacillus acidophilus* é denominado leite acidófilo. No entanto, as amostras probióticas de *Lactobacillus acidophilus* podem, também, ser adicionadas associadas a outras espécies de bactérias ácido-láticas durante a elaboração dos produtos lácteos fermentados (Quadro 3).

Quadro 3: Produtos comerciais contendo amostras de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*)

Produto	País de origem	Microorganismos
Leite acidófilo	Vários países	<i>L. acidophilus</i>
A-38	Dinamarca	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus</i> sp.
Progurt	Vários países	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Lactococcus</i> sp.
Leite acidófilo com leveduras	Rússia	<i>L. acidophilus</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>S. cerevisiae</i>
A-B Yoghurt	França	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Cultura	Dinamarca	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Milky	Itália	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Nu-Trish A/B Milk	EUA	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i>
Biomild	Vários países	<i>L. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp.
Iogurte acidófilo	Vários países	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
B-Active	França	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biogarde	Alemanha	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biogurte	Alemanha	<i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biokys	República Tcheca	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Mil-Mil	Japão	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Akult	Japão	<i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>

Fonte: adaptação de vários autores por Gomes e Malcata (1999).

B. bifidum: *Bifidobacterium bifidum*; *B. breve*: *Bifidobacterium breve*; *L. acidophilus*: *Lactobacillus acidophilus*; *L. casei* ssp. *casei*: *Lactobacillus casei* ssp. *casei*; *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*; *L. mesenteroides* ssp. *cremoris*: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*; *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

2.4. O gênero *Weissella*

2.4.1. Taxonomia

No passado, os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* eram considerados distintos, com pouca possibilidade de sobreposição entre eles. No entanto, estudos filogenéticos recentes mostraram que existe uma inter-relação significativa entre esses gêneros de microorganismos (Stiles e Holzapfel, 1997).

Os *Lactobacillus*, quanto aos testes fenotípicos, são subdivididos em três grupos fermentativos: os obrigatoriamente homofermentadores, os heterofermentadores facultativos e os obrigatoriamente heterofermentadores. Eles podem, também, ser subdivididos em três grupos filogenéticos principais: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei-pediococcus* e *Leuconostoc* (Vandame *et al.*, 1996).

Martinez-Murcia e Collins (1990 e 1991), citados por Martinez-Murcia *et al.* (1993), mostraram pelo seqüenciamento do gen que codifica a subunidade ribossomal 16S, que o gênero *Leuconostoc* é composto por três linhas genéticas diferentes: *Leuconostoc sensu stricto*, *Leuconostoc paramesenteroides* (que inclui também alguns *Lactobacillus* heterofermentadores, como *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus halotolerans* e *Lactobacillus viridescens*) e *Leuconostoc oenos*.

Martinez-Murcia *et al.* (1993) obtiveram os mesmos resultados que Martinez-Murcia e Collins (1990 e 1991), após determinar o seqüenciamento genético das subunidades 23S de três linhagens diferentes de

Leuconostoc. Por isso, ressaltaram a importância de separar o *Leuconostoc paramesenteroides* como um novo gênero.

Collins *et al.* (1993) investigaram a relação de espécies reconhecidas do gênero *Leuconostoc* com outras bactérias ácido-láticas, pelo seqüenciamento genético das subunidades ribossomais 16S de microorganismos isolados de salsicha grega. Esses microorganismos isolados assemelhavam-se ao *Leuconostoc* spp. por produzirem ácido láctico D(-), mas diferiam de muitas espécies pertencentes a esse gênero, em vários testes bioquímicos. O seqüenciamento das subunidades ribossomais 16S, juntamente às análises dos valores correspondentes às distâncias evolucionárias (K_{nuc}) entre os microorganismos isolados, *Leuconostoc* spp. e as bactérias ácido-láticas, evidenciaram que essas bactérias desconhecidas (isoladas das salsichas) tinham uma forte relação filogenética com o grupo do *Leuconostoc paramesenteroides*. Dessa forma, Collins *et al.* (1993), baseando-se em seus resultados e em pesquisas anteriores (Martinez-Murcia e Collins, 1990 e 1991 e Martinez-Murcia *et al.*, 1993), propuseram que o *Leuconostoc paramesenteroides* e, que espécies relacionadas, fossem classificados em um novo gênero, o qual eles propuseram que se chamasse *Weissella*. Além disso, as bactérias isoladas das lingüiças gregas, citadas anteriormente, foram reconhecidas como uma nova espécie, sendo identificadas como *Weissella hellenica*. A Tabela 1 mostra a designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella* e a Figura 1 mostra as inter-relações entre os membros do gênero *Weissella* com outras bactérias ácido-láticas.

Tabela 1: Designação de espécies de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* para o novo gênero *Weissella*

Grupo paramesenteroides	Nova designação: gênero <i>Weissella</i>
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>
<i>Lactobacillus confusus</i>	<i>Weissella confusa</i>
<i>Lactobacillus halotolerans</i>	<i>Weissella halotolerans</i>
<i>Lactobacillus kandleri</i>	<i>Weissella kandleri</i>
<i>Lactobacillus minor</i>	<i>Weissella minor</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i>

Fonte: Collins *et al.* (1993)

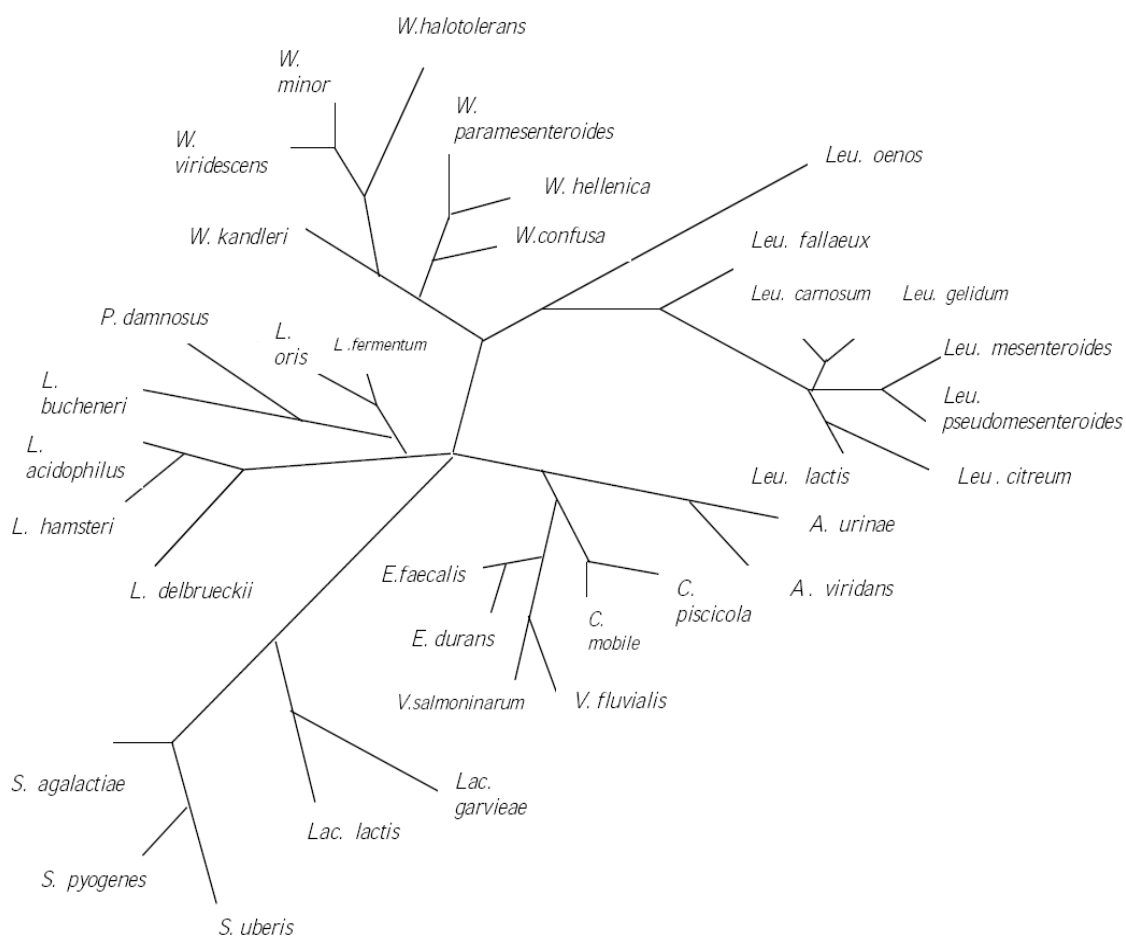


Figura 1: Árvore filogenética mostrando as inter-relações entre os membros do gênero *Weissella* com outras bactérias ácido-láticas.

A, *Aerococcus*; C, *Carnobacterium*; E, *Enterococcus*; L., *Lactobacillus*; Lac., *Lactococcus*; Leu., *Leuconostoc*; P, *Pediococcus*; S, *Streptococcus*; V, *Vagococcus*; W, *Weissella*

Fonte: Collins *et al.* (1993)

2.4.2. Morfologia

As bactérias pertencentes ao gênero *Weissella* apresentam, geralmente, a forma pares, isoladas ou em pequenos grupos. As células são Gram-positivo, não possuem de bastonetes ou cocos, podendo ocorrer em

motilidade e não têm a capacidade de formar esporos (Collins *et al.*, 1993). A Tabela 2 mostra as diferenças morfológicas entre as espécies do gênero *Weissella*.

Tabela 2: Características morfológicas de espécies do gênero *Weissella*

Microorganismo	Morfologia
<i>Weissella kandleri</i>	Bastonetes irregulares
<i>Weissella viridescens</i>	Pequenos bastonetes
<i>Weissella minor</i>	Bastonetes com extremidades arredondadas e estreitadas
<i>Weissella halotolerans</i>	Coco/bastonetes
<i>Weissella confusa</i>	Bastonetes
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Esférica ou lenticular
<i>Weissella helênica</i>	Esférica grande ou lenticular
<i>Weissella cibaria</i>	Bastonetes curtos
<i>Weissella thailandensis</i> ¹	Cocos

Fonte: Collins *et al.* (1993)

1- Descrita por Tanasupawat *et al.* (2000).

2.4.3. Características de cultivo

As bactérias pertencentes ao gênero *Weissella*, assim como os *Lactobacillus*, são microaerófilos. O crescimento ocorre na superfície do meio sólido e acentua-se em condições de anaerobiose ou pressão reduzida de O₂, associado a concentrações de CO₂ entre 5 e 10% (Kandler e Weiss, 1986).

Segundo Kandler e Weiss (1986), os nutrientes essenciais para o crescimento das espécies que, na classificação antiga pertenciam ao gênero *Lactobacillus* são, normalmente, encontrados no meio MRS, onde estão presentes os carboidratos fermentáveis, a peptona e o extrato de carne e leveduras.

Muitos pesquisadores utilizaram o caldo e o ágar MRS para cultivar as espécies

pertencentes à *Weissella* e observaram o crescimento efetivo, inclusive da *Weissella paramesenteroides* (Collins *et al.*, 1993; Martinez-Murcia *et al.*, 1993; Samelis *et al.*, 1994; Morea *et al.*, 1998; Paludan-Müller *et al.*, 1999; Corsetti *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2001; Björkroth *et al.*, 2002; Mugula *et al.*, 2002; Muyanjanja *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2005).

Weissella spp. cresce a 15°C, com exceção da *Weissella confusa* que cresce a 45°C (Collins *et al.*, 1993). Além de crescer sob essa temperatura, a *Weissella confusa* se distingue por crescer em ágar formando colônias muito diferentes daquelas formadas pelas outras espécies, por serem viscosas (Kandler e Weiss, 1986).

As amostras de *Weissella cibaria* crescem a 15, 37 e 45°C. Segundo Björkroth *et al.* (2002), amostras que foram isoladas de espécimes clínicas e alimentos fermentados

diferem da maioria das outras espécies do gênero *Weissella* por serem, também, capazes de crescer a 45°C. Como citado anteriormente, essa característica só havia sido relatada em amostras de *Weissella confusa* (Collins *et al.*, 1993). Em meio contendo 6,5% de NaCl, somente algumas amostras da espécie *Weissella cibaria* foram capazes de crescer. Entretanto, em meio adicionado de 8% desse composto, foi observado o crescimento de todos os representantes dessa espécie (Bjorkroth *et al.*, 2002).

Weissella hellenica não cresce a 37°C e apresenta crescimento lento a 10°C e 4°C. Há crescimento dessa espécie em meio enriquecido com 8% de NaCl, e não em meio com 10% de NaCl ou ágar acetato. Em caldo MRS, o crescimento é lento, com tendência das células se precipitarem. As colônias formadas são, freqüentemente, pontos minúsculos arredondados e branco acinzentados (Collins *et al.*, 1993).

Os representantes da espécie *Weissella thailandensis* crescem em meio com 10% de NaCl e no intervalo de temperatura correspondente a 25 e 37°C, não sendo capazes de crescer a 42°C. Esses microorganismos crescem também em pH 8,0 (Tanasupawat *et al.*, 2000).

Weissella halotolerans apresenta um bom crescimento na presença de 12% de NaCl, e um crescimento mais expressivo quando a concentração desse sal se eleva a 14% (Kandler *et al.*, 1983, citados por Kandler e Weiss 1986).

Weissella viridescens é uma espécie que requer alguns fatores de crescimento essenciais, como tiamina, biotina e riboflavina. O ácido fólico é considerado um estimulante do crescimento para essa espécie (Niven e Evans, 1957, citados por

Kandler e Weiss, 1986).

Weissella paramesenteroides cresce bem a 30°C, mas algumas amostras preferem temperaturas mais baixas, entre 18 e 24°C. O requerimento de alguns fatores para seu crescimento é alto, destacando-se a riboflavina, a piridoxina e o ácido fólico. É uma espécie mais tolerante ao NaCl e a pH mais baixo, sendo capaz de crescer em meio com pH inicial inferior a 5,0 (Garvie, 1967, citado por Garvie, 1986).

2.4.4. Metabolismo

As espécies do gênero *Weissella* são heterofermentadoras obrigatórias, isto é, as hexoses são fermentadas resultando em CO₂, ácido láctico e etanol ou ácido acético e as pentoses são fermentadas em ácido láctico e ácido acético (Garvie, 1986). Esses microorganismos não possuem catalase, nem o sistema citocromo. Com exceção de *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* e *Weissella thailandensis* que produzem ácido láctico D (-), todas as outras espécies deste gênero produzem isômeros lactato DL a partir da glicose (Collins *et al.*, 1993 e Tanasupawat *et al.*, 2000). O Quadro 4 mostra as características metabólicas de cada espécie pertencente ao gênero *Weissella*.

2.4.5. Isolamento e Identificação

2.4.5.1. Isolamento

O isolamento das bactérias do gênero *Weissella* pode ser feito em ágar MRS ou em ágar APT, “all purpose tween”, que contém triptona, tiamina, extrato de levedura, glicose, “tween”, sulfato ferroso, cloreto de sódio e outros sais (Evans e Niven, 1951). O ágar APT é, geralmente, usado para o isolamento de *Weissella viridescens* (Kandler e Weiss, 1986).

quadro metabólico colocar página

Entretanto, vários pesquisadores obtiveram com sucesso o isolamento e crescimento de várias espécies em ágar MRS, como a *Weissella confusa* (Johansson *et al.*, 1995, Paludan-Müller *et al.*, 1999, Corsetti *et al.*, 2001, Mugula *et al.*, 2002 e Muyanja *et al.*, 2002); *Weissella minor*, *Weissella halotolerans*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella hellenica* (Collins *et al.*, 1993) e *Weissella viridescens* (Samelis *et al.*, 1994).

2.4.5.2. Identificação

Segundo Vandame *et al.* (1996), a identificação de um microorganismo desconhecido requer a combinação de várias metodologias. Atualmente, existem técnicas avançadas como aquelas que utilizam princípios da biologia molecular, porém, alguns testes bioquímicos devem ser realizados antes dessas técnicas, com o objetivo de ter, primeiramente, uma caracterização fisiológica do microorganismo.

Os testes bioquímicos mais utilizados incluem reação de Gram, produção de catalase, capacidade de crescer em meios sob temperaturas diferentes, produção de peróxido de hidrogênio, tipos de carboidratos fermentáveis, configuração dos ácidos lácticos formados, capacidade de hidrolisar amônia e habilidade em formar polissacarídeos (dextran), a partir da sacarose (Kandler e Weiss, 1986; Collins *et al.*, 1993 e Bjorkroth *et al.*, 2002).

Além dos testes bioquímicos, técnicas como a análise da composição de bases do DNA e análise da parede celular, quanto à composição da estrutura peptidoglicana, contribuem muito para a identificação da espécie, por serem critérios bastante espécie – específicos (Bjorkroth *et al.*, 2002). O Quadro 5 mostra os aminoácidos que formam a estrutura peptidoglicana da parede celular e, também, as diferenças de bases que compõem o DNA de cada espécie do gênero *Weissella*.

Quadro 5: Sequência de aminoácidos da estrutura peptidoglicana da parede celular e a composição de bases do DNA (mol %) de espécies do gênero *Weissella*

Microorganismo	Peptidioglicano	G + C (%Mol)
<i>Weissella kandleri</i> ¹	Lis- Ala- Gli- Ala ₂	39
<i>Weissella viridescens</i> ¹	Lis- Ala- Ser	41 – 44
<i>Weissella minor</i> ¹	Lis- Ser- Ala ₂	44
<i>Weissella halotolerans</i> ¹	Lis- Ala- Ser	45
<i>Weissella confusa</i> ¹	Lis- Ala	45 – 47
<i>Weissella paramesenteroides</i> ²	L- Lis- L- Ser- L- Ala ₂ ; L- Lis- L- Ala ₂	37 – 38
<i>Weissella cibaria</i> ³	A3□; L- Lis- L- Ala- L- Ala	44 – 45
<i>Weissella hellenica</i> ⁴	Lis- L- Ala- L- Ser	39,4 – 40
<i>Weissella thailandensis</i> ⁵	L- Lis- L- Ala ₂	38 – 41,2

Fonte: ¹ Kandler e Weiss (1986), ² Garvie (1986), ³ Bjorkroth *et al.* (2002), ⁴ Collins *et al.* (1993), ⁵ Tanasupawat (2000)

As técnicas de identificação molecular incluem a extração do DNA total, seguida pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A partir do produto de PCR, pode-se

identificar o microorganismo pelo seqüenciamento da região gênica 16S – 23S ou pelo perfil de restrição enzimática dessa região gênica. Como resultado dos avanços

nas metodologias de seqüenciamento dos ácidos nucléicos, o seqüenciamento de fragmentos de DNA que codificam a produção das subunidades ribossomais tornou-se uma ferramenta de grande importância para a identificação de espécies de microorganismos. Segundo Collins *et al.* (1993), o número de nucleotídeos diferentes é, significativamente, maior entre duas espécies quando comparado a amostras da mesma espécie.

Muitos trabalhos conseguiram, a partir dessas técnicas da biologia molecular, identificar novas espécies do gênero *Weissella*, e contribuir bastante para a evolução taxonômica desse novo gênero (Collins *et al.*, 1993; Martinez-Murcia *et al.*, 1993; Tanasupawat *et al.*, 2000 e Bjorkroth *et al.*, 2002).

2.4.6. *Weissella confusa*

Weissella confusa já foi isolada a partir da cana de açúcar e do suco de cenoura, podendo ser encontrada, ocasionalmente, em leite cru, saliva e, também, em rede de esgoto (Kandler e Weiss, 1986). Pesquisadores, mais recentemente, isolaram essa mesma espécie a partir de amostras de alho e folhas de bananeira (Paludan-Müller *et al.*, 1999); na bebida fermentada chamada *ogi*, que é consumida por crianças e adultos da Nigéria e que representa uma parcela significativa da dieta dessas pessoas (Johansson *et al.*, 1995); em pães tradicionais da região da Apúlia, sul da Itália, que são feitos à base de *sourdough*, um tipo importante de trigo fermentado (Corsetti *et al.*, 2001); no *togwa*, um alimento fermentado produzido artesanalmente na Tanzânia, África (Mugula *et al.*, 2002); no *bushera*, uma bebida fermentada não alcoólica, típica das regiões montanhosas do oeste de Uganda, África (Muyanja *et al.*, 2002) e em queijo coalho produzido artesanalmente a partir de

leite cru em Pernambuco, Brasil (Guedes Neto, 2004).

A *Weissella confusa* já foi isolada de fezes humanas (Tannock *et al.*, 1999 e Walter *et al.*, 2001) e, também, de amostras de biópsia do cólon humano (Nielsen *et al.*, 2003), o que indica a presença dessa espécie na microbiota do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis. O isolamento de *Weissella confusa*, principalmente de partes do cólon humano, é um fato de grande relevância, pois a aderência à mucosa do cólon é uma característica desejável aos microorganismos probióticos.

Segundo Tong *et al.* (2007), estudos recentes indicaram resultados positivos da associação de microorganismos probióticos à terapia utilizada contra *Helicobacter pylori*, como aumento da taxa de erradicação desse microorganismo no trato gastrointestinal e, principalmente redução dos efeitos colaterais, como diarreia, náuseas e perda de apetite, provenientes da terapia com antimicrobianos. Os microorganismos probióticos mais estudados, atualmente, quanto aos seus efeitos benéficos são as bactérias ácido-láticas, principalmente os *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. Nam *et al.* (2002) avaliaram mais de 100 bactérias ácido-láticas isoladas de fezes de crianças com o objetivo de determinar quais amostras apresentariam atividade antagonista “in vitro” contra o *Helicobacter pylori*. Observou-se maior atividade na amostra identificada como *Weissella confusa* PL9001, baseando-se na sua capacidade de inibir o crescimento e a aderência do *Helicobacter pylori* à mucosa gástrica. Esses resultados demonstraram a possibilidade de se desenvolver um novo probiótico para o estômago com essa amostra.

2.5. O concentrado protéico de soro lácteo (CPS)

2.5.1. Características gerais

As principais proteínas do soro lácteo são: α - lactoalbumina e β - lactoglobulina, que constituem, aproximadamente, 25 e 55% do total de proteínas, respectivamente. Elas podem ser desnaturadas pelo calor e

interagirem, resultando em coagulação ou formação de gel, dependendo da concentração protéica, do pH, composição iônica e temperatura (Morr, 1992).

O CPS é um produto mais recente, que foi desenvolvido no século XX, no final da década de 60 e início da década de 70 (Huffman e Harper, 1999). A Figura 2 mostra as etapas de produção do CPS.

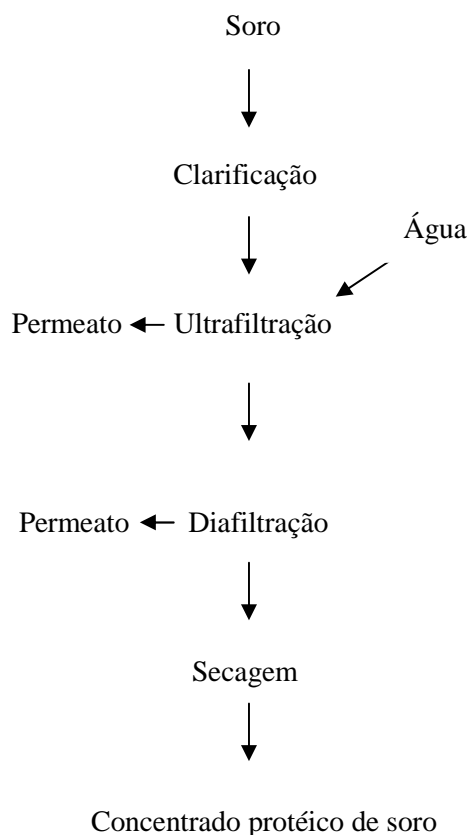


Figura 2: Fluxograma simplificado da produção do concentrado protéico de soro
Fonte: Huffman e Harper (1999)

O teor de proteína nos concentrados protéicos de soro lácteo varia de 34 a 85%, conforme mostra a Tabela 3. O CPS com 35% de proteína do total de sólidos é, principalmente, utilizado como substituto do leite desnatado em alimentos para humanos e, também, em rações para outros animais. Os concentrados protéicos com

maior teor protéico são usados, exclusivamente, na alimentação humana, sendo a indústria de laticínios o setor que mais emprega esse concentrado, seguido por padarias e indústria de produtos cárneos (Cunningham, 1995; citado por Wit, 1998).

Tabela 3: Composição típica de produtos derivados do soro lácteo

Constituinte	Soro em pó	CPS 34	CPI 80	Lactoalbumina	PIS
Proteína %	13	34	80	90	92
Lactose %	75	53	6	0,5	1
Cinzas %	8	7	3	0,5	2
Gordura %	1	3	7	4	1
Umidade %	3	3	4	4	4

Fonte: Huffmam e Harper (1999)

CPS = concentrado protéico de soro; PIS = proteína isolada de soro.

2.5.2. Propriedades funcionais

As proteínas do soro lácteo são bem conhecidas pelo seu valor nutricional alto e por suas propriedades funcionais versáteis em produtos alimentícios (Morr *et al.*, 1973; Yamauchi *et al.*, 1980; Smithers *et al.*, 1996; Mcintosh *et al.*, 1998 e Wit, 1998).

As propriedades funcionais dos CPS de interesse para a indústria alimentícia são: capacidade de formarem gel e interagirem com a água; serem emulsificantes, espumantes e estáveis ao calor; bem como as propriedades relacionadas com o sabor e textura (Mangino, 1984).

A capacidade de formar gel é importante para a inclusão do CPS em vários produtos alimentícios. Segundo Mangino (1992), essa característica, provavelmente, continuará sendo a característica funcional mais importante dos concentrados protéicos de soro.

A propriedade emulsificante benéfica das proteínas do soro lácteo permite a introdução dos glóbulos de gordura como elementos estruturais no gel protéico, formado pela indução do calor. Além disso, sabe-se que as interações entre as proteínas do soro e a caseína induzidas pelo calor tornam o leite uma interessante matéria prima para todos os tipos de produtos com textura e com alto valor nutricional (Wit, 1998).

Segundo Wit (1998), o comportamento das proteínas do soro nos produtos alimentícios é uma outra característica que poderia ser definida como funcionalidade protéica. Essa característica reflete a maneira como as proteínas interagem com os outros componentes do alimento, como açúcares, sal e outras proteínas. Essas interações são influenciadas pelos efeitos do processamento como homogeneização, calor, resfriamento e condições de armazenamento.

De acordo com Kessler (1998), nenhum outro constituinte do leite tem tanta influência nas propriedades estruturais e organolépticas dos produtos lácteos fermentados como a caseína e as proteínas do soro. A combinação de novas técnicas de processamento e mudanças na composição, pH e composição iônica podem originar novos produtos com aumento do potencial de suas propriedades funcionais.

2.5.3. Efeito em leites fermentados

Bactérias probióticas crescem muito devagar no leite devido à falta de atividade proteolítica (Klaver *et al.*, 1993; citados por Dave e Shah, 1998). Devido a isso, leites fermentados somente com culturas de *Lactobacillus acidophilus* ou de *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias podem ser produzidos, mas apresentam um longo tempo de fermentação e qualidade final comprometida (Shah, 2000).

Com o objetivo de reduzir o tempo de fermentação dos leites fermentados probióticos, culturas lácticas do iogurte são adicionadas nesses produtos. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, no entanto, produz ácido láctico durante a refrigeração desses produtos, processo conhecido como pós – acidificação, que afeta a viabilidade das bactérias probióticas (Dave e Shah, 1998).

Segundo Dave e Shah (1998), algumas culturas iniciais dos leites fermentados podem precisar da incorporação de alguns micronutrientes (peptídeos e aminoácidos) usando, por exemplo, o CPS, que reduz o tempo de fermentação e aumenta a viabilidade das bactérias probióticas. Por isso, estudando o crescimento e viabilidade de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias em leite fermentado adicionado com 2% de CPS, Dave e Shah (1998), observaram um menor tempo de fermentação (9 horas) em relação ao grupo controle (12 horas), adicionado com 2% de leite em pó desnatado. O crescimento e multiplicação do *Streptococcus thermophilus* foi mais rápido no leite fermentado suplementado com o CPS, o que poderia ser a razão para esse tempo de fermentação ser menor. Durante 35 dias de armazenamento de leites fermentados sob refrigeração a 4°C, os autores observaram um ligeiro declínio nas contagens de *Streptococcus thermophilus* no grupo controle e um aumento dessas contagens nos produtos adicionados com o CPS. As contagens de *Lactobacillus acidophilus* no primeiro dia de armazenamento dos leites adicionados com o CPS foram inferiores aos leites fermentados pertencentes ao grupo controle. Provavelmente, o menor tempo de fermentação observado nos leites com o concentrado protéico, não permitiu o crescimento extensivo dos *Lactobacillus*. Foi verificado, também, um declínio constante dessas contagens em todos os produtos, durante todo o período de

refrigeração, permanecendo sempre superior a 10^5 UFC/g nesse período. Com relação às bifidobactérias, a viabilidade dessas bactérias foi maior na presença do CPS, quando comparado ao leite fermentado controle. Dave e Shah (1998), após avaliarem os resultados das análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) e os resultados da viabilidade das culturas, concluíram que a fonte de nitrogênio, nas formas dos peptídeos e aminoácidos, está relacionada com o aumento da viabilidade das bifidobactérias em leites fermentados preparados, também, com culturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*. Portanto, proteínas e peptídeos parecem serem responsáveis pelas diferenças na viabilidade das bactérias nos leites fermentados adicionados com vários ingredientes, além de serem responsáveis pelo tempo gasto até que se alcance o pH 4,5 durante a fermentação desses produtos.

Bozanic *et al.* (2004) avaliaram o efeito da adição de 2% de CPS ou 2% de leite em pó sobre a qualidade do leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* La5. As adições de leite em pó e CPS aumentaram as contagens de *Lactobacillus acidophilus* La5 nos leites fermentados. No nono dia de estocagem, esses leites fermentados apresentaram contagem desses microorganismos igual a $1,65 \times 10^8$ UFC/g. Os autores destacaram uma importância terapêutica para esse fato, pois esses produtos apresentaram mais do que 1×10^6 UFC/g de bactérias probióticas. Portanto, o CPS teve uma forte influência no aumento das contagens de *Lactobacillus acidophilus* La5, pois as proteínas do soro lácteo estimulam o crescimento dessas bactérias, funcionando como uma fonte adicional de aminoácidos necessários. Foi demonstrado, também, qualidade sensorial alta desses leites fermentados durante todo período de refrigeração analisado (nove dias a 5°C).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Análises Físico-químicas, Análises Microbiológicas e Análises Sensoriais do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da UFMG, no período de fevereiro a dezembro de 2007.

3.1. Controle de qualidade do leite em pó desnatado

A opção de elaborar leites fermentados com leite em pó desnatado seria justificada pela associação das características probióticas das culturas utilizadas à imagem positiva do consumo de leite desnatado pelos consumidores, atualmente. A determinação da qualidade físico-química e microbiológica dos lotes de leite em pó desnatado teve como objetivo caracterizar o leite utilizado e conseqüentemente garantir o controle de qualidade da produção dos leites fermentados. Para realização dos experimentos foram utilizados quatro lotes diferentes de leite em pó desnatado da marca Molicó (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil). Foram feitas, em duplicata, as seguintes análises físico-químicas: determinações de pH, acidez titulável, gordura, proteína, umidade, extrato seco total e extrato seco desengordurado (Brasil, 2006). Para o controle microbiológico, foram realizadas, em duplicata, as análises de contagem global de mesófilos aeróbios (UFC/ml), pesquisas de coliformes totais e fecais (NMP/ml), *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp. preconizados no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leite em pó (Brasil, 1996), além da contagem de bolores e leveduras. 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).

3.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído, com ou sem a adição de concentrado protéico de soro e tratado termicamente

O leite em pó desnatado foi reconstituído a 10% em água destilada, adicionado de sacarose a 8% e acrescido a 2% ou não de concentrado protéico de soro (CPS) (WPC 033RQL, Estabgem (Gemacon®, Juiz de Fora, MG) contendo mínimo de 33,0 % de proteínas lácteas, 3,5 a 3,6 de umidade e pH entre 6,5 a 7,5) foi submetido a tratamento térmico a 110°C por 10 minutos. Após este processo, foi feito, em duplicata, o plaqueamento em meio MRS (Difco, *Detroit, Michigan, United States*) da diluição 10⁰ do leite em pó desnatado reconstituído a 10%, do leite em pó desnatado reconstituído a 10% e adicionado de 8% de sacarose e do leite em pó desnatado reconstituído a 10% e adicionado de 2% de CPS.

3.3. Microorganismos

Foram utilizadas duas amostras de bactérias ácido-lácticas: *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) e *Weissella confusa* (*W. confusa*), previamente isoladas de queijos de coalho artesanal e industrializado, produzido em Pernambuco, Brasil, identificadas por análise de restrição enzimática de DNA ribossomal e avaliadas quanto a propriedades probióticas (sensibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista “in vitro” (Guedes Neto, 2004).

3.4. Curvas de Fermentação / Crescimento

A curva de fermentação foi obtida pelas determinações do pH, da acidez titulável e da enumeração de bactérias ácido-lácticas (UFC/g) em meio ágar MRS (Difco, *Detroit Michigan, United States*), em intervalos de tempo de duas horas desde o tempo zero

(adição do inóculo) até a coagulação dos leites desnatados adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (leite LA), *Weissella confusa* (leite WC) e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* associados (leite LA+WC) sem e com CPS.

O tempo de fermentação também foi determinado durante a curva de fermentação, considerando como momento inicial a adição do inóculo ao leite e como término a formação do coágulo.

3.5. Preparo dos leites fermentados

Na elaboração do leite fermentado, 100 µL das culturas congeladas de *L. acidophilus* e *W. confusa* foram transferidos para tubos de ensaio contendo 5ml de Caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, United States). Estes tubos contendo as culturas *L. acidophilus* e *W. confusa* foram incubados a 37°C ± 2°C e 45°C ± 2°C, respectivamente, por 18 horas. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes para garantir a ativação das culturas.

Após esse período, 2% de cada cultura ativada foram inoculados em recipientes contendo leite desnatado reconstituído a 10%, adicionado de sacarose a 8%, tratado termicamente a 110°C por 10 minutos e resfriado a 37°C.

Os recipientes contendo leite e sacarose adicionados de *L. acidophilus* foram incubados a 37°C ± 2°C, enquanto que os adicionados de *W. confusa* isoladamente e as duas culturas associadas foram incubados a 45°C ± 2°C por tempo necessário até a coagulação do leite.

Os três produtos fermentados constituíram os inóculos para a elaboração dos leites fermentados. Estes inóculos foram adicionados numa concentração igual a 2% em recipientes de 200ml e 500ml contendo

leite em pó reconstituído a 10%, adicionado de sacarose a 8%, acrescidos ou não de CPS e tratado termicamente a 110°C por 10 minutos. Os leites adicionados dos inóculos com *L. acidophilus* foram incubados a 37°C ± 2°C, enquanto que os inoculados com *W. confusa* e com as duas culturas associadas foram incubados a 45°C ± 2°C até a coagulação. Após a coagulação, os produtos fermentados foram armazenados sob refrigeração a 8-10°C. Os recipientes contendo 200ml de leites fermentados foram utilizados nas análises físico-químicas e microbiológicas e os recipientes com 500ml nas análises sensoriais. Esse procedimento permitiu que cada frasco fosse retirado da geladeira e analisado no momento desejado.

Todo este processo foi feito para produzir três leites fermentados com adição de 2% de CPS e três leites fermentados sem adição de CPS, a partir das culturas *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas.

3.6. Análises laboratoriais dos leites fermentados

3.6.1. Avaliação físico-química dos leites fermentados

As análises foram realizadas nos dias um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a 8-10°C em refrigerador (Ormifrio Ltda GCI004, Sabará, MG, Brasil) O pH foi determinado através do pHmetro digital (GEHAKA PG1800, São Paulo, SP, Brasil). A determinação da acidez titulável, expressa em gramas de ácido láctico/100g de produto, seguiu a norma IDF (1991), de acordo com o RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007). O teor percentual de gordura foi obtido pelo método de Gerber (Brasil, 2005). Os teores percentuais de umidade e extrato seco total (EST) foram determinados na estufa (GEHAKA G4023D, São Paulo, SP, Brasil) e balança (SHIMADZU AY220, São Paulo, SP,

Brasil) (Brasil, 2006). O teor percentual de proteínas foi determinado pelo método Micro-Kjedahl, no equipamento TECNAL (TE012, Piracicaba, SP, Brasil), segundo Brasil (2006).

3.6.2. Avaliação microbiológica dos leites fermentados

As análises foram realizadas nos dias um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a 8 – 10°C.

3.6.2.1. Enumeração dos microorganismos ácido-lácticos

Para as contagens dos microorganismos foram feitas diluições decimais seriadas de (10^{-1} a 10^{-7}) dos leites fermentados produzidos, em salina peptonada (0,85% de NaCl e 0,1% de peptona). Em seguida, alíquotas de 0,1ml das diluições selecionadas foram incorporadas ao ágar MRS (Difco, *Detroit, Michigan, United States*) e incubadas sob aerobiose. A temperatura de incubação para *L. acidophilus* foi $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para a *W. confusa* e as duas culturas associadas. Após esse período, a enumeração dos microorganismos foi feita através da multiplicação do número de colônias formadas na placa por 10 e também pelo inverso da diluição (IDF, 1997).

3.6.2.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

A pesquisa de coliformes totais e termotolerantes foi feita utilizando o método do Número Mais Provável (NMP) (Brasil, 2003). Na Prova Presuntiva, as diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} foram inoculadas em triplicata em tubos contendo caldo lauril sulfato de sódio e tubos de Durhan invertidos. Estes tubos foram incubados a 36°C por 48 horas. A identificação da presença de gás nos tubos de Durhan indica resultado positivo e requer a realização do

teste confirmatório em caldo verde brilhante bile 2% lactose para coliformes totais e caldo EC para coliformes termotolerantes.

3.6.2.3. Pesquisa de bolores e leveduras

A pesquisa de bolores e leveduras foi feita de acordo com a Instrução Normativa (IN) 62, Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal (Brasil, 2003). Foram inoculados e espalhados com auxílio da alça de Drigalski, 0,1ml das diluições 10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} sobre a superfície do ágar batata glicose 2%, acidificado a pH 3,5. As placas foram incubadas, sem inverter, a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco a sete dias.

3.7. Avaliação sensorial dos leites fermentados

A análise sensorial de aceitação foi realizada em dois momentos, 10 e 40 dias de estocagem dos leites fermentados a 8-10°C. Em cada momento, foram analisados sensorialmente seis produtos diferentes (leites fermentados produzidos com três culturas diferentes, com e sem a adição do concentrado protéico de soro). Para cada momento de análise sensorial, foi utilizada uma equipe de provadores não treinados, composta por 30 estudantes, funcionários e professores da Escola de Veterinária da UFMG, selecionados de acordo com disponibilidade, interesse e hábito de consumir leites fermentados. As amostras foram codificadas com seqüências aleatórias de três dígitos e servidas aos provadores selecionados, dentro de cabines individuais, em porções de 30ml em copos de plástico incolor, a uma temperatura igual a 8 -10°C.

Os provadores receberam uma ficha (Anexo 1) contendo uma escala não estruturada formada por uma linha inteira, ancorada nos extremos pelos números zero e 10 onde marcaram um X, expressando o grau de

aceitação do produto. Para interpretação desses resultados, posteriormente, uma régua com 10cm foi colocada sobre a linha para quantificar o grau de aceitação dos provadores. Além disso, a ficha continha uma escala hedônica de cinco pontos, que permitia que os provadores expressassem o quanto gostaram ou desgostaram dos produtos. Posteriormente, foram atribuídos pontos para os graus de aceitação (1 = Detestei, 2 = Não gostei, 3 = Não gostei nem desgostei, 4 = Gostei, 5 = Adorei) para que os dados fossem analisados estatisticamente.

A realização das análises sensoriais do presente trabalho foi aprovada no dia 17 de maio de 2007 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer número ETIC 111/07.

3.8. Análise Estatística

O experimento foi realizado utilizando delineamento em blocos ao acaso com arranjo em parcelas subdivididas. Cada lote de leite em pó desnatado representou um bloco, os seis tratamentos (leites fermentados sem e com CPS, elaborados com *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas) foram considerados as parcelas, enquanto as subparcelas foram os cinco tempos (um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem sob refrigeração) em que foram

realizadas as análises físico-químicas e microbiológicas e os dois tempos (10 e 40 dias de estocagem) das análises sensoriais. Foram realizadas quatro repetições do experimento.

Para comparação das médias dos tratamentos, considerando os parâmetros físico-químicos e a enumeração de bactérias ácido-láticas (UFC/g) em meio ágar MRS, durante os 40 dias de estocagem, utilizou-se a análise estatística paramétrica e aplicado o Teste de Fisher e Student-Newman-Keuls, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

Os resultados da avaliação sensorial foram submetidos às análises estatísticas não paramétricas, através do teste de Kruskal-Wallis, em nível de significância de 5% (Sampaio, 2002).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Controle de qualidade do leite em pó desnatado

A composição físico-química e a acidez titulável de quatro lotes de leite em pó desnatado utilizados durante quatro repetições da produção de leites fermentados estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Teores percentuais médios de componentes físico-químicos e acidez titulável de quatro lotes de leite em pó desnatado

Parâmetro (%)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4
Gordura	0	0	0	0
Proteína	34,92	34,70	37,30	34,83
Umidade	3,63	4,15	3,13	3,05
Extrato Seco Total	96,37	95,85	96,87	96,95
Acidez *	1,52	1,53	1,62	1,58

*g de ácido láctico/ 100g

Os resultados de umidade (%) encontrados nos leites em pó utilizados estão de acordo com os valores estabelecidos pelo RTIQ de leite em pó (Brasil, 1996), com exceção do

segundo lote, o qual apresentou um resultado um pouco acima do estabelecido na legislação (máximo 4%). Esse fato pode ter ocorrido devido à falhas no

processamento industrial ou padronização do leite ou até mesmo devido à condições de estocagem inadequadas. Teores de umidade mais elevados podem ocasionar aumento da atividade de água no leite em pó e, conseqüentemente, favorecimento do crescimento microbiano. Além disso, poderia ser observado neste produto defeitos como “empedramento” ou agregação do leite em pó. No entanto, como o teor de umidade não estava muito elevado, esse defeito não foi verificado macroscopicamente no segundo lote de leite em pó analisado.

Em relação ao teor máximo de gordura, todos os leites em pó avaliados encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos na legislação (Brasil, 1996), pois todos apresentaram resultados inferiores a 1,5%. Esses resultados indicam que a padronização do leite e o processamento industrial dos mesmos foi correto, assim os leites em pó desnatados avaliados foram ideais para a utilização na produção de leite fermentado desnatado.

Como pode ser verificado na Tabela 4, 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). No entanto, todos os leites apresentaram resultados de acidez titulável dentro dos padrões, pois para cada cinco gramas de leite em pó desnatado analisado, foram gastos no máximo 9ml da solução de hidróxido de sódio NaOH 0,1N, atendendo o máximo permitido de 18ml de NaOH 0,1N para 10g de sólidos não gordurosos no leite em pó. Esses resultados indicam qualidade microbiológica adequada da matéria prima, bem como o processamento e estocagem adequados do leite em pó.

Os parâmetros proteína e extrato seco total 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 desnatado utilizado durante o experimento. A falta de padronização poderia comprometer os resultados físico-químicos dos leites fermentados produzidos, o metabolismo microbiano e, conseqüentemente, também os resultados microbiológicos e a avaliação sensorial.

Todas as análises para o controle microbiológico dos quatro lotes de leite em pó desnatado indicaram ausência de microorganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais e fecais, *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp.. Portanto, todos os leites em pó desnatados analisados atenderam aos requisitos estabelecidos na legislação (Brasil, 1996) e apresentaram qualidade microbiológica adequada. A qualidade do leite em pó desnatado 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.

4.2. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído, com ou sem a adição de concentrado protéico de soro e tratado termicamente

Não foi observado crescimento de colônias de microorganismos em meio MRS (Difco) plaqueado com a diluição 10^0 , indicando que o tratamento térmico aplicado foi adequado para garantir a esterilidade dos leites em pó desnatados, reconstituídos a 10%, adicionados de açúcar a 8% e 2% de CPS.

4.3. Curva de Fermentação / Crescimento

4.3.1. pH

As curvas de fermentação obtidas a partir dos resultados de pH são apresentadas na Figura 3, permitindo avaliar essa variável durante a incubação a 37°C dos leites

desnatados esterilizados, adicionados de *L. acidophilus*; e a 45°C dos leites adicionados de *W. confusa* e as duas culturas associadas, sem e com CPS.

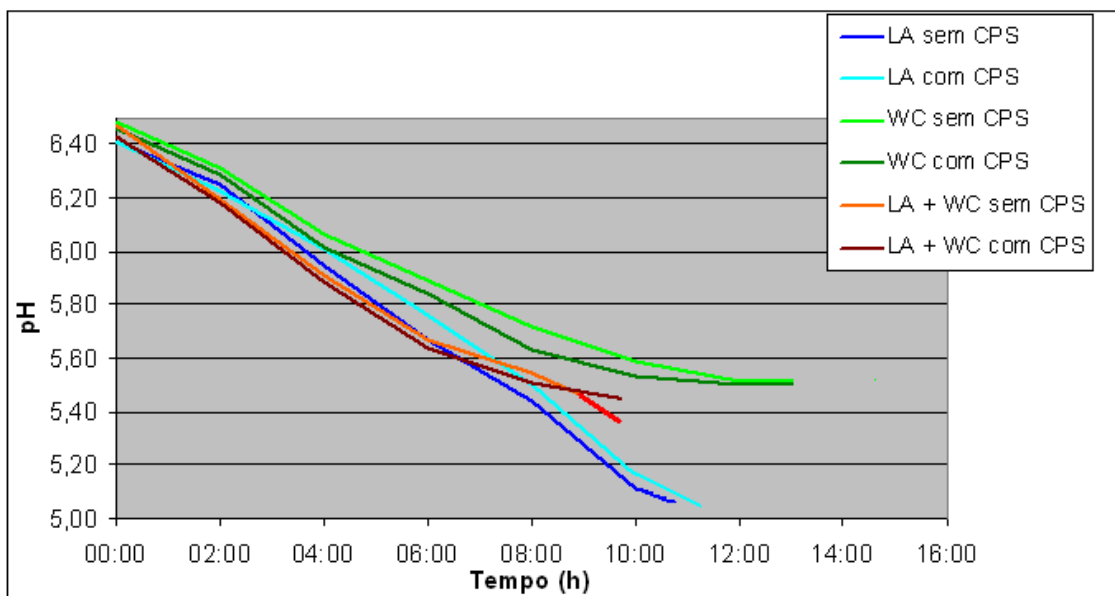


Figura 3: Médias de três repetições de pH durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Weissella confusa* (WC) e as duas culturas (LA+WC), sem e com concentrado protéico de soro (CPS)

O término da fermentação foi considerado baseando-se na observação da formação do coágulo, especificamente no desprendimento do coágulo da parede do frasco como mostra o Anexo 2, e não na determinação do pH. Isso explica porque o pH final nos leites fermentados foi maior que o ponto isoelétrico da caseína (4,6) (Fennema, 1996). Caso o leite fermentado permanecesse por mais tempo incubado, haveria retração do coágulo e dessoragem, que comprometeria a aceitação dos produtos durante as análises sensoriais, além da interferência nos parâmetros físico-químicos, como pH e acidez titulável. Segundo, Donkor *et al.* (2006), em geral, um pH baixo ao fim da fermentação resulta em maior queda de pH durante o período de estocagem sob refrigeração. Essa redução acentuada de pH poderia acontecer se os leites fermentados permanecessem mais tempo incubados, o que comprometeria a

viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento desses produtos sob refrigeração.

Analisando as variações de pH (Figura 3) durante 10:40h e 11:20h (Anexo 4) de fermentação do *L. acidophilus* em leites desnatados sem e com CPS, respectivamente, são observadas reduções de pH similares. Os leites fermentados por *L. acidophilus* apresentaram pH inicial igual a 6,41 e pH final semelhantes, 5,07 e 5,06 nos produtos sem e com CPS, respectivamente. Além disso, comparando-se todas as curvas presentes na Figura 3, é possível verificar que os leites LA foram os que apresentaram menor pH ao fim da fermentação, indicando uma resistência maior dessa cultura às condições com pH mais baixos em relação a *W. confusa*. Esse fato demonstra melhor propriedade probiótica do *L. acidophilus* em relação à

W. confusa, indicando que o *L. acidophilus* poderia resistir melhor ao pH (1,5 – 2,0) do estômago humano (Dunne *et al.*, 1999). Além disso, essa resistência é interessante para a conservação de microorganismos viáveis durante o prazo de validade dos leites fermentados, pois durante a estocagem, o pH desses produtos reduz ainda mais.

Os leites WC sem e com CPS apresentaram o mesmo tempo de fermentação (13 h) (Anexo 3). Esses produtos apresentaram tempo de fermentação mais prolongado quando comparados aos leites LA e LA+WC (Anexo 4). O intervalo de tempo entre a adição do inóculo e a obtenção do produto final deve ser considerado na avaliação da viabilidade econômica da produção industrial de leites fermentados, pois tempos prolongados de fermentação comprometem o fluxograma e o rendimento industrial. Deste modo, a utilização de *W. confusa* na indústria poderia ser inviável economicamente, em comparação com *L. acidophilus*.

Os produtos elaborados apresentaram a mesma tendência de queda do pH ao longo da fermentação, que pode ser constatada pela semelhança entre as curvas de fermentação no gráfico da Figura 3. O leite com CPS apresentou redução de pH de 6,49 para 5,52 e, o mesmo leite sem CPS, uma redução de 6,46 para 5,51. Os valores de pH encontrados nos leites WC foram maiores em relação aos valores de pH encontrados nos outros leites LA e LA+WC. Considerando a escassez de trabalhos avaliando a fermentação do leite por *W. confusa*, esses resultados têm grande relevância para avaliar o comportamento dessa cultura durante todo o tempo de fermentação em leites desnatados sem e com fonte adicional de aminoácidos e peptídeos.

Em relação às determinações de pH durante fermentação dos leites LA+WC, verifica-se

que esses produtos apresentaram uma redução de pH mais intensa, atingindo valor final mais rapidamente em relação aos leites adicionados com as mesmas culturas isoladamente (Figura 3).

O menor tempo de fermentação (9:40h) (Anexo 4) observado nos leites LA+WC, em relação aos outros leites, sugere a ocorrência da relação de simbiose entre essas culturas lácticas. No entanto, essa relação não foi investigada no presente trabalho. Considerando a redução do tempo de fermentação no leite pelas culturas *L. acidophilus* e *W. confusa*, a utilização dessas culturas simultaneamente, pode ser vantajosa para a indústria, até mesmo em relação a utilização do *L. acidophilus* isoladamente, pois além de potencializar a utilização dos equipamentos, em consequência da redução do tempo de fermentação, a indústria poderá disponibilizar no comércio um produto fermentado com diferentes características sensoriais e probióticas.

O leite LA+WC sem CPS apresentou uma redução de pH de 6,37 para 5,37 e o com CPS uma redução de 6,43 para 5,44. Assim como os leites adicionados com as culturas isoladas, os leites LA+WC sem e com CPS apresentaram curvas, a partir dos resultados de pH, muito semelhantes. Além disso, quando os leites LA+WC sem e com CPS são comparados, observa-se o mesmo tempo de fermentação (9:40h) entre eles (Anexo 4). Esses resultados foram diferentes dos encontrados por Dave e Shah (1998) que observaram influência do CPS no tempo de fermentação de leites fermentados elaborados com as culturas *L. acidophilus*, bifidobactéria e *Streptococcus thermophilus*, simultaneamente. Os autores observaram menores tempos de fermentação (7,5h e 8,5h) nos leites fermentados contendo 2% de CPS em relação ao controle (12h).

A mesma tendência observada na redução do pH nos leites com a mesma cultura sem e com CPS indicam que, provavelmente, o CPS utilizado ou a porcentagem adicionada desse ingrediente não influenciou na redução do pH durante a fermentação de todos os leites analisados.

A incorporação de micronutrientes ao leite pode ser utilizada para reduzir o tempo de fermentação dos leites fermentados (Oliveira *et al.*, 2001). No entanto, no presente trabalho, a incorporação de aminoácidos e peptídeos por meio da adição

de 2% de CPS contendo 34,5% de proteínas não interferiu no tempo de fermentação dos leites adicionados de *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas.

4.3.2. Acidez Titulável

Os valores apresentados na Figura 4 permitem acompanhar e comparar a acidez titulável (%) durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados com a mesma cultura, porém sem e com CPS, bem como a fermentação de leites adicionados com culturas diferentes.

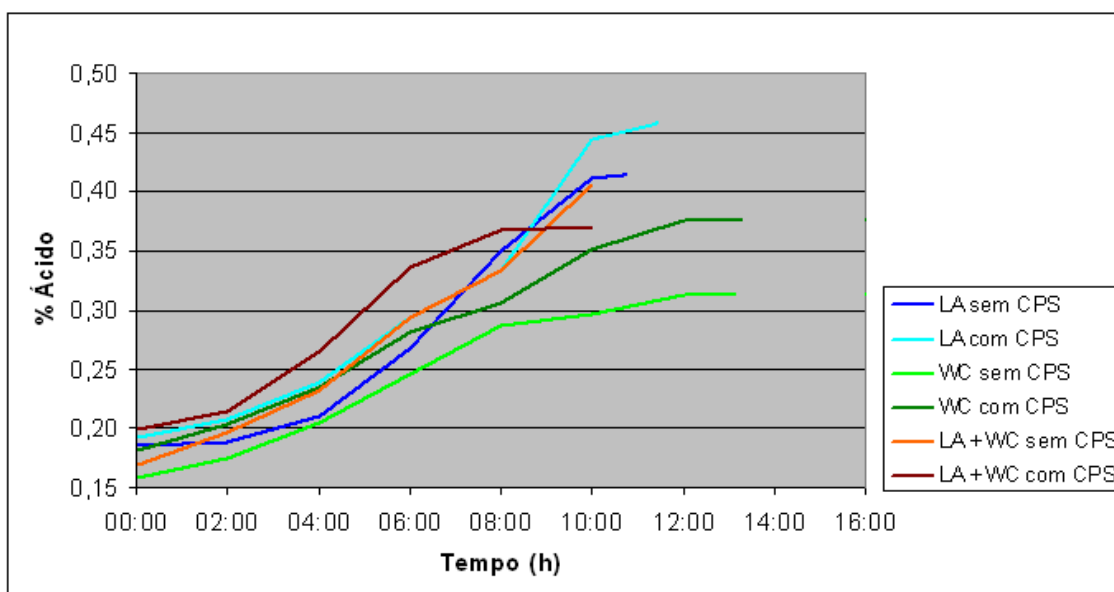


Figura 4: Médias de três repetições de acidez titulável (%) durante a fermentação de leites desnatados esterilizados, adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Weissella confusa* (WC) e as duas culturas (LA + WC), sem e com concentrado protéico de soro (CPS)

De acordo com a Figura 4, as curvas obtidas a partir dos resultados médios de acidez titulável (%) durante a fermentação dos leites LA sem e com CPS foram bastante semelhantes. Os leites sem e com CPS apresentaram, inicialmente, mesmo percentual de acidez titulável igual a 0,19, no entanto, ao final da fermentação, o leite com CPS apresentou acidez titulável um pouco maior (0,46%) em relação ao leite sem CPS (0,42%). Os resultados de acidez

titulável e pH (Figura 3) encontrados nos leites LA sem e com CPS foram bastante semelhantes aos resultados encontrados por Bozanic *et al.* (2004). Os autores não observaram diferença na redução do pH entre os leites sem e com 2% de CPS, durante a produção de leites acidófilos, porém, verificaram valores de acidez titulável um pouco mais altos nos leites acidófilos com CPS, assim como no presente trabalho.

Os leites LA, quando comparados aos outros leites, foram os que apresentaram maiores valores de acidez titulável (%) após o fim da fermentação, estando de acordo com os resultados médios finais de pH apresentados na Figura 3. Esses resultados indicam maior tolerância dessa amostra de *L. acidophilus* em relação a *W. confusa* a meios com acidez titulável mais alta. Segundo Gomes e Malcata (1999), o *L. acidophilus* é capaz de tolerar variações de acidez titulável entre 0,3 a 1,9%. As condições de acidez do trato gastrointestinal de humanos comprometem significativamente a viabilidade das bactérias ácido-lácticas (Lin *et al.*, 2006). Por isso, a resistência às condições de acidez mais altas é característica desejável em culturas probióticas, considerando-se a importância da sobrevivência desses microorganismos no trato gastrointestinal para garantir os efeitos benéficos à saúde (Fuller, 1989; Joint FAO/WHO, 2003).

Os leites WC sem e com CPS também apresentaram aumentos de acidez titulável similares durante a fermentação, os quais podem ser verificados nas curvas apresentadas na Figura 4. No entanto, observa-se que os valores de acidez titulável que constituem a curva correspondente ao leite WC com CPS são superiores em relação ao mesmo leite sem CPS (Figura 4). Os valores de acidez titulável no leite WC com CPS aumentaram de 0,18 para 0,38% durante todo período de fermentação, enquanto que no leite sem CPS esse aumento foi de 0,16 para 0,33%. Observam-se, também, na Figura 4 que os leites WC foram os que apresentaram acidez titulável mais baixa, bem como pH mais elevado (Figura 3) em comparação com os leites LA e LA+WC, sem e com CPS.

As curvas apresentadas na Figura 4, que correspondem aos resultados médios de acidez titulável durante a fermentação dos leites desnatados pelas duas culturas

associadas, sem e com CPS, demonstram aumentos percentuais de acidez titulável semelhantes entre os leites sem e com CPS até oito horas de incubação a 45°C. A partir de oito horas de fermentação, observa-se a estabilização do valor de acidez titulável no leite com CPS e aumento da acidez titulável no leite sem CPS. A acidez titulável aumentou de 0,17 para 0,41% no leite com as duas culturas sem CPS e de 0,20 para 0,37% no mesmo leite com CPS durante todo o período avaliado.

Todos os leites fermentados apresentaram acidez titulável inferior a 0,60% (Figura 4), valor oficial estabelecido pela legislação (Brasil, 2007) como o conteúdo mínimo de ácidos que devem estar presentes nesses produtos. A baixa acidez titulável dos leites fermentados está de acordo com os valores encontrados para pH, superiores a 4,6 e discutidos anteriormente. Portanto, para que esses produtos atingissem 0,60% de acidez titulável, o tempo de incubação na estufa seria prolongado e, conseqüentemente, ocorreriam perdas das características sensoriais dos leites fermentados como aspecto, consistência, odor e sabor. Além disso, os padrões estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) foram estabelecidos com base na fermentação de culturas lácticas comerciais, as quais, não foram as mesmas utilizadas no presente trabalho. Dessa forma, os resultados de acidez titulável diferentes dos padrões da legislação poderiam ser justificados, considerando-se que, para as bactérias ácido-lácticas testadas, novos valores padrões precisariam ser estabelecidos tanto para a acidez titulável, quanto para o pH, que não tem padrão estabelecido na legislação.

4.3.3. Enumeração das bactérias-ácido-lácticas

Os valores apresentados na Figura 5 permitem acompanhar o crescimento e a viabilidade das culturas *L. acidophilus*, *W.*

confusa e *L. acidophilus* e *W. confusa* em conjunto, durante a fermentação de leites

desnatados esterilizados sem e com CPS.

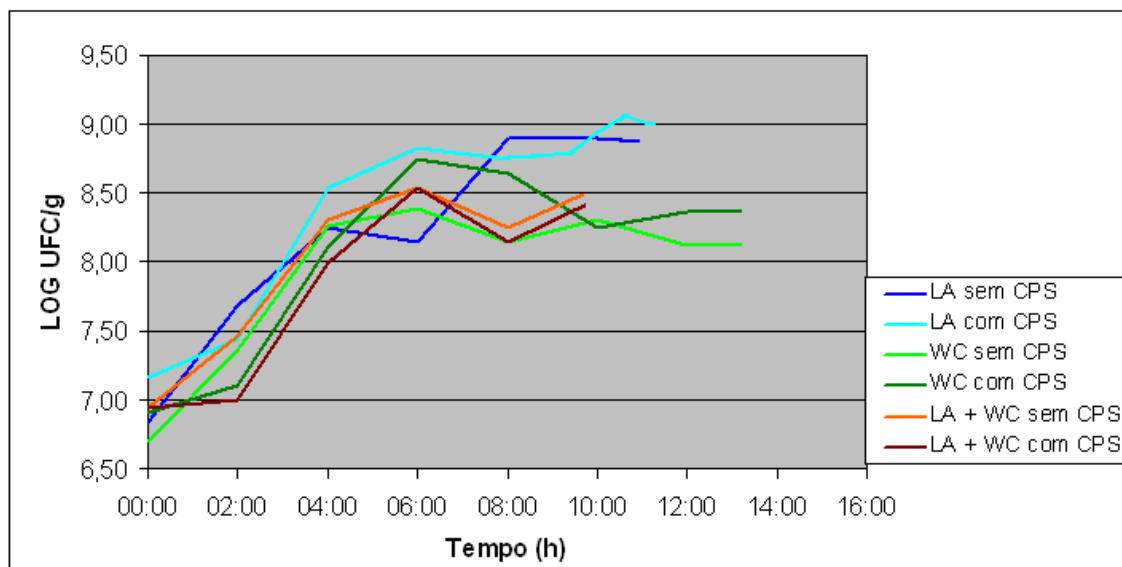


Figura 5: Médias de três repetições das contagens (log UFC/g) durante a fermentação de leites desnatados esterilizados adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Weissella confusa* (WC) e as duas culturas (LA + WC) sem e com concentrado protéico de soro (CPS)

Observando as curvas formadas a partir das contagens de *L. acidophilus* (Figura 5), verifica-se que as contagens médias no leite LA com CPS são superiores às contagens no mesmo leite sem o CPS. O leite LA adicionado de 2% de CPS apresentou, inicialmente, 10^7 UFC/g, e o leite sem CPS 10^6 UFC/g. Os leites sem e com CPS atingiram 10^8 UFC/g em tempos de incubação muito próximos, aproximadamente 4h de fermentação, no entanto, ao fim da fermentação, o leite LA com CPS apresentou 10^9 UFC/g, enquanto que o sem CPS a contagem manteve-se igual a 10^8 UFC/g. Os resultados observados sugerem uma influência positiva do CPS na viabilidade das culturas de *L. acidophilus* durante a fermentação do leite. Bozanic *et al.* (2004) encontraram resultados semelhantes, pois observaram, ao fim da fermentação de leites acidófilos suplementados com 2% de CPS, contagens maiores de *L. acidophilus* LA5 em relação ao mesmo produto sem CPS. Dave e Shah

(1998), embora tenham observado influência do CPS na redução do tempo de fermentação, não verificaram a mesma influência na viabilidade das culturas de *L. acidophilus* utilizadas juntamente com bifidobactéria e *Streptococcus thermophilus* na elaboração dos produtos. Nos leites fermentados sem e com 2% de CPS, os autores verificaram contagens de *L. acidophilus*, inicialmente, 10^6 UFC/g e após a fermentação, contagens 10^8 UFC/g.

A capacidade do *L. acidophilus* em tolerar melhor condições mais altas de acidez titulável em relação a alguns microorganismos probióticos, descrita por Donkor *et al.* (2006) e Gomes e Malcata (1999) e comentada anteriormente em relação à *W. confusa*, torna-se mais evidente no presente trabalho, quando os resultados de acidez titulável do leite fermentado por *L. acidophilus* (Figura 4) são comparados com os resultados médios de contagens de *L. acidophilus*.

De acordo com a Figura 5, as médias das contagens de WC no leite sem adição de 2% de CPS foram inferiores às contagens nos leites com CPS durante as primeiras quatro horas de incubação a 45 °C. A partir das quatro horas de incubação, a presença do CPS no leite parece ter influenciado no crescimento e viabilidade da cultura *W. confusa*, pois foi observado um aumento das contagens desse microorganismo no leite com CPS. Embora sejam observadas médias de contagens maiores no leite com CPS em relação ao leite sem CPS, ambos os leites apresentaram contagens 10^7 UFC/g na segunda hora de incubação e 10^8 UFC/g a partir das quatro horas de incubação, mantendo essa contagem até o fim da fermentação.

As médias das contagens totais de *L. acidophilus* e *W. confusa* seguiram a mesma tendência durante a fermentação dos leites sem e com CPS. O leite LA+WC sem CPS apresentou contagens superiores ao leite com CPS, mas ambos apresentaram na segunda hora de incubação contagens 10^7 UFC/g, alcançando 10^8 UFC/g na quarta hora de incubação, assim como os leites com as culturas isoladas.

O aumento da viabilidade de culturas lácticas em leites fermentados adicionados de CPS tem relação com a presença de nitrogênio na forma de peptídeos e aminoácidos (Dave e Shah, 1998) e parece ter relação também com o tipo de cultura utilizada na elaboração dos leites fermentados. No presente trabalho, a presença do CPS parece ter influenciado mais na viabilidade do *L. acidophilus* em relação à *W. confusa*.

Todos os produtos apresentaram, ao fim da fermentação, contagens superiores ao

mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007). A legislação estabelece contagens mínimas durante todo o prazo de validade igual a 10^7 UFC/g nos leites acidófilos e mínimo 10^6 UFC/g nos leites fermentados ou cultivados. No presente trabalho, os requisitos da legislação para o leite acidófilo podem ser considerados para o leite LA, pois é um produto elaborado somente com *L. acidophilus* e os padrões do leite fermentado ou cultivado para os leites WC e LA+WC. Contagens mais elevadas de microorganismos probióticos nos produtos finais são desejáveis, para garantir que contagens ideais sejam mantidas nos produtos fermentados estocados sob refrigeração durante todo o período de validade. Além disso, segundo Rasic e Kurmann (1983) citado por Gomes e Malcata (1999) as contagens 10^8 - 10^9 UFC/g presentes nos produtos fermentados elaborados com *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas são adequadas do ponto de vista probiótico. Esses resultados foram superiores às contagens consideradas ideais (10^6 UFC/g), segundo os autores, o que indica que mesmo se houvesse uma redução dessas contagens durante o armazenamento sob refrigeração, essas ainda permaneceriam adequadas para garantir os efeitos probióticos.

4.4. Avaliação físico-química dos leites fermentados

4.4.1. pH

A Tabela 5 apresenta os valores de pH nos tempos um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem de leites fermentados acrescidos ou não de CPS e elaborados com as culturas *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas a 8-10°C.

Tabela 5: Resultados médios de quatro repetições de pH de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Médias
	1	10	20	30	40	
LA s	4,58 ^{A a}	4,44 ^{A a}	4,42 ^{A a}	4,31 ^{A a}	4,26 ^{A a}	4,40 ^{BC}
LA c	4,58 ^{A a}	4,37 ^{A a}	4,31 ^{A a}	4,23 ^{A a}	4,13 ^{A a}	4,32 ^C
WC s	5,71 ^{A a}	5,58 ^{A a}	5,52 ^{A a}	5,47 ^{A a}	5,42 ^{A a}	5,53 ^A
WC c	5,60 ^{A a}	5,53 ^{A a}	5,47 ^{A a}	5,48 ^{A a}	5,34 ^{A a}	5,48 ^A
LA+WC s	4,94 ^{A a}	4,79 ^{A a}	4,68 ^{A a}	4,63 ^{A a}	4,44 ^{A a}	4,69 ^B
LA+WC c	4,90 ^{A a}	4,73 ^{A a}	4,66 ^{A a}	4,61 ^{A a}	4,47 ^{A a}	4,67 ^B

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Como pode ser observado na Tabela 5, não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e os dias avaliados, ou seja, as variações de pH encontradas em cada leite fermentado elaborado, independentemente, da adição do CPS não foram diferentes ($p > 0,05$) durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C. Donkor *et al.* (2006) também não observaram diferença na diminuição do pH entre diferentes iogurtes adicionados de culturas probióticas durante 28 dias e, segundo os autores, as variações de pH observadas ($p > 0,05$), provavelmente, não foram capazes de interferir na viabilidade das culturas probióticas utilizadas. Ainda de acordo com os mesmos autores, observando-se a Tabela 10, a diminuição de pH observada entre os leites fermentados produzidos neste experimento também não foi capaz de comprometer a viabilidade das culturas *L. acidophilus* e *W. confusa*, pois não foi observada diferença nas contagens totais de bactérias lácticas entre os tratamentos (leites fermentados) e dias de estocagem avaliados ($p > 0,05$).

Avaliando-se as médias de pH de cada tratamento, observa-se não ter diferença ($p > 0,05$) entre os leites fermentados elaborados com a mesma cultura, com e sem a adição do CPS. Esse ingrediente, embora seja capaz de fornecer peptídeos e aminoácidos para muitos microorganismos probióticos, não ocasionou redução significativa no pH dos leites fermentados. Dave e Shah, (1998) avaliaram o pH de iogurtes adicionados de culturas probióticas, sem e com 2% de dois tipos de CPS durante 35 dias de estocagem sob refrigeração e observaram uma queda no pH duas vezes maior nos leites fermentados adicionados de CPS em relação ao iogurte controle. Provavelmente, o teor protéico presente em maior quantidade nos CPS utilizados por esses autores, influenciaram na fermentação das culturas, causando uma diminuição significativa no pH ao longo do período de estocagem avaliado. Este comportamento não seria desejável, pois indica manutenção da atividade metabólica microbiana, o que poderia resultar em redução acentuada do pH, atingindo valores

que poderiam tornar-se prejudiciais à viabilidade dos microorganismos presentes no alimento e, assim, comprometer suas propriedades probióticas, bem como acentuar o gosto ácido do produto podendo o mesmo ser rejeitado pelo consumidor.

Entre os seis leites fermentados avaliados, os que apresentaram pH mais alto durante todo o período de estocagem foram aqueles elaborados com *W. confusa*. Estes leites fermentados apresentaram também pH inicial superior aos outros leites fermentados. Os valores superiores de pH desses produtos têm relação com os menores percentuais de acidez e menores contagens (UFC/g) desses microorganismos, apresentados durante todo o período de estocagem. Esse fato pode também estar relacionado com o tipo de metabolismo desse microorganismo, sendo heterofermentador obrigatório, as hexoses são fermentadas resultando em CO₂, ácido láctico e etanol ou ácido acético e as pentoses são fermentadas em ácido láctico e ácido acético (Garvie, 1986). Os leites fermentados que apresentaram pH

mais baixo foram aqueles produzidos com *L. acidophilus*. Durante os 40 dias avaliados, foi observado um decréscimo médio de pH igual a 0,08 nos leites fermentados com *L. acidophilus* sem CPS, este valor foi superior ao encontrado por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) que observaram um decréscimo igual a 0,05 em leites fermentados por *L. acidophilus*, durante 21 dias de estocagem sob refrigeração a 4°C.

Os resultados de pH não podem ser discutidos com base no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), pois esse, não é um parâmetro físico-químico abordado nessa legislação.

4.4.2. Acidez Titulável

A Tabela 6 apresenta os valores de acidez titulável (%) nos tempos um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem de leites fermentados acrescidos ou não de CPS e elaborados com as culturas *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas a 8-10°C.

Tabela 6: Resultados médios percentuais de quatro repetições de acidez titulável de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Média
	1	10	20	30	40	
LA s	0,58 ^{Ab}	0,66 ^{Aab}	0,64 ^{Aab}	0,76 ^{Ba}	0,76 ^{Aa}	0,68 ^B
LA c	0,63 ^{Ab}	0,73 ^{Ab}	0,73 ^{Ab}	0,89 ^{Aa}	0,94 ^{Aa}	0,78 ^A
WC s	0,31 ^{Bc}	0,34 ^{Cbc}	0,37 ^{Bb}	0,43 ^{Ca}	0,43 ^{Ba}	0,38 ^C
WC c	0,35 ^{Bd}	0,40 ^{Cc}	0,40 ^{Bc}	0,44 ^{Cb}	0,48 ^{Ba}	0,42 ^C
LA+WC s	0,54 ^{Ac}	0,59 ^{Bbc}	0,63 ^{Ab}	0,76 ^{Ba}	0,79 ^{Aa}	0,66 ^B
LA+WC c	0,60 ^{Ad}	0,67 ^{Abc}	0,68 ^{Ac}	0,76 ^{Bb}	0,86 ^{Aa}	0,71 ^{AB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p < 0,05).

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado

A acidez titulável (%) foi a única variável que apresentou diferença significativa entre tratamentos (leites fermentados) e dias de estocagem sob refrigeração. Por isso, o aumento observado nos teores percentuais de acidez titulável em cada tratamento durante os 40 dias de estocagem avaliados foi significativo ($p < 0,05$). A diferença estatística encontrada nos teores percentuais de acidez e que não foi observada na variável pH, pode ser explicada pela unidade de medida destas variáveis, a acidez titulável em porcentagem e o pH em escala logarítmica (inverso da concentração de íons H^+). No entanto, percebe-se que à medida que o tempo transcorria, os valores de pH dos leites fermentados diminuía e as porcentagens de acidez titulável aumentavam.

Os leites fermentados que apresentaram acidez titulável mais baixa no dia um após a fermentação e em todos os tempos de estocagem avaliados foram os produzidos a partir da *W. confusa*, independentemente, da adição de CPS. Esses resultados estão de acordo com os resultados observados neste experimento para o pH, pois esses mesmos leites fermentados foram os que apresentaram valores mais altos para esta variável durante todos os dias de estocagem sob refrigeração. Os leites WC apresentaram esses resultados, provavelmente, devido ao tipo de metabolismo (heterofermentador obrigatório) dessa cultura, diferente do metabolismo do *L. acidophilus*. O aumento de acidez titulável durante a estocagem dos produtos sob refrigeração, conhecido como acidificação pós fermentação é observado geralmente em iogurtes; no entanto, no presente trabalho, essa pode ser verificada de forma discreta nos leites adicionados de *L. acidophilus*, por meio dos valores de acidez titulável mais altos nesses produtos em relação aos leites WC. A acidificação pós-fermentação mais evidente nos leites LA comparado ao leite WC pode ser explicada pela persistência de atividade

metabólica dos lactobacilos durante o resfriamento (Béal *et al.*, 1999).

Entre os seis leites fermentados elaborados neste experimento, os que apresentaram acidez titulável mais alta, tanto no primeiro dia após a fermentação quanto durante todo o período de refrigeração, foram os produzidos com *L. acidophilus* e as duas culturas associadas, ambos adicionados de CPS. Além disso, comparando as médias de acidez titulável dos tratamentos na Tabela 6, é possível perceber que, embora seja observado maior percentual de acidez titulável nos leites fermentados adicionados de CPS, houve diferença somente entre os leites fermentados elaborados a partir de *L. acidophilus* ($p < 0,05$). Provavelmente, o CPS interferiu na fermentação do *L. acidophilus*, aumentando a produção de ácidos. Estes resultados estão de acordo com Dave e Shah, (1998) que observaram um aumento duas vezes maior na acidez titulável de leites fermentados elaborados com *L. acidophilus* e 2% de CPS durante 35 dias de estocagem sob refrigeração. Como neste experimento o *L. acidophilus* foi adicionado simultaneamente com a *W. confusa*, foi possível observar também maior acidez titulável no produto obtido pela fermentação realizada pelas duas culturas.

Em relação aos padrões estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) para os teores percentuais de acidez titulável, os leites fermentados sem a adição do CPS, com exceção da *W. confusa*, apresentaram valores inferiores ao estabelecido na legislação até os dez dias de estocagem a 8-10°C. Todos os leites adicionados de CPS, exceto *W. confusa*, apresentaram valores de acidez titulável entre 0,6 a 0,94% durante os 40 dias de armazenamento sob refrigeração a 8-10°C. Portanto, apresentaram valores dentro dos requisitos estabelecidos na legislação, que são 0,6 a 2,0% de ácido láctico.

Os leites WC apresentaram valores percentuais de acidez titulável entre 0,31 e 0,48, portanto, esses produtos apresentaram resultados de acidez inferiores ao estabelecido no RTIQ dos leites fermentados logo após a fermentação e durante todo o período de estocagem sob refrigeração. Dados sobre a produção e a avaliação da qualidade físico-química de leites fermentados obtidos a partir de *W. confusa* são escassos na literatura, somente descrevendo a presença de *W. confusa* em produtos fermentados artesanais. Portanto, a legislação brasileira não define requisitos específicos para esta cultura. Os resultados encontrados neste experimento indicam que esses produtos apresentam características físico-químicas distintas dos outros leites fermentados, por isso, os padrões físico-

químicos deveriam ser adaptados e estabelecidos para esta cultura conforme suas características, caso a mesma fosse utilizada comercialmente. Entretanto, para atender à legislação vigente e o padrão de leites fermentados no Brasil, se a *W. confusa* fosse utilizada, seria mais recomendável associá-la a outro microorganismo, como o *L. acidophilus*.

4.4.3. Teor de Proteína

Os teores de proteína dos leites fermentados elaborados no presente trabalho são apresentados na Tabela 7, permitindo avaliar durante 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C, a interferência do CPS nesse parâmetro e no valor nutricional (protéico) desses produtos.

Tabela 7: Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de proteína de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Média
	1	10	20	30	40	
LA s	2,89 ^{Aa}	2,86 ^{Aa}	2,99 ^{Aa}	3,11 ^{Aa}	3,06 ^{Aa}	2,98 ^B
LA c	3,27 ^{Aa}	3,37 ^{Aa}	3,35 ^{Aa}	3,47 ^{Aa}	3,32 ^{Aa}	3,35 ^A
WC s	2,90 ^{Aa}	2,97 ^{Aa}	3,03 ^{Aa}	3,02 ^{Aa}	3,02 ^{Aa}	2,98 ^B
WC c	3,32 ^{Aa}	3,32 ^{Aa}	3,47 ^{Aa}	3,38 ^{Aa}	3,36 ^{Aa}	3,37 ^A
LA+WC s	2,79 ^{Aa}	2,91 ^{Aa}	2,90 ^{Aa}	2,92 ^{Aa}	2,86 ^{Aa}	2,87 ^B
LA+WC c	3,16 ^{Aa}	3,27 ^{Aa}	3,22 ^{Aa}	3,31 ^{Aa}	3,29 ^{Aa}	3,24 ^A

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Os resultados percentuais dos teores de proteína dos seis leites fermentados analisados não apresentaram interação significativa com os tempos (dias) de estocagem sob refrigeração a 8-10 °C ($p > 0,05$) (Tabela 7). Esse fato demonstra que, embora sejam observadas variações no percentual de proteína de cada leite

fermentado produzido, durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10 °C, essas variações não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$).

A comparação das médias dos percentuais protéicos dos leites fermentados indica diferença ($p < 0,05$) entre os mesmos leites

fermentados, sem e com a adição de CPS. Esses resultados devem-se à adição de 2% do CPS WPC 033RQL, Estabgem®, contendo mínimo de 33,0 % de proteínas lácteas aos leites. Os leites fermentados adicionados de 2% de proteína apresentaram em média um aumento de 0,37% de proteína em relação aos outros leites fermentados. Dave e Shah, (1998) observaram um aumento médio igual a 0,7% de proteínas nos leites fermentados suplementados com 2 % de CPS em relação aos outros. Porém, esses autores utilizaram dois tipos de CPS com teores percentuais de proteína iguais a 72,5 e 73,5%, que explica a diferença entre esses resultados.

Com base no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), as médias dos produtos apresentados na Tabela 7, indicam com exceção do leite LA+WC sem a adição de CPS, que todos atenderam ao requisito mínimo estabelecido, igual a 2,9% de proteína. No entanto, uma análise dos valores percentuais de proteína de cada tratamento, em cada momento analisado, demonstra que o leite fermentado *L. acidophilus* sem CPS atendeu ao requisito mínimo de 2,9%, somente a partir de 20 dias de estocagem, embora tenha apresentado valores muito próximos como 2,89 e 2,86, respectivamente, nos dias um e 10 de refrigeração. Observa-se, também, que o leite LA+WC sem a adição de CPS, não atendeu ao requisito padrão no dias um e 40 de refrigeração.

Alguns leites fermentados elaborados sem a adição de CPS, não atenderam ao requisito exigido na legislação e todos aqueles com CPS apresentaram teores de proteína superiores à legislação, indicando que adição do CPS ao leite como fonte de peptídeos e aminoácidos essenciais é uma alternativa para incrementar o teor protéico dos leites fermentados elaborados com microorganismos probióticos e, conseqüentemente, aumentar o valor nutritivo desses produtos.

4.4.4. Teor de Gordura

Todos os leites fermentados apresentaram zero por cento de gordura durante todos os tempos de estocagem sob refrigeração a 8-10°C. Esses resultados estão de acordo com o tipo de leite em pó utilizado na produção dos leites fermentados, o leite em pó desnatado. Além disso, os resultados encontrados estão dentro dos padrões estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) que determina no máximo 0,5% de gordura nos leites fermentados desnatados.

4.4.5. Teores de Umidade e Extrato Seco Total

Os resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9 indicam, respectivamente, que os valores percentuais de umidade e extrato seco total dos tratamentos não têm relação significativa com os dias analisados de estocagem sob refrigeração a 8-10 °C ($p>0,05$), indicando que os leites fermentados produzidos mantiveram os teores de umidade e extrato seco total similares ao longo dos 40 dias avaliados.

Existe diferença ($p< 0,05$) entre os valores médios dos teores de umidade e extrato seco total encontrados nos leites fermentados elaborados com a mesma cultura, sem e com a adição de CPS, independentemente do tempo de estocagem. Os resultados médios de sólidos totais nos leites fermentados com e sem CPS variaram entre 16,66 e 17,04% e 15,49 e 15,73%, respectivamente. Corroborando com estes resultados, os valores de umidade dos leites fermentados elaborados com a adição de CPS foram menores ($p<0,05$) que aqueles dos produtos sem CPS (Tabela 8). Os resultados dos leites fermentados sem CPS são semelhantes aos resultados apresentados por Dave e Shah, (1998) que observaram resultados médios para sólidos totais entre 15,40 e 15,75%, porém para todos os leites fermentados com e sem CPS.

Entretanto, a diferença estatística observada neste experimento entre os leites fermentados sem e com CPS é esperada e compatível com a adição de 2% de CPS (WPC 033RQL, Estabgem®, contendo mínimo de 33,0 % de proteínas lácteas e 3,5 a 3,6% de umidade) aos leites durante a elaboração dos produtos fermentados. Segundo Dave e Shah, (1998), o CPS é um aditivo que tem sido bastante usado na indústria como substituto do leite em pó,

com o objetivo de aumentar o conteúdo de sólidos totais em iogurtes, alterar a viscosidade e torná-lo com aspecto mais cremoso. Além disso, Gardini *et al.* (1999) demonstraram que a composição do produto em termos de conteúdo de sólidos totais interfere na viabilidade dos probióticos. Por isso, o aumento de sólidos totais por meio da adição de CPS pode também interferir positivamente na viabilidade das culturas probióticas.

Tabela 8: Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de umidade de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Média
	1	10	20	30	40	
LA s	84,53 ^{A a}	84,65 ^{A a}	84,43 ^{A a}	84,49 ^{A a}	84,33 ^{A a}	84,48 ^A
LA c	83,34 ^{A a}	83,27 ^{A a}	83,20 ^{A a}	83,06 ^{A a}	83,20 ^{A a}	83,21 ^B
WC s	84,42 ^{A a}	84,24 ^{A a}	84,27 ^{A a}	84,24 ^{A a}	84,14 ^{A a}	84,26 ^A
WC c	83,00 ^{A a}	83,10 ^{A a}	82,85 ^{A a}	82,94 ^{A a}	82,90 ^{A a}	82,95 ^B
LA+WC s	84,46 ^{A a}	84,66 ^{A a}	84,49 ^{A a}	84,56 ^{A a}	84,37 ^{A a}	84,50 ^A
LA+WC c	83,26 ^{A a}	83,26 ^{A a}	83,30 ^{A a}	83,68 ^{A a}	83,19 ^{A a}	83,33 ^B

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

O RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) não define critérios para os teores percentuais de umidade e extrato seco total, por isso, com base na legislação brasileira não é possível comparar os resultados descritos nas Tabelas 8 e 9. No entanto, várias indústrias de laticínios brasileiras têm elaborado leites fermentados utilizando

aditivos (amido, carragena, etc). Desta forma, embora esteja estabelecida na legislação a concentração máxima no produto final de determinados aditivos, seria importante a definição de valores oficiais de teores de umidade e extrato seco total para a inspeção destes alimentos em relação a estes parâmetros de qualidade.

Tabela 9: Resultados médios percentuais de quatro repetições dos teores de extrato seco total de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Média
	1	10	20	30	40	
LA s	15,47 ^{A a}	15,35 ^{A a}	15,57 ^{A a}	15,51 ^{A a}	15,67 ^{A a}	15,51 ^B
LA c	16,66 ^{A a}	16,73 ^{A a}	16,80 ^{A a}	16,94 ^{A a}	16,80 ^{A a}	16,78 ^A
WC s	15,58 ^{A a}	15,76 ^{A a}	15,73 ^{A a}	15,76 ^{A a}	15,86 ^{A a}	15,73 ^B
WC c	17,00 ^{A a}	16,90 ^{A a}	17,15 ^{A a}	17,06 ^{A a}	17,10 ^{A a}	17,04 ^A
LA+WC s	15,54 ^{A a}	15,34 ^{A a}	15,51 ^{A a}	15,44 ^{A a}	15,63 ^{A a}	15,49 ^B
LA+WC c	16,74 ^{A a}	16,74 ^{A a}	16,70 ^{A a}	16,32 ^{A a}	16,81 ^{A a}	16,66 ^A

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

4.5. Avaliação microbiológica dos leites fermentados

4.5.1. Enumeração dos microorganismos ácido-lácticos

A Tabela 10 apresenta as contagens totais das bactérias ácido-lácticas nos tempos um, 10, 20, 30 e 40 dias de estocagem a 8-10°C de leites fermentados acrescidos ou não de CPS e elaborados com as culturas *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas.

Tabela 10: Contagens médias (UFC/g) em ágar MRS, de quatro repetições de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro, armazenados a 8-10 °C, durante 40 dias de estocagem

Leite Fermentado	Dias					Média
	1	10	20	30	40	
LA s	1,8 x 10 ^{9 A a}	5,5 x 10 ^{8 A a}	6,7 x 10 ^{8 A a}	7,2 x 10 ^{8 A a}	5,0 x 10 ^{8 A a}	8,4 x 10 ^{8 A}
LA c	7,2 x 10 ^{8 A a}	7,0 x 10 ^{8 A a}	7,5 x 10 ^{8 A a}	7,5 x 10 ^{8 A a}	4,5 x 10 ^{8 A a}	6,7 x 10 ^{8 A}
WC s	2,3 x 10 ^{8 A a}	2,4 x 10 ^{8 A a}	3,2 x 10 ^{8 A a}	2,7 x 10 ^{8 A a}	1,6 x 10 ^{8 A a}	2,4 x 10 ^{8 B}
WC c	7,2 x 10 ^{8 A a}	1,4 x 10 ^{8 A a}	2,5 x 10 ^{8 A a}	2,0 x 10 ^{8 A a}	1,1 x 10 ^{8 A a}	2,9 x 10 ^{8 B}
LA+WC s	5,7 x 10 ^{8 A a}	2,5 x 10 ^{8 A a}	3,0 x 10 ^{8 A a}	3,3 x 10 ^{8 A a}	2,0 x 10 ^{8 A a}	3,3 x 10 ^{8 B}
LA+WC c	4,5 x 10 ^{8 A a}	3,5 x 10 ^{8 A a}	2,7 x 10 ^{8 A a}	2,3 x 10 ^{8 A a}	2,4 x 10 ^{8 A a}	3,0 x 10 ^{8 B}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os valores médios de quatro repetições das contagens (UFC/g) das bactérias lácticas totais presentes nos seis leites fermentados e os valores médios de quatro repetições dessas contagens durante cada um dos cinco tempos (dias) diferentes de estocagem sob refrigeração a 8-10°C (Tabela 10). Esse resultado indica que, como pode ser verificado na Tabela 10, embora sejam observadas variações entre as contagens de cada leite fermentado nos diferentes dias de estocagem avaliados, essas não foram diferentes ($p > 0,05$) ao longo dos 40 dias de estocagem a 8-10 °C. Bozanic *et al.* (2004) avaliaram as contagens de *L. acidophilus* em leites acidófilos durante nove dias sob refrigeração a 5 °C. Os autores observaram uma contagem de *L. acidophilus* no nono dia semelhante à contagem no terceiro dia de estocagem. Além disso, a contagem média de *L. acidophilus* observada no nono dia ($1,65 \times 10^8$) foi semelhante à observada no décimo dia de estocagem desse experimento (Tabela 10). No entanto, Dave e Shah, (1998) observaram um declínio constante das contagens de *L. acidophilus* durante 35 dias estocagem.

A legislação brasileira estabelece requisitos mínimos de contagens de microorganismos específicos nos leites fermentados que devem ser cumpridos durante todo o prazo de validade desses produtos. Esses critérios estão definidos para o leite acidófilo, cuja fermentação se realiza exclusivamente com cultivos de *L. acidophilus* e também para o leite fermentado ou cultivado, obtido a partir da fermentação de uma ou várias bactérias ácido-lácticas, inclusive o *L. acidophilus*. Portanto, as contagens mínimas estabelecidas no RTIQ de leites fermentados para o leite acidófilo, podem ser consideradas para o leite fermentado por *L. acidophilus* sem e com CPS, e as contagens mínimas do leite fermentado ou cultivado podem ser aplicadas para os leites fermentados por *W. confusa* sem e com

CPS e para os leites fermentados pelas duas culturas associadas sem e com CPS. Estas contagens mínimas são 10^7 e 10^6 UFC/g para o leite acidófilo e leite fermentado ou cultivado, respectivamente. Diante do exposto, pode ser verificado na Tabela 10, que durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração, todos esses produtos fermentados apresentaram contagens 10^8 UFC/g, superiores ao estabelecido no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007).

Além de atender aos requisitos da legislação brasileira, os produtos probióticos devem garantir os efeitos benéficos, específicos de cada microorganismo, à saúde do consumidor. Para que isso aconteça, os microorganismos probióticos devem estar viáveis e estáveis no produto fermentado, bem como em concentrações adequadas no produto durante todo o prazo de validade estabelecido. Atualmente, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de se determinar a concentração adequada de microorganismo probiótico viáveis, bem como a dose mínima diária (UFC/dia) dos leites fermentados probióticos, que garanta os efeitos benéficos à saúde do consumidor. Alguns autores sugerem no mínimo 10^6 UFC de bactérias probióticas por grama de leite fermentado, pois a dose diária mínima recomendada está entre 10^8 e 10^9 UFC (Rasic e Kurmann, 1983; citado por Gomes e Malcata, 1999). Dessa forma, se 100g do leite fermentado probiótico contendo entre 10^6 a 10^7 UFC/g fosse consumido diariamente, a dose diária mínima igual a 10^8 - 10^9 UFC seria atendida, garantindo os efeitos probióticos. Com relação aos efeitos probióticos, verifica-se na Tabela 10, que todos os leites fermentados elaborados sem e com CPS, apresentaram concentrações adequadas de microorganismos viáveis (10^8 UFC/g) no dia um após a fermentação e se mantiveram adequadas ao longo dos 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C.

Verifica-se, também, que os leites fermentados que apresentaram maiores contagens durante o período de estocagem avaliado foram os elaborados com *L. acidophilus* (Tabela 10). Esses mesmos leites fermentados foram os que apresentaram maior percentual de acidez, conforme a Tabela 6. Esses resultados estão de acordo com os observados por Donkor *et al.* (2006). Esses autores avaliaram iogurtes adicionados de culturas probióticas, entre elas o *L. acidophilus*, durante 28 dias de estocagem a 4°C e verificaram que o *L. acidophilus* parece ser capaz de tolerar melhor as condições de acidez em relação a outros microorganismos probióticos.

As contagens de microorganismos encontradas neste experimento durante os 40 dias de estocagem parecem ser superiores ao descrito em algumas pesquisas (Dave e Shah, 1998; Oliveira *et al.*, 2002; Zacarchenco e Massaguer-Roig, 2004 e Donkor *et al.*, 2006) especialmente sobre os leites fermentados por *L. acidophilus*, pois são escassos os trabalhos que avaliam a produção de leites fermentados com *W. confusa*, bem como a contagem total dessa cultura nesses produtos. Dave e Shah (1998) avaliaram iogurtes adicionados de *L. acidophilus*, sem e com 2% de CPS e encontraram contagens entre 10^7 e 10^5 UFC/g durante os 35 dias avaliados sob refrigeração a 4°C. Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) observaram uma redução nas contagens de *L. acidophilus* em leites fermentados elaborados somente com esta cultura de 10^8 para 10^7 após 21 dias de estocagem a 4°C. Donkor *et al.* (2006) encontraram contagens iniciais de *L. acidophilus* em iogurtes iguais a 10^7 UFC/g que se mantiveram até os 21 dias de estocagem a 4°C, quando foi observado uma redução para 10^6 UFC/g. Oliveira *et al.* (2002) observaram diminuição da viabilidade das culturas de *L. acidophilus* que foram adicionadas juntamente ao *Streptococcus thermophilus*

de 10^8 para 10^6 após 28 dias de estocagem a 4°C.

Na Tabela 10, é possível observar que não existe diferença ($p>0,05$) entre as médias das contagens (UFC/g) dos mesmos leites fermentados sem e com CPS. Portanto, neste experimento, a adição de peptídeos e aminoácidos por meio de 2% de CPS não foi capaz de interferir significativamente na viabilidade das culturas *L. acidophilus* e *W. confusa*. Os aminoácidos e peptídeos existentes no CPS podem ser utilizados como fatores de crescimento para as culturas lácticas, favorecendo a viabilidade das mesmas. Champagne *et al.* (1996) avaliaram o CPS como meio de cultura para culturas lácticas e observaram maior crescimento desses microorganismos no CPS em relação ao leite e ao meio de cultura comercial avaliado. Dave e Shah, (1998) também observaram um declínio constante das contagens de *L. acidophilus* durante 35 dias estocagens em leites fermentados sem e com CPS. Entretanto, Bozanic *et al.* (2004) observaram diferença ($p<0,05$) nas contagens de *L. acidophilus* em leites fermentados sem e com CPS. Segundo os autores, a adição de CPS aumentou a contagem de células viáveis de *L. acidophilus* no leite acidófilo, pois o CPS serviu como uma fonte adicional de aminoácidos essenciais para esta cultura. O conteúdo de proteínas no CPS utilizado no trabalho de Bozanic *et al.* (2004) varia entre 60 a 60,5%, ou seja, quase o dobro do utilizado neste experimento. Este fato poderia explicar a forte influência do CPS na viabilidade das culturas utilizadas por esses autores.

4.5.2. Pesquisa de coliformes totais e termotolerantes

Durante as quatro repetições de pesquisa de coliformes totais e termotolerantes em todos os leites fermentados, não foi observada presença de gás em nenhum dos

tubos contendo caldo Lauril Sulfato de Sódio e tubos de Durhan invertidos. Por isso, somente a Prova Presuntiva foi realizada durante essa análise. Esses resultados indicam qualidade higiênica adequada durante todo o processo de produção e armazenamento dos leites fermentados produzidos. Além disso, os resultados apresentados indicam ausência de coliformes totais e termotolerantes nos leites fermentados no dia um após a fermentação e durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10 °C, qualidade microbiológica superior à exigida no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007).

4.5.3. Pesquisa de bolores e leveduras

Não foi observado crescimento de colônias de bolores e leveduras nas placas. Os resultados indicaram ausência de bolores e leveduras em todos os leites fermentados durante os 40 dias sob refrigeração a 8-

10°C, qualidade superior à exigida no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), que permite até duas amostras entre cinco com contagens entre 50 a 200 UFC/g e demonstraram que não ocorreu contaminação ambiental ou por manipulação com esses microorganismos.

4.6. Avaliação sensorial dos leites fermentados

4.6.1. Teste de aceitação pela escala hedônica de cinco pontos

As medianas apresentadas na Tabela 11 referem-se aos resultados da análise sensorial dos leites fermentados por *L. acidophilus*, *W. confusa* e as duas culturas associadas sem e com CPS representados em forma de pontos atribuídos a cada grau de aceitação (adorei a detestei) presente na escala hedônica de cinco pontos da ficha sensorial.

Tabela 11: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração 8-10°C

Leites fermentados	Dias	
	10	40
LA s	4,0 ^{A a}	4,0 ^{A a}
LA c	4,0 ^{AB a}	4,0 ^{AB a}
WC s	3,0 ^{C a}	3,0 ^{B a}
WC c	3,0 ^{C a}	3,0 ^{AB a}
LA + WC s	3,0 ^{C a}	4,0 ^{A a}
LA + WC c	3,0 ^{BC a}	4,0 ^{A a}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa (p<0,05)

1- Detestei, 2- Não gostei, 3-Não gostei nem desgostei, 4-Gostei, 5-Adorei

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Os resultados da análise sensorial dos leites fermentados armazenados por 10 dias sob refrigeração a 8-10°C indicaram uma preferência pelos leites LA, independentemente da adição ou não de CPS, os quais apresentaram uma mediana correspondente ao grau de aceitação “gostei”. Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) utilizaram uma escala hedônica de nove pontos (desgostei muitíssimo a gostei muitíssimo) para avaliar o atributo sabor de leites fermentados elaborados com *L. acidophilus* e observaram uma pontuação que atribui a esses leites a aceitação “não gostei nem desgostei,” inferior a observada no presente trabalho. A diferença na aceitação dos produtos entre os trabalhos pode ser explicada pela utilização de amostras diferentes de *L. acidophilus*, que possuem padrão de fermentação distintos, resultando em produtos sensorialmente diferenciados.

O leite LA+WC com CPS aos 10 dias de estocagem apresentou mediana correspondente a classificação não gostei nem desgostei, que não foi diferente do leite LA com CPS ($p>0,05$), indicando uma aceitação similar entre esses dois leites fermentados (Tabela 11). Provavelmente, os teores de acidez titulável presentes nesses leites fermentados influenciaram na aceitação sensorial desses produtos. Os leites LA+WC e LA, ambos adicionados de CPS, apresentaram aos dez dias de estocagem valores de acidez titulável iguais a 0,67% e 0,73%, respectivamente. Esses resultados não foram diferentes ($p>0,05$), assim como os graus de aceitação descritos anteriormente, justificando este fato. Entretanto, o leite LA+WC com CPS apresentou aceitação inferior ao leite LA sem CPS, indicando que, neste caso, a não adição deste ingrediente interferiu na aceitação dos produtos avaliados aos 10 dias. Mais uma vez, demonstrando maior influência da cultura bacteriana utilizada na elaboração dos leites fermentados em

relação à adição ou não do CPS na aceitação sensorial dos produtos avaliados.

Na avaliação sensorial dos leites fermentados armazenados por 10 dias sob refrigeração, os provadores demonstraram menor aceitação pelos leites WC sem e com CPS e leites LA+WC sem CPS, provavelmente, devido à acidez mais baixa observada nesses leites fermentados em relação aos leites LA. Esses leites fermentados apresentaram medianas menores em relação aos outros leites, correspondendo à classificação “não gostei nem desgostei,” sendo que foram observados provadores que adoraram (mediana máxima igual a cinco) e outros que detestaram (mediana mínima igual a um) esses produtos (Anexo 4).

As medianas observadas nas análises sensoriais dos produtos armazenados por 40 dias à 8-10°C foram mais altas nas avaliações dos leites LA+WC sem e com CPS deixando de apresentar a aceitação “não gostei nem desgostei” aos 10 dias de armazenamento para apresentar a aceitação “gostei”. Embora esses leites fermentados tenham apresentado medianas mais altas aos 40 dias de estocagem, essas não foram estatisticamente diferentes dos valores de suas medianas encontradas aos 10 dias de estocagem. Provavelmente, o aumento significativo da acidez titulável ($p<0,05$) nesses produtos durante o período de estocagem influenciou na mudança de aceitação de “não gostei nem desgostei” para “gostei”. Esse aumento foi de 0,59 e 0,67% no décimo dia de estocagem para 0,79 e 0,86% aos 40 dias de estocagem dos leites LA+WC sem e com CPS, respectivamente.

Os leites WC sem e com CPS apresentaram mediana igual a três (não gostei nem desgostei) nas análises sensoriais aos 10 e 40 dias de estocagem. No entanto, aos 40 dias de armazenamento o leite WC com

CPS apresentou aceitação equivalente aos leites LA ($p>0,05$). Segundo Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004), a produção de ácido acético por bifidobactérias pode conferir ao produto fermentado sabor e aroma de “vinagre”, no entanto, considerando que a *W. confusa* também produz esse ácido durante seu metabolismo, esse defeito não foi relatado nos leites WC pelos provadores. Portanto, as medianas mais baixas encontradas nesses produtos, provavelmente, foram resultado de níveis mais baixos de acidez e não à produção do ácido acético.

Foi verificado, durante todas as análises sensoriais, que a maior parte dos provadores associaram, imediatamente, o termo leite fermentado à marca comercial que utiliza a cultura *Lactobacillus casei* ssp. Provavelmente, os provadores utilizaram esses produtos como referência na avaliação sensorial e, como o leite WC possui acidez titulável mais baixa em relação aos produtos comerciais, eles foram considerados produtos sensorialmente inferiores.

Os mesmos leites fermentados, independentemente da cultura bacteriana utilizada, sem e com CPS avaliados sensorialmente aos 10 e 40 dias de estocagem sob refrigeração não apresentaram medianas diferentes ($p>0,05$), indicando que os provadores não identificaram diferença no sabor entre os leites sem e com CPS, ou seja, a presença do CPS não interferiu no sabor desses produtos. As interações entre as proteínas do soro e a caseína induzidas pelo calor tornam o leite uma interessante matéria prima para todos os tipos de produtos com textura e com alto valor nutricional (Wit, 1998). Considerando a presença de proteínas do soro usando o CPS e a presença de calor durante a incubação a temperaturas de 37 e 45°C dos leites adicionados de culturas lácticas, as possíveis interações entre as proteínas do

CPS e caseína do leite durante a produção desses produtos, provavelmente, melhoraram o valor nutricional do produto final, mas não interferiram nas características sensoriais.

Com relação ao aspecto sensorial, os leites fermentados não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre os dois tempos de estocagem avaliados (10 e 40 dias), sugerindo que o período de 40 dias pode ser utilizado como tempo de validade para esses produtos, pois esse período de estocagem sob refrigeração a 8-10°C não comprometeu as características sensoriais dos produtos avaliados.

4.6.2. Teste de aceitação pela escala não estruturada

As medianas das pontuações observadas na escala não estruturada ancorada nos extremos pelos números zero e 10 durante as análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 10 e 40 dias sob refrigeração 8-10°C (Tabela 12) foram bastante semelhantes aos resultados apresentados anteriormente na Tabela 11.

Os resultados indicam que com 10 dias de estocagem a 8-10°C os produtos mais aceitos foram os leites LA sem e com CPS (Tabela 12). As medianas desses produtos foram 7,0 e 6,45, respectivamente, no entanto, esses leites fermentados chegaram a obter 10 e zero como nota máxima e mínima, respectivamente (Anexo 5). A discrepância entre as notas pode ser justificada pelo painel de provadores não treinados utilizado no experimento. Além disso, não foi verificada diferença ($p>0,05$) entre esses leites sem e com CPS. Esses resultados não foram semelhantes aos observados por Bozanic *et al.* (2004) que avaliaram várias características sensoriais e observaram qualidade superior nos leites acidófilos suplementados com CPS em relação ao controle. No entanto, esses autores utilizaram cinco provadores

treinados nas análises sensoriais, o que pode explicar a diferença na qualidade entre os leites acidófilos sem e com CPS. Além disso, no trabalho de Bozanic *et al.* (2004) foi adicionado 2% de CPS nos leites, assim como no presente trabalho, porém o conteúdo de proteínas desse CPS variou entre 60 a 60,5%, diferentemente do

utilizado neste experimento. Veith e Reynolds (2004) observaram uma relação positiva entre a composição das proteínas do CPS e a capacidade de formarem gel e interagirem com a água, fatores que poderiam interferir nas características sensoriais dos leites fermentados.

Tabela 12: Medianas dos resultados do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados esterilizados, fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração 8-10°C

Leites fermentados	Dias	
	10	40
LA s	7,0 ^{A a}	6,0 ^{AB a}
LA c	6,45 ^{AB a}	5,5 ^{AB a}
WC s	5,0 ^{C a}	5,0 ^{B a}
WC c	5,0 ^{C a}	5,5 ^{A a}
LA + WC s	5,0 ^{C a}	6,5 ^{A a}
LA + WC c	5,0 ^{BC a}	6,25 ^{A a}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

No teste de avaliação sensorial com escala não estruturada, diferentemente do ocorrido no teste de aceitação utilizando a escala hedônica, foi verificada diferença entre os leites WC sem e com CPS armazenados por 40 dias sob refrigeração a 8-10°C, sendo que o produto adicionado de CPS apresentou uma melhor aceitação (Tabela 12). Verificou-se também que os leites WC apresentaram notas (medianas) que não foram diferentes ($p > 0,05$) dos leites LA, por isso, pode-se considerar que a aceitação dos leites WC e LA foram similares aos 40 dias de armazenamento sob refrigeração. Porém, o leite WC sem CPS também foi inferior ($p < 0,05$) aos leites LA+WC sem e com CPS.

De maneira geral, aos 40 dias de armazenamentos a 8-10°C os leites fermentados apresentaram resultados estatísticos mais similares que aos 10 dias. Quando os resultados do teste de aceitação dos leites fermentados armazenados por 10 dias são comparados com os resultados dos produtos armazenados por 40 dias, não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre as medianas. Os resultados da escala não estruturada confirmam a idéia dos resultados apresentados no teste de aceitação com a escala hedônica, de que estes produtos fermentados podem apresentar uma vida de prateleira de 40 dias.

Mangino (1992) considera a capacidade de formar gel a característica funcional mais importante dos concentrados protéicos de soro. A viscosidade não foi avaliada isoladamente nas análises sensoriais, mas é importante destacar que, mesmo não observando diferença ($p>0,05$) entre os leites sem e com CPS, todos os leites fermentados adicionados de CPS apresentaram, durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração, um coágulo mais firme e um nível de sinérese mais moderado em relação aos leites sem CPS. Oliveira e Damim (2003) observaram efeito significativo da adição de sacarose e do aumento do teor de sólidos totais do leite, bem como da co-cultura empregada, na firmeza dos leites fermentados. Esses resultados têm relação com as observações feitas nos leites fermentados elaborados no presente trabalho, pois os autores observaram esse efeito em leites fermentados com teores de sólidos totais (15%) e sacarose (8%) iguais as dos produtos elaborados neste experimento.

5. RESUMO DOS RESULTADOS

Os leites fermentados por *L. acidophilus*, quando comparados aos outros leites fermentados, apresentaram valores de acidez titulável (%) mais altos, assim como valores de pH mais baixos ao fim da fermentação.

Todos os leites fermentados apresentaram contagens adequadas do ponto de vista probiótico e superiores ao mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007) ao fim da fermentação.

Os leites LA+WC, independentemente da adição de CPS, apresentaram um tempo de fermentação menor, podendo ser vantajoso para a indústria a utilização dessas culturas, simultaneamente, em relação à utilização do *L. acidophilus* ou *W. confusa* isoladamente.

A incorporação de aminoácidos e peptídeos por meio da adição de 2% de CPS contendo 34,5% de proteínas não interferiu no tempo de fermentação dos leites, independentemente das culturas lácticas adicionadas.

Os leites fermentados elaborados com *W. confusa*, independentemente da adição de CPS, apresentaram pH mais alto e acidez titulável mais baixa durante os 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10 °C.

Não foram observadas diferenças ($p>0,05$) nos parâmetros físico-químicos avaliados (exceto acidez titulável) durante 40 dias de estocagem dos leites fermentados sob refrigeração a 8-10°C, sugerindo que esse tempo pode ser utilizado como prazo de validade para esses produtos.

Todos os leites fermentados elaborados, independentemente da adição de CPS, apresentaram concentrações adequadas de microorganismos viáveis (10^8 UFC/g) para garantir os efeitos probióticos, durante 40 dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C, sugerindo que esse período pode ser utilizado como tempo de validade para esses produtos.

Os resultados da pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e bolores e leveduras indicaram ausência desses microorganismos em todos os leites fermentados durante os 40 dias sob refrigeração, portanto, a qualidade microbiológica dos leites fermentados avaliados foi superior à exigida na legislação (Brasil, 2007).

Durante as análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C, os provadores não identificaram diferença no sabor entre os leites fermentados acrescidos ou não de CPS, ou seja, a presença do CPS não interferiu no sabor desses produtos ($p>0,05$).

Os leites fermentados, com relação ao aspecto sensorial, não apresentaram diferença ($p>0,05$) entre os dois tempos de estocagem avaliados (10 e 40 dias), sugerindo que o período de 40 dias pode ser utilizado como tempo de validade para esses produtos, pois esse período de estocagem não comprometeu as características sensoriais dos produtos avaliados.

6. CONCLUSÕES

As culturas lácticas *L. acidophilus* e *W. confusa* poderiam ser utilizadas na produção industrial de novos leites fermentados probióticos. O período de 40 dias pode ser utilizado como tempo de validade para esses produtos, pois todos os leites fermentados apresentaram durante este período contagens adequadas do ponto de vista probiótico e superiores ao mínimo estabelecido na legislação. Além disso, este período não comprometeu as características sensoriais dos produtos avaliados. A adição de 2% de CPS contendo 34,5% de proteínas não interferiu no tempo de fermentação dos leites, independentemente das culturas lácticas adicionadas. Além disso, a presença do CPS não interferiu no sabor destes produtos, portanto este ingrediente pode ser utilizado durante a elaboração industrial de leites fermentados.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a possibilidade da utilização dos microorganismos isolados de produtos lácteos artesanais, como o queijo de coalho, na produção industrial de novos leites fermentados. O ideal seria a associação das amostras de *L. acidophilus* e *W. confusa* testadas, proporcionando menor tempo de fermentação. Dessa forma, a produção industrial brasileira desses produtos poderia tornar-se menos dependente das culturas

lácticas comercializadas por empresas estrangeiras.

Provavelmente, o concentrado protéico de soro poderá ser utilizado, futuramente, para reduzir o tempo de fermentação do leite pelas culturas lácticas testadas e melhorar a viabilidade das mesmas, porém o teor de proteína presente no concentrado protéico de soro e a porcentagem adicionada desse ingrediente ao leite devem ser modificados em relação à formulação utilizadas no presente trabalho para tentar potencializar os efeitos desse aditivo no produto final e proporcionar benefícios econômicos ao fabricante.

Os resultados indicam, também, a necessidade de serem realizadas novas pesquisas avaliando os aspectos sensoriais dos leites fermentados por painéis com juízes treinados e o comportamento das culturas em sistema de produção em escala industrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALLONGUE, J. Bifidobacteria and probiotic action. In: Salminen, S.; Von Wright, A. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 357-428.

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

BEIGI, R. H.; WIESENFELD, H. C.; HILLIER, S. L.; STRAW, T.; KROHN, M. A. Factors associated with absence of H₂O₂-producing *Lactobacillus* among women with bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.*, v. 191, p. 924-929, 2005.

- BJÖRKROTH, K. J.; SCHILINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W. H.; KORKEALA, H. J.; VANDAME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 52, p. 141-148, 2002.
- BOZANIC, R.; TRATNIK, L.; HERCEG, Z.; MARIC, O. The influence of milk powder, whey protein concentrate and inulin on the quality of cow and goat acidophilus milk. *Acta aliment.*, v.33, n.4, p.337-346, 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº 146 de 07/03/2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó. Brasília, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62 de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília, 2005. 1018 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº.46 de 23/10/2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, 2007.
- BUTTRISS, Judith. Nutritional properties of fermented milk products. *Int. J. Dairy Technol.*, v. 50, n.1, p. 21-27, 1997.
- CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; AUDET, P. Starters produced on whey protein concentrates. *Milchwiss.*, v. 51, p.561-564, 1996.
- COLLINS, M. D.; SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J.; WALLBANKS, S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 75, p. 595-603, 1993.
- CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTI, N.; GOBBETTI, M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 64, p.95-107, 2001.
- CUNNINGHAM, S. *Marketing of Dairy Ingredients: World Ingredients*. Parte 2. p. 38-41. 1995.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2804-2816, 1998.
- DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *Int. Dairy J.*, v.16, p.1181-1189, 2006.
- DUNNE, C., MURPHY, H., FLYNN, S. *et al. Probiotics: from myth to reality*. In:

- Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism, and Applications. Groningen: Kluwer Academic Publishers. 410p. 1999.
- EVANS, J. B.; NIVEN JR, C. F.; Nutrition of the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bacteriol.*, v.62, p.599-603, 1951.
- FENNEMA, O.R. *Food Chemistry*. 4.ed. Madison: Marcel Dekker, 1996. 1069p.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FULLER, R. *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman & Hall. 1992. 398p.
- GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.*, v.9, p.125-134, 1999.
- GARVIE, E. I. Genus *Leuconostoc* In: SENAETH, P.H.A; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986. 1234 p.
- GARVIE, E. I. The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc* including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.*, v.48, p.439-447, 1967.
- GILLILAND, S. E. Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.2483-2494, 1989.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Tech.*, v.10, p.139-157, 1999.
- GONZÁLEZ, S. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C.; MACIAS, M. E. N.; OLIVER, G. Inhibition of enteropathogens by Lactobacilli strains used in fermented milk. *J. Food Prot.* v. 56, n.9, p.773-776, 1993.
- GUEDES NETO, L. G. *Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de Staphylococcus spp e de bactérias ácido lácticas e de sua atividade antagonista in vitro*. 2004. 94f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GUSILS, C.; GONZALEZ, S.M.; OLIVER, G. *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. *J. Food Prot.*, v. 62, p. 252-256, 1999.
- HATTINGH, A. L.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.*, v.11, p.1-17, 2001.
- HUFFMAN, L. M.; HARPER, W. J. Maximizing the value of milk through separation technologies. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.2238-2244, 1999.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Determination of titratable acidity. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.150, p.1 - 2, 1991.
- IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°. *Bull. Int. Dairy Fed.*, n.117B, p.1 - 4, 1997.

- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. New York: Chapman & Hall. 1996.
- JOHANSSON, M-L.; SANNI, A.; LONNER, C.; MOLIN, G. Phenotypically based taxonomy using API 50CH of *Lactobacilli* from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 25, p.159-168, 1995.
- JOINT FAO/WHO Food and Agricultural Organization/World Health Organization *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London, Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002. 11 p.
- JOINT WHO/FAO/OIE Food and Agricultural Organization/World Health Organization Background document for the Joint WHO/FAO/OIE expert. In: *Workshop on non-human antimicrobials usage and antimicrobials resistance scientific assessment*. Geneva, Switzerland, December 1-5, 2003. 117 p.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. *Aust. J. Technol.*, v.52, p.28-35, 1997.
- KANDLER, O.; SCHILLINGER, U.; WEISS, N. *Lactobacillus halotolerans* sp. nov., rev. and *Lactobacillus minor* sp. nov., nom.rev. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.4, p.280-285, 1983.
- KANDLER, O.; WEISS, N. Regular non-sporing Gram-positive rods. In: SENAETH, P.H.A; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT J.G. (editors). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986. 1234 p.
- KESSLER, H. G. The structure of fermented milk products as influenced by technology and composition. *Texture of fermented milk products and dairy desserts: Proceedings of the IDF, Symposium*, Vicenza, Itália, p. 93-105, 1998.
- KLAVER, F. A. M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. *Neth. Milk Dairy J.*, v.47, 151-164, 1993.
- KROEGER, M.; KURMANN, J.A; RASIC, J.L. Fermented milks – past, present and future. *Food Technol.*, v. 43, p. 92-99, 1989.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. *Trends Food Sci. Tech.*, v. 6, p.241-244, 1995.
- LEE. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.250, n.1, p.157-162, 2005.
- LILLEY, D.M.; STILWELL, R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci*, v. 147, p. 747-748, 1965.
- LIN, H.W.; HWANG, C.F.; CHEN, L.W.; TSEN, H.Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.*, v.23, p. 74–81, 2006.
- MANGINO, M. E. Physicochemical of whey protein functionality. *J. Dairy Sci.*, v.67, p.2711-2722, 1984.
- MANGINO, M. E. Gelation of whey protein concentrates. *Food Technol.*, v.46, p.114-117, 1992.
- MARTINEZ-MURCIA, A. J.; COLLINS, M. D. A phylogenetic analyses of the genus *Leuconostoc* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.70, p. 73-84, 1990.

- MARTINEZ-MURCIA, A. J.; COLLINS, M. D. A phylogenetic analyses of an atypical *Leuconostoc*: description of *Leuconostoc fallax* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.82, p. 55-60, 1991.
- MARTINEZ-MURCIA, A. J.; HARLAND, N. M.; COLLINS, M. D. Phylogenetic analyses of some leuconostoc and related organisms as determined from large-subunit rRNA gene sequences: assessment of congruence of small- and large- subunit rRNA derived trees. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 74, p. 532-541, 1993.
- MCINTOSH, G. H.; ROYLE, P. J.; LEU, R. K. L.; REGESTER, G. O.; JOHNSON, M. A.; GRINSTED, R. L.; KENWARD, R. S.; SMITHERS, G. W. Whey protein as functional food ingredients. *Int. Dairy J.*, v.8, p.425-434, 1998.
- MOREA, M.; BARUZZI, F.; CAPPA, F.; COCCONCELLI, P. S. Molecular characterization of the *Lactobacillus* community in traditional processing of Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 43, p.53-60, 1998.
- MOREIRA, J. L.; MOTA, R. M.; HORTA, M.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, v. 5, n. 15, p. 1-9, 2005.
- MORR, C. V. Improving the texture and functionality of whey protein concentrate. *Food Technol.*, v.46, p.110-113, 1992.
- MORR, C. V.; SWENSON, P.E.; RICHTER, R.L. Functional characteristics of whey protein concentrates. *J. Food Sci.*, v. 38, p.324-330, 1973.
- MUGULA, J. K.; NNKO, S. A. M.; NARVHUS, J. A.; SORHAUG, T. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 80, p.187-199, 2002.
- MUYANJA, C. M. B. K.; NARVHUS, J. A.; TREIMO, J.; LANGSRUD, T. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from *bushera*: a Ugandan traditional fermented beverage. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 80, p.201-210, 2002.
- NAM, H.; MISUN HA; ON BAE; YEONHEE LEE. Effect of *Weissella confusa* strain PL9001 on the adherence and growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, n.9, p.4642-4645, 2002.
- NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. *Enferm. Infecc. Microbiol.*, v. 15, p. 183-190, 1995.
- NIELSEN, D.S.; MOLLER, P. L.; ROSENFELDT, V.; PAERREGAARD, A.; MICHAELSEN, K. F.; JAKOBSEN, M. Case study of the distribution of mucosa associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, n.12, p.7545-7548, 2003.
- NIVEN, C. F.; EVANS, J. B. *Lactobacillus viridescens* nov.spec., a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. *J. Bacteriol.*, v.73, p.758-759, 1957.
- OCANÃ, V. S., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A.; NADER-MACIAS, M. E. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr. Microbiol.* v. 38, p.279-284, 1999.

- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, v.11, p.935-942, 2001.
- OLIVEIRA, M. N.; DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.23, p.172-176, 2003.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J. P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *J. Food Sci.*, v.67, n.6, p.2336-2341, 2002.
- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.*, v.8, p.749-758, 1998.
- PALUDAN-MÜLLER, C.; HUSS, H. H.; GRAM, L. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 46, p.219-229, 1999.
- RASIC, J.L.; KURMAN, J.A. *Bifidobacteria and Their Role*. Birkhäuser, Basel, Switzerland. 1983.
- ROBINSON, R. Therapeutics properties of fermented milks. Essex (England): Elsevier, 1991. 185 p.
- SALMINEM, S. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, v. 8, p. 563-572, 1998.
- SALMINEM, S. Probiotics: how should they be defined? *Trends Food Sci. Tech.*, v.10, p. 107-110, 1999.
- SAMELIS, J.; MAUROGENAKIS, F.; METAXOPOULOS, J. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 23, p.179-196, 1994.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.
- SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.894-907, 2000.
- SHAHANI, K.M.; CHANDAN, R.C. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. *J. Dairy Sci.* v.62, p.1685-1694, 1979.
- SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D.; SILVA, K. J.; DIONYSIUS, D. A.; FRANCIS, G. L.; GODDARD, C.; GRIEVE, P. A.; MCINTOSH, G. H.; MITCHELL, I. R.; PEARCE, R. J.; ROGESTER, G. O. New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.1454-1459, 1996.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* *Int. J. Food Microbiol.*, v. 36, p.1-29, 1997.
- SUSKOVIC, J.; BRKIC, B.; MATOSIC, S.; MARIC, V. *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwiss.* V.52, n.8, p.430-435, 1997.
- TANASUPAWAT, S.; SHIDA, O.; OKADA, S.; KOMAGATA, K. *Lactobacillus acidipiscis* so. nov and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 50, p. 1479-1485, 2000.

TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.65, n.9, p.4264-4267, 1999.

TONG, J.L.; RAN, Z.H.; SHEN, J.; ZHANG, C.X.; XIAO, S.D. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 25: 155-168, 2007.

VANDAME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.*, v.60, n.2, p. 407-438, 1996.

VEITH, P. D.; REYNOLDS, E. C. Production of a high gel strength whey protein concentrate from cheese whey. *J. Dairy Sci.*, v.87, p.831-840, 2004.

WALTER, J.; HERTEL, C.; TANNOCK, G. W.; LIS, C. M.; MUNRO, K.; HAMMES, W.P. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.67, n.6, p. 2578- 2585, 2001.

WIT, J. N. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.597-608, 1998.

YAMAUCHI, K.; SHIMIZU, M.; KAMIYA, T. Emulsifying properties of whey protein. *J. Food Sci.*, v.45, p.1237-1242, 1980.

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

9. ANEXOS

Anexo 1: Modelo da Ficha Sensorial utilizada nas análises sensoriais dos leites fermentados estocados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10 °C

ANÁLISE SENSORIAL DOS LEITES FERMENTADOS

Nome: _____ Data: _____

Por favor, prove com atenção as amostras.

Identifique o número de cada amostra e marque um x na linha abaixo, como se estivesse dando uma nota para o produto numa escala de 0 (zero) a 10 (dez). Marque também uma das opções a seguir, dando sua opinião sobre cada amostra.

Amostra: _____

0

10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0

10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0

10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0

10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0

10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Amostra: _____

0

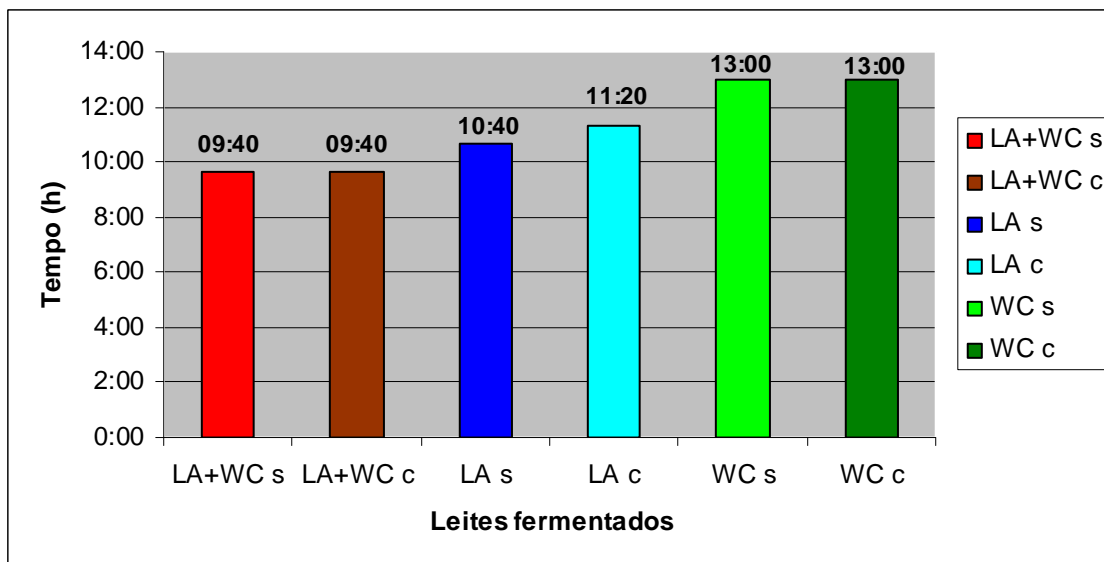
10

				
<input type="checkbox"/> ADOREI	<input type="checkbox"/> GOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI	<input type="checkbox"/> NÃO GOSTEI	<input type="checkbox"/> DETESTEI

Anexo 2: Fotografia do coágulo formado e o seu desprendimento da parede do frasco.



Anexo 3: Médias de três repetições do tempo de fermentação de leites desnatados esterilizados adicionados de *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e as duas culturas associadas sem e com concentrado protéico de soro



LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Anexo 4: Resultados máximos e mínimos do teste de aceitação (escala hedônica de cinco pontos) de leites desnatados fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C

Leites fermentados	Dias			
	10		40	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
LA s	1	5	2	5
LA c	1	5	1	5
WC s	1	5	1	5
WC c	1	5	1	5
LA+WC s	1	5	1	5
LA+WC c	1	5	1	5

1- Detestei, 2- Não gostei, 3-Não gostei nem desgostei, 4-Gostei, 5-Adorei

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS

Anexo 5: Resultados máximos e mínimos do teste de aceitação (escala não estruturada) dos leites desnatados fermentados por *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* simultaneamente, sem e com concentrado protéico de soro armazenados por 10 e 40 dias sob refrigeração a 8-10°C

Leites fermentados	Dias			
	10		40	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
LA s	0,0	10,0	0,5	10,0
LA c	0,0	10,0	0,0	10,0
WC s	0,5	9,5	0,0	10,0
WC c	0,0	10,0	0,0	10,0
LA+WC s	0,0	10,0	0,5	10,0
LA+WC c	0,5	10,0	0,5	10,0

LA s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* sem CPS; LA c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* com CPS; WC s: leite fermentado por *Weissella confusa* sem CPS; WC c: leite fermentado por *Weissella confusa* com CPS; LA+WC s: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* sem CPS; LA+WC c: leite fermentado por *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* com CPS