



**Universidade Norte do Paraná**

---

CENTRO DE PESQUISA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

SILVIA TORRES DI CICCO

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E DE  
VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS EM  
LEITE FERMENTADO COM LACTOSE HIDROLISADA**

---

Londrina  
2012

**SILVIA TORRES DI CICCO**

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E DE  
VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS EM  
LEITE FERMENTADO COM LACTOSE HIDROLISADA**

Projeto de dissertação apresentado à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis

Londrina  
2012

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

**Dados Internacionais de catalogação-na-publicação  
Universidade Norte do Paraná  
Biblioteca Central  
Setor de Tratamento da Informação**

Di Cicco, Silvia Torres

D541a Avaliação físico-química, sensorial e de viabilidade de micro-organismos probióticos em leite fermentado com lactose hidrolisada / Silvia Torres Di Cicco. Londrina: [s.n], 2012.

iv; 46p

Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite – Fabricação de Derivados. Universidade Norte do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis.

1- Tecnologia do leite – dissertação de mestrado – UNOPAR 2- Aceitação sensorial 3- Intolerância 4- *Lactobacillus acidophilus* 5- *Lactobacillus casei*  
I- De Rensis, Christiane Vasconcellos Barros, orient. II- Universidade Norte do Paraná.

CDU 637.1

SILVIA TORRES DI CICCO

**AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIAL E DE VIABILIDADE DE  
MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS EM LEITE FERMENTADO  
COM LACTOSE HIDROLISADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis

Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Priscila Cristina Bizan Vianna

Universidade Norte do Paraná

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Larissa Canhadas Bertan

Universidade Federal da Fronteira Sul

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por estar sempre presente na minha vida guiando meus passos e me capacitando.

Gostaria de agradecer algumas pessoas que foram fundamentais e me acompanharam durante esse período de mestrado.

Aos meus pais, Ivo e Elenice e minha irmã Isabela, que me incentivaram, principalmente a minha mãe que sempre me apoiou e participou de todos os momentos ao longo desse período de estudo e dedicação.

Ao Maurício, pelo apoio, compreensão, companheirismo e carinho.

Minha gratidão especial para minha professora e orientadora Christiane, uma pessoa maravilhosa, amiga e uma profissional admirável, obrigada por sua dedicação e por ter acreditado e confiado em mim, por estar presente e por me apoiar em todos os momentos ao longo desses anos.

A todos os professores do Mestrado, em especial ao Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig e Priscila Viana, pelas orientações.

A minha amiga Josemeyre, por me incentivar e sempre ter uma palavra de motivação.

Aos amigos do Mestrado e da graduação que colaboraram de diversas formas para que esse sonho fosse concretizado: Alessandra, Angélica, Ariane, Danielle, Fernanda, Jéssica, José Renato, Larissa, Osney, Priscila e Tarlis. Aline, Cintia e Paulo.

Aos funcionários e amigos do laboratório, Donato, Joelma e Elaine pela ajuda, atenção e amizade.

DI CICCIO, Silvia Torres. **Avaliação Físico-Química, sensorial e de viabilidade de micro-organismos probióticos em Leite Fermentado com Lactose Hidrolisada**. 2012. p. 45. Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite. UNOPAR – UNIVERSIDADE NORTE DO PARANÁ, LONDRINA, 2012.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas, sensoriais e a viabilidade dos micro-organismos probióticos em leites fermentados com lactose hidrolisada. As culturas probióticas utilizadas na proporção 2% (v/v) foram *Lactobacillus acidophilus* (LA) e *Lactobacillus casei* (LC). Foram produzidos três tipos de leites fermentados com lactose hidrolisada, todos adicionados com uma cultura *starter* - *Streptococcus thermophilus* na proporção 2%. Os leites fermentados foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 quanto à enumeração dos micro-organismos *starter* e probióticos, acidez e pH. A composição centesimal das diferentes formulações foram realizadas nos dias seguintes à fabricação das mesmas. A aceitação sensorial dos leites fermentados foram avaliadas sete dias após o processamento. Os resultados foram analisados através da análise de variância utilizando o Teste de Tukey (5% de probabilidade) para verificar a diferença entre as médias. Cada bloco de experimentos foi repetido três vezes, totalizando-se 9 experimentos. Os leites fermentados dos três tratamentos apresentaram resultados físico-químicos de acordo com os padrões exigidos pela legislação vigente. A composição físico-química não apresentou diferença significativa para os diferentes tratamentos dos leites fermentados. Durante o período de armazenamento refrigerado a 4 °C dos leites fermentados, os valores de pH e acidez apresentaram diferença significativa, sendo que a acidez também apresentou diferença quanto ao tratamento. Não foi verificada diferença significativa na contagem de *Streptococcus thermophilus* durante o período de armazenamento e entre os tratamentos. Os valores de acidez apresentaram diferença significativa para os três tratamentos. Houve diferença significativa na contagem de *Lactobacillus* nos produtos LA (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*) e LC (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus casei*). As notas médias dos atributos avaliados tais como: a aparência; a impressão global; o aroma; o sabor; a textura apresentaram variações de 5,86 a 7,08, indicando uma boa aceitação do produto. Cerca de 41% dos consumidores certamente ou provavelmente comprariam o leite fermentado Controle. Já 42% dos consumidores teriam a mesma atitude para o leite LA e 49% dos consumidores para o leite LC.

**Palavras-chave:** aceitação sensorial, intolerância, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*.

DI CICCIO, Silvia Torres. **Evaluation of the physico-chemical and sensorial aspects and of the feasibility of probiotic micro-organisms in lactose hydrolyzed fermented milk.** 2012. p. 45. Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite. UNOPAR – UNIVERSIDADE NORTE DO PARANÁ, LONDRINA, 2012.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate physico-chemical and sensorial characteristics and the feasibility of probiotic micro-organisms on lactose-hydrolyzed fermented milk. The probiotic cultures used were *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, in the proportion of 2% (v / v). There were produced three types of fermented milk with hydrolysed lactose, in which a *starter* culture of *Streptococcus thermophilus* in proportion of 2% was added. The fermented milk probes were evaluated on the 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>th</sup> and 28<sup>th</sup> days, regarding the enumeration of the *starter* micro-organisms and the probiotics, acidity and pH. The centesimal composition of the different formulations was carried out the day after their production. The acceptance of the fermented milk was evaluated seven days after the processing. The results were examined through the analysis of variance using the Tukey test (probability of 5%) to verify the difference between the average results. Each block of experiments was repeated three times, totaling nine experiments. The fermented milk of the three treatments showed physico-chemical results according to the standards required by law. The physico-chemical composition showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) for the different treatments of the fermented milk. During the period of storage of the fermented milk at 4°C, the pH and acidity showed significant differences ( $p < 0.0001$ ), and the acidity also showed differences according to the treatment ( $p < 0.0001$ ). There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) noticed in the counting of *Streptococcus thermophilus* during storage period and between the treatments. The values of pH and acidity showed significant differences ( $p < 0.05$ ) for the three treatments. There was a significant difference ( $p < 0.0001$ ) in the counting of *Lactobacillus* in the products LA and LC. The averages of the evaluated attributes such as appearance, overall impression, smell, flavor, and texture, showed a variation from 5.86 to 7.08, indicating good acceptance of the product. About 41% of consumers would certainly or probably buy the fermented milk Control. However, 42% of consumers would have the same attitude for milk LA and 49% of consumers for milk LC.

**Keywords:** sensorial acceptability, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and intolerance.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Figura 1-</b> Estrutura química da lactose .....	14
<b>Figura 2 -</b> Fluxograma de fabricação dos leites fermentados .....	24
<b>Figura 3 –</b> Escala para teste de Diferença do Controle .....	27
<b>Figura 4 –</b> Escala hedônica estruturada de 9 pontos – Teste de Aceitação .....	28
<b>Figura 5 -</b> Valores de pH dos leites fermentados durante o período de armazenamento .....	32
<b>Figura 6 -</b> Valores de acidez dos leites fermentados durante o período de armazenamento .....	33
<b>Figura 7 -</b> Contagem de <i>Streptococcus thermophilus</i> durante o período de armazenamento .....	34
<b>Figura 8 -</b> Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> e <i>L. casei</i> nos leites fermentados LA e LC, durante o período de armazenamento a 4°C .....	36
<b>Figura 9 -</b> Intenção de compra dos provadores em relação aos leites fermentados sem lactose, com e sem adição de probióticos .....	39



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição média do leite de vaca .....	13
<b>Tabela 2</b> - Formulações dos leites fermentados .....	22
<b>Tabela 3</b> - Média e desvio padrão da composição físico-química dos leites fermentados com lactose hidrolisada com e sem adição de probióticos.....	30
<b>Tabela 4</b> – Resultado da avaliação estatística do pH, acidez e contagem de <i>S. thermophilus</i> durante o período de armazenamento .....	31
<b>Tabela 5</b> - Resultado da avaliação estatística da contagem de <i>Lactobacillus</i> durante o período de armazenamento .....	35
<b>Tabela 6</b> - Teste de diferença do controle das amostras com adição de micro-organismos probióticos.....	37
<b>Tabela 7</b> – Notas médias do teste de aceitação sensorial dos leites fermentados com lactose hidrolisada e com adição de probióticos .....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>12</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
3.1 LEITE.....	13
3.2 LACTOSE – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....	14
3.3 INTOLERÂNCIA À LACTOSE.....	15
3.4 HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	16
3.5 LEITE FERMENTADO.....	17
3.6 CULTURAS PROBIÓTICAS.....	18
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS.....	21
4.2 PREPARO DAS CULTURAS.....	21
4.3 HIDRÓLISE DA LACTOSE.....	21
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE.....	21
4.5 FABRICAÇÃO DOS LEITES FERMENTADOS.....	22
4.6 ARMAZENAMENTO E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM.....	23
4.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	25
4.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	25
4.9 ANÁLISE SENSORIAL.....	26
4.9.1 Teste de Diferença do Controle.....	26
4.9.2 Teste de Aceitação Sensorial.....	27
4.10 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	29
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
5.1 COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	30
5.2 MUDANÇAS OCORRIDAS DURANTE O ARMAZENAMENTO REFRIGERADO.....	31
5.3 ANÁLISE SENSORIAL.....	37
5.3.1 Teste de Diferença do Controle.....	37
5.3.2 Teste de Aceitação sensorial.....	38
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A intolerância a lactose consiste na ausência ou deficiência na produção de lactase, enzima responsável por hidrolisar a lactose proveniente de leite e derivados. (MANAN, 1999; CARMINATTI, 2001; LONGO, 2006).

Os principais sintomas clínicos de intolerância à lactose são dor e distensão abdominal, flatulência e diarreia aquosa (JIANG; MUSTAPHA; SAVAIANO, 1996). Mais de 50% da população mundial apresenta intolerância à lactose, sendo essa uma das desordens genéticas mais comuns (DURING et al., 1998).

A hidrólise da lactose por beta-galactosidase é uma das principais tecnologias aplicadas para produção de produtos lácteos com baixa lactose. Uma alternativa para diminuir os efeitos causados pela intolerância à lactose consiste no uso de alimentos funcionais com adição de culturas probióticas (SAAD, 2006).

Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos e isso se deve aos avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos, que resultaram na incorporação de probióticos não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e até em produtos cárneos (MATTILA, SANDHOLM, 2002).

Os alimentos probióticos são suplementados com micro-organismos vivos que consumidos regularmente em quantidades suficientes, devem produzir efeitos benéficos à saúde e ao bem estar, além dos efeitos nutricionais habituais que beneficiam o hospedeiro por meio da melhoria do equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; GIBSON; ROBERFROID, 1995; HENKER et al., 2007).

O principal objetivo da utilização dos probióticos é aumentar o número e a atividade dos micro-organismos intestinais com propriedades úteis ao hospedeiro (FULLER, 1989). Os probióticos devem apresentar resistência ao ácido do estômago, à bile e as enzimas pancreáticas e digestivas, adesividade às células da mucosa intestinal e produção de substâncias antimicrobianas contra as bactérias patogênicas (HAVENAAR et al., 1992; SALMINEM et al., 1998; OUWERHAND et al., 1999; SAARELA et al., 2000; HOLZAPPEL; SCHILLINGER, 2002; DANIEL et al., 2006).

Diversos produtos lácteos probióticos estão disponíveis comercialmente. Dentre esses produtos, os leites fermentados são os mais

comercializados no mundo (STANTON et al., 1998; GARDINER et al., 1999).

Atualmente, muitos países possuem uma grande variedade de produtos com baixa lactose, porém no Brasil este mercado ainda tem sido pouco explorado. Com exceção do leite UHT, o mercado brasileiro ainda não dispõe de derivados lácteos com baixo teor de lactose voltados a esses consumidores (ABLV, 2005). Recentemente, a indústria de produtos lácteos tem dado grande importância ao desenvolvimento de produtos contendo baixo teor de lactose, visando atender aos consumidores que apresentam má absorção ou intolerância à lactose (SUENAGA et al., 2010).

## **2 OBJETIVO**

Avaliar as características físico-químicas, sensoriais e a viabilidade dos micro-organismos probióticos em leite fermentado com lactose hidrolisada.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Leite

Segundo a legislação brasileira, “leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 2002).

Tem grande importância na alimentação humana, devido ao seu elevado valor nutritivo, como fonte de proteínas, lipídeos, carboidratos, vitaminas e minerais, é também um excelente meio para o crescimento de vários grupos de micro-organismos desejáveis e indesejáveis (SOUZA et al., 1995).

Contém praticamente, todos os nutrientes em quantidades significativas, é um alimento completo. O leite de alguns animais, como de vaca, búfala, cabra e ovelha, são usados para consumo humano e também na forma de derivados lácteos (WALSTRA, WOUTERS, GEURTS, 2006).

Dentre os diferentes componentes do leite, a água apresenta-se em maior proporção, e os demais são formados principalmente por gordura, proteínas e carboidratos. Existem, também, pequenas quantidades de substâncias minerais, substâncias hidrossolúveis transferidas diretamente do plasma sanguíneo, proteínas específicas do sangue e traços de enzimas (TRONCO, 2003). A composição aproximada do leite de vaca está descrita na Tabela 1.

**Tabela 1** - Composição média do leite de vaca

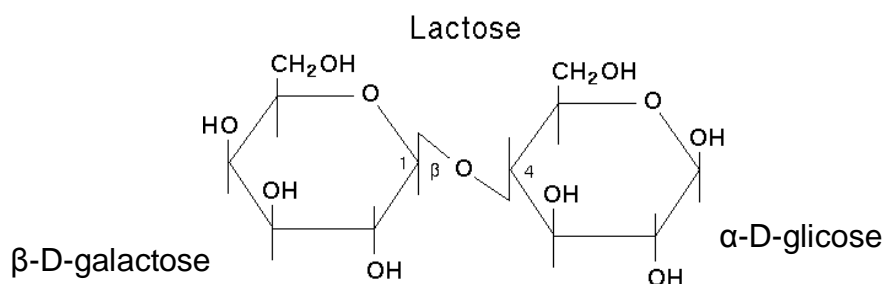
<b>Componente</b>	<b>Composição média (%)</b>
Água	87,0
Sólidos totais	13,0
Gordura	3,9
Proteínas	3,4
Lactose	4,8
Minerais	0,8

**Fonte:** FOX, 1998.

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a composição e qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o estado de saúde do animal, o período de lactação e o número de parições. Os fatores extrínsecos incluem higiene e manejo da ordenha, a dieta, a temperatura e velocidade de resfriamento, transporte e armazenamento do leite antes de seu processamento (FOX; MCSWEENEY, 1998; SANTOS; FONSECA, 2006; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

### 3.2 Lactose – principais características

A lactose é o principal carboidrato do leite. É um dissacarídeo constituído por glicose e galactose, ligados por uma ligação glicosídica (beta-galactosil-1-4-glicose) (Figura 1), sintetizada a partir da glicose absorvida pelo sangue (FOX, 1998).



**Figura 1-** Estrutura química da lactose

**Fonte:** CAMPBELL, 2000.

Nos leites de diferentes mamíferos, a concentração da lactose varia entre 2% e 10%, sendo que o teor de lactose no leite bovino varia em torno de 4,4% e 5,2%, com média de 4,8% de lactose anidra. A lactose tem um papel importante na síntese do leite, pois é seu principal fator osmótico, responsável por 50% desta variável. Em função da estreita relação entre síntese de lactose e quantidade de água drenada para o leite, o conteúdo de lactose é o componente do leite que tem menos variação (FOX; McSWEENEY, 1998).

Segundo Kirkpatrick e Fenwick (1987), por possuir poder adoçante inferior ao da sacarose, a lactose pode ser utilizada na formulação de alimentos sem ofuscar o sabor natural de outros componentes. Quando usada em produtos assados, a lactose promove a reação de *Maillard*, o que melhora a coloração da crosta. Em altas temperaturas, a lactose carameliza e contribui para o sabor e cor.

Nutricionalmente, a lactose promove a absorção de cálcio e fósforo, o que é especialmente útil em formulações infantis. Além disso, o grupo no carbono anomérico da porção glicose, por não estar envolvido na ligação glicosídica, fica livre para reagir com agentes oxidantes, sendo a lactose considerada, assim, um açúcar redutor (BECKER, 2009). Segundo Kocián (1988), a lactose colabora para a prevenção do raquitismo e da osteomalácia, prolongando a ação da vitamina D, no caso de redução da radiação solar.

Uma das desvantagens da lactose é a de não ser facilmente digerida por uma parte da população humana (CARMINATTI, 2001). Grande parte da população mundial tem problemas em consumir leite por serem intolerantes à lactose, ou por apresentarem um quadro de má absorção da lactose (KARDEL, 1997).

### 3.3 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose consiste na ausência ou deficiência na enzima intestinal  $\beta$ -galactosidase no organismo. Essa enzima, também chamada de lactase, é responsável pela hidrólise da molécula de lactose, originando dois monossacarídeos, glicose e galactose, que são facilmente absorvidos pelo intestino (SUENAGA et al., 2003). Quando a hidrólise da lactose não é realizada ou não é completa no intestino delgado, esse dissacarídeo não é absorvido, podendo provocar, no intestino grosso, eliminação de água, causando diarreia. Além disso, a lactose é fermentada pelos micro-organismos presentes na microbiota intestinal, produzindo ácido láctico, ácido butírico e outros ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para menos de 6,0 causando, assim, produção de gases no intestino, cólicas e diarreia (BECKER, 2009; FOX; MCSWEENEY, 1998).

A má absorção de lactose pode ser congênita ou adquirida (GALVÃO et al., 1996), sendo, esta última, classificada em primária e secundária. A mais comum é a hipolactasia primária, que consiste na tendência natural do



organismo de diminuir a produção de lactase com o avançar da idade; a secundária, transitória, ocorre devido a quadros persistentes de diarreia, que provocam a morte das células produtoras de lactase da mucosa intestinal, principalmente em crianças; na congênita, o indivíduo nasce sem capacidade para produzir lactase, e permanece assim durante toda a vida (SWAGERTY JUNIOR; WALLING; KLEIN, 2002).

A  $\beta$ -D-galactosidase comumente chamada de lactase é uma enzima produzida pelas vilosidades intestinais que envolvem o intestino delgado. No intestino humano, a lactose é geralmente hidrolisada pela enzima lactase, sendo absorvida como glicose e galactose que são açúcares mais solúveis e de mais rápida absorção (CARMINATTI, 2001; LONGO, 2006). A velocidade de reação da enzima depende da quantidade de lactase presente no intestino delgado, pH, temperatura e tempo de reação (GIST-BROCADES, 2004).

A lactase pode ser produzida por bactérias (*Escherichia coli* e *Lactobacillus bulgaricus*), leveduras (*Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces fragilis*) e bolores (*Aspergillus foetidus* e *Aspergillus niger*) (CARMINATTI, 2001). De acordo com a legislação brasileira, a enzima lactase utilizada na indústria alimentícia deve ser de origem microbiana, proveniente da levedura *Kluyveromyces lactis* (BRASIL, 2003).

Devido aos sintomas desagradáveis provocados pela intolerância à lactose, as pessoas deficientes em lactase normalmente privam-se do consumo de leite e, com isto, de seus benefícios nutritivos (GOURSAUD, 1985; KOCIÁN, 1988; FERREIRA, 1997).

### 3.4 Hidrólise da lactose

Segundo Silva e Cardoso (2007), a redução do teor de lactose no leite e derivados é de suma importância nutricional e comercial, já que o consumo desses alimentos beneficiaria as pessoas intolerantes à lactose. Assim, a hidrólise da lactose é um processo promissor para a indústria de alimentos, uma vez que possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem esse carboidrato em suas composições.

Para a quebra da lactose, dois métodos têm sido mais utilizados: a hidrólise química e a enzimática. A hidrólise química requer condições de operação extremamente rigorosas, como elevadas temperaturas e pH ácido, formando

diversos subprodutos que deverão ser purificados. Nesse caso, podem ocorrer problemas tecnológicos, como a desnaturação das proteínas do leite e a coloração e odor inaceitáveis pelo consumidor. A hidrólise enzimática ocorre em condições mais brandas, tanto de temperatura como de pH, e é catalisada pela enzima lactase. Pode ser aplicada no leite ou no soro, sem tratamento prévio, e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, aumentando sua doçura (CARMINATTI, 2001; SANTOS; LADERO; GARCIA-OCHOA, 1998; VITOLLO, 2001).

A hidrólise da lactose pode ser aplicada a fim de se evitar os sintomas provocados pela intolerância à lactose em humanos, além de oferecer certas vantagens tecnológicas, como a diminuição dos riscos de cristalização da lactose em derivados lácteos e o aumento do poder adoçante (CARMINATTI, 2001; SCRIBAN, 1985).

As  $\beta$ -galactosidases comerciais são obtidas a partir de micro-organismos que têm atividade ótima em pH ácido, como *Kluyveromyces* sp. A enzima  $\beta$ -galactosidase é uma alternativa para aliviar sintomas de intolerância à lactose (FOX; MCSWEENEY, 1998).

A hidrólise ocasiona modificações físicas e químicas dos produtos, pois aumenta a solubilidade, o poder adoçante e a digestibilidade dos açúcares e a viscosidade, o corpo e a textura e o paladar dos produtos (VINHAL, 2001).

É um processo promissor para a indústria de alimentos porque possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem lactose em sua composição (LONGO, 2006) ou com um teor reduzido deste carboidrato, para pessoas com intolerância à lactose, além de prevenir a cristalização da lactose na produção de sorvetes, de produtos como leite condensado e doce de leite (CARMINATTI, 2001; OLIVEIRA, 2005).

### 3.5 Leite Fermentado

A fermentação é um método de preservação utilizado há muito tempo. Devido à ausência de métodos de refrigeração ou pasteurização, o processo de fermentação envolvia a coagulação do leite por micro-organismos presentes no meio, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria-prima (GUERROUE; BENEDET; FARIA, 2006). Segundo FARNWORTH (2008), a fermentação é a transformação de matérias-

primas em diferentes produtos, com valor agregado, através do metabolismo de micro-organismos sobre os diferentes substratos.

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

Segundo Tamime (2006), um amplo espectro de micro-organismos tem sido utilizado pela indústria de alimentos, tendo como principais objetivos aumentar o tempo de vida de prateleira de produtos através da fermentação, melhorar percepções sensoriais e propriedades reológicas dos produtos, e contribuir para as propriedades dietéticas, nutraceuticas e funcionais.

As bactérias ácido-lácticas utilizadas, atualmente, para a fabricação de leites fermentados pertencem, principalmente, aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, entre outros, e são denominadas por fermentarem açúcares, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. Essas bactérias agem acidificando os produtos alimentares, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados em relação à matéria-prima não fermentada (GUERROUE; BENEDET; FARIA, 2006).

### 3.6 Culturas probióticas

Além da hidrólise da lactose, outra proposta para minimizar os efeitos causados pela intolerância a esse carboidrato consiste no uso de alimentos funcionais contendo culturas probióticas. Essas culturas podem promover a melhor utilização da lactose pelos intolerantes, uma vez que, no produto, devido à sua capacidade de utilizar a lactose como fonte de carbono, os níveis desse açúcar ficam diminuídos (GOMES; MALCATA, 1999). Além disso, algumas bactérias probióticas, como *L. acidophilus* e *B. bifidum*, produzem lactase, disponibilizando, no intestino do indivíduo, maiores quantidades dessa enzima que hidrolisa a lactose (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 1998). Um micro-organismo probiótico deve, necessariamente, sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (ácidos, bile e enzimas pancreáticas) e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

Novas descobertas relacionadas a aspectos científicos voltados à nutrição, principalmente ao estudo da dieta alimentar para a promoção à saúde, tem ampliado as aplicações dos probióticos *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. lactis* em alimentos (SANDERS; HUIS IN'T VELD, 1999; HELLER, 2001).

O modo exato pelo qual os probióticos podem atingir os seus efeitos ainda é incerto (KOMATSU et al., 2008). Segundo Fuller (1989), existem três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos: o primeiro deles é a eliminação do número de células viáveis mediante a formação de compostos com atividade antimicrobiana; o segundo mecanismo são as mudanças do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição das funções enzimáticas; o terceiro baseia-se no aumento da imunidade do hospedeiro por meio do estímulo para produção de anticorpos.

Além da promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes a esse carboidrato, há ainda outros benefícios das culturas probióticas à saúde do hospedeiro, tais como: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrointestinal à colonização de patógenos; diminuição da população de patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos; estímulo do sistema imune; alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Destacam-se, entre os micro-organismos empregados como probióticos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor escala, as espécies *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (LEE et al., 1999).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza que uma porção diária de bebida ou alimento pronto para o consumo apresente entre  $10^8$  e  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) do probiótico utilizado, referente à quantidade de micro-organismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para

obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g de produto que contenha entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC/g (HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005). Para garantir um efeito contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (SAAD, 2006).

Dados experimentais indicam que diversos probióticos são capazes de modular algumas características da fisiologia digestiva, como a imunidade da mucosa e a permeabilidade intestinal (SAAD, 2006). Estudos referentes aos efeitos nutricionais e fisiológicos do leite na dieta humana tornaram-se de grande interesse aos profissionais de saúde e de indústrias de leite e derivados, visto que uma grande porcentagem da população mundial apresenta sintomas relacionados a intolerância à lactose (SOUSA; RIBEIRO, 2006).

As principais aplicações de culturas probióticas são realizadas em produtos lácteos como leites fermentados e iogurtes. Os micro-organismos podem ser adicionados como cultura única ou em conjunto com outras bactérias lácticas, durante ou após a fermentação, ou, ainda, ao produto fresco, antes de sua distribuição (ANJO, 2004; HAULY; FUCHS; PRUDENCIO-FERREIRA, 2005).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Matérias-primas

Para a fabricação dos leites fermentados foram utilizados leite UHT desnatado (Batavo), leite em pó desnatado (Molico), enzima  $\beta$ -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact<sup>®</sup> - L500), cultura starter *Streptococcus thermophilus* (Danisco) e culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (Danisco).

### 4.2 Preparo das culturas

As culturas lácticas foram preparadas no dia anterior a fabricação dos leites fermentados, na proporção de 2% (v/v). O leite em pó desnatado foi reconstituído em água a 80 °C, resfriado a 43 °C e adicionado da cultura liofilizada. As culturas foram colocadas em banho maria a 43 °C separadamente (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *L. casei*), durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, armazenada sob refrigeração.

### 4.3 Hidrólise da lactose

A hidrólise da lactose do leite foi realizada adicionando-se 0,4 g da enzima  $\beta$ -galactosidase (Maxlact) para cada 1000 mL da mistura de leite UHT desnatado e leite em pó desnatado. Em seguida, o leite foi mantido a 40 °C, durante 4 horas. Logo após, a mistura de leites foi aquecida a 95 °C por 5 minutos (Carminatti, 2001), com o objetivo de inativar a enzima. Em seguida, a mistura foi resfriada a temperatura de refrigeração (4 °C) por 24 horas.

### 4.4 Quantificação de glicose

A determinação da concentração de glicose foi realizada pelo método glicose-oxidase, utilizando-se o kit Glicose-PP (Analisa). A absorbância medida, em 500 nm, foi diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

A concentração do teste através do Fator de Calibração (FC) foi calculada de acordo com a equação 1 e 2:

$$FC = CP + AP \quad \text{equação (1)}$$

Em que:

CP = Concentração do Padrão

CT = Concentração do Teste

AP = Absorbância do Padrão

AT = Absorbância do Teste

$$CT \text{ em mg/dL} = FC \times AT \quad \text{equação (2)}$$

#### 4.5 Fabricação dos leites fermentados

O leite com lactose hidrolisada teve sua temperatura ajustada para 43 °C e foi separado em três partes, em recipientes esterilizados. Em seguida, cada uma das partes foi inoculada com a cultura *starter* e com as culturas probióticas previamente preparadas, conforme indicado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Formulações dos leites fermentados

Tratamentos	Cultura probiótica		
	Cultura starter <i>S. thermophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
<b>Controle</b>	X		
<b>LA</b> ( <i>S. thermophilus</i> e <i>L. acidophilus</i> )	X	X	
<b>LC</b> ( <i>S. thermophilus</i> e <i>L. casei</i> )	X		X

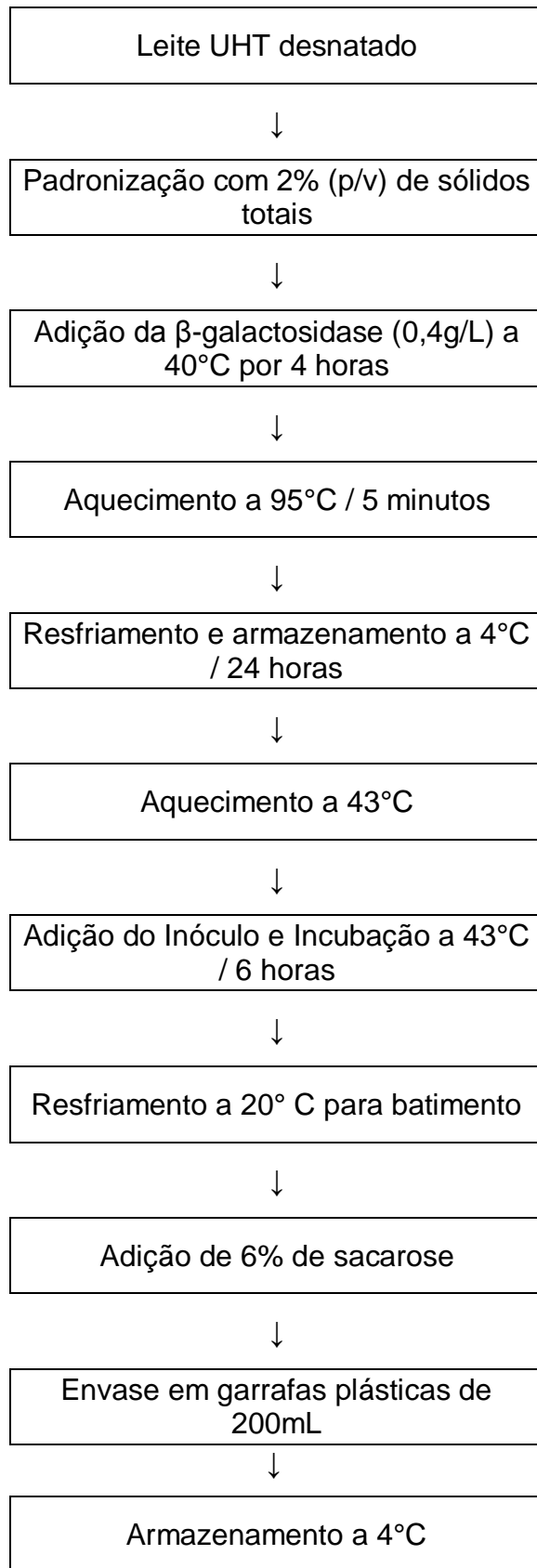
A fermentação foi realizada a 43 °C, durante aproximadamente 6 horas. Após esse tempo, os produtos referentes aos três tratamentos foram submetidos a resfriamento a 20 °C para batimento e adição de 6% de sacarose, envasados em garrafas plásticas de 200 mL previamente esterilizadas e posteriormente mantidos a 4 °C até o momento das análises. No fluxograma da Figura 2 são mostradas as etapas da fabricação dos leites fermentados.

#### 4.6 Armazenamento e períodos de amostragem

Os leites fermentados foram armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento das análises. As análises (contagem dos micro-organismos *starter* e probióticos, acidez e pH) foram realizadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. A composição centesimal dos diferentes tratamentos foi realizada no dia seguinte à fabricação das mesmas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A aceitação sensorial (Teste de aceitação e Diferença do Controle) dos leites fermentados foi realizada com os leites do terceiro processo sete dias após o processamento, tendo em vista o tempo necessário para o equilíbrio dos componentes que interferem no seu sabor. O fluxograma do processo de fabricação dos leites fermentados apresenta-se na Figura 2.





**Figura 2** - Fluxograma de fabricação dos leites fermentados

#### 4.7 Análises microbiológicas

Alíquotas de 10 g de amostra foram transferidas para erlenmeyer com 90 mL de solução de água peptonada 0,1 %. A partir desta diluição, foram efetuadas diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente e seus resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de produto (UFC/g).

A contagem de *Streptococcus thermophilus* foi realizada semeando-se em profundidade as diluições decimais em ágar M17 enriquecido com lactose e as colônias foram contadas após um dia de incubação a 45 °C por 24 horas, em aerobiose (DAVE, SHAH, 1996).

A contagem de *Lactobacillus* foi realizada semeando-se as diluições decimais em ágar LBS (Ágar Rogosa) (ROGOSA, MITCHELL E WISEMAN, 1951) em profundidade com sobrecamada. As placas foram incubadas em aerobiose e as colônias foram contadas após 72h de incubação das placas a 37°C.

#### 4.8 Análises físico-químicas

As análises para determinação dos teores de proteína foram realizadas utilizando-se o método Micro-Kjeldahl, com o fator de 6,38 multiplicado pela porcentagem de nitrogênio total (AOAC, 2003). O teor de umidade foi determinado pelo método AOAC (1995). O teor de lipídios foi determinado pelo método butirométrico de Gerber (BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 1989). A porcentagem de cinzas foi determinada por incineração em mufla a 550°C (AOAC, 2003). A acidez total foi obtida por meio de titulação com NaOH 0,1 N determinada em % de ácido láctico, conforme o método da AOAC (2003). Na determinação do pH usou-se um potenciômetro previamente calibrado, segundo o método da AOAC (2003).

## 4.9 Análise sensorial

### 4.9.1 Teste de Diferença do Controle

Foi utilizado o teste de Diferença do Controle (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006) com objetivo de avaliar se havia diferença sensorial entre os leites fermentados com lactose hidrolisada Controle, LA e LC. As amostras foram servidas a temperatura de refrigeração em copos plásticos descartáveis.

A análise foi realizada por 36 provadores consumidores de leite fermentado. Cada provador recebeu uma amostra padrão (controle) especificada com a letra P, e 3 amostras codificadas com número de 3 dígitos, correspondentes à Controle, LA e LC. Para definição da ordem de apresentação, foi respeitada a primeira posição para o padrão e a apresentação das amostras para cada provador foi aleatorizada. Os provadores foram solicitados a comparar as amostras com o padrão, em termos globais, através de uma escala de 1 a 9, onde 1 = idêntica ao padrão e 9 = extremamente diferente do padrão, conforme Figura 3.

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra Padrão (P) e amostras codificadas. Prove a amostra Padrão e em seguida, prove cada uma das amostras codificadas e avalie, na escala abaixo, o quanto cada amostra codificada difere em termos GLOBAIS, da amostra Padrão (P)

0 = Nenhuma  
diferença

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

9 = extremamente Diferente

Amostra	Grau de diferença
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Figura 3** – Escala para teste de Diferença do Controle

#### 4.9.2 Teste de Aceitação Sensorial

O teste de aceitação de cada produto foi realizado com uma equipe de provadores composta por 100 consumidores potenciais dos produtos, selecionados em função da disponibilidade, interesse e hábito de consumir leites fermentados. O teste de aceitação foi realizado utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos (Figura 4), em que 1 = desgostei muitíssimo e 9 = gostei muitíssimo. Para a intenção de compra foi utilizada a mesma ficha contendo uma escala estruturada de cinco pontos, onde 1= certamente compraria e 5: certamente não compraria. Todos os testes foram realizados de acordo com Meilgaard; Civille; Carr (2006). As amostras foram apresentadas aos provadores da seguinte forma:

cada provador posicionou-se na cabine individual, com luz branca e foi apresentada uma amostra aleatória por vez juntamente com uma ficha contendo a escala hedônica, água e biscoito de água e sal.

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra codificada de LEITE FERMENTADO. Por favor, observe e prove a amostra e indique, conforme a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou:

AMOSTRA: \_\_\_\_\_

9 - Gostei muitíssimo  
 8 - Gostei muito  
 7 - Gostei moderadamente  
 6 - Gostei ligeiramente  
 5 - Nem gostei / nem desgostei  
 4 - Desgostei ligeiramente  
 3 - Desgostei moderadamente  
 2 - Desgostei muito  
 1 - Desgostei muitíssimo

APARÊNCIA \_\_\_\_\_  
 IMPRESSÃO GLOBAL \_\_\_\_\_  
 AROMA \_\_\_\_\_  
 SABOR \_\_\_\_\_  
 TEXTURA \_\_\_\_\_

Se você encontrasse este produto à venda, qual seria sua atitude?

5 - Certamente compraria  
 4 - Provavelmente compraria  
 3 - Talvez comprasse / Talvez não comprasse  
 2 - Provavelmente não compraria  
 1 - Certamente não compraria

Comentários: \_\_\_\_\_

**Figura 4** – Escala Hedônica estruturada de nove pontos – Teste de aceitação

#### 4.10 Planejamento experimental e análise estatística dos resultados

Cada bloco de experimentos foi repetido três vezes, totalizando 9 experimentos. Os resultados obtidos para a composição química e intenção de compra foram avaliados através de Análise de Variância e teste de Tukey para verificar diferenças entre as amostras ( $p < 0,05$ ).

Para a avaliação das mudanças ocorridas no armazenamento refrigerado, foi adotado um delineamento do tipo *split-plot*, sendo que a sub-parcela foi obtida pela incorporação do fator tempo de armazenamento refrigerado. O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação destes fatores foi avaliado por análise de variância e teste de médias de Tukey ao nível de 5% de significância. O programa *Statistica*, versão 8.0 (STATSOFT, 2007) foi utilizado para avaliação dos resultados.

Para o Teste de Diferença do Controle, os resultados foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), considerando os diferentes tratamentos no leite fermentado com lactose hidrolisada como causa de variação, e teste de média Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados da análise sensorial de aceitação foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) utilizando o Teste de Tukey (5% de probabilidade) para verificar a diferença entre as médias. O programa utilizado para avaliação desses resultados foi o SAS - *Statistical Analysis System*, versão 8.2 (2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição físico-química

O leite utilizado para a fabricação dos leites fermentados continha em média  $4,3\% \pm 0,28$  de lactose. Após a hidrólise da lactose com adição da enzima  $\beta$ -galactosidase pelo período de aproximadamente 4 horas a  $40^{\circ}\text{C}$ , apresentou aproximadamente 99% de hidrólise, o método utilizado foi fenol sulfúrico.

A Tabela 3 apresenta os valores médios da composição físico-química dos leites fermentados Controle (*Streptococcus thermophilus*), LA (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*) e LC (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus casei*).

**Tabela 3** - Média e desvio padrão da composição físico-química dos leites fermentados com lactose hidrolisada com e sem adição de probióticos.

Produto	Controle	LA	LC	Valor de $p(1)$
pH	$4,84 \pm 0,25^a$	$4,70 \pm 0,22^a$	$4,84 \pm 0,20^a$	0,997
Acidez (ácido láctico)	$1,13 \pm 0,13^a$	$1,29 \pm 0,16^a$	$1,13 \pm 0,15^a$	0,166
Sólidos totais (%)	$79,32 \pm 0,96^a$	$79,24 \pm 1,21^a$	$79,34 \pm 0,86^a$	0,607
Proteína (%)	$3,32 \pm 0,20^a$	$3,36 \pm 0,12^a$	$3,38 \pm 0,20^a$	0,809
Gordura (%)	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,00 \pm 0,00^a$	$0,00 \pm 0,00^a$	>0,005
Cinzas (%)	$1,71 \pm 0,09^a$	$1,67 \pm 0,17^a$	$1,64 \pm 0,16^a$	0,510

(1)  $p < 0,05$

<sup>a</sup> médias com letras em comum na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ );

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os parâmetros físico-químicos entre os diferentes tratamentos dos leites fermentados (Tabela 3).

Os leites fermentados com lactose hidrolisada dos três tratamentos apresentam resultados físico-químicos conforme recomendado pela legislação vigente para o leite fermentado que são: acidez (g de ácido láctico /100g) de 0,6 a 2,0 e proteínas (g/100 g) mínima de 2,9 (BRASIL, 2007).

## 5.2 Mudanças ocorridas durante o armazenamento refrigerado

De acordo com o resultado da avaliação estatística (Tabela 4) os valores de pH e acidez apresentaram diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) ao longo do tempo de armazenamento dos leites fermentados. A acidez também apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) para o tratamento. Já a contagem de *S. thermophilus* não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

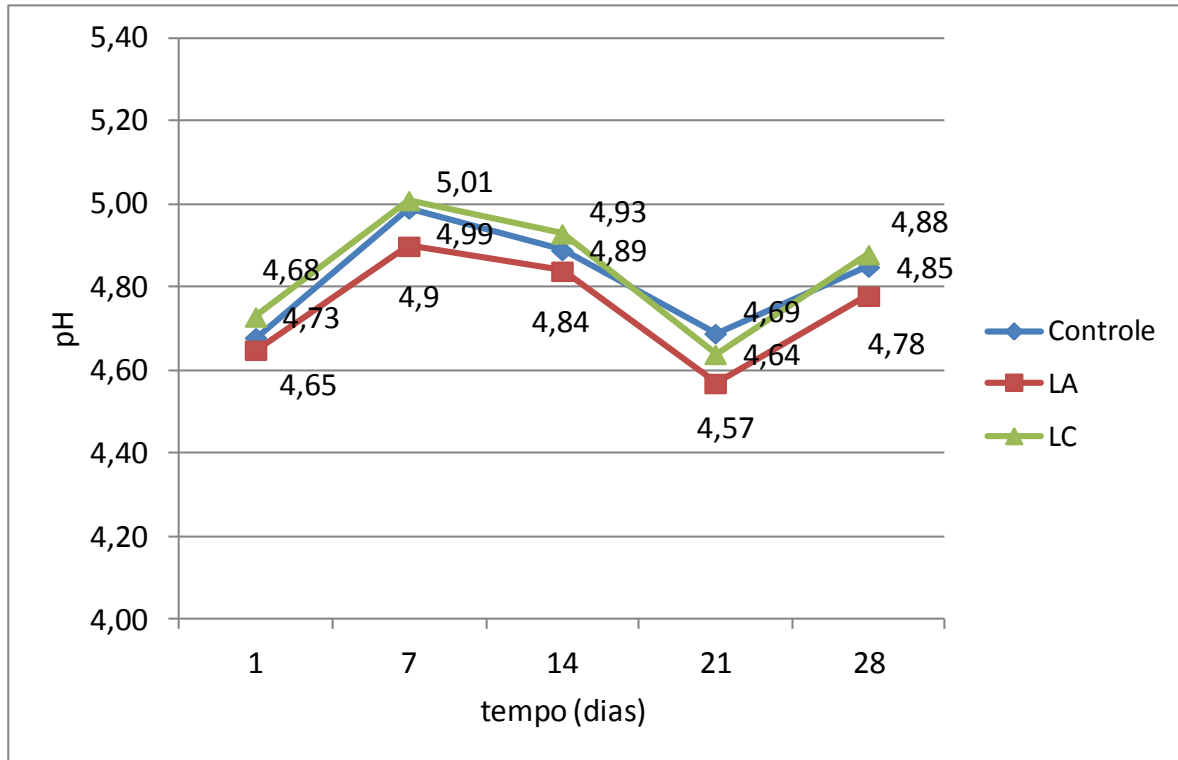
**Tabela 4** – Resultado da avaliação estatística do pH, acidez e contagem de *S. thermophilus* durante o período de armazenamento

	Valores de $p^{(1)}$		
	pH	Acidez	<i>S. thermophilus</i>
Tratamento <sup>(2)</sup>	0,064	<b>0,000013</b>	0,752
Tempo de armazenamento <sup>(3)</sup>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,000189</b>	0,251
Tratamento x tempo	0,997	0,166678	0,739

<sup>(1)</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>(2)</sup> Tratamento: leite fermentado com lactose hidrolisada sem e com adição de micro-organismos probióticos; <sup>(3)</sup> 28 dias.

A Figura 5 mostra o desenvolvimento do pH dos leites fermentados durante os 28 dias de armazenamento.

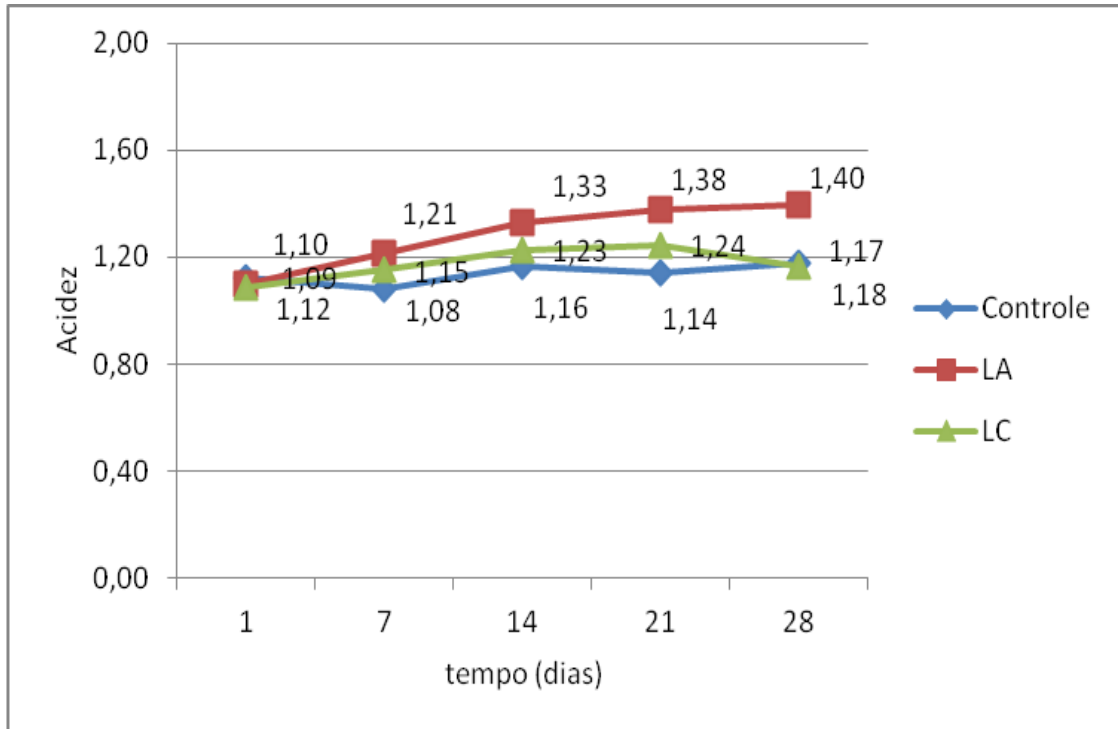




**Figura 5** - Valores de pH dos leites fermentados durante o período de armazenamento

Os valores de pH apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os três tratamentos durante o período de armazenamento. O aumento dos valores de pH foi observado para os três tratamentos até o dia 7, após esse período houve redução e posterior aumento no dia 28, sendo os valores médios de pH para Controle: 4,84, LA: 4,70, LC: 4,84. A redução de pH e aumento da acidez durante o período de armazenamento sob refrigeração são chamados de pós-acidificação, provenientes da atividade dos micro-organismos lácticos, principalmente dos *Lactobacillus* por produzir ácido láctico e possuir maior capacidade de tolerar ambientes ácidos (ROBINSON, LUCEY e TAMIME, 2006).

A Figura 6 apresenta os valores de acidez titulável dos leites fermentados expressos em porcentagem de ácido láctico, durante o período de armazenamento a 4°C.



**Figura 6** - Valores de acidez dos leites fermentados durante o período de armazenamento

O leite fermentado LA apresentou valor médio maior (1,28 % ácido láctico) do que o Controle (1,14 % ácido láctico) e LC (1,17 % ácido láctico) durante o período de armazenamento, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) com relação aos outros leites fermentados.

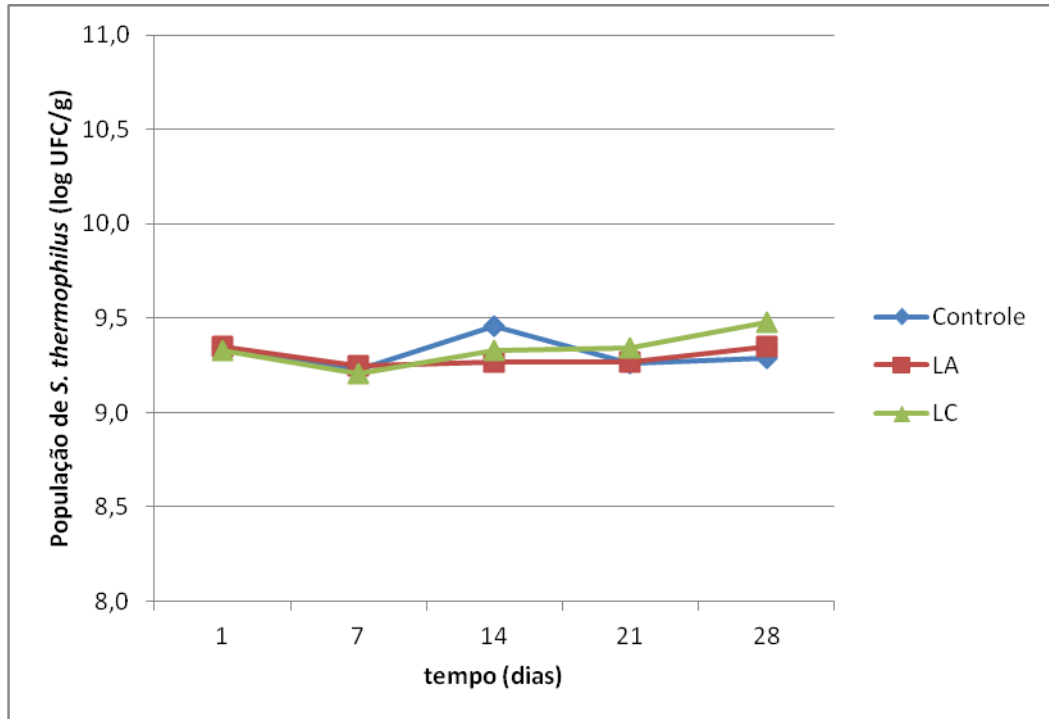
A diferença significativa evidenciada no leite fermentado LA foi verificada a partir do dia 7 com pequeno aumento do valor de acidez com relação aos outros tratamentos. Nos tratamentos Controle e LC houve um pequeno aumento no valor da acidez acompanhado pela redução do valor de pH, mas não significativo.

O *S. thermophilus* produz ácido láctico durante a fermentação enquanto o *L. acidophilus* produz ácido láctico, acético, benzóico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e microcinas, devido a isso houve diferença significativa do produto LA com relação ao Controle e LC no requisito acidez.

Essa diferença deve-se a queda do pH e aumento da acidez no dia 21, provavelmente essa variação está relacionada à ação do *Lactobacillus acidophilus*, que é um micro-organismo com grande capacidade de produção de

ácido no meio da fermentação, devido a sua característica de alta acidez. E o *Lactobacillus casei* apresenta pós-acidificação lenta (BRASIL, 2000).

As populações médias de *Streptococcus thermophilus* nos três tratamentos durante o período de armazenamento estão expostas na Figura 7.



**Figura 7** - Contagem de *Streptococcus thermophilus* durante o período de armazenamento.

A contagem dos *Streptococcus thermophilus* não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, os valores médios foram 9,32 log UFC/g para o Controle, 9,27 log UFC/g para LA e 9,33 log UFC/g para o LC, fornecendo valores acima de  $10^8$  log UFC/mL células viáveis durante o período de armazenamento.

Os resultados da avaliação estatística da contagem de *Lactobacillus* durante o período de armazenamento estão demonstrados na Tabela 5.

**Tabela 5** - Resultado da avaliação estatística da contagem de *Lactobacillus* durante o período de armazenamento.

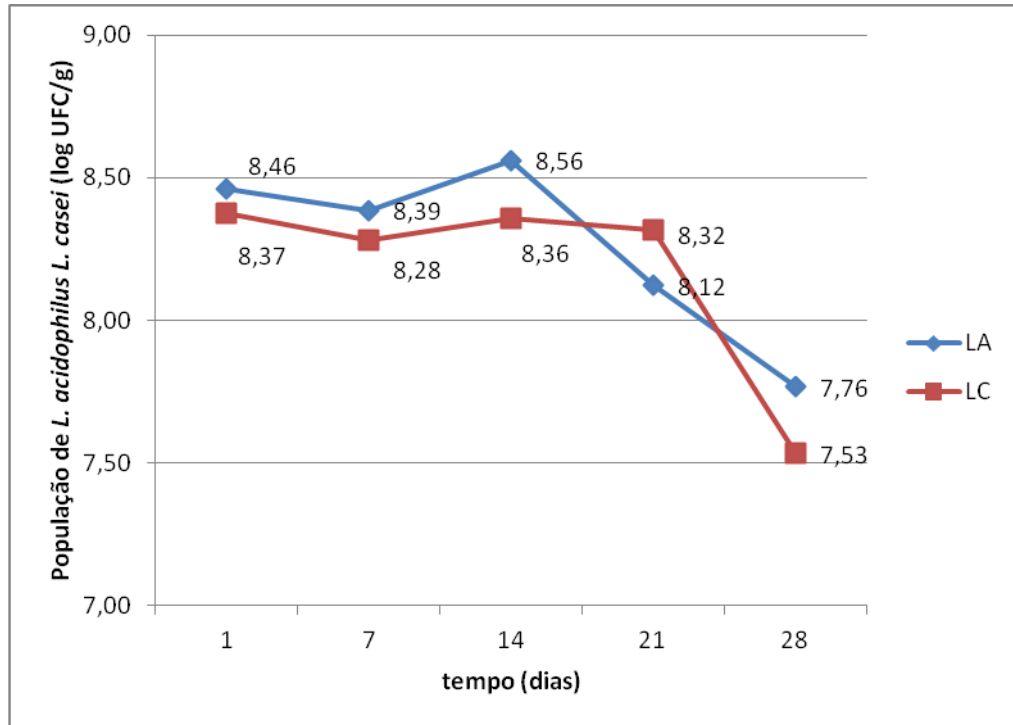
	Valores de $p^{(1)}$
	<i>Lactobacillus</i>
Tratamento <sup>(2)</sup>	0,253
Tempo de armazenamento	<b>&lt;0,0001</b>
Tratamento x tempo	0,334

<sup>1)</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>(2)</sup> Tratamento: leite fermentado com lactose hidrolisada e com adição de micro-organismos probióticos; <sup>(3)</sup> 28 dias.

De acordo com a Tabela 5 verificou-se que a contagem de *Lactobacillus* no produto LA (8,39) apresentou diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) com relação a contagem no produto LC (8,32), durante o tempo de armazenamento.

Gilliland e Lara (1998) relatam que diversos fatores poderão influenciar na sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem, sendo eles: o meio de cultura; o valor de pH; e a fase final em que os *Lactobacillus* são contados.

Na Figura 8, pode-se observar a viabilidade dos *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* nos leites fermentados durante o período de armazenamento sob refrigeração.



**Figura 8** - Viabilidade de *L. acidophilus* e *L. casei* nos leites fermentados LA e LC, durante o período de armazenamento a 4°C

Os leites fermentados contendo *Lactobacillus* apresentaram redução em sua população de 1 ciclo logarítmico nas contagens após 21 dias de armazenamento. Mantendo-se em torno de  $10^6$  log UFC/mL células viáveis no último dia de armazenamento. Essa redução pode ter sido provocada pelo aumento da acidez (produção de ácido láctico, acético e benzóico durante o armazenamento e o *L.acidophilus* pode ser inibido de acordo com a composição do meio e disponibilidade de nutrientes (COLLINS, ARAMAKI, 1980; GILLILAND; SPECK, 1977).

Com a queda do pH no dia 21 ocorreu a redução nas contagens de células viáveis de *L. acidophilus* porque o pH interfere na viabilidade da microflora probiótica em leites fermentados (VINDEROLA et al, 2000), e aumento da acidez. Com relação ao *L.casei* a perda de viabilidade de *L.casei* nos produtos fermentados depende do tempo de estocagem, da sensibilidade das culturas às condições de processo e influenciada pela acidez (FARIA et al, 2006).

A redução de um ciclo logarítmico na contagem do produto LA e LC se deu através da inibição dos *Lactobacillus* pelo *S. thermophilus*.

### 5.3 Análise Sensorial

#### 5.3.1 Teste de Diferença do Controle

O teste de diferença do controle permitiu verificar se as amostras de leite fermentado com lactose hidrolisada contendo micro-organismos probióticos, diferiam significativamente da amostra controle (sem adição de probióticos) em termos globais.

Os resultados avaliados através do teste de médias de Dunnett demonstraram que somente o leite fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* diferiu significativamente do controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela). Esta diferença deve-se provavelmente a diferença no teor de acidez (Figura 6). No sétimo dia após a produção os valores da acidez nos tratamentos foram para Controle 1,078, LA 1,214 e LC 1,151, sendo o maior valor de acidez evidenciado no tratamento LA.

Na Tabela 6 estão expostos os resultados obtidos no teste de diferença do controle das amostras com e sem adição de micro-organismos probióticos.

**Tabela 6** - Teste de diferença do controle das amostras com e sem adição de micro-organismos probióticos

<b>Amostras</b>	<b>Média</b>
Controle	3,28 <sup>a</sup>
LA	4,81 <sup>b</sup>
LC	3,50 <sup>a</sup>

A amostra com *Lactobacillus casei* não apresentou diferença significativa quando comparada com o controle ( $p > 0,05$ ).

### 5.3.2 Teste de Aceitação sensorial

Os resultados da aceitação sensorial não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras para os atributos sensoriais avaliados nas três amostras (Tabela 7).

**Tabela 7** – Notas médias do teste de aceitação sensorial dos leites fermentados com lactose hidrolisada e com adição de probióticos

<b>Atributos</b>	<b>Controle</b>	<b>LA</b>	<b>LC</b>
Aparência <sup>1</sup>	6,89 <sup>a</sup>	7,08 <sup>a</sup>	6,85 <sup>a</sup>
Impressão Global	6,60 <sup>a</sup>	6,61 <sup>a</sup>	6,68 <sup>a</sup>
Aroma	6,87 <sup>a</sup>	6,71 <sup>a</sup>	6,76 <sup>a</sup>
Sabor	6,19 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>	6,41 <sup>a</sup>
Textura	5,86 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	6,30 <sup>a</sup>

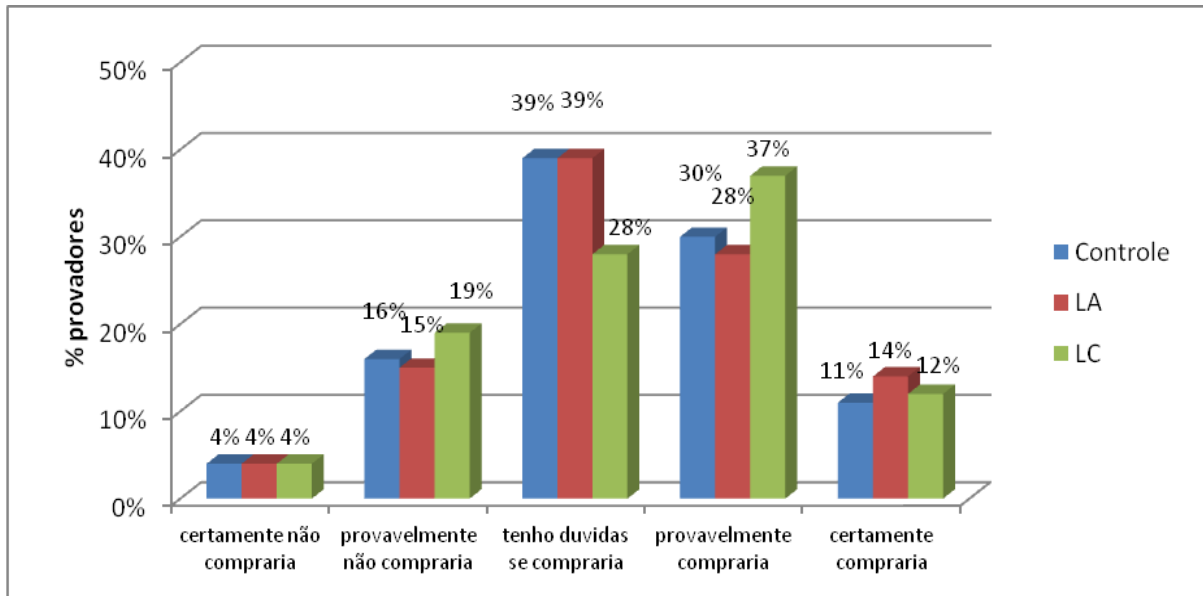
\* letras em comum na mesma linha significa que as amostras não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ )

<sup>1</sup> 1: desgostei muitíssimo, 9: gostei muitíssimo.

As médias dos atributos avaliados variaram de 5,86 a 7,08, indicando um índice de aceitação médio do produto (notas iguais ou superiores a 6).

A Figura 9 apresenta os resultados para a intenção de compra dos produtos.

**Figura 9** - Intenção de compra dos provadores em relação aos leites fermentados sem lactose, com e sem adição de probióticos.



Cerca de 41% dos provadores certamente ou provavelmente comprariam o leite fermentado Controle. Já 42% teriam a mesma atitude para o leite LA e 49% para o leite LC. De acordo com as observações feitas pelos provadores, as amostras apresentavam grumos e o produto poderia ser mais líquido, talvez devido a isso, a intenção de compra não foi tão alta. Outra observação apontada foi o sabor ácido no leite fermentado LA.



## 6 CONCLUSÃO

A adição de culturas probióticas não alterou a composição físico-química dos leites fermentados.

Os valores de pH e acidez contribuíram para a queda de um ciclo logarítmico na contagem dos *Lactobacillus*, mesmo assim a contagem atendeu a legislação.

As médias dos atributos avaliados indicaram uma boa aceitação dos produtos. As culturas lácticas *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* podem ser utilizadas em leites fermentados pois atendem os parâmetros de viabilidade exigidos pela legislação para serem considerados probióticos no prazo de validade de 28 dias.

## 7 REFERÊNCIAS

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, n.2, p.145-154, 2004.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Washington, 16<sup>a</sup> ed., 1995.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Washington, 17<sup>a</sup> ed., 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LEITE LONGA VIDA. Brasil (ABLV). Mercado Total de Leite Fluido Comportamento das Vendas Internas de Leite Longa Vida 1990/2004. Disponível em: [HTTP://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida](http://www.ablv.org.br/Index.cfm?fuseaction=longavida). Acesso em: 21/07/2010

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

BECKER, L. V. **logurte Probiótico com Teor Reduzido de Lactose Adicionado de Óleo de Linhaça**. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal. Padrões de Identidade e qualidade (PIQ) de Leites Fermentados, Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000. Disponível em: [WWW.agricultura.gov.br/sislegis](http://www.agricultura.gov.br/sislegis). Acesso em: 12/08/2011.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº.51. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução RDC nº. 348. Utilização de enzimas na indústria de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 dez. 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº 46, de 23 de novembro de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados; 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos / ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Atualizada em **Julho 2008**. Acesso em 17 abr. 2010

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. Determination fat content of milk and milk products (Gerber Method). London: **British Standards Institution**. 1989, 12 p.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 3ª Ed. 751.p.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando beta-galactosidase *Kluyveromyces lactis***. 2001. 79p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

COLLINS, E. B.; ARAMAKI, K. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, v. 62, p.353, 1980.

DANIEL, C.; POIRET, S; GOUDERCOURT, D; DENNIN, V.; LEYER, G; POT, B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 5799-5805, 2006.

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

DURING, M. J.; XU, R.; YOUNG, D.; KAPLITT, M. G.; SHERWIN, R. S.; LEONE, P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. **Nature Medicine**, v.4, p. 1131-1135, 1998.

EMBRAPA. **Dados da produção mundial e nacional de leite**. 2008. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/producao/dados2002/producao/2.30.htm>. Acesso em 25/05/2010.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE, J. L. **Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei***. *Pesq agropec. bras.*, Brasília, v.41, n.3, p.511-516, mar.2006.

LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e mercado**. Campinas: ITAL, 1997, cap. 1, p. 1-7.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H., **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Londres:Blackie Academic & Professional, 1998.

FULLER, R. **Probiotics in man and animals**. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.66, p.365-378, 1989.

GALVÃO, L.C. TRONCON, L.E.A.; FERNANDES, M.I.M.; CARRER, J.C.; HYPÓLITO, L. Absorção de lactose e tolerância a diferentes tipos de iogurtes em adultos com hipolactasia. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.33, n.1, p.10-6, 1996.

GARDINER, G.; STANTON, C.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J.K; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. **J. Dairy Sci.**, Savoy, v. 82, n.7, p. 1379-1397, 1999. (Artigo: Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos)

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of Probiotic. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GILLILAND, S. E.; SPECK, L. M. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* towards intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, v.40, p.820, 1977.

GUERROUE JL; BENEDET HD; FARIA CP. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **PAB**, v.41, p.511-516. 2006.

GIST-BROCADES, Dairy Ingredients Group. Maxilact: the dairy yeast lactase. In:

**Biotechnology contributing to food, health and the environments**. The Netherlands: Gist-Brocades BSD B.V., 2004. 12p.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biociência Alimentar**. São Paulo, n. 64, dez., 1999.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **O leite**: do úbere à fábrica de laticínios. Portugal: Publicações Europa-America Lda, 1985, v.1, parte, cp. 1, p. 31-56.

GURGEL, M. S. C. C.C.A.; OLIVEIRA, A. J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. *Leite & Derivados*, São Paulo, v.4, n.22, p. 38-43, 1995.

HAULY M.C.O; FUCHS, R.H.B; PRUDENCIO-FERREIRA S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligossacarídeos: características probióticas e aceitabilidade. **Revista de Nutrição**, v.18, p.613-622, 2005.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUIS-INT'VELD, J. H. J. Selection of strains for probiotic use. London: Chapman e Hall, 1992.

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

HENKER, J.; LAASS, M.; BLOKHIN, B. M.; BOLBOT, Y. K.; MAYDANNIK, V. G.; ELZE, M.; WOLFF, C.; SCHULZE, J. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhea in infants and toddlers. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 166, n.4, p. 311-318, 2007.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, Amsterdam, v. 35, n.2, p. 109-116, 2002.

JIANG, T.; MUSTAPHA, A.; SAVAIANO, D. A. **Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented Milk containing *bifido-bacterium longum***. *J. Dairy Sci*, v. 79, p. 750-757, 1996.

KARDEL, G.; ANTUNES, L. A. F. Culturas lácticas e probióticas empregadas na fabricação de leites fermentados: leites fermentados. In: LERAYER, A. L. S.; SALVA, T. J. G. **Leites fermentados e bebidas lácteas: tecnologia e Mercado**. Campinas: ITAL, 1997, cap. 2, p. 26-33.

KIRKPATRICK, K. J.; FENWICH, R. M. Manufacture and general properties of dairy ingredients. **Food Technology**, v. 41, n. 10, p. 58-65, Oct. 1987.

KOCIÁN, J. Lactose intolerance – minireviwe. **International Journal Biochemistry**, v.20, n.1, 0. 1-5,1988.

KOMATSU, R.T.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-46, 2008.

LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LONGO, G. **Influência da adição de lactase na produção de iogurtes**. 2006. 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

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

MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; LIT, W. K. Lactose content of modified enzyme-treated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, 0. 439-443, 1999.

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

MEILGAARD, M. CIVILLE, G. V. CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4. Ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

OLIVEIRA, C. C. M. **Produção de  $\beta$ - galactosidase por levedura recombinante** – Desenvolvimento de um sistema de produção estável. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Minho, Braga, 2005.

ROGOSA, M. J. A.; MITCHELL.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacillus. *J. Dental Res.* 30:682, 1951.

SAAD, S. M. I. **Probióticos e prebióticos: o estado da arte**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 42, p. 1-16, 2006.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p 341-347, 1998.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. **Estratégias para o controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314p.

SANTOS, A.; LADERO, M.; GARCÍA-OCHOA, F. Kinetic modeling of lactose hydrolysis a  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 558-567, 1998.

SCRIBAN, R. (Coord.). **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985. 489p.

SHAHANI, K. M.; VAKIL, J. R.; KILARA, B. A. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. II Isolation of acidophilin from *L.acidophilin*. **Cult. Dairy Prod. J.**, 12(2), 8-11, 1976.

SILVA, S. V. da; **Desenvolvimento de iogurte probiótico com prebiótico**. 2007. 107 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS.

SOUSA, G. D. B., RIBEIRO, E. J. **Influência da aeração na síntese de  $\beta$ -galactosidade por fermentação com *Kluyveromyces marxianus***. 2006. 27 f. Relatório Final (Faculdade de Engenharia Química) Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais, 2006.

STANTON, C. et al. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 491-497, 1998.

STATSOFT, INC. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2007.

SUENAGA, C.I.; SIU, E.R.; KATO L.M.; OSAKO, M.K. **Intolerância à lactose**. UNIFESP: Escola Paulista de Medicina. 2003. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/currbio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>>. Acesso em: 27/05/2010.

SWAGERTY JUNIOR, D.L.; WALLING, A.D.; KLEIN, R. M. Lactose intolerance. **American Family Physician**, v. 65, p. 1845-50, 2002.

TAMIME, A. Y. **Fermented Milks**. Blackwell Science Ltd, 2006.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do Leite**. 2 ed. Santa Maria: UFSM, 2003.

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

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

VINHAL, E. F. **Hidrólise da lactose no leite por  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis***. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

VITOLLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001, v.4, cap. 14, p. 387-420.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2ª edição. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

ZACARCHENCO, P.B., MASSAGUER-ROIG, Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**., Campinas, 24(4): 674-679, out.-dez. 2004.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and symbiotic in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Internacional Dairy Journal**, Amerstam, v. 8, p. 473-9, 1998.