



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS

ANA PAULA HIROKI

**ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO COM BAIXO TEOR
DE LACTOSE E ADIÇÃO DE LEITELHO**

Londrina
2014

ANA PAULA HIROKI

**ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO COM BAIXO TEOR
DE LACTOSE E ADIÇÃO DE LEITELHO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lina Casale Aragon
Alegro

LONDRINA
2014

ANA PAULA HIROKI

**ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO COM BAIXO TEOR
DE LACTOSE E ADIÇÃO DE LEITELHO**

Dissertação aprovada em _____ de março de 2014, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Cínthia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Paraná

Prof. Dr. Leandro Freire

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado serenidade e tranquilidade em todos os momentos, e força para superar todas as dificuldades.

À professora dr^a Lina Casale Aragon-Alegro por todo o conhecimento e ensinamento me transmitiu, além de todo o carinho, paciência e dedicação que sempre teve.

À professora dr^a Cíntia Hoch Batista de Souza, por ter sido sempre prestativa e atenciosa.

À toda a minha família, que é a minha fortaleza e meu porto seguro.

Aos amados e abençoados irmãos Renan e Lígia, que me ajudaram em todos os momentos, sendo muito dedicados, pacientes e amorosos.

À querida Flávia Kawahigashi, que mais do que técnica de laboratório se demonstrou uma amiga, sempre me ajudando e deixando o ambiente da pesquisa muito mais agradável.

À Geyci Colognesi pela grande ajuda e pelo carinho com que sempre me recebeu no laboratório.

À CAPES pela bolsa e apoio financeiro.

RESUMO

A intolerância à lactose é comum na população brasileira, causando sintomas desagradáveis quando ocorre a ingestão de leite e seus derivados. O objetivo do trabalho foi a elaboração de um leite fermentado com redução no teor de lactose, adicionado de culturas probióticas e contendo 30% de leiteiro, um subproduto lácteo rico em nutrientes. Foram elaboradas 4 formulações de leite fermentado: HTP) leite e leiteiro com lactose hidrolisada + *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*; HT) leite e leiteiro com lactose hidrolisada + *S. thermophilus*; NHTP) leite e leiteiro adicionados de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis*; NHT) leite e leiteiro adicionados de *S. thermophilus*. Os leites fermentados foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento a 4°C quanto ao pH, acidez titulável e enumeração dos micro-organismos. Os dados obtidos foram analisados através de análise de variância, ao nível de 5% de significância. Os produtos HTP e HT apresentaram 89 e 70% de lactose hidrolisada, respectivamente, demonstrando a importância do probiótico também na hidrólise deste carboidrato. Durante os 28 dias, o pH do produto NHTP foi menor que os outros. A população de *S. thermophilus* manteve-se sempre acima de 11 log UFC/mL, em todas as formulações. Nos leites fermentados probióticos, as populações desses micro-organismos diminuíram durante o armazenamento, mas mantiveram-se sempre acima de 8 log UFC/mL, o que é suficiente para que o produto seja definido como probiótico. Além disso, a lactose hidrolisada parece promover a multiplicação dos microrganismos utilizados.

Palavras-chave: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, leiteiro, lactase, fermentação.

ABSTRACT

Lactose intolerance is common among the Brazilian population, causing unpleasant symptoms when milk and its derivatives are ingested. The purpose of the work was to elaborate fermented milk with reduction in lactose content, added to probiotic cultures and containing 30% of buttermilk, a dairy product rich in nutrients. It were elaborated 4 formulations of fermented milks: HTP) milk and buttermilk with hydrolyzed lactose + *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis*; HT) milk and buttermilk with hydrolyzed lactose + *S. thermophilus*; NHTP) milk and buttermilk added to *S. thermophilus*, *L. acidophilus* and *B. animalis*; NHT) milk and buttermilk added to *S. thermophilus*. The fermented milks were evaluated on days 1, 7, 14, 21 and 28 of storage at 4°C for pH, titratable acidity and enumeration of microorganisms. The data obtained were analyzed using variance analysis, at 5% level of significance. The products HTP and HT presented 89 and 70% of hydrolyzed lactose, respectively, demonstrating the importance of probiotics also on the hydrolysis of this carbohydrate. During the 28 days, the pH of the product NHTP was smaller than the others. The *S. thermophilus* population always remained above 11 log UFC/mL in all formulations. In these fermented milks probiotics, the populations of these microorganisms decreased during storage, but always remained above 8 log UFC/mL, which is enough to ensure that the product is defined as probiotic. In addition, hydrolyzed lactose seems to promote the multiplication of microorganisms used.

Palavras-chave: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, buttermilk, lactase, fermentation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1 Lactose	9
2.1.1 Intolerância à lactose	10
2.1.2 Hidrólise da lactose	12
2.2 Leite Fermentado	12
2.3 Culturas probióticas	14
3 ARTIGO	16
4 CONCLUSÃO	28
5 REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose têm se tornado um problema mais evidente com o passar dos anos, sendo causada pela deficiência na concentração da enzima intestinal β -galactosidase (também conhecida como lactase), ou a sua ausência no organismo. Sendo esta enzima a responsável pela hidrólise da molécula de lactose, originando dois monossacarídeos, glicose e galactose, (facilmente absorvidos pelo intestino) quando o organismo não a possui a hidrólise da lactose não é realizada ou não é completa no intestino delgado, portanto esse dissacarídeo não é absorvido, podendo, assim, provocar alguns desconfortos como a eliminação de água no intestino grosso, causando diarreia.

Estudos têm sido realizados para minimizar os efeitos provocados pela intolerância à lactose, e para que indivíduos com este problema não sejam privados dos benefícios dos alimentos de origem láctea, entre eles a hidrólise da lactose do leite antes da fabricação de produtos. Além de uma outra proposta, para minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose, o uso de alimentos funcionais contendo culturas probióticas. Culturas probióticas, por exemplo, pode garantir maior atividade enzimática, no caso de intolerantes, maior atividade da enzima lactase.

Para os consumidores intolerantes à lactose a ideia de encontrarem, no comércio, um leite fermentado probiótico com lactose hidrolisada já é bastante interessante. Além disso, se o produto for acrescido de leitelho, um subproduto obtido a partir da fabricação da manteiga, rico em proteínas, lipídios, oligossacarídeos, fosfolipídios, glicolipídios e glicoproteínas, tornaria esse derivado lácteo ainda mais promissor.

Sendo assim a elaboração de um leite fermentado probiótico com redução de lactose e adição de leitelho torna-se uma alternativa inovadora para as indústrias de derivados lácteos, aproveitando-se um subproduto rico em nutrientes e que apresenta características tecnológicas em sistemas alimentícios, além de benefícios à saúde.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lactose

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

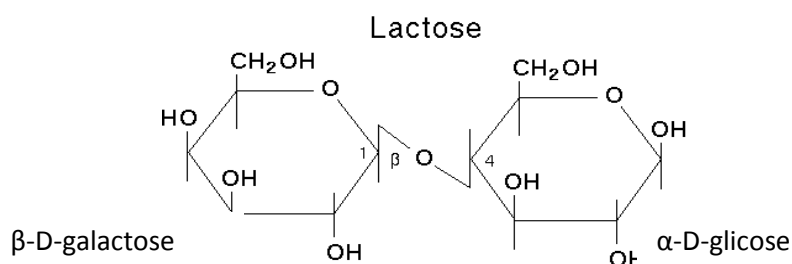


Figura 1. Estrutura química da lactose.

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. Em função da estreita relação entre a sua síntese e a quantidade de água drenada para o leite, o conteúdo de lactose é o componente do leite que tem menos variação (FOX; McSWEENEY, 1998).

A lactose tem várias aplicações na indústria alimentícia. É utilizada, por exemplo, em doces, confeitos, pães, recheios, etc., devido às suas propriedades físico-químicas: esse componente fornece boa textura e cor aos alimentos. Apresenta apenas um terço do poder adoçante da sacarose e menos da metade do da glicose (VALSECHI, 2001). Segundo KIRKPATRICK; FENWICK (1987), por possuir poder adoçante inferior ao da sacarose, ela pode

ser utilizada na formulação de alimentos sem ofuscar o sabor natural de outros componentes.

Quando usada em produtos assados, promove a reação de *Maillard*, o que melhora a coloração da crosta. Nutricionalmente, a lactose promove a absorção de cálcio e fósforo, provavelmente pelo aumento inespecífico da pressão osmótica intestinal, um efeito comum a muitos açúcares e outros carboidratos o que é especialmente útil em formulações infantis (FOX; McSWEENEY, 1998). 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).

Uma das desvantagens do uso da lactose é a dificuldade da sua digestão 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 deste carboidrato (KARDEL, 1997).

2.1.1 Intolerância à lactose

A intolerância a lactose consiste na deficiência da concentração da enzima intestinal β -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 microrganismos 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 em 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 β -D-galactosidase, comumente chamada de lactase, é uma enzima produzida pelas células das 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 lactase depende da quantidade de enzima, pH, temperatura, tempo de reação (GIST-BROCADES, 2004).

A lactase pode ser encontrada em vegetais (pêssegos e amêndoas), animais e humanos (pele, intestinos e cérebro), 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).

A intolerância à lactose é uma desordem genética muito comum, em dados estimados, mais de 37 milhões de brasileiros a possuem por causa da deficiência na síntese da lactase (β -galactosidase) (CAMPOS, 2009).

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).

2.1.2 Hidrólise da lactose

Segundo CAMPOS et al (2009), a redução do teor de lactose em leite e derivados é importante comercialmente, 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 (150°C) e pH ácido (normalmente 1,2), durante um curto período formando diversos subprodutos que deverão ser purificados (CARMINATTI et al., 2001). 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, segundo Gekas e Lopez-Leiva¹⁰, a faixa de pH ótima para atividade dessa enzima é de 6,9-7,3, e a temperatura ótima, 35°C. Pode ser aplicada no leite ou no soro, sem tratamento prévio, e os produtos obtidos preservam as propriedades nutricionais da matéria-prima, melhorando sua doçura (SANTOS, LADERO, GARCIA-OCHOA, 1998; CARMINATTI, 2001; VITOLLO, 2001).

2.2 Leite Fermentado

Entende-se por leites fermentados os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. Os fermentos lácticos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. O leite utilizado na fabricação de leites fermentados poderá ser fluído ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos de origem láctea, bem como de outras substâncias alimentícias recomendadas pela tecnologia atual de fabricação de leites fermentados, nos termos do presente Padrão de Identidade e Qualidade, e que não interfiram no

processo de fermentação do leite pelos fermentos lácticos empregados (BRASIL, 2007).

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

Uma opção inovadora na fabricação de leites fermentados poderia ser a adição do leitelho, um subproduto lácteo derivado da fabricação de manteiga, a partir do creme do leite, ao produto.

Uma das etapas do processamento da manteiga consiste no batimento do creme de leite. Durante essa agitação, ocorre o rompimento dos glóbulos de gordura e acontece à liberação dos lipídeos para a formação da manteiga com separação de uma fase aquosa, o líquido resultante dessa inversão de fase denomina-se leitelho (FOX e MCSWEENEY, 1998; VALSECHI, 2001).

A maioria dos componentes solúveis em água contidos no creme, como proteínas, lactose e minerais, além de alguns lipídeos e material derivado da membrana dos glóbulos de gordura rompida com a agitação do processamento, migram para o leitelho (RIGUEIRA, 2006; COSTA et al, 2009).

Com a produção crescente de manteiga, no Brasil e no mundo, e o leitelho apresentando carga poluidora duas vezes superior a do soro, verifica-se a necessidade de aproveitamento do mesmo.

O leitelho contém, em média, 11,7% de sólidos, incluindo 6,5% de lactose, 3,0% de proteínas, 1,5% de lipídeos e 0,7% de minerais (MORIN et al., 2006). Assim, ele poderia ser aproveitado para a fabricação de produtos como as bebidas lácteas e leites fermentados, dentre outros, em substituição parcial a

um dos ingredientes principais, como o soro e o leite, resultando em novos produtos.

2.3 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, 2002). Além disso, algumas bactérias probióticas, como *L. acidophilus* e *B. bifidum*, produzem a lactase, disponibilizando, no intestino do indivíduo, maiores quantidades dessa enzima (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003). Um microrganismo probiótico deve, necessariamente, sobreviver às condições adversas do trato gastrintestinal (ácidos, bile e enzimas pancreáticas) e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, por meio da adesão ao epitélio intestinal (ZIEMER; GIBSON, 1998).

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 da população de micro-organismo patogênicos 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 gastrintestinal 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 microrganismos empregados como probióticos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e, em menor escala, a espécie *Enterococcus faecium* (LEE et al., 1999; LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

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 microrganismos viáveis que deve ser ingerida diariamente para obtenção dos efeitos benéficos (BRASIL, 2008). Essa dose corresponde ao consumo de 100 g ou mL de produto que contenha entre 10^6 e 10^7 UFC/g ou mL (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 (CAMPOS, 2009).

As principais aplicações de culturas probióticas são realizadas em produtos lácteos como leites fermentados e iogurtes. Os microrganismos 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).

3 ARTIGO

ELABORAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO COM BAIXO TEOR DE LACTOSE E ADIÇÃO DE LEITELHO

Ana Paula HIROKI¹, Ligia GRECCO², Renan GRECCO², Elsa Helena Walter de SANTANA³, Marcela de Rezende COSTA⁴, Cínthia Hoch Batista de SOUZA⁵, Lina Casale ARAGON-ALEGRO^{6*}

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: anahiroki@yahoo.com.br.

²Graduandos do curso de Biomedicina, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: renan.grecco@hotmail.com, ligia.lica@hotmail.com

³Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com.

⁴Médica veterinária, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Senador Filinto Müller, 2443, Cidade Universitária, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: marcela.rezende@ufms.br.

^{6*}Bióloga, doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG: 26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora pra correspondência).

⁶*Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG: 26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora pra correspondência).

RESUMO

A intolerância à lactose é comum na população brasileira, causando sintomas desagradáveis quando ocorre a ingestão de leite e seus derivados. O objetivo do trabalho foi a elaboração de um leite fermentado com redução no teor de lactose, adicionado de culturas probióticas e contendo 30% de leiteiro, um subproduto lácteo rico em nutrientes. Foram elaboradas 4 formulações de leite fermentado: HTP) leite e leiteiro com lactose hidrolisada + *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*; HT) leite e leiteiro com lactose hidrolisada + *S. thermophilus*; NHTP) leite e leiteiro adicionados de *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B. animalis*; NHT) leite e leiteiro adicionados de *S. thermophilus*. Os leites fermentados foram avaliados nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento a 4°C quanto ao pH, acidez titulável e enumeração dos micro-organismos. Os dados obtidos foram analisados através de análise de variância, ao nível de 5% de significância. Os produtos HTP e HT apresentaram 89 e 70% de lactose hidrolisada, respectivamente, demonstrando a importância do probiótico também na hidrólise deste carboidrato. Durante os 28 dias, o pH do produto NHTP foi menor que os outros. A população de *S. thermophilus* manteve-se sempre acima de 11 log UFC/mL, em todas as formulações. Nos leites fermentados probióticos, as populações desses micro-organismos diminuíram durante o armazenamento, mas mantiveram-se sempre acima de 8 log UFC/mL, o que é suficiente para que o produto seja definido como probiótico. Além disso, a lactose hidrolisada parece promover a multiplicação dos microrganismos utilizados.

Palavras-chave: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, leiteiro, lactase, fermentação.

1 INTRODUÇÃO

A lactose é o principal carboidrato do leite, e o componente de menor variabilidade na matéria seca. Possui o mesmo peso molecular da sacarose, mas diferindo no poder adoçante e na solubilidade, sendo 10 vezes menos solúvel (VALESCHI, 2001). Do ponto de vista nutricional, a lactose promove a absorção de cálcio e fósforo, provavelmente pelo aumento inespecífico da pressão osmótica intestinal, um efeito comum a muitos açúcares e outros carboidratos (FOX; McSWEENEY, 1998).

Porém o alto nível de lactose presente no leite acaba restringindo o seu consumo por pessoas que apresentam intolerância a este carboidrato, devido à deficiência na concentração da enzima lactase (β -galactosidase) no intestino delgado. Portanto, para que os indivíduos intolerantes não se privem dos muitos benefícios do leite, torna-se importante a redução do teor de lactose no leite e em seus derivados, sendo a hidrólise enzimática, com a utilização da β -galactosidase, um dos métodos mais interessantes para esta finalidade (MATIOLLI, 2001).

Além disso, uma outra alternativa para quem apresenta intolerância à lactose é a adição de culturas probióticas em nestes produtos com baixo teor de lactose, pois essas culturas podem promover a melhor utilização da lactase e, assim, dependendo do nível de intolerância do indivíduo, o consumo de produtos fermentados ou leite hidrolisado pode ser possível (KIM, 1997).

O leitelho, um subproduto da fabricação da manteiga, é uma fonte de nutrientes, como fosfolípidios e proteínas, (MORIN et al., 2006), além de apresentar baixo custo, por se tratar de um resíduo. A utilização deste componente para a produção de um leite fermentado tornaria esse produto ainda mais promissor.

O objetivo deste trabalho foi a produção de leites fermentados probióticos com lactose hidrolisada e a utilização do leitelho, para avaliar o efeito das culturas probióticas na hidrólise e a viabilidade dessas culturas durante a vida de prateleira dos produtos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram formulados leites fermentados probióticos contendo 70% de base láctea (leite UHT padronizado 3%, Tirol) e 30% de leiteiro (Confepar, Londrina, Brasil), enzima β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact® – L500), além do fermento lácteo BioRich (Chr. Hansen, Hønsholm, Dinamarca), constituído de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus* (Tabela 1). O experimento foi repetido três vezes. Além disso, as análises físico-químicas foram realizadas em triplicata, e as microbiológicas, em duplicata.

Tabela 1. Formulações dos leites fermentados.

Formulação	Leite (%)	Leiteiro (%)	Probiótico	Hidrólise da Lactose
HTP	70	30	+	+
HT	70	30	-	+
NHTP	70	30	+	-
NTP	70	30	-	-

(+) Presença (-) Ausência

2.2 Quantificação da Lactose

Foi realizada através da reação da lactose com a metilamina, a absorbância foi medida em 540nm e os resultados foram expressos em concentração de lactose (g/100mL) amostra e expressos em porcentagem.

2.3 Hidrólise da Lactose

A hidrólise da lactose do leite foi realizada adicionando-se 0,8 g da enzima β -galactosidase para cada 100 mL de leite UHT integral, que foi mantido a 40°C durante 4 horas. Ao final desse tempo, uma alíquota de 10 mL foi retirada para determinação da glicose, inversamente proporcional à concentração de lactose. O leite que foi utilizado com a lactose íntegra também permaneceu armazenado a 40°C durante 4 horas.

2.4 Determinação da concentração de glicose

A Determinação de glicose foi realizada pelo método glicose-oxidase, utilizando-se o Kit Glicose P-P (Analisa®), que se baseia na oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, pela glicose oxidase. A absorbância foi medida em 505 nm. Os resultados foram calculados em mg/dL de glicose e expressos em porcentagem.

2.5 Elaboração dos leites fermentados

O leitelho, em pó, foi reconstituído na proporção de 125 g/Kg de água e adicionado conforme o planejamento experimental, à base láctea. Em seguida, as misturas foram aquecidas durante 5 minutos a 90 °C, em placas aquecedoras, e resfriadas em banho de gelo. Quando foi atingida a temperatura de 42 °C, foi adicionado, na proporção de 2%, o fermento lácteo. Após homogeneização, estas misturas foram incubadas em estufa BOD a 42 °C, até atingir valores de pH ente 4,6 e 4,8. Em seguida, foram resfriadas a 10 °C, quando foram realizadas as quebras manuais dos coágulos (durante 30 s) e a adição dos demais ingredientes: 5% de polpa de morango (Polpa Norte, Japurá, Brasil), 10% de açúcar (União, Santos, Brasil), 0,2% de aromatizante (All flavours, Diadema, Brasil) e 0,2% de corante vermelho natal (Mix, São Bernardo do Campo, Brasil). Os leites fermentados foram envasados em

garrafas plásticas pré-higienizadas de capacidade de 500 mL, e armazenadas a 6°C até a realização das análises.

2.6 ANÁLISES E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM

O processo de fermentação foi avaliado a cada 30 minutos, através de acidez titulável e pH. As matérias-primas (leite e leiteiro) e os produtos finais tiveram pH, acidez avaliados.

Os produtos foram avaliadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento a 6 °C, quanto ao, pH, acidez titulável e enumerações de *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus acidophilus*.

2.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O leite, o soro, o leiteiro e as bebidas lácteas foram avaliados quanto ao pH, acidez utilizando-se os métodos oficiais da AOAC (2003). A acidez titulável foi medida através da titulação com hidróxido de sódio e o pH utilizando-se um potenciômetro de imersão.

2.8 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para a enumeração de *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus*, foram pesados 10 gramas das amostras e homogeneizados com 90 mL de solução salina 0,85% esterilizada. A partir desta diluição inicial, foi preparada uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente. Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas na superfície de placas contendo ágar MRS (Himedia, Mumbai, Índia) adicionado de 0,2 % (m/v) de cloreto de lítio (Cinética, Brasil) e 0,3 % (m/v) de propionato de sódio (Sigma, São Paulo, Brasil) (MRS-LP) para a enumeração de *Bifidobacterium animalis*. Ágar MRS contendo 1,5% de sais biliares (Himedia, Mumbai, Índia) (MRS-Bile) para a enumeração de *Lactobacillus acidophilus* e ágar M17 (Himedia, Mumbai, Índia) a 10% para enumeração do *Streptococcus thermophilus*. As placas de MRS-LP foram

incubadas em anaerobiose a 37 °C por 72 horas e as de MRS-Bile e M17, incubadas em aerobiose, a 37° por 72 horas (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000).

2.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram avaliados através de análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Statistica (STATSOFT, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pH dos produtos diminuiu e acidez aumentou durante o período de armazenamento, como mostram as figuras 1 e 2, demonstrando que pode haver pós-acidificação dos produtos provavelmente devido às culturas utilizadas.

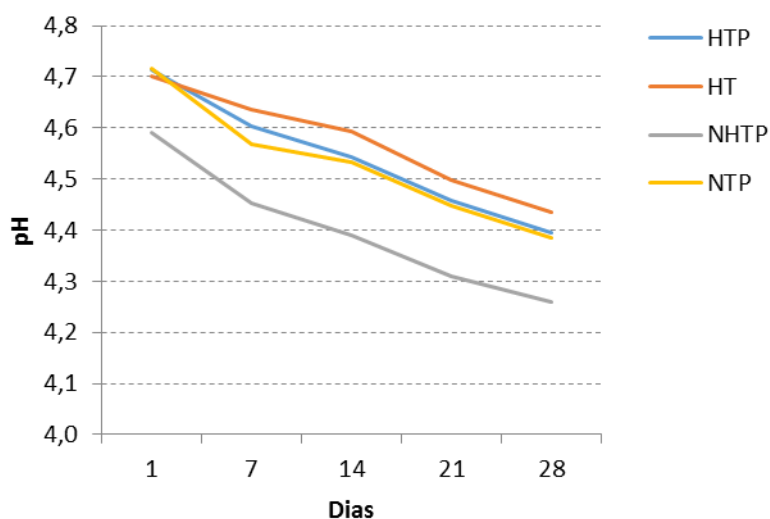


Figura 1. Valores do pH das amostras durante o período de armazenamento.

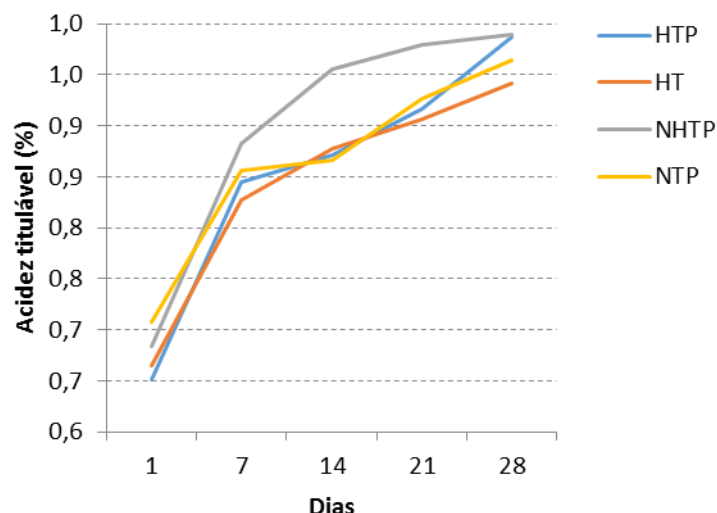


Figura 2. Acidez titulável dos produtos durante o período de armazenamento.

O pH das amostras decaiu da faixa de 4,7 até uma faixa de 4,4, resultados parecidos obtiveram Donkor et al. (2006), Moreira et al. (1999), Penna, Sivieri e Oliveira (2001) que observaram valores de pH entre 3,86 - 4,08, 3,76 - 4,39 e 4,45 - 4,60, nos produtos lácteos fermentados avaliados em seus trabalhos.

A acidez e o pH dos produtos HT e HTP sofreu uma menor variação em relação aos outros, o que mostra que a adição da enzima lactase pode contribuir para a diminuição da pós-acidificação dos leites fermentados.

Na pesquisa realizada por Moreira et al. (1999) a faixa de acidez dos diversos tipos de leites fermentados comerciais pesquisados foi de 0,70 e 1,20 % de ácido láctico.

Os produtos HTP e HT obtiveram uma porcentagem de lactose hidrolisada de 89 e 70%, respectivamente. Resultados obtidos por Longo (2006) utilizando uma concentração de 0,8g/L da enzima lactase, foram de 88,07% de hidrólise para o leite e para a preparação de iogurtes uma hidrólise de 85 a 86%.

A maior redução de lactose no produto HTP em relação ao HT pode ser explicada pelo fato deste conter as culturas probióticas, o que também auxilia na hidrólise do carboidrato.

Segundo HOLSINGER e KLIGERMAN (1991), os sintomas da intolerância podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%, chegando-se a um valor calculado em aproximadamente 1,23% de lactose quando 220mL de produto lácteo é consumido (MANAN; KARIM; KIT, 1999).

Como mostra a figura 3, a população do micro-organismo *Streptococcus thermophilus* se manteve, em todo o período de amostragem, superior a 11 log UFC/mL, diminuindo apenas no final dos 28 dias, fato também verificado por GIST-BROCADES (2004), que em seu estudo percebeu que a hidrólise da lactose pode estimular a multiplicação destas culturas.

ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (2004) observaram que os leites fermentados apresentaram contagens de células viáveis de *S. thermophilus* constantes ao longo dos 21 dias de estocagem refrigerada, respectivamente ao redor de 10^9 UFC/mL.

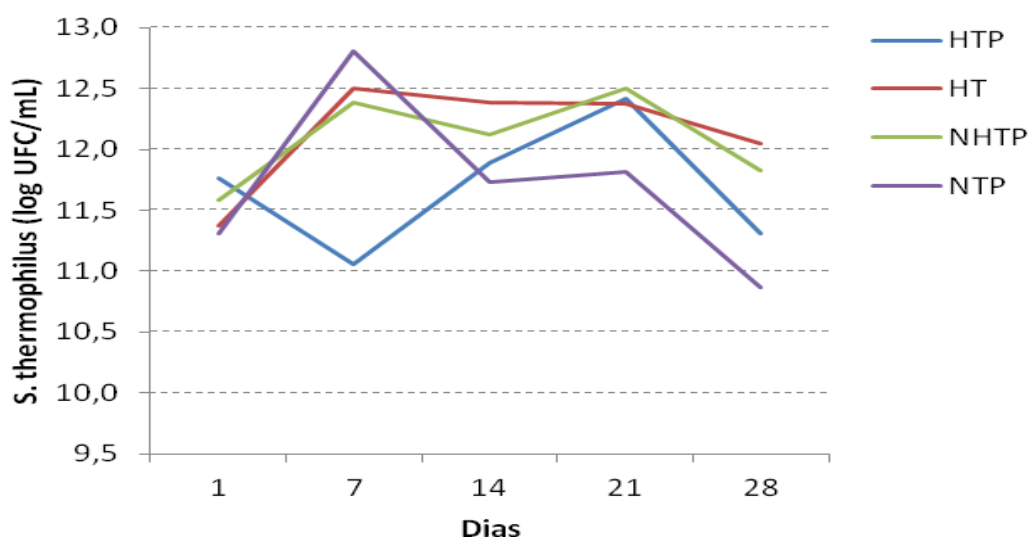


Figura 3. Populações de *Streptococcus thermophilus* nos produtos, durante o período de armazenamento.

A figura 4 mostra a população das culturas probióticas. Observa-se que houve um declínio nas populações desses micro-organismos, mas que até o último dia de avaliação ainda estiveram dentro dos limites estabelecidos na legislação. CUNHA et al (2008), em seu trabalho, utilizaram culturas probióticas no início do processo fermentativo e obtiveram resultados satisfatórios, valores maiores que 10^6 UFC/mL tanto para *Lactobacillus acidophilus* quanto para

Bifidobacterium animalis, utilizando uma base de 70% de leite para a fermentação.

A redução do ciclo logarítmico no final da amostragem, também foi observada por ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG (2004), que utilizaram culturas probióticas para a produção de uma bebida látea.

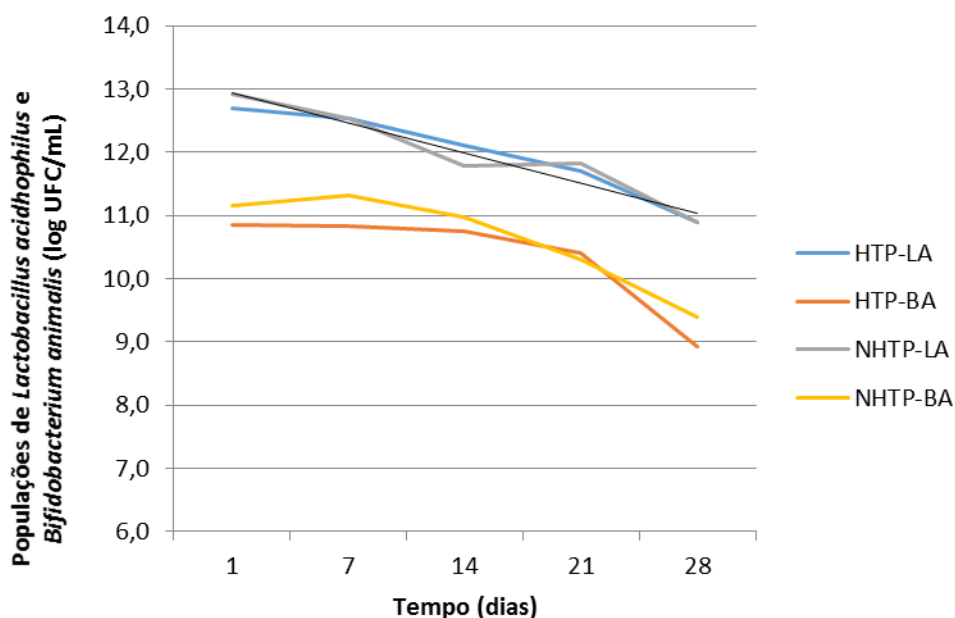


Figura 4. Populações dos micro-organismos probióticos nos produtos, durante o período de amostragem.

4 CONCLUSÃO

As populações dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* se mantiveram suficientemente acima dos valores para que o produto seja considerado probiótico.

Os resultados da hidrólise da lactose nos produtos foram suficientes para diminuir o desconforto causado por esse carboidrato nos indivíduos com intolerância, além disso, a hidrólise parece promover a multiplicação dos micro-organismos e a diminuição da pós-acidificação durante a vida de prateleira.

5 REFERÊNCIAS

- CUNHA, M.E.T.; SUGUIMOTO, H.H.; OLIVEIRA, A.N.; SIVIERI, K.; COSTA, M.R. Intolerância à Lactose e Alternativas Tecnológicas. **UNOPAR Científica, Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 83-88, 2008.
- DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 10, p. 1181-1189, 2006.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H., **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1998.
- GIST-BROCADES, Dairy Ingredients Group. Maxilact: the dairy yeast lactase. In: Biotechnology contributing to food, health and the environment. The Netherlands: Gist-Brocades. **BSD B.V.**, 2004. 12p.
- HOLSINGER, V. H.; KILGERMAN, K. H. Application of lactose in dairy foods and other foods containing lactose. *Food Technology*, v. 45, n. 1, p. 94-95, 1991.
- KIM, S.H.; LIM, K.P.; KIM, H.S. Differences in the hydrolysis of lactose and other substrates by β -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.2264- 2269, 1997.
- 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.
- MANAN, D. M. A.; KARIM, A. A.; KIT, W. K. Lactose content of modified enzyme- treated 'dadih'. **Food Chemistry**, n. 65, p. 439-443, 1999.
- MATIOLI, G.; MORAES, F.F.; ZANIN, G.M. Hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*: characterization of the enzyme. **Acta Scientiarum**, v.23, n.3, p.655-659, 2001.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P.; FERREIRA, C. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras-MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 147-152, 1999.

MORIN, P.; POULIOT, Y.; JIMÉNEZ-FLORES, R. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 521-528, 2006.

PENNA, A. L. B.; SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Relations between quality and rheological properties of lactic beverages. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 49, n. 1, p. 7-13, 2001.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados**. Araras – SP. UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p. Apostila.

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

4 CONCLUSÃO

As populações dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* se mantiveram suficientemente acima dos valores para que o produto seja considerado probiótico.

Os resultados da hidrólise da lactose nos produtos foram suficientes para diminuir o desconforto causado por esse carboidrato nos indivíduos com intolerância, além disso, a hidrólise parece promover a multiplicação dos microorganismos e a diminuição da pós-acidificação durante a vida de prateleira.

5 REFERÊNCIAS

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

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. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista das alegações aprovadas**. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 mai. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução RDC n°. 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 nº46, de 23 de novembro de 2007: **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**; 2007.

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

CAMPOS, T.C.A.S.; D'ALMEIDA, W.K.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; ROIG, S.M.; SUGUIMOTO, H.H. Utilização da β -galactosidase na Hidrólise da Lactose do Leite em Baixa Temperatura. **UNOPAR Científica, Ciênc. Biol. Saúde**, v.11, n.4, p.51-54, 2009.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de Hidrólise Enzimática da Lactose em Reator a Membrana Utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2001.

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

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

GALVÃO, L.C. TRONCON, L.E.A.; FERNANDES, M.I.M.; CARRER, J.C.; HYPPÓLITO, 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.

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.

GOURSAUD, J. La leche de vaca: composición y propiedades físico-químicas. In: LUQUET, F. M. **Leche y productos lácteos: la leche de la mamá a la lechería**. Zaragoza: Acribia, v. 1, parte 1, cap. 1, p. 3-92. 1991.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Biociencia Alimento**: Boletim de Tecnologia, v. 101, p. 12-22, 2002.

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

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

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.329-346, 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.

MORIN, P.; POULIOT, Y.; JIMÉNEZ-FLORES, R. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 521-528, 2006.

RIGUEIRA, J. C. S. **Desenvolvimento de metodologia analítica para detecção de adulteração pela adição de leite em pó e leite fluido**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2006.

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

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, New York, v.61, n.3, p.91-9, 2003.

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

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: 27/05/2011.

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

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. ***International Dairy Journal***, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

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, v.4, cap.14, p. 387-420, 2001.

VALSECHI, O. ***Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal***: o leite e seus derivados. Araras – SP. UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p. Apostila.

ZIEMER, C. J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and sybiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. ***Internacional Dairy Journal***, Amerstam, v. 8, p. 473-479, 1998.