



Universidade Norte do Paraná

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

**INFLUÊNCIA DE *Streptococcus thermophilus*
PRODUTOR DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE
NATURAL COM BAIXO TEOR DE LACTOSE**

Londrina
2012

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

**INFLUÊNCIA DE *Streptococcus thermophilus*
PRODUTOR DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE
NATURAL COM BAIXO TEOR DE LACTOSE**

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

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

LONDRINA
2012

LARISSA DE MEDEIROS CHAGAS

INFLUÊNCIA DE *Streptococcus thermophilus* PRODUTOR
DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL
COM BAIXO TEOR DE LACTOSE

Dissertação aprovada em 05 de junho de 2012, pela banca examinadora constituída pelos professores:

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

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

À minha família, amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada pela força, apoio, torcida e compreensão sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro que além de orientadora é uma grande amiga que sempre me incentivou, aconselhou e exigiu o meu melhor para que esse trabalho se concretizasse.

Ao técnico de laboratório Jorge Donato sempre muito eficiente e prestativo

À Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa, pelo apoio e colaboração na análise estatística dos dados deste trabalho.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório Alisson Santana, Osney Inay e Priscila Costa Ribeiro pela força, apoio e momentos de descontração tão preciosos ao longo dessa jornada.

A todos os meus alunos, que pelo apoio e carinho me motivam a buscar sempre novos conhecimentos;

Aos meu pais que me ensinaram todos os valores tão imprescindíveis para o cumprimento dessa etapa como responsabilidade, disciplina e dedicação, muito obrigada por tudo que sou hoje devo a vocês.

Ao meu irmão Luís Gustavo de Medeiros Chagas que mesmo estando longe sempre torceu e me apoiou mesmo quando tudo parecia desabar.

Às minhas pequenas irmãs Luiza e Beatriz pela doçura e amor incondicional dedicados a mim.

Às minhas “bonitinhas” Tatianne e Michele Negri, amigas-irmãs, companheiras de uma vida, por estarem sempre me apoiando nos momentos de alegria e de raiva também.

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

ROBERTO SHINYASHIKI

Chagas, Larissa de Medeiros. Influência de *Streptococcus thermophilus* produtor de exopolissacarídeos em iogurte natural com baixo teor de lactose. 2012. 48p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2012.

RESUMO

O mercado dos produtos com baixo teor de lactose ainda é pouco explorado no Brasil, apesar de 58 milhões de pessoas sofrerem de má absorção ou intolerância à lactose neste país. Uma maneira de se minimizar os efeitos causados pela intolerância a esse carboidrato é a ingestão de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, já que cerca de 50% de sua concentração original é hidrolisada durante a fermentação, pela ação da β -galactosidase microbiana produzida pelos organismos presentes no iogurte. Porém, existem relatos de que a viscosidade de um iogurte com produzido com lactose hidrolisada é menor. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia de uma cultura filante na fermentação e durante a vida de prateleira de um iogurte natural sem lactose. Para isso, foram produzidas quatro formulações de iogurte: 1) com lactose íntegra + cultura filante; 2) com lactose íntegra+ cultura não filante; 3) com lactose hidrolisada + cultura filante; 4) com lactose hidrolisada + cultura não filante. Os iogurtes foram armazenados sob refrigeração e analisados após um, sete, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Nesses períodos, foram enumeradas as populações das culturas *starter*, além do pH, acidez, viscosidade, capacidade de retenção de água e quantificação de exopolissacarídeos. A composição centesimal dos iogurtes foi realizada a fim de se caracterizar os produtos. Os dados foram analisados através de análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Statistica. O comportamento do pH e da acidez durante o processo fermentativo não foi afetado pela hidrólise ou pelo emprego da cultura filante; porém, o tempo de duração deste processo foi reduzido nas formulações que continham a cultura filante. Durante a vida de prateleira das quatro formulações foram observados a diminuição dos valores de pH e o aumento da acidez titulável. O emprego de cepas produtoras de exopolissacarídeos corrigiu o defeito na viscosidade apresentado nas formulações com baixo teor de lactose e melhorou significativamente a capacidade de retenção de água dos iogurtes.

Palavras-chave: Produto lácteo. Cultura filante. Fermentação.

ABSTRACT

The market of low lactose content products is still little explored in Brazil, despite 58 million people suffering from lactose malabsorption or intolerance in this country. One way to minimize the effects caused by this carbohydrate intolerance is the ingestion of fermented milk products such as yogurt, since about 50% of its original concentration is hydrolyzed during fermentation, by the action of β -galactosidase produced by microorganisms present in yogurt. However, there are reports that the viscosity of a yoghurt produced with hydrolysed lactose decreases. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of a exopolysaccharide (EPS)-producing culture in fermentation and during the shelf life of a hydrolyzed lactose yogurt. To do this, four formulations were produced: 1) lactose + EPS-producing culture; 2) lactose + culture; 3) hydrolysed lactose + EPS-producing culture; 4) hydrolysed lactose + culture. Yoghurts were stored under refrigeration and analyzed after one, seven, 14, 21 and 28 days of storage. In these periods, were evaluated the populations of the starter cultures, in addition to pH, acidity, viscosity, water-holding capacity and EPS quantification. The centesimal composition of yogurt was performed in order to characterize the products. Data were analyzed by using analysis of variance and Tukey test at the 5% level of significance, with Statistica program. The behavior of the pH and acidity during the fermentation process was not affected by hydrolysis or by use of EPS-producing culture; however, the duration of this process has been reduced in the formulations that contained the EPS-producing culture. During shelf life of the four formulations were observed a decrease of pH and titratable acidity increases. The employment of EPS-producing strains corrected the defect in viscosity brought in formulations with low lactose content and significantly improved the water holding capacity of yogurt.

Keywords: Dairy product. Exopolysaccharide producing strain. Fermentation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	10
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1	LEITE.....	12
2.2	LACTOSE.....	13
2.2.1	Intolerância à lactose.....	13
2.2.2	Hidrólise da lactose.....	14
2.3	IOGURTE.....	15
2.3.1	Culturas do iogurte.....	15
2.3.2	Exopolissacarídeos.....	18
3	ARTIGO.....	20
4	CONCLUSÃO.....	40
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A lactose é o principal carboidrato do leite, sendo o constituinte predominante e menos variável da matéria seca desse alimento (ALBUQUERQUE, 1997; GOURSAUD, 1985). É um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose ligada a uma molécula de galactose, que está presente no leite de todos os mamíferos na concentração de 2% a 10%, sendo encontrada, no leite de vaca, com concentração média de 4,8% (GOURSAUD, 1985).

A incapacidade de digerir esse carboidrato, denominada intolerância à lactose, é uma patologia que atinge mais de 50% da população mundial (DURING et al., 1998), e resulta da deficiência ou ausência da enzima intestinal β -galactosidase ou lactase (CUNHA et al., 2008). A molécula de lactose presente no leite, quando consumida por pessoas deficientes em lactase, não é quebrada em monossacarídeos (galactose e glicose) no intestino delgado e, portanto, não é absorvida (SUENAGA et al., 2003). Sintomas como diarreia, gases, dores abdominais e vômitos variam, em intensidade, de indivíduo para indivíduo.

Uma maneira de se minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose é a ingestão de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, já que cerca de 50% de sua concentração original é hidrolisada durante a fermentação, pela ação da β -galactosidase produzida pelos microrganismos presentes no iogurte (BRANDÃO, 1995; LIN et al., 1991).

A utilização de leite com lactose hidrolisada, além de proporcionar uma alternativa tecnológica para a produção do iogurte, por acarretar em uma multiplicação mais rápida das culturas *starter*, é de extrema importância, uma vez que, no Brasil, este mercado ainda tem sido pouco explorado. Com a necessidade de desenvolvimento de novos produtos sem lactose, a fim de serem atendidas as necessidades dos consumidores que apresentam má absorção ou intolerância a esse carboidrato, foram produzidos,

em um trabalho anterior, iogurtes a partir de leites com diferentes porcentagens de hidrólise da lactose. Porém, observou-se que os produtos desenvolvidos apresentaram diminuição de sua viscosidade. Assim, é importante avaliar se o uso de cepas de *Streptococcus thermophilus* produtoras de exopolissacarídeos pode minimizar esse efeito negativo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEITE

Segundo a Legislação brasileira, “leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 2002). É um alimento completo, que contém praticamente todos os nutrientes em quantidades significativas, sendo pobre em ferro, vitamina C e fibras (WALSTRA, 2006).

O leite deve ter as seguintes características e propriedades: ser agradável (com preservação das suas propriedades de sabor, cor, odor, viscosidade); estar limpo (livre de sujeiras, microrganismos e resíduos); ser íntegro (composição correta e conservação adequada) e ser seguro (não causar danos à saúde) (EMBRAPA, 2008).

Dentre os diferentes componentes do leite, a água apresenta-se em maior proporção, sendo os demais, principalmente, gordura, proteínas e carboidratos, todos sintetizados na glândula mamária. 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.

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

Fonte: ABLV (2008)

Diferentes leites apresentam variações quanto ao volume e quanto à relação entre os seus componentes. Essas variações dependem de fatores como espécie animal, raça, individualidade animal, intervalo entre ordenhas, variação durante a ordenha, período de lactação, estação do ano, alimentação, temperatura, doenças, idade do animal e condições climáticas (PINHEIRO; MOSQUIM, 1991).

2.2 LACTOSE

A lactose, principal carboidrato do leite, é composta por dois monossacarídeos, uma molécula de D-glicose e uma de molécula de β -D-galactose, tendo sua concentração aproximada variando entre 2% e 10% nos diferentes tipos de leite. O teor de lactose no leite bovino varia em torno de 4,4% e 5,2%, com média de 4,8% de lactose anidra (FOX, 1998).

Fisiologicamente, a lactose é uma substância energética, e seus monossacarídeos entram na constituição de cerebrosídeos, abundantes na massa cerebral (CARMINATTI et al., 2001). No intestino, a lactose promove a absorção do cálcio, provavelmente pelo aumento inespecífico da pressão osmótica intestinal, um efeito comum a muitos açúcares e outros carboidratos (FOX, 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).

Esse açúcar fermentescível não é utilizado diretamente pelas bactérias lácticas nos processos fermentativos, mas indiretamente, através da hidrólise dessa molécula em glicose e galactose, pela beta-D-galactosidase, com produção final de ácido lático (BECKER, 2009).

2.2.1 Intolerância à lactose

A intolerância à lactose é causada pela deficiência ou ausência 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 pelas células intestinais (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 pode ser fermentada pelos microrganismos presentes na microbiota intestinal, produzindo ácido lático e butírico, além de outros ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para menos de 6,0 causando, assim, produção de gases no intestino, cólicas e diarreia (FOX, 2008; BECKER, 2009).

A má absorção de lactose pode ser congênita ou adquirida (GALVÃO et al., 1996), sendo, esta última, classificada em primária ou 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 intolerância à lactose é uma desordem genética muito comum. No Brasil, 58 milhões de pessoas apresentam alguma dificuldade em digerir a lactose, pela deficiência da enzima lactase no intestino (BATAVO, 2004).

2.2.1 Hidrólise da lactose

Uma maneira de se minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose é a ingestão de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, já que cerca de 50% de sua concentração original é hidrolisada durante a fermentação, pela ação da β -galactosidase microbiana produzida pelos organismos presentes no iogurte (BRANDÃO, 1995; LIN et al., 1991). Outra proposta para minimizar esses efeitos consiste na ingestão de alimentos

lácteos com teor reduzido de lactose, o que beneficiaria as pessoas intolerantes a este carboidrato, sendo de suma importância nutricional e comercial. Sendo assim, nos últimos anos a hidrólise da lactose tem sido 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 hidrólise da lactose, dois métodos têm sido utilizados: a hidrólise ácida (homogênea ou heterogênea) e a enzimática (enzimas na forma livre, imobilizadas em suporte ou recuperadas). Na hidrólise enzimática, utiliza-se a enzima β -galactosidase e condições brandas, tanto de temperatura, como pH (CARMINATTI et al., 2001). Fontes comerciais de β -galactosidase são obtidas a partir de microrganismos que têm atividade ótima em pH ácido, como *Aspergillus* sp. e *Kluyveromyces* sp.

Além de ser aplicada a fim de se evitar os sintomas provocados pela intolerância à lactose em humanos, a hidrólise deste carboidrato oferece certas vantagens tecnológicas, como a diminuição dos riscos de cristalização da lactose em derivados lácteos e o aumento do poder adoçante (CARMINATTI, 2001).

2.3 IOGURTE

2.3.1 Culturas do iogurte

Iogurte é o leite fermentado com cultivos protossimbióticos de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, os quais podem ser acompanhados, de forma complementar, de outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2000).

Essas culturas ativas de bactérias láticas fermentam o leite, metabolizando parte da lactose presente a ácido lático. Durante esse processo, que normalmente ocorre entre quatro e cinco horas de incubação, em temperatura variando entre 40 e 44 °C, o leite líquido tem a sua consistência alterada, em virtude da coagulação de suas proteínas. A redução de pH a 5,1 -

5,2, resultante da produção de ácido láctico durante a fermentação, causa a desestabilização das micelas de caseína, sendo que a coagulação completa ocorre quando o pH 4,6 é atingido. Nesse momento, o leite coagulado deve ser resfriado rapidamente, para que a fermentação seja praticamente interrompida (VAN DE WATER, 2003).

As bactérias lácticas tradicionais utilizadas na fabricação de iogurtes, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, são termofílicas e homofermentativas. A produção do ácido láctico a partir da lactose do leite é a função primária desses microrganismos, que apresentam, como funções secundárias, o desenvolvimento de aroma e textura próprios do iogurte, além da produção de metabólitos com efeitos conservantes (VEDAMUTHU, 2006).

O *Streptococcus thermophilus* é uma bactéria esférica Gram positiva, anaeróbia, não móvel e não produtora de catalase. É a única espécie do gênero usada como cultura *starter* em produtos lácticos, sendo utilizada em fermentações lácticas em que são requeridas temperaturas altas de processamento e incubação. Este microrganismo metaboliza somente a porção da glicose da molécula de lactose, expelindo a galactose da célula para o meio. As culturas de *S. thermophilus* geralmente produzem um fraco coágulo, devido à baixa produção de ácido (CHANDAN; O'RELL, 2006, VEDAMUTHU, 2006). *S. thermophilus* pode sobreviver a 60 °C por 30 minutos, e é incapaz de se multiplicar a 10 °C. Embora a temperatura ótima de multiplicação seja 30 °C, este microrganismo multiplica-se bem em cooperação com *Lactobacillus bulgaricus*, a 42 °C, temperatura utilizada na produção do iogurte (CHANDAN; O'RELL, 2006).

Lactobacillus bulgaricus é um bacilo Gram positivo, não móvel, não produtor de catalase. Tem capacidade de produzir ácido láctico e peróxido de hidrogênio, além da enzima lactase, que hidrolisa a molécula da lactose em glicose e galactose. Sua temperatura ótima de multiplicação é 45 °C, mas, para produção de iogurte, a temperatura de 42-43 °C é utilizada por ser mais próxima da temperatura ótima para *S. thermophilus* (CHANDAN; O'RELL, 2006).

As bactérias *starter* do iogurte apresentam uma relação simbiótica obrigatória durante sua multiplicação no leite. O início da fermentação (acidez < 20 °D) favorece o desenvolvimento do *Streptococcus thermophilus*, estimulado por alguns aminoácidos livres (especialmente a valina), produzidos pelo *Lactobacillus bulgaricus*, provocando um aumento da acidez. Nessa fase, o *Streptococcus thermophilus* libera ácido fórmico, que é estimulante do desenvolvimento do *Lactobacillus bulgaricus*. Ao se atingir aproximadamente 46 °D, o meio torna-se pouco propício ao *Streptococcus thermophilus*, favorecendo o rápido desenvolvimento do *Lactobacillus bulgaricus*, que produz acetaldeído, o principal responsável pelo aroma característico do iogurte (ZOURARI et al., 1992; WALSTRA et al., 1999; VEDAMUTHU, 2006).

A multiplicação associada destas duas culturas resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior produção de ácido láctico e maior desenvolvimento de sabor e aroma no iogurte (TAMIME; DEETH, 1980; SABOYA et al., 1997).

O iogurte constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos para o ser humano (TEIXEIRA et al., 2000). Além disso, devido à ação metabólica das bactérias sobre os componentes do leite, estes são transformados em substâncias mais simples, podendo ser consumidos por pessoas que, por apresentarem deficiência da enzima lactase em seu organismo, não toleram a lactose presente no leite (SALADO; ANDRADE, 1989). Ainda, as células bacterianas utilizadas na fermentação, durante o processo de metabolismo do organismo humano, em condições gástricas, sofrem “lise”, liberando a lactase, que auxiliará no intestino (BRANDÃO, 1995).

Sabe-se que o consumo de leite e derivados por pessoas intolerantes à lactose varia de acordo com o nível de intolerância. Geralmente, pessoas intolerantes ao leite de vaca podem consumir produtos lácteos fermentados (KIM; GILLILAND, 1983). Porém, para alguns indivíduos, a melhor alternativa é a ingestão de produtos isentos de lactose, como o leite com lactose hidrolisada.

A elaboração de um iogurte com lactose hidrolisada destinado a essas pessoas também é possível. Em um trabalho desenvolvido por Chagas e Zampar (2009), foram produzidos iogurtes com leite integral e com leite integral com lactose hidrolisada. Os autores observaram que a viscosidade do iogurte produzido com o leite com lactose hidrolisada foi menor que a do iogurte produzido com leite com a lactose íntegra. Eles comentam, ainda, que a formação do coágulo parece ter sido prejudicada pela hidrólise da lactose, que resultou em um produto menos firme.

As propriedades físicas do iogurte, como consistência e viscosidade do coágulo, são de grande importância, e estão relacionadas, principalmente, ao conteúdo de sólidos da mistura destinada à elaboração do iogurte e ao aumento da acidez durante o processo de fermentação. Para resolver este problema, a prática mais utilizada nas indústrias é a adição de leite em pó (integral, semi-desnatado ou desnatado), com o objetivo de alcançar a concentração de sólidos necessária para a melhor consistência do iogurte (TAMIME; ROBINSON, 1991).

Para um bom desenvolvimento do processo de fermentação do leite, e consequente aumento da acidez, as culturas *starter* utilizadas devem ser resistentes à degradação, apresentar um poder acidificante médio, além de serem capazes de se desenvolverem em simbiose e de produzirem substâncias responsáveis pela viscosidade, sabor e aroma do iogurte (TAMIME; DEETH, 1980).

As bactérias lácticas são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor, e também podem contribuir para melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da síntese de exopolissacarídeos (RUAS-MADIEDO et al., 2009).

2.3.2 Exopolissacarídeos

Exopolissacarídeos microbianos (EPS) são polímeros produzidos por alguns microrganismos e que podem permanecer

covalentemente ligados à parede celular bacteriana, formando cápsulas, ou estarem fracamente ligados, sendo excretados pela célula, na forma de muco. As bactérias lácticas e outras Gram positivas empregadas na fabricação de alimentos, por exemplo, bifidobactérias e propionibactérias, também são capazes de produzir EPS (RUAS-MADIEDO et al., 2009)

Estes biopolímeros têm recebido uma atenção crescente nos últimos anos, devido à sua aplicação tecnológica em alimentos lácteos, podendo ser adicionados em vários produtos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes (RUAS-MADIEDO et al., 2009). A interação EPS-proteínas do leite ajuda a determinar a viscosidade de um produto fermentado (BROADBENT et al., 2003). Em iogurte, esses biopolímeros previnem a sinerese e contribuem para a formação de gel (DLAMINI et al., 2009).

Algumas culturas de *Streptococcus thermophilus*, utilizadas como *starter* na produção de iogurte, têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos. Esses polímeros apresentam efeitos fisiológicos para o microrganismo, protegendo-o em condições ambientais adversas (BROADBENT et al., 2003), contribuindo na formação de agregados celulares e no reconhecimento e adesão à superfície celular, facilitando a colonização em vários ecossistemas (DUBOC; MOLLET, 2001) e aumentando o tempo de permanência no trato gastrointestinal, de modo a reforçar, assim, a colonização de bactérias, inclusive as probióticas (WELMAN; MADDOX, 2003).

Embora a concentração de EPS seja relativamente pequena em leites fermentados (De VUYST; DEGEEST, 1999), a produção *in situ* de EPS por cepas de *S. thermophilus* melhoram a viscosidade e a retenção de água em iogurtes (DUBOC; MOLLET, 2001; WELMAN et al., 2003). Assim, essas cepas produtoras de EPS podem ser uma alternativa ao uso de hidrocolóides, como agentes de textura (DOLEYRES et al., 2005), podendo ser uma solução para o fraco coágulo resultante da fermentação de leite com lactose hidrolisada.

3 ARTIGO

INFLUÊNCIA DE *Streptococcus thermophilus* PRODUTOR DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL COM LACTOSE HIDROLISADA

Larissa de Medeiros CHAGAS¹, Alisson Santana da SILVA², Osney Inay MASSAMI³, Priscila Costa RIBEIRO⁴, Elsa Helena Walter de SANTANA⁵, Marcela de Rezende COSTA⁶, Lina Casale ARAGON-ALEGRO^{7*}

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: la_medeiros@msn.com.

²Graduando do curso de Biomedicina, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: alissonsantana57@hotmail.com.

³Mestrando em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: ozinay@hotmail.com.

⁴Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: priscila.farm@hotmail.com.

⁵Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com.

⁶Médica 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.

^{7*}Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, 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

O mercado dos produtos com baixo teor de lactose ainda é pouco explorado no Brasil, apesar de 58 milhões de pessoas sofrerem de má absorção ou intolerância à lactose neste país. Uma maneira de se minimizar os efeitos causados pela intolerância a esse carboidrato é a ingestão de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, já que cerca de 50% de sua concentração original é hidrolisada durante a fermentação, pela ação da β -galactosidase microbiana produzida pelos organismos presentes no iogurte. Porém, existem relatos de que a viscosidade de um iogurte com produzido com lactose hidrolisada é menor. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influencia de uma cultura filante na fermentação e durante a vida de prateleira de um iogurte natural sem lactose. Para isso, foram produzidas quatro formulações de iogurte: 1) com lactose íntegra + cultura filante; 2) com lactose íntegra+ cultura não filante; 3) com lactose hidrolisada + cultura filante; 4) com lactose hidrolisada + cultura não filante. Os iogurtes foram armazenados sob refrigeração e analisados após um, sete, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Nesses períodos, foram enumeradas as populações das culturas *starter*, além do pH, acidez, viscosidade, capacidade de retenção de água e quantificação de exopolissacarídeos. A composição centesimal dos iogurtes foi realizada a fim de se caracterizar os produtos. Os dados foram analisados através de análise de variância e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa Statistica. O comportamento do pH e da acidez durante o processo fermentativo não foi afetado pela hidrólise ou pelo emprego da cultura filante; porém, o tempo de duração deste processo foi reduzido nas formulações que continham a cultura filante. Durante a vida de prateleira das quatro formulações foram observados a diminuição dos valores de pH e o aumento da acidez titulável. O emprego de cepas produtoras de exopolissacarídeos corrigiu o defeito na viscosidade apresentado nas formulações com baixo teor de lactose e melhorou significativamente a capacidade de retenção de água dos iogurtes.

1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose é causada pela deficiência ou ausência da enzima intestinal β -galactosidase no organismo. Esta enzima, também chamada de lactase, é responsável pela hidrólise da molécula de lactose, originando dois monossacarídeos, glicose e galactose, que são facilmente absorvidos pelas células intestinais (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 pode ser fermentada pelos microrganismos da microbiota intestinal, produzindo ácido láctico e butírico, além de outros ácidos voláteis que reduzem o pH das fezes para menos de 6,0 causando, assim, produção de gases no intestino, cólicas e diarreia (FOX, 2008; BECKER, 2009).

A má absorção de lactose é uma desordem genética muito comum, que pode ser congênita ou adquirida (GALVÃO et al., 1996), sendo, esta última, classificada em primária ou 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 prevalência da hipolactasia primária em adultos, varia nos diferentes países, com porcentagens de 4 a 5% no nordeste da Europa, Dinamarca e Grã-Bretanha (SAHI, 1994), até de 86,8% no sul da Índia (BABU et al., 2009), 89% no Japão (NOSE et al., 1994) e 94% na Sibéria (LEMBER et al., 1995). No Brasil, existe uma grande variação nesta prevalência, que é de 57% entre brancos e mulatos, 80% entre os negros, 89% entre os índios e 100% entre os japoneses (ALVES et al., 2002; MATTAR et al., 2009).

Uma maneira de se minimizar os efeitos causados pela intolerância à lactose é a ingestão de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, uma vez que cerca de 50% da concentração original deste carboidrato é hidrolisada durante o processo de fermentação, pela ação da β -galactosidase produzida pelos microrganismos fermentadores no iogurte (KLEINMAM, 1990; LIN et al., 1991; BRANDÃO, 1995). Além disso, estes microrganismos, durante sua passagem pelo estômago, têm suas células lisadas, liberando a lactase produzida por eles no trato gastrointestinal humano, o que auxilia na redução do quadro de intolerância (BRANDÃO, 1995).

Outra proposta para minimizar esses efeitos consiste na ingestão de alimentos lácteos com teor reduzido de lactose, o que beneficia as pessoas intolerantes a este carboidrato, sendo de suma importância nutricional e comercial. Sendo assim, nos últimos anos a hidrólise da lactose tem sido um processo promissor para a indústria de alimentos, uma vez que possibilita o desenvolvimento de novos produtos sem esse carboidrato em suas composições.

O processo de hidrólise da lactose é simples e não requer equipamentos especiais na planta industrial (ZADOW, 1986). Para a hidrólise da lactose, dois métodos têm sido utilizados: a hidrólise ácida e a enzimática. Na primeira, o pH normalmente é ajustado para 1,2, e a temperatura, para 150 °C durante um curto período. Na hidrólise enzimática, utiliza-se a enzima β -galactosidase e condições brandas, tanto de temperatura, como pH (CARMINATTI et al., 2001).

Fontes comerciais de β -galactosidase são obtidas a partir de microrganismos que têm atividade ótima em pH ácido, como *Aspergillus* sp. e *Kluyveromyces* sp. A primeira lactase comercializada, no início dos anos 70, era proveniente de levedura e produzida pela Gist-Brocades. O primeiro produto lácteo com lactose hidrolisada, um leite em pó, foi produzido por uma indústria alemã (HARJU, KALLIOINEN, TOSSAVAINEN, 2012).

A indústria produtora de lactase Gist-Brocades (2004) sugere a utilização de sua enzima de três diferentes maneiras, para produção de iogurte: 1) pré-hidrólise do leite pasteurizado a baixas temperaturas (6 °C a 10 °C), durante aproximadamente 15 horas e, só então, faz-se o tratamento térmico do

leite e sua fermentação; 2) pré-hidrólise do leite em altas temperaturas (37 °C a 40 °C), durante 4 horas, seguida de tratamento térmico e fermentação; 3) hidrólise da lactose e acidificação do leite feitas de maneira simultânea, desde que a temperatura de incubação não exceda 40 °C. Neste último, a hidrólise ocorre até o pH 5,7 ser atingido, o que inativa a enzima.

Além de ser aplicada a fim de se evitar os sintomas provocados pela intolerância à lactose em humanos, a hidrólise deste carboidrato oferece certas vantagens tecnológicas, como a diminuição dos riscos de cristalização da lactose em derivados lácteos e o aumento do poder adoçante (CARMINATTI, 2001).

Um iogurte natural com lactose hidrolisada foi desenvolvido por Chagas e Zampar (2009). Porém, os autores observaram que a viscosidade do iogurte produzido com o leite contendo lactose hidrolisada foi menor que a do iogurte com a lactose íntegra, sugerindo que a formação do coágulo parece ter sido prejudicada pela hidrólise da lactose, que resultou em um produto menos firme.

As bactérias lácticas são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de aroma e sabor, e podem, também, contribuir para a melhoria da textura e da viscosidade de produtos fermentados, por meio da síntese de exopolissacarídeos (RUAS-MADIEDO et al., 2009).

Exopolissacarídeos microbianos (EPS) são polímeros que podem permanecer covalentemente ligados à parede celular bacteriana, formando cápsulas, ou fracamente ligados, sendo excretados pela célula. Algumas bactérias lácticas empregadas na produção de alimentos são capazes de produzir EPS. Esses biopolímeros têm recebido atenção crescente nos últimos anos, devido à sua aplicação tecnológica em produtos lácteos, podendo ser adicionados em vários alimentos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes (RUAS-MADIEDO et al., 2009).

A interação ESP-proteínas do leite ajuda a determinar a viscosidade de um produto fermentado (BROADBENT et al., 2003). No iogurte,

ainda, esse biopolímero previne a sinerese e contribui para a formação do gel (DLAMINI et al., 2009). Além disso, os EPS apresentam efeitos fisiológicos para o consumidor, contribuindo na formação de agregados celulares e no reconhecimento e adesão à superfície da célula intestinal, facilitando a colonização de bactérias benéficas à saúde, como as probióticas, que permanecem mais tempo no trato gastrointestinal (DUBOC; MOLLET, 2001; WELMAN; MADDOX, 2003).

Algumas culturas de *Streptococcus thermophilus*, utilizadas como *starter* na produção de iogurte têm a capacidade de produzir exopolissacarídeos. A produção *in situ* de EPS por cepas de *S. thermophilus* melhora a viscosidade e a retenção de água em iogurtes (DUBOC; MOLLET, 2001; WELMAN et al., 2003), sendo que essas cepas produtoras de EPS podem ser uma alternativa ao uso de hidrocolóides, como agentes de textura, nesses produtos (DOLEYRES et al., 2005).

Com o exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das culturas de *Streptococcus thermophilus* produtoras de exopolissacarídeos nas características do iogurte natural com baixo teor de lactose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento dos iogurtes e as análises foram realizados nos laboratórios do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, da Universidade Norte do Paraná, em Londrina - PR.

2.1 MATÉRIAS-PRIMAS

Para a produção dos iogurtes foram utilizados leite UHT integral (Líder), leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), enzima β -galactosidase derivada de *Kluyveromyces lactis* (Maxilact[®] – L500), culturas *starter* *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (YO-MIX[™] 496 LYO 100 DCU e YO-MIX[™] 883 LYO 50 DCU, Danisco).

2.2 PREPARO DAS CULTURAS

As culturas lácticas foram preparadas no dia anterior à produção dos iogurtes, na proporção de 2%. Para isto, leite em pó desnatado foi reconstituído em água a 80 °C, resfriado a 42 °C e adicionado da cultura liofilizada. A mistura foi incubada em estufa a 42 °C até o pH 4,6 ser atingido. Em seguida, foram armazenadas sob refrigeração.

2.3 QUANTIFICAÇÃO DA LACTOSE

A determinação da concentração de lactose do leite foi realizada pelo método de Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Para isso, 5 mL de leite foram homogeneizados em liquidificador, com 300 mL de água destilada gelada, durante 5 minutos. A mistura foi filtrada e 10 mL do filtrado foram adicionados em um balão de 50 mL, que teve seu volume completado com água destilada. Dois mL dessa solução foram transferidos para tubo de ensaio, adicionados de 1 mL de fenol (Merck) 5% e 5 mL de ácido sulfúrico (Merck). O tubo foi mantido em temperatura ambiente, durante 10 minutos, e agitado em seguida. Após incubação, em banho-maria, a 25 °C, durante 15 minutos, a leitura foi feita em espectrofotômetro (Cintra 5, GBC Scientific Equipment) a 490 nm.

2.4 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 6 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 6 horas.

2.5 PRODUÇÃO DOS IOGURTES

Em cada dia de produção foram elaboradas quatro formulações de iogurte: 1) leite com lactose íntegra e adição de cultura não produtora de EPS; 2) leite com lactose hidrolisada e adição de cultura não produtora de EPS; 3) leite com lactose íntegra e adição de cultura produtora de EPS; 4) leite com lactose hidrolisada e adição de cultura produtora de EPS.

Para a produção dos iogurtes, foram separadas quatro alíquotas de leite UHT integral, sendo duas com lactose íntegra, e duas, hidrolisada, que foram aquecidas a 40 °C e tiveram os seus teores de sólidos totais corrigidos para 14%, com a adição de leite em pó desnatado, para aumento da matéria seca e conseqüente melhora na consistência dos iogurtes. Em seguida, as misturas passaram por tratamento térmico a 90 °C, durante 3,5 minutos e, após resfriamento a 42 °C, foram adicionadas as culturas *starter* previamente preparadas, como indicado anteriormente neste item. As misturas foram incubadas a 42 °C, para fermentação, até obter-se pH 4,6. Elas foram, então, foram resfriadas e mantidas a 4 °C. Toda a produção foi repetida três vezes.

2.6 ARMAZENAMENTO E PERÍODOS DE AMOSTRAGEM

Os iogurtes foram armazenados sob refrigeração (4 °C) até os momentos das análises. Todas as análises (enumeração dos microrganismos, acidez, pH, concentração de EPS, viscosidade e capacidade de retenção de água) foram realizadas após um, sete, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Os valores de pH e acidez também foram verificados a cada trinta minutos, durante o processo de fermentação. A composição centesimal dos iogurtes foi realizada no dia seguinte à produção dos mesmos, a fim de caracterizá-los. As análises microbiológicas foram feitas em duplicata, e as outras, em triplicata.

2.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

2.7.1 Preparo e diluição das amostras

Alíquotas de 10 g das amostras foram transferidas para bolsas para amostragem esterilizadas, onde foram adicionados 90 mL de

solução salina (0,85% p/v). A partir desta diluição, foram efetuadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. Todas as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Lima et al. (2009) e seus resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônia por grama de produto (log UFC/g).

2.7.2 Enumerações de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*

Para as enumerações de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, diluições decimais foram semeadas em profundidade, em ágar M17 e ágar MRS acidificado até pH 5,4, com ácido acético glacial, respectivamente, que foram incubados a 37°C, em aerobiose. As colônias de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram contadas após dois e três dias, respectivamente.

2.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber, de acordo com Kosikowski e Mistry (1997). As análises seguintes foram realizadas seguindo os procedimentos da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2003). O pH dos leites e queijos foram mensurados utilizando-se potenciômetro de imersão (Tecnal, Piracicaba, Brasil) previamente calibrado. A acidez foi determinada através de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (Cinética Reagentes & Soluções, Jandira, Brasil) utilizando fenolftaleína como indicador. O teor de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl e o de proteína total, multiplicando-se o teor de nitrogênio total por 6,38. O teor de cinzas foi avaliado pelo método gravimétrico de incineração em mufla (FDG Equipamento, EDGCON 1P, São Paulo, Brasil) a 550 °C e o de sólidos totais, por secagem em estufa de circulação forçada (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil) à temperatura de 105 °C, por 16 h.

O teor de lactose dos iogurtes foi calculado através da determinação da concentração de glicose nos produtos, realizada pelo método glicose-oxidase, utilizando-se o kit Glicose-PP (Analisa). A absorbância

medida, em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

A determinação da viscosidade foi realizada em viscosímetro rotativo microprocessado (Q860M21, Quimis), e a capacidade de retenção de água, determinada segundo Parnell-Clunies et al. (1986) conforme descrita a seguir: aproximadamente 20 g de iogurte foram centrifugados a 5000 x g, por 15 minutos, a 10 °C. O fluido sobrenadante foi drenado e pesado. A capacidade de retenção de água foi expressa em %, como g H₂O/100 g de amostra.

O procedimento usado para quantificação de EPS, baseado em Tsutsumi et al. (2009) modificado, foi realizado conforme descrito a seguir: uma alíquota de 10 g de iogurte foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos, à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi separado, adicionado de 3 volumes de álcool etílico absoluto e armazenado em refrigerador por 48 horas. Após o período de refrigeração o material foi seco em estufa a 70 °C até peso constante.

2.9 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A lactose é um dissacarídeo que, quando submetido à ação da enzima lactase, é quebrado em dois monossacarídeos: glicose e galactose. Uma vez que a concentração de glicose é inversamente proporcional à concentração de lactose presente na amostra, neste trabalho, a porcentagem de hidrólise no leite foi medida pela concentração de glicose.

O leite utilizado para a produção dos iogurtes apresentou, em média, 6,8% de lactose. Após a hidrólise deste carboidrato por um período de 6 horas a 40 °C, verificou-se a presença de aproximadamente 2,74% de glicose

no produto, indicando que, durante este tempo, 80,6% da lactose presente no leite foi hidrolisada.

Os leites com lactose íntegra e hidrolisada adicionados das culturas *starter* tiveram seus valores de pH e acidez observados a cada 30 minutos, durante o processo fermentativo. Os valores de pH das quatro formulações produzidas estão mostrados na figura 1.

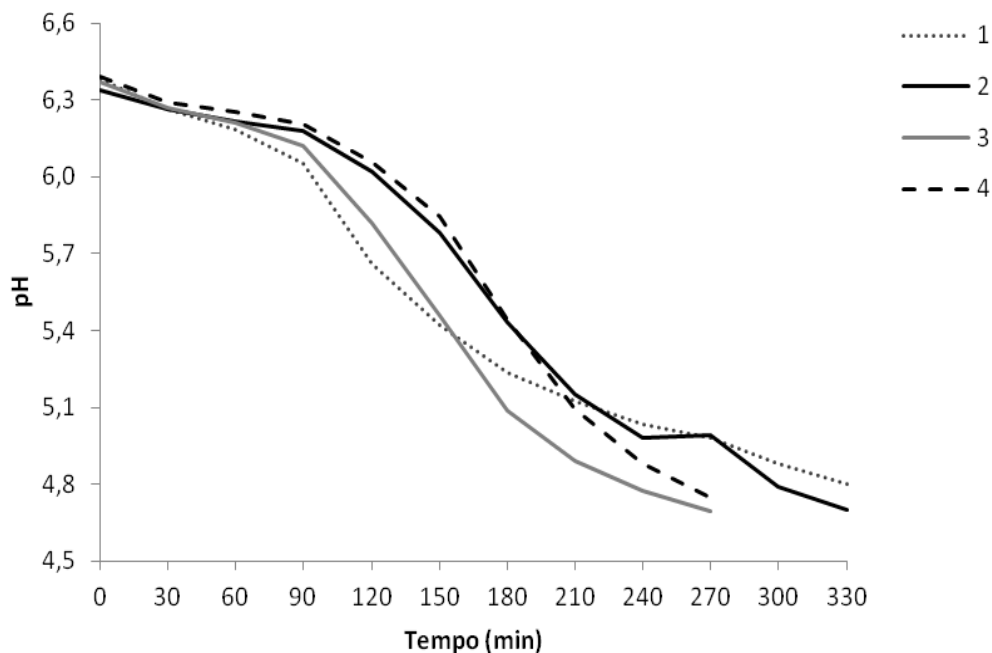


Figura 1. Variação dos valores de pH observados nas quatro formulações, durante o processo fermentativo.

Em todas as formulações, o pH diminuiu durante o processo de fermentação ($p < 0,05$), até atingirem valores aproximados de 4,7 (Figura 1) que, segundo Fuchs et al. (2005), é o pH considerado ideal para promover a coagulação das proteínas do leite. Essa redução dos valores de pH ocorreu devido à produção de ácido láctico e de outros ácidos orgânicos, pela cultura láctica (TAMIME e ROBINSON, 1991). Segundo Kessler (1981), o iogurte é composto de ácido láctico (58,9%), ácido cítrico (28,1%), ácido acético (5,3%), ácido fórmico (2,4%) e ácido succínico (2,3%).

O ácido láctico age como conservante natural, além de tornar os componentes do leite mais facilmente digeríveis, favorecendo, principalmente,

os indivíduos aclorídricos (SILVA et al., 2001). Este ácido também contribui para a desestabilização das micelas de caseína e, conseqüentemente, para a formação do gel, além de proporcionar o sabor ácido característico do iogurte, podendo, também, acentuar o aroma do produto (KESSLER, 1981).

Porém, o controle do pH é importante no processo de fermentação, pois a separação do soro está diretamente relacionada a este parâmetro. Em produtos com pH inferior a 4,0, ocorre separação do soro, devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo (THAMER e PENNA, 2006).

Não foi verificada diferença estatística entre os valores de pH das quatro formulações de iogurte avaliadas, em cada momento de análise do processo fermentativo ($p > 0,05$). Porém, é válido ressaltar que os iogurtes contendo cultura produtora de EPS (3 e 4) atingiram o pH final mais rapidamente, em torno de quatro horas e meia, enquanto os iogurtes contendo cultura starter não produtora de EPS (1 e 2) apresentaram esses valores ao final de cinco horas do processo fermentativo. Esses resultados indicam que o tipo de cultura utilizada afetou significativamente o tempo de fermentação dos iogurtes.

De acordo com Jay (2000), a acidez titulável é mais expressiva do que o pH isolado, quando deseja-se determinar a quantidade de ácidos orgânicos em alimentos, uma vez que a medição do pH é dada pela concentração de íons hidrogênio, e os ácidos orgânicos podem não estar completamente dissociados.

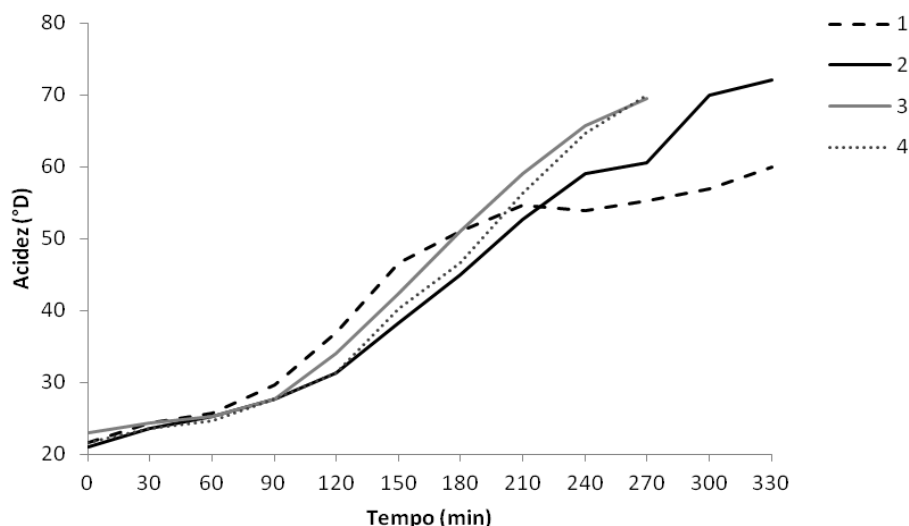


Figura 2. Variação dos valores de acidez observados nas quatro formulações, durante o processo fermentativo.

Os valores de acidez dos iogurtes, durante o processo fermentativo, foram inversamente proporcionais aos de pH (Figura 2). As formulações contendo a cultura filante (3 e 4), atingiram mais rapidamente os valores finais de acidez de 69 e 70°D, respectivamente, enquanto a formulação 2, com leite com lactose hidrolisada contendo cultura não produtora de EPS, necessitou de mais trinta minutos para atingir a mesma acidez. Por outro lado, o processo de fermentação do iogurte contendo lactose íntegra e cultura não produtora de EPS, mesmo necessitando de uma hora a mais em relação aos das formulações 3 e 4, apresentou valor de acidez mais baixo, próximo de 60°D.

Nossos resultados diferem dos obtidos por Pereira (2002), que observou que o tempo de fermentação de leite contendo lactose íntegra foi menor que o de leite com teor de lactose reduzido.

A fim de se caracterizar os iogurtes recém-produzidos, foram realizadas análises da composição centesimal dos mesmos, cujos resultados podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Média e desvio padrão, em porcentagem, da composição centesimal das diferentes formulações de iogurte produzidas.

Formulação	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Cinzas	EST
1	1,38 ±0,08 ^b	0,78 ±0,07 ^a	8,43 ±0,21 ^a	0,99 ±0,7 ^{ab}	11,58 ±0,15 ^a
2	1,67 ±0,14 ^a	0,72 ±0,07 ^a	6,75 ± 1,33 ^{ab}	1,03 ±0,02 ^{ab}	10,16 ±1,14 ^b
3	1,52 ±0,13 ^{ab}	0,75 ±0,6 ^a	7,47 ± 0,38 ^{ab}	0,98 ±0,4 ^b	10,72 ±0,53 ^{ab}
4	1,68 ±0,12 ^a	0,86 ±0,3 ^a	6,32 ± 0,61 ^b	1,03 ±0,03 ^a	9,90 ±0,83 ^b

^{ab}Para cada parâmetro, valores seguidos pela mesma letra não são significativamente diferentes ($p>0,05$). EST = extrato seco total.

Não foi verificada diferença entre as concentrações de proteínas presentes nas diferentes amostras ($p>0,05$). O teor de lipídeos verificado no iogurte da formulação 1 (lactose íntegra e cultura não produtora de EPS) foi menor que os observados nos iogurtes contendo lactose hidrolisada ($p<0,05$). Além disso, os iogurtes elaborados a partir de leite com lactose hidrolisada apresentaram menores valores de carboidratos que os produzidos com leite contendo lactose íntegra, sendo que apenas as formulações 1 e 4 diferiram significativamente ($p<0,05$). O maior valor de extrato seco total foi observado na formulação 1.

Os iogurtes elaborados foram analisados a cada sete dias, durante um período de 28 dias de armazenamento refrigerado (5 °C), para várias características. Na tabela 2, pode-se observar os valores de pH, acidez, capacidade de retenção de água e concentração de exopolissacarídeos verificados nas diferentes formulações de iogurte, durante a vida-de-prateleira.

Os valores médios de pH e de acidez titulável verificados nas quatro formulações diminuíram e aumentaram, respectivamente, durante a período de armazenamento dos produtos ($p<0,05$) (Tabela 2). Este comportamento dos valores de pH e acidez nos iogurtes ocorreu devido à produção de ácido lático e de outros ácidos orgânicos pela cultura *starter* (TAMIME e ROBINSON, 1991).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de capacidade de retenção de água, concentração de exopolissacarídeos, pH e acidez titulável obtidos em cada formulação, para cada dia de análise.

Formulação	Dia	CRA (%)	EXO (g/L)	pH	Acidez (°D)
1	1	40.07 ± 0.03 ^{ABa}	30.88 ± 0.26 ^{Aa}	4.29 ± 0.19 ^{Aa}	111.3 ± 3.1 ^{Aa}
	7	45.25 ± 8.52 ^{Aa}	43.49 ± 11.63 ^{Aa}	3.98 ± 0.03 ^{Ba}	142.2 ± 1.6 ^{Ba}
	14	56.25 ± 0.69 ^{Ca}	57.29 ± 11.10 ^{Aa}	3.89 ± 0.09 ^{Ba}	151.7 ± 6.9 ^{Ca}
	21	37.11 ± 2.34 ^{Ba}	35.68 ± 11.68 ^{Aa}	3.66 ± 0.05 ^{Cab}	200.2 ± 0.8 ^{Da}
	28	37.01 ± 0.79 ^{Ba}	45.46 ± 16.75 ^{Aa}	3.48 ± 0.02 ^{Da}	205.3 ± 1.0 ^{Da}
2	1	40.12 ± 0.02 ^{Ab}	33.91 ± 3.22 ^{Aa}	4.26 ± 0.17 ^{Aa}	113.0 ± 2.5 ^{Aa}
	7	39.16 ± 5.40 ^{Aa}	44.09 ± 18.34 ^{Aa}	3.99 ± 0.01 ^{Ba}	139.3 ± 1.2 ^{Bac}
	14	46.74 ± 0.61 ^{Bb}	53.30 ± 21.32 ^{Aa}	3.94 ± 0.03 ^{Ba}	150.0 ± 5.6 ^{Ca}
	21	29.64 ± 1.16 ^{Cb}	37.44 ± 17.72 ^{Aa}	3.71 ± 0.07 ^{Ca}	195.3 ± 8.1 ^{Da}
	28	28.63 ± 0.94 ^{Cb}	54.32 ± 18.77 ^{Aa}	3.51 ± 0.02 ^{Da}	203.7 ± 1.4 ^{Eab}
3	1	40.22 ± 0.02 ^{ABc}	26.24 ± 6.77 ^{Aa}	4.27 ± 0.18 ^{Aa}	111.7 ± 3.0 ^{Aa}
	7	43.93 ± 9.43 ^{Aa}	42.61 ± 14.28 ^{Aa}	4.00 ± 0.05 ^{Ba}	136.2 ± 1.0 ^{Bbd}
	14	56.06 ± 0.74 ^{Ca}	53.35 ± 11.19 ^{Aa}	3.91 ± 0.03 ^{Ba}	150.0 ± 5.1 ^{Ca}
	21	35.38 ± 2.11 ^{BDa}	44.66 ± 21.90 ^{Aa}	3.68 ± 0.01 ^{Ca}	195.8 ± 6.9 ^{Da}
	28	34.08 ± 1.33 ^{Dc}	47.64 ± 20.32 ^{Aa}	3.51 ± 0.06 ^{Da}	203.5 ± 2.3 ^{Eab}
4	1	40.10 ± 0.01 ^{Ab}	35.69 ± 7.67 ^{Aa}	4.19 ± 0.19 ^{Aa}	114.5 ± 5.5 ^{Aa}
	7	38.85 ± 7.56 ^{Aa}	51.61 ± 17.85 ^{Aa}	4.01 ± 0.11 ^{Ba}	138.8 ± 3.0 ^{Bcd}
	14	48.52 ± 0.62 ^{Bc}	49.69 ± 17.44 ^{Aa}	3.90 ± 0.04 ^{Ba}	153.0 ± 6.1 ^{Ca}
	21	31.43 ± 0.84 ^{Cb}	39.35 ± 11.88 ^{Aa}	3.62 ± 0.02 ^{Cb}	195.3 ± 5.7 ^{Da}
	28	30.57 ± 0.90 ^{Cd}	52.80 ± 17.64 ^{Aa}	3.53 ± 0.03 ^{Ca}	202.0 ± 1.5 ^{Db}

^{A,B,C,D} Em uma mesma coluna, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de análise, dentro de uma mesma formulação.

^{a, b, c, d} Em uma mesma coluna, letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as formulações, em um mesmo dia de análise.

CRA = capacidade de retenção de água; EXO = concentração de exopolissacarídeos.

Neste trabalho, os valores médios de pH dos iogurtes, durante a vida de prateleira, variaram entre 4,19 e 4,29 (iniciais) e 3,48 e 3,53 (finais). Em relação à acidez, os valores médios iniciais variaram entre 111,3 e 114,5, e os finais, entre 202,0 e 205,3 (Tabela 2).

Segundo Martin (2002) a hidrólise das proteínas do iogurte, provocada por micro-organismos se dá devido a formação de polipeptídeos e está diretamente relacionada ao pH, temperatura e tempo de armazenamento do produto. Quando ocorre esse fenômeno, pode-se observar que há uma atividade intensa na fase log, os teores de nitrogênio não proteico diminuem quando a proporção entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* também diminui e os

ácidos graxos livres podem afetar a atividade proteolítica da cultura lática podendo, assim, afetar a textura do coágulo (Tamime e Robinson, 1988)

Lee et al. (1991) observaram que, levando-se em conta as alterações de pH, acidez titulável e viabilidade das células da cultura lática, alterações toleráveis são observadas em armazenamentos de 10 a 16 dias com temperaturas variando de 5 a 15 °C e que armazenamento sob temperaturas superiores a 30 °C é impraticável. Ainda segundo Bellucci et al. (1991) os valores de pH diminuem conforme se prolonga o período de armazenamento do produto e/ou ocorre um aumento na temperatura deste armazenamento.

Comparando-se as diferentes formulações, de acordo com a tabela 2, observa-se que, os valores de pH e acidez foram semelhantes, na maioria dos dias. No sétimo dia de armazenamento, verificou-se diferença nos valores de acidez entre as amostras, sendo que as que continham culturas produtoras de EPS apresentaram, de maneira geral, menor acidez ($p < 0,05$). Comportamento contrário foi observado no dia 21, quando comparadas as duas amostras elaboradas com leite com lactose hidrolisada. A formulação contendo a cultura filante apresentou valores de pH menores que a fermentada por cultura não produtora de EPS ($p < 0,05$).

Segundo a variação na acidez de leites fermentados dependem, em maior ou menor grau, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do Gurgel e Oliveira (1995) poder de pós-acidificação das culturas utilizadas. Portanto, a escolha de culturas de baixa pós-acidificação é determinante na qualidade de produtos fermentados.

Em todas as amostras, o maior valor de capacidade de retenção de água foi observado em 14 dias de armazenamento dos iogurtes ($p < 0,05$). Este parâmetro, quando comparadas as diferentes formulações, apresentou diferenças significativas. No primeiro dia de análises, apesar de a estatística apontar algumas diferenças na CRA, os valores foram praticamente iguais, assim como no sétimo dia. Com 14 e 21 dias de armazenamento, verificou-se que as formulações que continham leite com lactose íntegra apresentaram valores maiores de CRA, comparando-se com as demais

($p < 0,05$). Ao final da vida-de-prateleira dos iogurtes, esse comportamento ainda foi observado. Porém, dentre os produzidos com leite com lactose íntegra, o iogurte que apresentou maior CRA foi o fermentado com cultura não produtora de EPS. Já o iogurte com lactose hidrolisada que apresentou a melhor CRA foi o que continha a cultura filante ($p < 0,05$).

Em relação à concentração de EPS nas diferentes formulações, não foi verificada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os valores. Esse resultado indica que, provavelmente, a técnica utilizada não foi eficiente ou, ainda, não foi realizada de maneira correta. Para a publicação, essa análise será repetida.

As populações médias de *Streptococcus thermophilus* nas diferentes formulações, durante o período de armazenamento refrigerado podem ser observadas na figura 3.

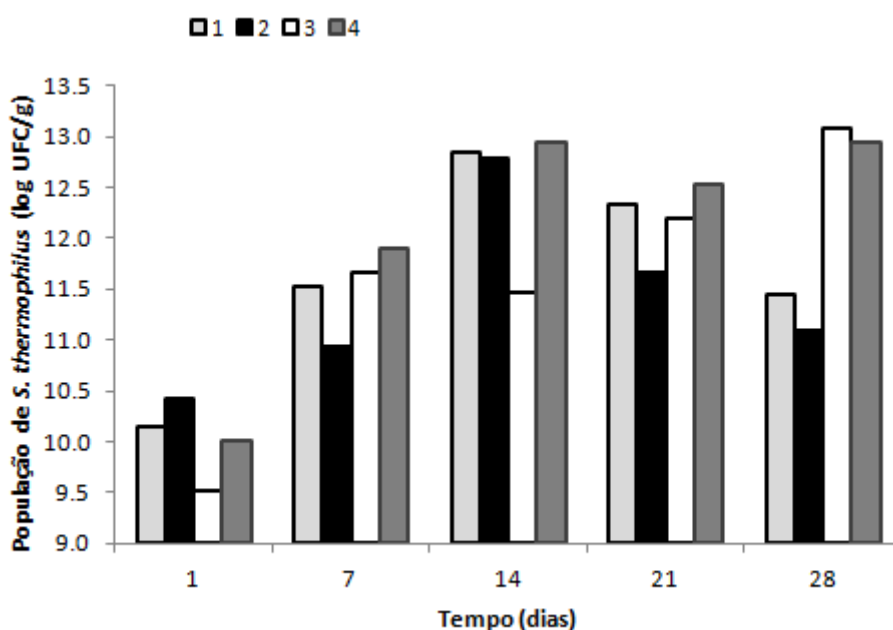


Figura 3. Populações médias de *Streptococcus thermophilus* (log UFC/g) nas diferentes formulações de iogurte, durante o tempo de armazenamento.

Na figura 4, pode-se observar as populações médias de *Lactobacillus bulgaricus* presentes nas diferentes formulações de iogurte, durante o período de armazenamento refrigerado.

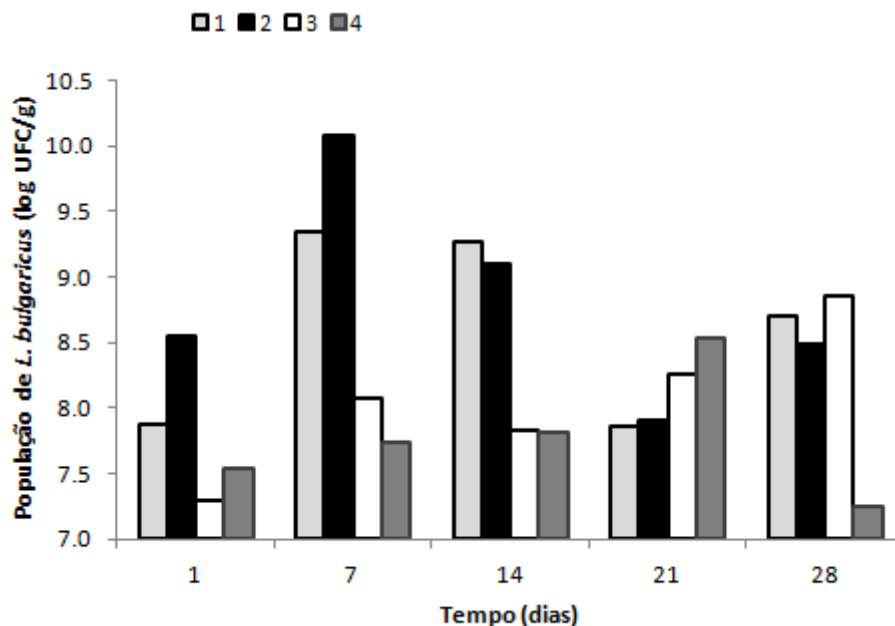


Figura 4. Populações médias de *Lactobacillus bulgaricus* (log UFC/g) nas diferentes formulações de iogurte, durante o tempo de armazenamento.

Analisando-se as populações médias de *Streptococcus thermophilus* (figura 3) e de *Lactobacillus bulgaricus* (figura 4) nas diferentes formulações é possível constatar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre elas, ou seja, a hidrólise da lactose (iogurtes 2 e 4) não afetou o desenvolvimento da cultura láctica. A cultura filante também não apresentou diferença no comportamento, quando comparada com a cultura não produtora de EPS, e nem ao longo do período de armazenamento.

Na figura 5, observam-se os valores de viscosidade das amostras, obtidos no vigésimo primeiro dia de armazenamento.

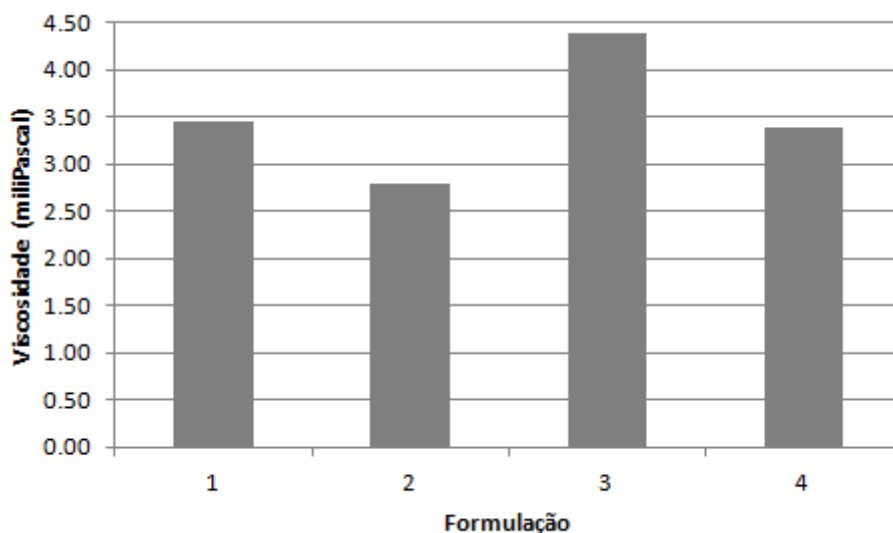


Figura 5. Valores médios de viscosidade observados no vigésimo primeiro dia de armazenamento das diferentes formulações de iogurte.

Chagas e Zampar (2009) verificaram que a viscosidade do iogurte é diretamente afetada de acordo com a concentração de lactose hidrolisada no produto, uma vez que, quanto maior a quantidade de lactose hidrolisada o iogurte continha, mais prejudicada a viscosidade do produto final, tornando-o significativamente mais fluido. Em um trabalho realizado por Urshev et al. (2008), foi verificado que leites fermentados que continham cepas de culturas filantes apresentavam maiores índices de viscosidade quando comparados àqueles que continham cultura não-filante. Aslim, Beyatli e Yuksekdag (2006) demonstram que há uma forte correlação positiva e significativa entre a produção de EPS e o desenvolvimento de maior viscosidade em produtos fermentados.

Visando corrigir o problema apresentado por Chagas e Zampar (2009) em iogurtes com lactose hidrolisada e levando em consideração os apontamentos feitos pelos autores supracitados em relação a viscosidade, esse trabalho verificou que é possível corrigir o defeito da viscosidade através da produção de iogurte com lactose hidrolisada com cultura produtora de ESP, fato que fica explícito na Figura 5, na qual comparando-se as diferentes formulações é possível observar não houve diferença significativa entre o

tratamento 1 (padrão) e o tratamento 4 (iogurte com lactose hidrolisada e cultura filante).

4 CONCLUSÃO

Ao se analisar os dados deste trabalho, conclui-se que é possível corrigir o efeito negativo que a hidrólise da lactose causa na viscosidade do iogurte com o emprego de culturas lácticas produtoras de exopolissacarídeos. O EPS mostrou-se um excelente agente espessante e geleificante, além de melhorar a capacidade de retenção de água, pois a sinerese é outro problema ligado a produção de iogurte com lactose hidrolisada, uma vez que estes apresentam uma maior sinerese quando comparados a formulação com lactose íntegra.

O emprego da cultura filante não afetou o processo fermentativo e os valores de pH e acidez se mantiveram semelhantes quando comparados à formulação que continha a cultura não produtora de EPS.

5 REFERÊNCIAS

A.O.A.C Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15 ed. Washington, 1995. 109 p.

ALVES, G. M. S. MORAES, M. B., FAGUNDES-NETO, U. Nutritional status and breath hydrogen test with lactose and lactulose in Terena Indian children. **J Pediatr**. n 78 p113-9, 2002.

ASLIM, B. Beyatli, Y. Yuksekdog, Z. N. Productions and monomer compositions of exopolysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from traditional home-made yoghurts and raw Milk. **International Journal of Food Science and Technology**. n 41, p 973–79, 2006.

BABU J. KUMAR S., BABU P. PRASAD J. H. GHOSHAL, U. C. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. **Am J Clin Nutr** doi: 10.3945/ajcn.2009.27946.

BECKER, L. V. Iogurte 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.

BELLUCCI, V. L. Efeitos das condições de armazenamento no pH, acidez titulável, sobrevivência e atividade proteolítica de culturas lácticas. **Dissertação** (Mestrado Em Ciência E Tecnologia De Alimentos) – Escola Superior De Agricultura “Luiz De Queiroz”, Universidade De São Paulo, Piracicaba, 1991.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite e Derivados**, v.5, n.25, p.24-38, 1995.

BROADBENT, J.R., McMAHON, D.J., WELKER, D.L., OBERG, C.J., MOINEAU, S. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 86, 407–23, 2003.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de Hidrólises 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.

CHAGAS, L. M., ZAMPAR, P. D. Efeito da hidrólise da lactose na produção de iogurte. 2009. 34p. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Farmácia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2009.

DLAMINI, A. M., PEIRIS, P. S., BAVOR, J.H., KAILASAPATHY, K. Rheological characteristics of an exopolysaccharide produced by a strain of *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 107, n 3, p 272–274, 2009

DOLEYRES, Y.; SCHAUB, L.; LACROIX, C. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4146–56, 2005

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-6, 1956.

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

FUNCHS, R. H. B., BORSATO, D. BONA, E. HAULY, M. C. O. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência Tecnologia de Alimentos**., Campinas, 25(1): p175-181, 2005.

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 environment. The Netherlands: Gist-Brocades BSD B.V., 2004. 12p.

HARJU, M. KALLIOINEN, H. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products: Technological aspects. **International Dairy Journal** n. 22 p 104-09, 2012.

KESSLER, H.G. Food engineering and dairy technology. Germany, 612p, 1981.

Jay, JM. Modern Food Microbiology. Aspen Publishers Inc. Maryland. 6th ed. 25p. 2000.

KLEINMAM, R. E. Practical significance of lactose intolerance in children: supplement. **Pediatric**, v. 86, n.4, p. 643-4, 1990.

LEE, J. J., KIM, H. Y. SHIN, J. B., BAEK, Y. J. Studies on the changes of the physical properties and the shelf-life of liquid yogurt stored at different temperatures. **Journal of Dairy Science**. v. 13, n.2, p124-3. 1991.

LEMBER M. TAMM, A. PIIRSOO, A. Suurmaa K, KERMES, K. KERMES, R. et al. Lactose malabsorption in Khants in Western Siberia. **Scand J Gastroenterol**. n 530 p225-7, 1995.

LIMA, K.G.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT – Food Science and Technology**, v.42, p. 491-5, 2009.

MARTIN, A. F. Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas. **Dissertação** (Mestrado Em Ciência E Tecnologia De Alimentos) – Escola Superior De Agricultura “Luiz De Queiroz”, Universidade De São Paulo, Piracicaba, 2002.

MATTAR, R. MONTEIRO, M. S. VILLARES, C. A. SANTOS, A. F. SILVA, J. M. K. CARRILHO, F. J. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutr J.**, 2009.

NOSE, O. IIDAY, K. H. HARADA T. OGAWA M. YABUUCHI, H. Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. **Arch Dis Child**, n 54, p 436-40, 1979.

RUAS-MADIEDO, P.; SALAZAR, N.; REYES-GAVILÁN, C.G. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced y lactic acid bacteria. In: **Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends**. M. Ullrich, ed. Caister Academic Press, Norwich, UK, 2009.

SAHI, T. Genetics and epidemiology of adult-type hypolactasia. **Scand J Gastroenterol.** n 29, p 07-20,1994.

SILVA, M. R. et al. Elaboração e avaliação de uma bebida láctea fermentada à base de soro de leite fortificada com ferro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 1, p. 7-14, 2001.

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

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.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-77, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. Fermented milks and their future trends. Part II. Technological aspects. **Journal of Dairy Research**. v. 55 n. 2 p.281-307, 1988;

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciencia y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 368 p, 1991.

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

URSHEV, Z. L. DIMITROV, Z. P. FATCHIKOVA, N. S. PETROVA, I. G. ISHLIMOVA D. I. Partial characterization and dynamics of synthesis of highmolecular mass exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **World Journal Microbiology Biotechnology**. n 24, p 171 – 79, 2008.

WELMAN, A.D., MADDOX, I.S.; ARCHER, R.H.. Screening and selection of exopolysaccharide-producing strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.1200–6, 2003.

ZADOW, J. G. Lactose hydrolysed dairy products. **Food Technology in Australia**. n 38, p 460 e 462-71, 1986.

4 CONCLUSÃO

Ao se analisar os dados deste trabalho, conclui-se que é possível corrigir o efeito negativo que a hidrólise da lactose causa na viscosidade do iogurte com o emprego de culturas lácticas produtoras de exopolissacarídeos. O EPS mostrou-se um excelente agente espessante e geleificante, além de melhorar a capacidade de retenção de água, pois a sinerese é outro problema ligado a produção de iogurte com lactose hidrolisada, uma vez que estes apresentam uma maior sinerese quando comparados a formulação com lactose íntegra.

O emprego da cultura filante não afetou o processo fermentativo e os valores de pH e acidez se mantiveram semelhantes quando comparados à formulação que continha a cultura não produtora de EPS.

5 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L.C. **O leite em suas mãos**. Juiz de Fora: Concorde Editora Gráfica, 150p, 1997.

BATAVO. **Leite Batavo Sensy baixa lactose**. 2004. 2p. Publicidade.

BECKER, L. V. **Iogurte 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.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. **Leite e Derivados**, v.5, n.25, p.24-38, 1995.

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: <<http://www.agricultura.gov.br/sislegis>>. Acesso em: 22/05/2010.

BROADBENT, J.R., McMAHON, D.J., WELKER, D.L., OBERG, C.J., MOINEAU, S. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 86, 407–23, 2003.

CARMINATTI, C. A. Ensaio de Hidrólises 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.

CHAGAS, L. M., ZAMPAR, P. D. Efeito da hidrólise da lactose na produção de iogurte. 2009. 34p. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Farmácia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2009.

CHANDAN, R.C.; O'RELL, K.R. Principles of yogurt processing. In: CHANDAN, R.C. **Manufacturing yogurt and fermented milks**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2006. p.211-236.

CUNHA, M. E. T., SUGUIMOTO, H. H., OLIVEIRA, A. N, SIVIERI, K. COSTA, M.R. **Intolerância à Lactose e Alternativas Tecnológicas**. Revista UNOPAR Científica, v.10, p.83-8, 2008.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 153-77, 1999.

DLAMINI, A. M., PEIRIS, P. S., BAVOR, J.H., KAILASAPATHY, K. Rheological characteristics of an exopolysaccharide produced by a strain of *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n 3, p 272–274, 2009

DOLEYRES, Y.; SCHAUB, L.; LACROIX, C. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4146–56, 2005.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759-768, 2001.

DURING, M.J.; SAMULSKI, R.J.; ELSWORTH, J.D.; KAPLITT, M.G.; LEONE, P.; XIAO, X.; LI, J.; FREESE, A.; TAYLOR, J.R.; ROTH, R.H.; SLADEK, J.R.; O'MALLEY, K.L.; REDMOND, D.E.Jr. In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudate of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. **Gene Therapy**, v.5, p.820-7, 1998.

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

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

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.

GOUSAUD, 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, n 1, p 31-56, 1985;.

KIM, H.S.; GILLILAND, S.E. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 959-66, 1983.

KLEINMAM, R. E. Practical significance of lactose intolerance in children: supplement. **Pediatric**, v. 86, n.4, p. 643-4, 1990.

LIN M.Y., SAVAIANO D. A., HARLANDER S. Influence of nonfermented dairy products containing bacterial starter cultures on lactose maldigestion in humans. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.87-95, 1991.

PINHEIRO, A. J. R.; MOSQUIM, M. C. A. V. **Apostila**: Processamento de leite de consumo. Dep. Tecnologia de Alimentos. UFV: Viçosa, 1991.

RUAS-MADIEDO, P.; SALAZAR, N.; REYES-GAVILÁN, C.G. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: **Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends**. M. Ullrich, ed. Caister Academic Press, Norwich, UK, 2009.

SABOYA, L. V.; OETTERER, M.; OLIVEIRA, A. J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados: uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 176-85, 1997.

SALADO, G. A.; ANDRADE, M. O. Processamento e qualidade nutricional do iogurte. **Boletim Cultura**, v.7, p.1-35, 1989.

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

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.

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-77, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt: ciencia y tecnologia**. Zaragoza: Acribia, 368 p, 1991.

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

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, p.113-44, 2003.

VEDAMUTHU, E.R. Starter cultures for yogurt and fermented milk. In: CHANDAN, R.C. **Manufacturing yogurt and fermented milks**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p.89-115, 2006.

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

ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. **Le lait**, v.72, p.1-34, 1992.