

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SORO E DE CULTURA PROBIÓTICA NAS
CARACTERÍSTICAS DE UMA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA**

Álvaro Fernando Trevisani Cardoso

Orientadora: Marília Magalhães Gonçalves

Ouro Branco

Junho/2015

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SORO E DE CULTURA PROBIÓTICA NAS
CARACTERÍSTICAS DE UMA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA**

Álvaro Fernando Trevisani Cardoso

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientadora: Marília Magalhães Gonçalves

Ouro Branco

Junho/2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SORO E DE CULTURA PROBIÓTICA NAS
CARACTERÍSTICAS DE UMA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA**

Álvaro Fernando Trevisani Cardoso

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Marília Magalhães Gonçalves – Orientador

Bruno Meireles Xavier – Examinador 1

Edson Romano Nucci – Examinador 2

Ouro Branco, 23/06/2015

Sumário

1. Resumo	4
2. Introdução	4
3. Objetivos	5
4. Revisão de Literatura	5
4.1. Bebidas lácteas	5
4.2. Soro de queijo	6
4.3. Probióticos	9
4.4. Fermentação	12
5. Material e Métodos	14
5.1. Preparo da Bebida Láctea Fermentada	15
5.2. Testes Físico-Químicos	16
5.3. Análises estatísticas	17
6. Resultados	17
7. Conclusão	20
8. Referencias Bibliográficas	21

1. Resumo

No trabalho foram testados os efeitos da substituição da água pelo soro de queijo na formulação de bebidas lácteas fermentadas e da adição da cultura potencialmente probiótica *Lactobacillus helveticus*. Desenvolveram-se três formulações de bebida láctea fermentada. Na primeira formulação o leite em pó foi reconstituído em água e adicionado das culturas lácticas *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Na segunda formulação o leite em pó foi reconstituído em soro de leite e adicionado das culturas *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. E na terceira formulação o leite em pó foi reconstituído em soro de leite e adicionado das culturas *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus*. As bebidas lácteas onde o leite em pó foi reconstituído com soro apresentaram tempo menor de fermentação, maior acidez, maior porcentagem de gordura, menor viscosidade e maior quantidade de proteínas quando comparadas às bebidas preparadas com leite em pó reconstituído com água. A adição do *Lactobacillus helveticus* não promoveu diferença significativa entre os tratamentos.

2. Introdução

Os consumidores brasileiros estão em processo de mudança de hábitos alimentares. Estão mais interessados em produtos saudáveis, inovadores, seguros e de prática utilização, o que contribui cada vez mais para o crescimento do consumo de bebidas lácteas. Com o objetivo de redução de custos aliado à necessidade de se criar alternativas à utilização do soro proveniente da expressiva produção de queijos no Brasil, os laticínios buscam cada vez mais a produção de bebida láctea com soro de queijo em sua composição. Desta forma, este produto está ganhando cada vez mais espaço no mercado consumidor. Esta expansão se dá por causa da redução do preço de venda em consequência do menor custo de produção e pelo maior nível de informações sobre os benefícios nutricionais por parte do consumidor (ORDÓÑEZ *et al*, 2007; VENTURINI FILHO, 2010).

Para os laticínios, a utilização do soro líquido em bebidas lácteas é uma das melhores opções para seu aproveitamento. Seu processo de produção é

simples e aproveita grande parte dos equipamentos já utilizados para o beneficiamento do leite. Assim, demandando pequenos investimentos e gerando um efluente de menor carga orgânica, pois se lançado sem tratamento em cursos d'água reduz a vida aquática, devido a sua alta demanda bioquímica de oxigênio (VENTURINI FILHO, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2013).

O soro possui diversos nutrientes provenientes do leite, ou seja, de origem natural. Dentre esses nutrientes destacam-se as proteínas que são de alto valor nutricional. Além dos minerais, como cálcio, fósforo e magnésio que são fundamentais para a saúde óssea e desempenham outras importantes funções (LEITE, 2006).

Por suas características físico-químicas e nutricionais, o soro pode ser utilizado juntamente com probióticos. Probióticos são micro-organismos vivos que quando consumidos em dose adequada, exercem influências benéficas, melhorando o balanço intestinal microbiano no hospedeiro. Seus benefícios estão relacionados à imunomodulação (defesas do organismo) e à prevenção de certas doenças em humanos (CUNHA *et al.* 2008).

3. Objetivos

Produzir e avaliar uma bebida láctea fermentada a partir de leite em pó reconstituído em soro e adicionada de micro-organismo potencialmente probiótico, além de avaliar o efeito das modificações no processo sobre as características físico-químicas do produto.

4. Revisão de Literatura

4.1. Bebidas lácteas

Bebida Láctea é o produto lácteo resultante da mistura do leite e soro de leite adicionado ou não de outras substâncias alimentícias. A base Láctea tem que representar pelo menos 51% massa/massa do total de ingredientes do produto. Quando é adicionada de cultivo de micro-organismos específicos, recebe o nome de bebida láctea fermentada e não pode ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. A contagem total de bactérias lácticas

viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g (unidades formadoras de colônia), no produto final, durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

O principal componente da bebida láctea é o leite, que pode ser pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou desnatado. Outro componente é o soro de leite, que pode ser líquido, concentrado ou em pó. Já para as bebidas lácteas fermentadas é adicionado os cultivos de bactéria láctica isoladamente ou em combinação com os demais componentes. Os ingredientes lácteos opcionais podem ser: creme, sólidos de origem láctea, manteiga, gordura anidra do leite ou *butter oil*, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, leiteiro e outros produtos de origem láctea. Já os ingredientes não lácteos podem ser: açúcares, maltodextrina, edulcorantes nutritivos e não nutritivos, frutas em pedaço, polpa ou suco e outro preparados a base de frutas, mel, cereais, vegetais, gorduras vegetais, chocolates, frutas secas, café, especiarias e outros alimentos, aromatizantes naturais e inócuos e/ou sabores, amidos, gelatina ou outros produtos ou substâncias alimentícias (VENTURINI FILHO, 2010 ; BRASIL, 2005).

Quanto às características sensoriais, as bebidas lácteas apresentam consistência líquida, com variações de viscosidade de acordo com sua composição. Além de cor, odor e sabor característicos ou de acordo com os ingredientes, corantes ou aromatizantes adicionados. Devem ser envasadas em materiais adequados para as condições de armazenamento e que confirmem uma proteção apropriada contra a contaminação. Aquelas pasteurizadas e fermentadas deverão ser conservadas em temperatura máxima de 10°C (VENTURINI FILHO, 2010).

4.2. Soro de queijo

Na fabricação de queijos é adicionado ao leite às bactérias lácticas, denominadas de fermento e as enzimas denominadas coalho, que são capazes de coagular o leite. A acidez gerada pela transformação da lactose em ácido láctico junto com a atividade da enzima causa a desestabilização das proteínas das micelas de caseína, dando início ao processo de coagulação, gerando o gel de caseína. Esse gel é aquecido causando contração e expulsão de líquido

do seu interior, sendo que este líquido recebe o nome de soro de queijo. Assim, o soro de queijo é um subproduto da coagulação do leite, tendo sua composição variada dependendo do queijo produzido (VENTURINI FILHO, 2010 ; LEITE, 2006).

O soro de queijo pode ser classificado dependendo do processo do qual ele é originado. Por exemplo, no caso da fabricação dos queijos mussarela, cheddar e suíço, a coagulação das proteínas é feita por um processo enzimático que resulta em um soro que é classificado como doce, de acidez titulável entre 0,10 e 0,15%. Já na fabricação dos queijos cottage, ricota, ocorre a adição de ácido (lático, cítrico ou acético) para promover a coagulação. Nesse processo parte da lactose é convertida a ácido lático, antes que o soro seja separado da massa, por bactérias do fermento, de forma que o soro gerado é ácido, com acidez titulável entre 0,35 e 0,44% (LEITE, 2006).

No soro doce encontram-se em torno de 50% dos sólidos inicialmente presentes no leite, e sua composição média é de 6,6% de sólidos totais, 0,8% de proteínas, 5,0% de lactose, 0,7% de cinzas, 0,3% de gordura. A fração proteica contém cerca de 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactoalbumina e 25% de outras frações proteicas como imunoglobulinas. Essas proteínas são de alto valor nutricional, sendo utilizadas na produção de enzimas, anticorpos e outras substâncias. As principais funções biológicas das proteínas do soro do leite bovino incluem: reparação celular, construção e reparação de músculos e ossos, geram energia, essencial para quem pratica atividades físicas, além de outros benefícios que estão ligados a processos metabólicos do corpo, como atividade imunoestimulante, proteção ao sistema cardiovascular e atividade antimicrobiana e antiviral (VENTURINI FILHO, 2010; ALMEIDA *et al.*, 2013). Na Tabela 1 é apresentada uma comparação entre a composição média do soro doce e do leite de vaca.

Tabela 1 – Composição média do soro doce e do leite de vaca

Constituintes	Soro doce (% m/v)	Leite (% m/v)
Água	93 – 94	87
Lactose	4,5 – 5,0	4,8

Proteínas	0,8 – 1,0	3,5
Sais minerais	0,5 – 0,7	0,7
Lipídeos	0,3 – 0,5	4

Fonte: Leite, 2006 ; Ordóñez *et al*, 2007

Os sais minerais são os mesmos presentes no leite, destacando-se os sais de sódio e potássio, que representam a metade do total. O restante é formado por sais de cálcio, magnésio e fósforo. Há também ácido láctico, ácido cítrico, compostos nitrogenados não protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (LEITE, 2006).

Antigamente o soro era apenas usado para o consumo humano, ração animal ou eliminado como efluente líquido sendo lançado nos cursos d'água sem nenhum tratamento prévio, por se tratar de um subproduto de baixo valor econômico. Até o ano de 1995, metade do soro produzido em todo o mundo ainda era descartado como um efluente, tornando o soro um sério problema ambiental, por causa do alto teor de matéria orgânica e grande volume descartado (VENTURINI FILHO, 2010).

O excedente de soro é um problema para indústrias de laticínios, principalmente as de pequeno e médio porte, pelo custo elevado do tratamento. Por isso, algumas descartam o soro diretamente na rede pública, rios e lagos. Porém o poder poluente do soro é aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Se lançado em cursos d'água reduz a vida aquática, devido à demanda bioquímica de oxigênio (30.000 mg a 50.000 mg DQO/mL de soro) e, se descartado no solo, compromete a estrutura físico-química, diminuindo o rendimento da colheita (SIQUEIRA *et al.*, 2013).

Para atender às legislações ambientais, as indústrias têm buscado alternativas para a sua utilização ao invés do descarte. No Brasil soro sem processamento é muito utilizado por produtores rurais na alimentação de bovinos e suínos. Essa é uma destinação do soro de reduzido impacto ambiental, e de grande valor nutricional para os animais. Porém, explora pouco a potencialidade encontrada no soro. O soro também pode ser utilizado como fertilizante. Porém com o passar do tempo, grandes depósitos de sais podem ocorrer, reduzindo a fertilidade das terras. E tendo também o risco de agentes

patogênicos que podem se desenvolver no soro antes do lançamento ao solo (LEITE, 2006).

O soro também pode ser comercializado em pó, bastante utilizado na indústria alimentícia. O soro passa por um processo de evaporação à vácuo, é concentrado formando uma solução supersaturada de lactose e depois é cristalizado e seco no *spray dryer*. As maiores aplicações são nos setores de panificação, bebidas lácteas, produtos para alimentação infantil e confeitos. O soro ácido em pó é utilizado apenas para conferir sabor azedo em produtos de panificação. A lactose cristalizada obtida a partir do soro é utilizada em bebidas para alimentação infantil, na produção do adoçante lactitol e como excipiente em formulações farmacêuticas. As proteínas contidas no soro, também podem ser separadas por ultrafiltração e utilizadas como suplemento alimentar e como matéria-prima para a fabricação de produtos nutricionais (LEITE, 2006).

Existem diversos trabalhos para desenvolvimento de bebidas lácteas fermentadas aproveitando o soro de queijo e variando sua concentração no produto. Porém, até o momento, há poucos relatos da substituição total da água por soro na formulação da bebida láctea fermentada, mantendo-se a concentração de leite constante no preparo da bebida. Barana *et al.* (2012) desenvolveram bebidas lácteas fermentadas substituindo o volume de água no preparado de frutas por soro ácido. Após a fermentação, o preparado de frutas com soro foi adicionado à bebida láctea na proporção 1:3 (v/v), respectivamente e o produto apresentou boa aceitação sensorial.

4.3. Probióticos

Probióticos são micro-organismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, afetam de forma benéfica o desenvolvimento da microbiota do intestino. O termo “probiótico” é de origem grega e significa “para a vida”. Podem ser utilizados para prevenir as infecções entéricas e gastrointestinais (BRANDÃO, 2007).

Os micro-organismos probióticos são, na maioria, bactérias lácticas, as quais favorecem o produto alimentício ao qual foram adicionados para determinados fins e exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Essas bactérias

fermentam a lactose, produzindo ácido láctico, tendo a capacidade de se manter vivas no produto final e de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, fixando-se no intestino e trazendo benefícios para a microbiota dos consumidores. Encontram-se distribuídas em regiões específicas do trato intestinal, que tenham disponibilidade de nutrientes, potencial hidrogeniônico, potencial redox e fatores químicos e físicos. Para garantir um melhor e duradouro efeito no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (SILVA, 2007 ; BRANDÃO, 2007).

Em um intestino saudável, a microbiota predominante se compõe de micro-organismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os *Lactobacillus* geralmente citados como probióticos são: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellibiosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus reuteri*. As espécies de bifidobacteria com atividade probiótica são: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium thermophilum* e *Bifidobacterium animalis*. Outras bactérias ácido-láticas com propriedades probióticas são: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Sporolactobacillus inulinus*, enquanto os micro-organismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* Nissle, *Propionibacterium freudenreichii* e *Saccharomyces cerevisiae* têm sido citados como micro-organismos não lácticos associados à atividades probióticas principalmente para uso farmacêutico ou em animais. (MORAES ; COLLA, 2006)

Alguns dos benefícios dos probióticos à saúde do hospedeiro são: controle da microbiota intestinal e estabilização da mesma após o uso de antibióticos, aumento da resistência gastrintestinal à colonização por micro-organismos patógenos; diminuição da população de patógenos por causa da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos, auxílio na digestão da lactose em indivíduos intolerantes, estimulação do sistema imune, alívio da constipação; melhora da absorção de minerais e estímulo à produção de vitaminas (SAAD, 2006).

Alguns critérios para a seleção de micro-organismos probióticos para uso em alimentos são: serem de origem humana, não serem patogênicos, apresentarem tolerância ao trato gastrointestinal, terem habilidade de sobreviver aos processos tecnológicos, permanecerem viáveis durante a vida-de-prateleira e possuírem os benefícios à saúde comprovados.

(MORAES ; COLLA, 2006)

Os probióticos são definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, gerando efeitos benéficos à saúde do indivíduo. A quantidade mínima viável de probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (BRASIL, 2002). Os probióticos reconhecidos pela ANVISA estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Probióticos reconhecidos pela ANVISA

Probióticos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
<i>Lactobacillus casei variedade rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei variedade defenss</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)
<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Enterococcus faecium</i>

Fonte: ANVISA, 2015

Lactobacillus helveticus é uma bactéria produtora de ácido láctico utilizada na produção de diversos queijos, incluindo mussarela, cheddar e parmesão. Esta bactéria ajuda a realçar o sabor dos queijos e pode reduzir ou evitar a amargura. Também pode ser encontrada em certos tipos de leite

fermentado e na forma de suplemento dietético. *L. helveticus* é uma bactéria benéfica que pode ajudar a reduzir ou impedir o crescimento de bactérias patogênicas no interior do corpo e assim melhorar a saúde geral de um indivíduo. (PROBIOTIC, 2015).

L. helveticus não é reconhecido pela ANVISA como uma bactéria probiótica, porém seus esferitos têm sido estudados e vários efeitos positivos têm sido relatados. Strahinic *et al.* (2013) estudaram as principais características *L. helveticus* isolado do intestino humano. Nesse estudo observou-se crescimento ótimo do micro-organismo entre 37 e 42 °C em leite desnatado. Em condições ótimas, suas proteínas hidrolisam completamente todas as três frações de caseína. Além disso, suas células são capazes de hidrolisar a β -lactoglobulina e reduzir a sua alergenicidade, contribuindo assim para uma melhor digestibilidade, especialmente em pessoas alérgicas ao leite de vaca.

Strahinic *et al.* (2013) ainda testaram a capacidade de crescimento do *L. helveticus* em leite desnatado reconstituído, leite de vaca integral comercial UHT, e leite de cabra. No final de uma fermentação de 4 h a 42 °C, os valores de pH variaram entre 4,35 e 4,69, dependendo do leite. A maior acidez obtida foi no leite de vaca integral.

Yang *et al.* (2010) produziram um iogurte probiótico preparado a partir de extrato de soja germinada no qual utilizaram as bactérias *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. O produto teve boa aceitação sensorial com pH variando em 3,9 – 3,94 e acidez titulável entre 0,75 e 0,80%.

4.4. Fermentação

Fermentação pode ser definida como um processo no qual transformações químicas são realizadas em um substrato orgânico pela ação de enzimas produzidas por micro-organismos. Bioquimicamente, a fermentação é o processo metabólico no qual carboidratos e outros compostos são parcialmente oxidados, resultando em liberação de energia, sem qualquer aceptor de elétrons externo. Os aceptores finais de elétrons são compostos orgânicos produzidos diretamente da quebra de carboidratos. Como ocorre oxidação

incompleta do composto original, é liberada apenas uma pequena quantidade de energia durante o processo (JAY, 2005).

As bactérias ácido-láticas são caracterizadas por produzir ácido láctico a partir de hexoses. Sendo organismos fermentadores, faltam neles sistemas de transporte de elétrons ou de citocromos e não possuem o ciclo de Krebs (JAY, 2005).

As culturas lácteas starter são essenciais na indústria de laticínios para que haja a produção de ácido láctico. São bactérias que convertem lactose em ácido láctico, e são formadas por uma ou várias linhagens. Uma boa cultura láctica pode converter quase toda a lactose em ácido láctico. Para o preparo da bebida láctea fermentada é normalmente utilizado cultura starter mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subespécie *bulgaricus* em uma proporção 1:1 (JAY, 2005).

Streptococcus thermophilus e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* exibem uma relação simbiótica na fermentação, isto é, são mais eficientes, gerando mais ácido na forma de cultura mista do que ao serem utilizados isolados. Durante a fermentação, o *S. thermophilus* cresce rapidamente, utilizando os aminoácidos essenciais produzidos pelo *Lactobacillus bulgaricus*. Com isso o *S. thermophilus* produz ácido láctico e pequenas quantidades de ácido fórmico, o qual reduz o pH do meio, chegando a um nível ótimo de crescimento do *Lactobacillus bulgaricus*, acelerando o seu crescimento (VENTURINI FILHO, 2010).

Com a conversão da lactose em ácido láctico pelas bactérias, e consequentemente diminuição do pH, a caseína se torna insolúvel e o leite mais viscoso. A produção gradual de ácido láctico começa por desestabilizar os complexos de caseína (proteínas do soro desnaturadas, por solubilização do fosfato de cálcio e dos citratos). Os agregados das micelas de caseína vão se associando e coalescem parcialmente à medida que o valor de pH se aproxima do ponto isoelétrico, ou seja, 4,6 a 4,7 (VENTURINI FILHO, 2010).

Para uma boa fermentação do leite, as culturas devem ser resistentes à degradação, apresentar poder acidificante, capacidade de desenvolvimento em

simbiose e de produzirem substâncias responsáveis pela viscosidade, sabor e aroma do produto (VENTURINI FILHO, 2010).

A otimização do processo é desejável para a redução do tempo de fermentação e aumento do produto de interesse. O tempo de fermentação é uma característica importante do processo industrial, pois limita o período necessário para a obtenção do produto final, ou seja, sendo um fator limitante desse processo. A temperatura de fermentação e a concentração de micro-organismos constituem-se nos fatores que geralmente são alterados para reduzir esse tempo, sendo muito desejável, desde que mantenha a qualidade do produto final (CARVALHO *et al.* 2011).

5. Material e Métodos

O produto foi desenvolvido no Laboratório Biotecnológico e as análises foram realizadas no Laboratório Biotecnológico e no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de São João Del Rei – Campus Alto Paraopeba. O teste para determinação de gordura na bebida láctea produzida foi realizado no laboratório físico-químico do Laticínio Lara – Menininha do Campo® em Conselheiro Lafaiete.

As matérias-primas que foram utilizadas na composição do substrato para fermentação são: leite em pó integral (Integraly®) e soro de queijo mussarela (cedido pelo Laticínio Lara – Menininha do Campo®).

O soro de queijo utilizado na produção das bebidas é da produção de queijo tipo mussarela onde se utilizou a bactéria láctica *Streptococcus thermophilus* e as enzimas quimosinas para coagulação das proteínas do leite, o soro foi recolhido diretamente após a dessora da coalhada. Foi transportado em garrafas pets do laticínio em Conselheiro Lafaiete até o Campus Alto Paraopeba em Ouro Branco e armazenado por 15 horas em geladeira a 4°C para realização das bebidas. Já o leite em pó utilizado tem em sua composição emulsificante lecitina de soja.

Para fermentação do leite foram utilizadas duas culturas mistas comerciais para uso direto, uma composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus*

bulgaricus e outra composta por *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Lactobacillus helveticus* (Biotec Fermenti[®]).

5.1. Preparo da Bebida Láctea Fermentada

Antes de iniciar o processo de produção da bebida fermentada, foi feita a limpeza dos materiais e utensílios utilizados com detergente líquido e enxágue com água corrente.

O experimento foi realizado em três repetições. Em cada uma delas, foram preparados 3 tratamentos

Tratamento 1: leite em pó reconstituído em água adicionado das culturas *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

Tratamento 2: leite em pó reconstituído em soro de leite adicionado das culturas *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

Tratamento 3: leite em pó reconstituído em soro de leite, adicionado das culturas *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus helveticus*. Em todos os tratamentos foram utilizadas 10% (m/v) de leite em pó integral em relação à água ou soro (quantidade indicada pelo fabricante para reconstituição em água).

Antes da adição das culturas, o leite reconstituído foi submetido ao processo de pasteurização. Os tratamentos, colocados em frascos do tipo bequer, foram levadas ao banho-maria (HydroSan) e após atingirem a temperatura de 90°C permaneceram no banho por 5 minutos. Após o tempo foram rapidamente resfriadas em banho de gelo até a temperatura de 42°C. Em seguida procedeu-se a adição das culturas lácteas na quantidade indicada pelo fabricante (0,018%).

Os 3 tratamentos foram incubadas em estufa bacteriológica (Solab) a 42°C. Em 30 em 30 minutos foi retirado uma alíquota dos tratamentos e levado ao pHmetro para medir o pH, isto foi feito até redução do pH a valores próximos a 4,6. Ao chegar próximo a esse valor de pH, a fermentação foi interrompida e as amostras resfriadas em banho de gelo até a temperatura de 20°C. Foram adicionados 6% de açúcar. As amostras foram mantidas em

geladeira a 4°C por 20 horas para a realização dos testes físico-químicos. O experimento foi realizado em triplicata.

5.2. Testes Físico-Químicos

Os tratamentos de cada repetição foram avaliadas com relação a suas características físico-químicas. Os testes foram realizados no dia posterior à fabricação.

O pH dos tratamentos foi determinado em potenciômetro digital (DM-22/DIGIMED), devidamente calibrado. As medidas de pH também foram feitas a cada 30 minutos durante todo o período de fermentação.

A determinação da acidez total foi realizada medindo o teor de ácido láctico presente em 10g de amostra dos tratamentos por titulação com NaOH 0,1 mol.L⁻¹ na presença de fenolftaleína como indicador.

A viscosidade foi determinada cronometrando o tempo de escoamento de 9 mL da amostra dos tratamentos em pipeta de 10 mL. Técnica utilizada na aula de microbiologia indústria do curso de Engenharia de Bioprocessos na Universidade Federal de São João Del Rei.

Para determinar o teor de gordura foi utilizado o método butirômetro. Foram adicionados 10mL de ácido sulfúrico, 11mL da amostra dos tratamentos e 1 mL de álcool isoamílico em um butirômetro de leite fluido e centrifugado (V6500/SmithKline Beecham) por 5 minutos a 1200 rpm. O ácido quebra as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido à liberação do calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo solvente, o álcool isoamílico (CASTANHEIRA, 2010).

Para dosagem de proteínas, uma amostra de 5 mL dos tratamentos foram submetidas ao método de Lowry. Esse método utiliza como principal reagente colorimétrico o Folin Ciocalteau, que em meio alcalino, sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença de cobre, produzindo um complexo azulado com absorção máxima em 750 nm. Quanto mais intensa é a coloração, maior é a concentração de proteínas na amostra (ZAIA *et al.*, 1998). Foi

utilizado uma solução padrão de albumina para realizar os cálculos e determinar a quantidade de proteína total nas amostras.

5.3. Análises estatísticas

Os resultados dos testes físico-químicos realizados na bebida após fermentação foram submetidos à análise de variância e teste de médias (teste de Tukey) utilizando o Excel.

6. Resultados

De modo geral, as formulações apresentaram um bom desenvolvimento da fermentação durante a incubação, atingindo pH de parada em um período de tempo que variou de 4 horas a 6 horas.

Na Figura 1 encontram-se as curvas com os valores de pH das amostras medidos ao longo do tempo de fermentação. Percebe-se que as amostras nas quais foi feita a reconstituição do leite em pó com soro (amostras 2 e 3) apresentaram tempo de fermentação menor e acidificação mais rápida, provavelmente pela presença de maior quantidade de substrato para as bactérias. O soro tem alta quantidade de lactose (próxima à do leite), dessa forma, com a soma da lactose do leite e do soro tem-se o dobro de lactose do que na amostra onde o leite em pó foi reconstituído somente com água.

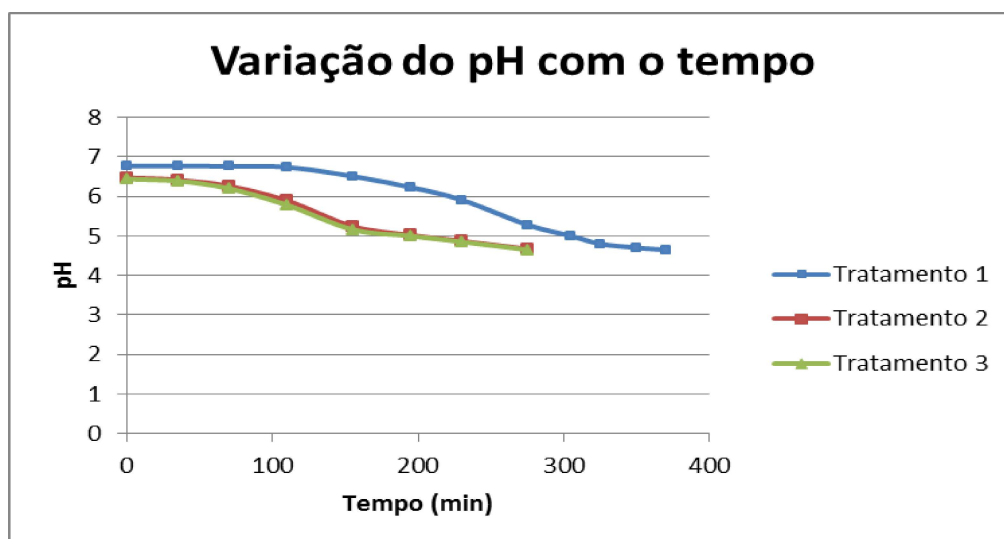


Figura 1 - Variação do pH com o tempo

É importante estudar a cinética da fermentação para determinar os fatores que influenciam no tempo das reações e assim poder otimizar o processo. Observa-se que a quantidade maior de substrato modificou a cinética de fermentação das bactérias lácticas, ou seja, reduziu consideravelmente o tempo de fermentação da bebida. Sendo o tempo de fermentação um fator limitante desse processo, pois limita o período necessário para a obtenção do produto final.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas na bebida láctea após a fermentação: acidez titulável, medida de viscosidade, teor de gordura e proteínas. Além do pH no qual foi interrompida a fermentação e o tempo necessário para atingi-lo.

Tabela 3– Média e desvio padrão dos resultados dos testes físico-químicos dos tratamentos e do tempo de fermentação

Parâmetros analisados	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3
Tempo de fermentação (h)	6,27 ($\pm 0,25$) ^a	4,10 ($\pm 0,29$) ^b	4,10 ($\pm 0,29$) ^b
pH de parada	4,59 ($\pm 0,06$) ^a	4,61 ($\pm 0,06$) ^a	4,66 ($\pm 0,05$) ^a
Acidez (%)	0,47 ($\pm 0,06$) ^a	0,64 ($\pm 0,06$) ^b	0,67 ($\pm 0,03$) ^b
Viscosidade (s)	41,14 ($\pm 1,94$) ^a	20,86 ($\pm 1,11$) ^b	19,66 ($\pm 1,65$) ^b
Gordura (%)	2,17 ($\pm 0,25$) ^a	2,67 ($\pm 0,05$) ^b	2,63 ($\pm 0,05$) ^b
Proteínas (g/L)	8,55 ($\pm 0,51$) ^a	18,61 ($\pm 1,96$) ^b	18,59 ($\pm 1,81$) ^b

Os valores apresentados são as médias dos parâmetros avaliados. Na mesma linha, letras diferentes minúsculas sobrescritas indicam as diferenças ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Em todos os parâmetros testados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey houve diferença significativa entre o tratamento com leite em pó reconstituída com água e os tratamentos reconstituídas com soro ($p < 0,05$),

exceto para o pH de parada. Isso já era esperado já que se procurou parar a fermentação no mesmo ponto para todos os tratamentos.

Com relação à acidez titulável, observa-se que o tratamento 1 apresentou menor valor, o que indica que houve uma menor transformação de lactose em ácido láctico, muito provavelmente pelo fato que este tratamento apresentava menor quantidade de lactose. Os tratamentos preparados com soro não apresentaram diferença significativa entre elas em relação a esse parâmetro.

Barana *et al.* (2012) desenvolveram bebidas lácteas fermentadas onde substituíram a água por soro ácido no preparado de fruta e também verificaram que a acidez titulável aumentou nos tratamentos com soro nas suas formulações. A acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados. O ácido láctico produzido atua como conservante natural além de tornar os componentes do leite mais digeríveis. Entretanto, acidez superior a 1,2% pode resultar em produtos com sabor ácido desagradável, comprometendo sua aceitação (SILVEIRA, 2009).

Os tratamentos preparados com soro também apresentaram teor de lipídios significativamente superiores às preparadas com água. Este resultado é coerente, uma vez que o soro contém uma pequena porcentagem de lipídios.

Observa-se que nas amostras com soro houve um acréscimo significativo na quantidade de proteínas em relação às amostras preparadas com água. Os dados encontrados eram esperados, já que 20% das proteínas do leite estão no soro, e confirmam uma melhoria no valor nutricional da bebida fermentada.

As proteínas do soro são de alto valor nutricional, e tem sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos, em razão da descoberta do elevado valor biológico de seus peptídeos, fonte de aminoácidos essenciais, os quais os seres humanos não são capazes de sintetizar. Essa bebida de elevado valor nutricional pode ser interessante para o público infantil, pois uma das funções biológicas dessas proteínas é o auxílio na construção de músculos e ossos e na geração de energia (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Amatayakul *et al.* (2006) desenvolveram bebidas lácteas variando a concentração de leite com a de soro, e observaram que a diminuição da concentração do leite e aumento da de soro houve diminuição da viscosidade. E concluíram que o aumento da quantidade de proteínas do soro na fabricação de iogurtes de bandeja levou à redução da firmeza do gel protéico, associada à redução das ligações tridimensionais da malha do gel causada pela menor quantidade de caseína. Porém no trabalho atual não se variou a concentração de leite, ou seja, a quantidade de caseína não é menor nas amostras reconstituídas com soro. Pode ser que a que a redução da firmeza do gel protéico, neste caso, está associada somente ao aumento da quantidade de proteínas do soro ou a algum outro elemento presente no soro, que reduz essa viscosidade.

O tratamento 3, preparada com soro e fermentada com *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* não apresentou diferença significativa nos parâmetros analisados em relação ao tratamento preparado com soro e fermentada apenas com as cepas convencionais (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). É possível concluir que a presença do *Lactobacillus helveticus* não alterou as características físico-químicas da bebida láctea. Tal fato contribui para sua possível utilização como probiótico, uma vez que o desejável é que o micro-organismo permaneça viável no produto, sem alterá-lo.

7. Conclusão

As bebidas lácteas onde o leite em pó foi reconstituído com soro apresentaram tempo menor de fermentação, maior acidez, maiores porcentagem de gordura, menor viscosidade e maior quantidade de proteínas quando comparadas às bebidas preparadas com leite em pó reconstituído com água. A adição do *Lactobacillus helveticus* não promoveu diferença significativa entre os tratamentos.

Dessa forma, conclui-se que a adição do soro em substituição à água no preparado das bebidas lácteas promoveu resultados positivos. Pois aumentou o valor nutricional da bebida trazendo benefícios ao consumidor. Além de

benefícios ao laticínio, pois além de dar utilidade ao subproduto reduziu consideravelmente o tempo de fermentação da bebida.

Seria interessante realizar trabalhos futuros com análises sensoriais para verificar se a substituição da água por soro e a adição do *Lactobacillus helveticus* afetam na aceitabilidade do produto. Verificar a viabilidade do *Lactobacillus helveticus* durante a vida de prateleira do produto e também verificar a acidez dos tratamentos ao longo do tempo. Além do teste de separação do soro.

8. Referencias Bibliográficas

ALMEIDA, C. C. ; CONTE-JUNIOR, C.A. ; SILVA, A. C. O. ; ÁLVARES, T.S. Proteína do soro do leite: composição e suas propriedades funcionais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 1840-1854, 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas> Disponível em: <http://anvisa.gov.br> . Acesso em: 19 abr 2015.

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. Physical characteristics of set yoghurt made with altered casein to whey protein ratios and EPS-producing starter cultures at 9 and 14% total solids. **Food Hydrocoll.**, v.20, p.314-324, 2006.

BARANA, A. C.; LIMA, R. C.; BOTELHOS, V. B.; SIMÕES, D. R. Desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada feita com soro ácido de queijo quark. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, p.13-21, 2012.

BRANDÃO, W. A. P. L. N. T. M. **Elaboração de bebida fermentada simbiótica de soro lácteo**. 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis-SC, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrumentação Normativa 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 de agosto de 2005. Seção 1, p7.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrumentação Normativa 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 de outubro de 2007. Seção 1, p4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília, 2002.

CARVALHO, D. S. ; ZAMBIAZI, Rui C . Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentos e Nutrição** , v. 22, p. 351-357, 2011.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Manual Básico de Controle de Qualidade de Leite e Derivados**. 1ª Ed. Cap-Lab Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, 2010.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.29, n.1.p103-116, Março 2008.

CHAGAS L .M. **Influência de *Streptococcus thermophilus* produtor de exopolissacarídeos em iogurte natural com baixo teor de lactose**. 2012.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) - Universidade Norte do Paraná, Paraná, 2012

JAY, James M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2005.

LEITE, M. T. **Otimização da produção de ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

MORAES, F. P.; COLLA, F. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.

ORDÓÑEZ, J. A; RODRIGUEZ, M. I. C; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLON, G. D. G. F.; PERALES, L. DE LA H. P.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos** – Alimentos de origem animal. Editora Artmed, Vol. 2. São Paulo, 2007

PROBIOTIC. Disponível em: <http://www.probiotic.org/lactobacillus-helveticus.htm>. Acesso em: 17 abr 2015.

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

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

SILVEIRA, N.D.P. **O emprego da metodologia de superfície de resposta no desenvolvimento de um novo produto simbiótico, fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp. *Jugurti* CRL 416 à base de extratos aquosos de soja e de yacon (*Smallantus sonchifolia*)**. 2009. 133f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) –

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2009.

SIQUEIRA, A. M. O.; MACHADO, E. C. L.; STAMFORD, T. L. M. Bebidas lácteas com soro de queijo e frutas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, p. 1693-1700, 2013.

STRAHINIC I.; LOZO J.; TERZIC-VIDOJEVIC A., FIRA D.; KOJIC M.; GOLIC N.; BEGOVIC J.; TOPISIROVIC L. Technological and probiotic potential of BGRA43, a natural isolate of *Lactobacillus helveticus*. **Front. Microbiol**, 2013.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas não alcoólicas**: Ciência e Tecnologia, vol. 2 – Editora Blucher, 2010.

YANG, M. and LI, L. Physicochemical, textural and sensory characteristics of probiotic soy yogurt prepared from germinated soybean. **Food Technol. Biotechnol.** 48; 490–496, 2010.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos Métodos existentes. **Revista Química Nova**, v. 21, n. 6, p.787-793, junho de 1998.