

# PRODUÇÃO DE UM IOGURTE PROBIÓTICO: ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ORGANOLÉTICAS

Dissertação de Mestrado

Tanisha Marie Santos Sousa

Mestrado em

**TECNOLOGIA E SEGURANÇA  
ALIMENTAR**



# PRODUÇÃO DE UM IOGURTE PROBIÓTICO: ESTUDO DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS E ORGANOLÉTICAS

Dissertação de Mestrado

Tanisha Marie Santos Sousa

## Orientador

Professora Doutora Célia Costa Gomes da Silva

Dissertação de Mestrado submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em  
Tecnologia e Segurança Alimentar



## **AGRADECIMENTOS**

Na realização desta dissertação, gostaria de expressar o meu reconhecimento a todos aqueles que de alguma forma, contribuíram para a realização da mesma. Em especial quero agradecer:

À minha orientadora Doutora Célia Silva pela orientação, paciência, ensinamentos e dedicação prestada ao longo deste trabalho.

À Marina Lopes pela disponibilidade e ajuda no trabalho prático.

Ao Senhor Paulo Caetano pela sua disponibilidade de entregar o leite para o fabrico dos iogurtes.

Ao IITAA - Instituto de Investigação e Tecnologia Agrária e do Ambiente pelo apoio recebido para aquisição dos reagentes e à Chegalvorada pelo fornecimento do leite.

Às técnicas de laboratório, Berta Borges e Guida Pires, pela disponibilidade e ajuda na parte prática.

À minha grande amiga Mariana Teixeira, por todos os momentos partilhados de amizade e entreaajuda ao longo destes anos.

À minha afilhada Joana Fonseca pela boa disposição, ajuda e amizade.

À Dona Fernanda, pela amizade, pelo apoio prestado e ajuda ao longo destes anos.

À Engenheira Valentina, pelas palavras de motivação e por toda a força positiva que consegue transmitir.

À Fátima Carreira e à Fátima Pimentel, pelos conselhos, pela ajuda e pelas palavras de motivação.

Aos meus pais, Manuela e Carlos, pilares da minha vida, pelo amor, pelo apoio incondicional e pela educação que me deram, dotada de perseverança, ambição, independência e motivação.

Ao David, meu namorado, pelo amor, paciência, incentivo e compreensão ao longo deste trabalho.

À restante família, que me voltou a acompanhar em mais uma etapa importante na minha vida, pelo apoio e pelas palavras de motivação.

A todos os meus amigos, colegas, familiares e professores, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste estudo, o meu profundo e sincero agradecimento pela amizade, palavras e energia positiva.

## RESUMO

A inclusão de bactérias benéficas em alimentos probióticos, tem sido alvo de interesse por parte das indústrias em geral, em virtude da preocupação crescente da população por uma alimentação e estilo de vida saudáveis. A estirpe *Leuconostoc citreum* L3C1E7 foi isolada de um queijo artesanal da ilha do Pico, tendo demonstrado algumas propriedades probióticas em estudos anteriores. Para além de produzir um exopolissacárido (EPS), foi também demonstrado que a ingestão desta bactéria produz um efeito benéfico no sistema imunitário em animais. Esta estirpe tem assim uma enorme potencialidade para ser utilizada num alimento probiótico. No presente trabalho, foi escolhido o iogurte para testar a aplicação desta estirpe probiótica, uma vez que a produção de EPS poderá trazer vantagens funcionais a este tipo de alimento. Desta forma, pretende-se avaliar as propriedades funcionais e organoléticas de um iogurte probiótico produzido com a incorporação desta estirpe de L3C1E7. Para este estudo, foram produzidos vários iogurtes com diferentes concentrações de sacarose (0%, 2%, 5% e 10%), de modo a poder avaliar a melhor concentração para maximizar a produção de EPS e as propriedades organoléticas do produto final. Foram avaliados vários parâmetros físico-químicos, que incluíram o pH, a acidez titulável, a sinérese com base em dois métodos (método de corte e a capacidade de retenção da água), a viscosidade, a tensão superficial, os açúcares totais e os açúcares redutores. Foi ainda realizada uma análise sensorial com um painel de 35 provadores não treinados. Não se observaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em alguns dos parâmetros avaliados, nomeadamente no pH, na acidez titulável, na sinérese e na presença de açúcares redutores, em ambos os iogurtes produzidos. No entanto, a adição da estirpe L3C1E7 resultou num aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da viscosidade nos iogurtes produzidos com sacarose. A viscosidade também aumentou com o tempo de armazenamento a 4°C (6 dias) como resultado provável da produção de EPS pela bactéria L3C1E7. A concentração de 5% de sacarose foi a escolhida para a realização das provas organoléticas. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os iogurtes com e sem a incorporação da estirpe L3C1E7, nos vários parâmetros avaliados (aroma, acidez, doçura, consistência e impressão geral), observou-se uma tendência para os consumidores preferirem os iogurtes com a presença da estirpe probiótica. Podemos assim concluir que a estirpe L3C1E7 apresenta um enorme potencial para ser utilizada no fabrico de um iogurte probiótico.

**Palavras-chave:** probiótico; EPS; concentração.

## ABSTRACT

The inclusion of probiotic bacteria in certain types of food has been of interest to industries in general, as the population is increasingly concerned about health and a healthier lifestyle. The strain *Leuconostoc citreum* L3C1E7 was isolated from an artisanal cheese of Pico Island, having shown some probiotic properties in previous studies. In addition to producing an exopolysaccharide (EPS), it was also shown that the intake of this bacterium produces a beneficial effect on the immune system in animals. Consequently, this strain has a huge potential to be used in a probiotic food. In this work, yogurt was chosen to test the application of this probiotic strain, since EPS production may bring functional benefits to this type of food. Therefore, the objective of this study was to evaluate how this L3C1E7 strain influences the functional and sensorial properties of a probiotic yogurt. For this study, several yoghurts were produced with different concentrations of sucrose (0%, 2%, 5% and 10%), in order to maximize the production of EPS and the sensory attributes of the final product. We evaluated several physico-chemical parameters, including pH, titratable acidity, syneresis based on two methods (cutting method and the water holding capacity), viscosity, surface tension, the total sugar and reducing sugars. Sensory analysis was also performed with a panel of 35 untrained tasters. No significant differences were observed ( $P > 0.05$ ) in some of the evaluated parameters, including pH, titratable acidity, syneresis and reducing sugars contents of both yogurts produced. However, the addition of L3C1E7 strain resulted in a significant increase ( $P < 0.05$ ) of viscosity in yoghurts produced with sucrose. Viscosity also increased with storage time at 4 °C (for 6 days), possibly as a result of the production of EPS by the bacteria L3C1E7. The concentration of 5% sucrose was chosen to carry out the sensory analysis. Although the yogurts with and without the incorporation of the strain L3C1E7, did not significantly differ ( $P > 0.05$ ) in the parameters evaluated (aroma, acidity, sweetness, consistency and overall impression), there was a tendency for the consumers to prefer the yoghurts with the probiotic strain. We can thus conclude that the strain L3C1E7 presents a huge potential for application in the manufacture of a probiotic yogurt.

**Key words:** probiotic; EPS; concentration.

## LISTA DE ABREVIATURAS

° D- Graus Dornic

BAL- Bactérias do ácido láctico

CH-1- Culturas lácticas

CRA- Capacidade de retenção de água

DNS- Ácido 3.5 dinitrosalicílico

EPS- Exopolissacárido

FAO- Food and Agriculture Organization

hab- habitantes

Lb.- *Lactobacillus*

L3C1E7- *Leuconostoc citreum*

M- Molar

MRS- Man Rogosa Agar

nm- Nanómetro

OMS- Organização Mundial de Saúde

rpm- Rotações por minuto

S.- *Streptococcus*

TCA- ácido tricloroacético

UFC- Unidades formadoras de colónias

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	3
RESUMO .....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE QUADROS .....	13
<b>Capítulo I</b> .....	14
1. INTRODUÇÃO .....	14
<b>Capítulo II</b> .....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 O Iogurte.....	17
2.1.1 - História .....	17
2.1.2 - Consumo de iogurtes em Portugal Continental .....	18
2.1.3 - Definição.....	19
2.1.4 - Tipos de iogurte .....	19
2.1.5 - Etapas do processo tradicional do fabrico de um iogurte .....	22
2.1.6 - Composição, valor nutricional e terapêutico .....	26
2.2 Bactérias do ácido láctico (BAL) .....	29
2.2.1 – BAL utilizadas nos iogurtes .....	29
2.2.2 – O <i>Leuconostoc citreum</i> .....	30
2.3 Probióticos.....	32
2.4 Exopolissacáridos (EPS).....	36
2.4.1 - Aplicação de exopolissacáridos nos produtos lácteos .....	39
<b>Capítulo III</b> .....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	41



3.1	Matéria-prima .....	41
3.2	Preparação das culturas bacterianas.....	41
3.3	Ensaio experimental - preparação dos iogurtes .....	42
3.4	Caracterização físico-química .....	44
3.4.1	Valor de pH.....	44
3.4.2	Acidez Titulável.....	44
3.4.3	Sinérese.....	45
3.4.3.1	- Método de Corte .....	45
3.4.3.2	- Método de Centrifugação .....	45
3.4.4	Viscosidade.....	46
3.4.5	Tensão Superficial .....	46
3.4.6	Determinação dos Açúcares Totais e Açúcares Redutores.....	46
3.4.6.1	- Preparação da amostra .....	46
3.4.6.2	- Açúcares Totais.....	47
3.4.6.3	- Açúcares Redutores .....	48
3.5	Análise sensorial.....	49
3.6	Análise estatística .....	52
<b>Capítulo IV</b>	.....	<b>53</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	.....	<b>53</b>
4.1	Valor de pH.....	53
4.2	Acidez titulável.....	55
4.3	Sinérese.....	56
4.4	Viscosidade.....	58
4.5	Tensão superficial.....	60
4.6	Açúcares totais e açúcares redutores .....	61
4.7	Análise sensorial.....	63
<b>Capítulo V</b>	.....	<b>65</b>

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
7. Anexos .....	77
7.1 Resultado da análise estatística (SPSS) – Análises químicas .....	77
7.2 Resultado da análise estatística (SPSS) – Análise sensorial .....	97

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Evolução do consumo de leite e os seus derivados (Adaptado de: INE, 2015) .....	18
<b>Figura 2:</b> Processo de fabricação dos diferentes tipos de iogurte (Adaptado de: Lee <i>et al.</i> , 2010) .....	22
<b>Figura 3:</b> Curva de desenvolvimento simbiótico da cultura láctica durante a fermentação do iogurte (Adaptado de: Silva <i>et al.</i> , 2010).....	30
<b>Figura 4:</b> Efeitos benéficos decorrentes do consumo de produtos lácteos fermentados (Adaptado de: Linares <i>et al.</i> , 2017) .....	33
<b>Figura 5:</b> Diretrizes para a avaliação de probióticos para uso alimentar (Adaptado de: Linares <i>et al.</i> , 2017) .....	34
<b>Figura 6:</b> Estruturas básicas de $\alpha$ -glucanos sintetizados por glucansucrases (Adaptado de: Leemhuis <i>et al.</i> , 2013) .....	38
<b>Figura 7:</b> Fluxograma do processo de desenvolvimento dos iogurtes com diferentes concentrações de sacarose.....	43
<b>Figura 8:</b> Curva de calibração do açúcar total. As concentrações de glucose são expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	48
<b>Figura 9:</b> Curva de calibração dos açúcares redutores. As concentrações de glucose são expressas em $\mu\text{g mL}^{-1}$ .....	49
<b>Figura 10:</b> Formulário utilizado na prova organolética .....	51
<b>Figura 11:</b> Valores médios de pH nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%).....	53
<b>Figura 12:</b> Valores médios da acidez titulável nas várias amostras de iogurtes com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de três amostras. ....	55
<b>Figura 13:</b> Valores médios de sinérese (%) nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de duas amostras.....	57
<b>Figura 14:</b> Valores médios de capacidade de retenção da água (%) nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). Diferentes letras correspondem as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias. As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de duas amostras.....	58

**Figura 15:** Valores médios da viscosidade (mPa.s) nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). O símbolo \* indica uma diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos iogurtes produzidos com a bactéria L3C1E7 em comparação com os iogurtes sem a bactéria. As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de duas amostras. ....59

**Figura 16:** Valores médios da viscosidade (mPa.s) medidos ao fim do 1º dia de refrigeração a 4 °C e ao fim do 6º dia nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). I0 – Iogurte sem sacarose; I0+L3C1E7 - Iogurte sem sacarose com L3C1E7; I2 – Iogurte com 2% de sacarose; I2+L3C1E7 - Iogurte com 2% de sacarose e com L3C1E7; I5 – Iogurte com 5% de sacarose; I5+L3C1E7 - Iogurte com 5% de sacarose e com L3C1E7; I10 – Iogurte com 10% de sacarose; I10+L3C1E7 - Iogurte com 10% de sacarose e com L3C1E7. ....60

**Figura 17:** Valores médios da tensão superficial nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). Diferentes letras correspondem as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias. As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de duas amostras. ....61

**Figura 18:** Valores médios dos Açúcares totais, Açúcares redutores com adição de invertase e Açúcares redutores, nas várias amostras de iogurtes, com diferentes concentrações de sacarose (0, 2, 5 e 10%). Diferentes letras maiúsculas correspondem as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos açúcares totais. Diferentes letras minúsculas correspondem as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos açúcares redutores com invertase. As barras de erro representam os valores do erro padrão da média de três amostras. ....62

**Figura 19:** Gráficos de extremos e quartis dos diferentes parâmetros avaliados na análise sensorial. Os parâmetros avaliados foram: A – Aroma, B – Sabor ácido, C – Sabor doce, D – Consistência, E – Apreciação geral. ....64

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Classificação dos iogurtes quanto ao teor de matéria gorda (Adaptado de: Portaria n.º742/92, Diário da República, 1992) .....	20
<b>Quadro 2:</b> Tipos de iogurte (Adaptado de: Portaria n.º742/92, Diário da República, 1992).	21
<b>Quadro 3:</b> Classificação dos iogurtes quanto à sua composição e aromatização (Adaptado de: Portaria n.º742/92).....	21
<b>Quadro 4:</b> Combinações tempo-temperatura para pasteurização do leite (Adaptado de: Modhu, 2016) .....	24
<b>Quadro 5:</b> Composição nutricional de diferentes variedades de iogurte (por 100 g) (Adaptado de: Weerathilake <i>et al.</i> , 2014) .....	26
<b>Quadro 6:</b> Algumas estirpes de bactérias do ácido láctico, bifidobacterias e propionibactérias com potencial para biossintetizar compostos promotores da saúde em produtos lácteos fermentados (Adaptado de: Linares <i>et al.</i> , 2017).....	35

## Capítulo I

### 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a preocupação crescente com a saúde e com a qualidade de vida leva os consumidores a procurarem alimentos que sejam saudáveis e que proporcionem algum benefício na saúde, diminuindo-se assim o consumo de alimentos ricos em açúcar, sal e gordura, mesmo que para este efeito se tenha que pagar mais por este tipo de produtos. Para além disso, existe uma preocupação com os hábitos alimentares e com um estilo de vida saudável. Tem aumentado a procura de alimentos com alguma propriedade funcional, prevenindo o aparecimento de determinadas doenças.

No caso dos iogurtes, existe uma forte procura pelos que sejam probióticos, pois para além de serem uma das melhores fontes de cálcio, ajudam no restabelecimento da microbiota intestinal. Desta forma, a ingestão de iogurtes com bactérias probióticas pode contribuir para a prevenção de diarreia, redução do colesterol, redução de enzimas fecais potencialmente mutagénicas, redução da intolerância à lactose, aumento da resposta imune, aumento da absorção de cálcio, síntese de algumas vitaminas e pré-digestão de proteínas (Oliveira *et al.*, 2017).

Os probióticos são definidos pela OMS como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades suficientes, proporcionam benefícios para a saúde do organismo (Guarner *et al.*, 2005). Chegando ao intestino, esses microrganismos, normalmente bactérias, aderem à mucosa intestinal e mantêm-se viáveis, causando efeitos positivos para a saúde humana. A ingestão dos probióticos é assim desejável, pois certas bactérias presentes no iogurte e noutros produtos lácteos fermentados, podem ajudar a regular o equilíbrio intestinal e fortalecer o sistema imunológico. Desta forma, os probióticos são usados para moldar o ambiente microbiano intestinal e induzir efeitos benéficos na melhoria das respostas alérgicas. A aplicação de bactérias probióticas, como as bactérias do ácido lático (BAL), para apoiar a manutenção de uma microbiota equilibrada, tem sido amplamente relatada (Naidu *et al.*, 1999).

Algumas BAL são ainda capazes de produzir exopolissacáridos (EPS). Os EPS são estruturas de elevada massa molecular, compostos por um número elevado de oses, que ao serem adicionados ao alimento, comportam-se como agentes espessantes. Estes podem ser sintetizados por microrganismos como algas e fungos. Porém, os biopolímeros produzidos pelas bactérias têm sido o principal alvo de estudos com aplicação no setor dos laticínios.

Diversos estudos têm sido realizados em leites fermentados, como é o caso dos iogurtes (Duboc *et al.*, 2001). Nos iogurtes, os EPS promovem um aumento da viscosidade, melhoram a sua consistência, textura e diminuem a sinérese. As alterações da textura e sinérese dos iogurtes derivam da alteração da estrutura física do produto durante o seu fabrico e podem ser provocados por processos mecânicos como a homogeneização, ou ainda pelo fato de o leite apresentar menores teores de sólidos totais, como por exemplo no caso do uso de leite desnatado, o que forma uma rede mais frágil (Mende *et al.*, 2016). Desta forma, a incorporação de agentes espessantes como os EPS produzidos pelas bactérias presentes nos iogurtes pode melhorar sua consistência e textura.

Recentemente, foi isolada do queijo do Pico uma estirpe de BAL produtora de EPS, identificada como *Leuconostoc citreum* L3C1E7 (Domingos-Lopes *et al.*, 2018). O EPS produzido por esta bactéria foi identificado como um dextrano muito ramificado (alternano). Este EPS é produzido a partir da sacarose que é hidrolisada por uma enzima extracelular, incorporando a glucose na estrutura do dextrano e libertando a frutose para o meio exterior (Domingos-Lopes *et al.*, 2018). Esta estirpe demonstrou ainda possuir propriedades probióticas, ao exercer um efeito benéfico no sistema imunitário, demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* (Domingos-Lopes *et al.*, 2017).

No presente trabalho pretende-se estudar as propriedades funcionais do EPS produzido pela referida estirpe bacteriana, de modo que esta seja introduzida na produção de um iogurte natural, aproveitando os benefícios que esta poderá trazer, não só nas características organoléticas e físico-químicas do iogurte, como para benefício da saúde de quem o consumir (Domingos-Lopes *et al.*, 2017). Desta forma, o objetivo deste trabalho consiste em estudar as propriedades funcionais e organoléticas de um iogurte probiótico com a incorporação desta estirpe de L3C1E7. Para este estudo, irão ser produzidos vários iogurtes com diferentes concentrações de sacarose, de modo a poder avaliar a melhor concentração para maximizar as propriedades físico-químicas e organoléticas do produto final.

Desta forma, irão ser analisados os efeitos da adição da BAL e sacarose na melhoria do iogurte ao nível do aumento da viscosidade e diminuição da sinérese, e das características sensoriais, incluindo a sensação bucal, a perceção do sabor, o brilho e cremosidade.

Nesta dissertação, serão apresentados cinco capítulos:

O primeiro capítulo, a Introdução, no qual é realizada uma abordagem da temática em estudo, contendo todos os objetivos e uma breve explicação de toda a estrutura desta dissertação.

O segundo capítulo, Revisão Bibliográfica, onde é feita uma revisão bibliográfica da temática escolhida.

O terceiro capítulo, Materiais e Métodos, onde serão apresentados todos os materiais e reagentes utilizados, assim como as metodologias empregues durante toda a prática experimental realizada neste trabalho.

O quarto capítulo, Resultados e a Discussão, onde são apresentados os resultados obtidos no trabalho prático acompanhados com a respetiva discussão. Os resultados obtidos são comparados e discutidos, com base em trabalhos anteriormente publicados.

Por último, o quinto capítulo, Conclusão, onde são apresentadas as principais conclusões e algumas sugestões para futuros trabalhos relacionados com o tema em estudo.