

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DA GLICOSE OXIDASE SOBRE A  
VIABILIDADE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM  
IOGURTE**

**Adriano Gomes da Cruz**

Engenheiro Químico

**Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria**

Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), para a obtenção do Título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

**Campinas, 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C889e Cruz, Adriano Gomes da  
Efeito da glicose-oxidase sobre a estabilidade do iogurte probiótico  
/ Adriano Gomes da Cruz. -- Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: José de Assis Fonseca Faria  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Engenharia de Alimentos

1. Iogurte. 2. Probióticos . 3. Glicose oxidase. 4. Estabilidade.  
I. Faria, José de Assis Fonseca. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Título em inglês: Effect of the glucose oxidase on the stability of probiotic yogurt  
Palavras-chave em inglês (Keywords): Yogurt, Probiotic, Glucose oxidase, Stability

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: José de Assis Fonseca Faria

Gabriela Alves Macedo

Helena Maria André Bolini

Leila Maria Spadoti

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria**  
**Universidade Estadual de Campinas/FEA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gabriela Alves Macedo**  
**Universidade Estadual de Campinas/FEA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Maria André Bolini**  
**Universidade Estadual de Campinas/FEA**

---

**Dr<sup>a</sup>. Leila Maria Spadoti**  
**Instituto de Tecnologia de Alimentos/TECNOLAT**

---

**Dr<sup>a</sup>. Patrícia Blumer Zacarchenco de Sá**  
**Instituto de Tecnologia de Alimentos/TECNOLAT**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Fávaro-Trindade**  
**Universidade de São Paulo/FZEA**

---

**Prof. Dr. Flavio Luis Schimdt**  
**Universidade Estadual de Campinas/FEA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Elisabeth Antunes Moraes**  
**Universidade Estadual de Campinas/FCA**

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa tese a minha família -  
Lucio, Lourdes, Waldea, Andréia -  
que apoiou minhas escolhas e  
esteve sempre do lado. Em especial  
a Maria de Lourdes Gomes de  
Almeida, que fez todo o possível e  
impossível enquanto vida para mim.*

.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Assis Fonseca Faria. Exigente ao extremo, sem deixar o lado humano. Exemplo profissional e pessoal pra mim. Foi dele a idéia desse projeto;

Aos membros da banca examinadora, por suas excelentes e oportunas correções. Tive bastante sorte em ter professores e pesquisadores bastante comprometidos com meu trabalho;

A Kimie, nosso alicerce no laboratório de Embalagens e Estabilidade de Alimentos. Com calma e competência coordena todas as atividades, tornando o ambiente bastante produtivo e agradável;

Aos professores da FEA e que representam mais que mestres para mim, sendo amigos: Gabriela Macedo, Gláucia Pastore, Helena Godoy, Marcelo Prado e Juliana Pallone (DCA), Helena Bolini e Cida (DEPAN) e Pedro Felício, Walkíria Viotto, Marcelo Cristianini, Marise Pollonio, Flávio Schmidt, Carlos Anjos, Caroline Steel e Yoon Chang (DTA);

Aos funcionários da secretária do DTA, Tânia, Jaime e Marlene. Sou igualmente muito feliz em conhecê-los.

A Thomás Mazano Parisotto e Estevão Gabriel Bisogni Silva, alunos de iniciação científica, que foram parte integrante da equipe que resultou nessa tese e tiveram empenho e dedicação irrestrita durante todo o período necessário.

A Eduardo Henrique (Coconut), um grande amigo faz bastante falta, companheiro nas publicações;

A meu grande amigo Rafael Andrade (FEQ/FEA), com o qual aprendi bastante e tenho aprendido. Sem ele, a minha vida em Campinas e na Unicamp não seria a mesma;

A Thiago Martins (Anjão) que hoje é parte integrante do meu cotidiano. Amizade tardia, porém verdadeira;

Aos amigos da USP, Anderson Sant'Ana (amizade de longa data, bem especial, companheiro de publicação) e Daniel Granato;

Aos amigos do DTA que tornaram a convivência mais agradável nessa caminhada: Sérgio, Carol, Luciana Éspere, Milena, Rãs (Vanessa e Lu Fontes), Marcília, Veri, Atílio, Daniela Cordeiro, Renata e Diana, Paulo, Eveline, Bob, Priscila, Mari, Bárbara, Márcio, Leandra.

As novas amizades do DTA, as quais confirmam que ainda é espaço pra boas surpresas na vida: Lígia, Mônica e Clarice;

Aos amigos do laboratório de Embalagens e Estabilidade de Alimentos: Wellington, Eliene e Clívia. Junto formamos uma equipe. Sou privilegiado por conviver com vocês;

Aos amigos do DEPAN: Rafael Cadena, Mariana, Alessandra, Karina, Aline, Erick, Lia e Nice (DEPAN).

Aos amigos do DEA: Rodrigo, Fábio, Elizama, Lucas, Marcus (Abu), Abraão e Fifa.

Aos funcionários e amigos do DTA: Diego, Ana Maria, Ana Lourdes, Beth, Adauto, Ana Kon por todo o auxílio prestado bem como amizade dispensada.

Aos funcionários da FEA, sempre presentes e solícitos: Geraldo, Creuza, Cláudia e Lu (Biblioteca), Cosme e Marcos (Pós).

A Dixie Toga, Prozint e Danisco pela doação das embalagens, enzima e das culturas lácticas e probióticas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante todo o tempo de doutorado bem como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2007/08395-3), pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa.

**Ao Nosso Deus, soberano e Senhor de todas as coisas em nossa vida. Ele me deu força pra chegar até aqui e superar todos os obstáculos. Muito obrigado, Senhor!**

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO GERAL .....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	5
CAPÍTULO 1 .....	7
IOGURTE PROBIÓTICO: BENEFÍCIOS À SAÚDE, TECNOLOGIA E ASPECTOS SENSORIAIS 7	
RESUMO.....	8
1 - INTRODUÇÃO.....	9
2 - MERCADO CONSUMIDOR E ASPECTOS REGULATÓRIOS.....	10
3 - BENEFÍCIOS À SAÚDE .....	14
4 - ASPECTOS SENSORIAIS E ATITUDES DO CONSUMIDOR .....	16
5 - PROCESSAMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO .....	18
6 - O ESTRESSE DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM IOGURTES.....	31
7 - PERSPECTIVAS .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
CAPÍTULO 2 .....	55
OTIMIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	55
RESUMO.....	56
1 - INTRODUÇÃO.....	57
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	59
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
4 - CONCLUSÕES .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CAPÍTULO 3 .....	83
PARÂMETROS DE QUALIDADE DO IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE.....	83
RESUMO.....	84
1 - INTRODUÇÃO.....	85
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	86
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	93
4 - CONCLUSÕES .....	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

CAPÍTULO 4 .....	117
IOGURTE PROBIÓTICO CONTENDO GLICOSE OXIDASE: AVALIAÇÃO SENSORIAL E DESEMPENHO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E REDES NEURAIS ARTIFICIAIS PARA MODELAGEM DA IMPRESSÃO GLOBAL .....	117
RESUMO.....	118
1 - INTRODUÇÃO .....	119
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	120
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	125
4 - CONCLUSÃO .....	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140
CONCLUSÕES GERAIS .....	147

## **RESUMO GERAL**

A incorporação e a viabilidade de bactérias probióticas em alimentos ao longo do seu período de estocagem, que resultem em benefício para a saúde do consumidor, é um desafio constante para as indústrias de alimentos, requerendo a compreensão dos fatores intrínsecos e extrínsecos ao processamento. A exposição ao oxigênio apresenta-se como um fator relevante, na medida em que esse grupo microbiano apresenta metabolismo anaeróbio e/ou microaerófilo, o que pode resultar em morte celular e perda da funcionalidade do produto. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da glicose oxidase sobre o aumento da sobrevivência das bactérias probióticas em iogurte, bem como em seus parâmetros de qualidade e aceitação sensorial. Foi observado o efeito potencial da glicose oxidase na redução do oxigênio dissolvido no iogurte bem como na manutenção da sua funcionalidade, sem interferência nos parâmetros de qualidade e aceitação sensorial do produto.

Palavras chaves: bactérias probióticas, iogurte, glicose oxidase, absorvedor de oxigênio.

## **ABSTRACT**

The incorporation and viability of probiotic bacteria in processed food during its storage period is a constant challenge for the food industry, and thus requiring an understanding of intrinsic and extrinsic factors in relation to processing. The oxygen exposure is presented as a relevant factor, since the microbial group presents anaerobic metabolism, which can result in cell death and loss of product functionality. This study aimed to evaluate the effect of glucose oxidase as oxygen absorber for increasing the survival of probiotic bacteria in yogurt as well as its effect on the quality parameters and sensory acceptability. It was noted the potential effect of glucose oxidase in the reduction of dissolved oxygen in yogurt and in maintaining its functionality, without interference on quality parameters and sensory acceptability of the product.

Key-words: probiotic bacteria, yogurt, glucose oxidase, oxygen absorber.

## INTRODUÇÃO GERAL

Probióticos são definidos como “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FOOD/WHO, 2001). Alimento probiótico é definido como um produto processado que contém microorganismos probióticos viáveis em uma matriz adequada e em suficiente concentração (SAXELIN et al, 2008). Isso significa que a viabilidade e a atividade metabólica desses microorganismos devem ser mantidas em todas as etapas de processamento do alimento, desde a manufatura até a ingestão pelo consumidor, significando também que eles devem ser capazes de sobreviverem no trato gastrointestinal (SANZ, 2007). Na literatura científica foi estabelecida uma quantidade terapêutica no produto final de  $10^6$ - $10^7$  UFC/g de culturas probióticas no alimento processado (SHAH, 2000), alcançando até  $10^8$ - $10^9$  UFC proveniente do consumo diário de 100 g ou 100 ml do alimento, beneficiando conseqüentemente a saúde do consumidor (JAYAMANNE e ADAMS, 2006). No Brasil, a legislação em vigor determina que a quantidade viável mínima de culturas probióticas deve ser entre  $10^8$  e  $10^9$  UFC por porção de produto e que a contagem deve constar no rótulo do produto (ANVISA, 2008).

A ingestão de alimentos contendo culturas probióticas confere vários benefícios à saúde, sendo que alguns já foram provados cientificamente, e outros precisam ainda de mais estudos em seres humanos. Primeiramente, essas bactérias afetam benéficamente a saúde humana promovendo o equilíbrio da microbiota intestinal e melhorando as defesas da mucosa contra patógenos (BOYLSTON et al, 2004). Alguns desses efeitos benéficos à saúde, relacionados a ingestão de microorganismos probióticos, são: atividade antimicrobiana, prevenção e tratamento de diarreias, alívio dos sintomas relacionados à intolerância a lactose, antimutagenicidade e atividade anticarcinogênica, estímulo do sistema imunológico, melhora da saúde urogenital, alívio de constipação e otimização do efeito de vacinas (SHAH, 2007). Geralmente, as cepas probióticas são de origem intestinal e não devem apresentar qualquer efeito deletério, de acordo com seu

local de origem. No entanto, as bactérias intestinais podem exibir propriedades no alimento que não são desejáveis ou não possuem relevância no intestino. Um exemplo pode ser o potencial para produzir aminas biogênicas no alimento (HAMMES & HERTEL, 2002).

É importante mencionar que os efeitos na melhora da saúde são dependentes da linhagem presente na formulação do produto, e que não existe uma cepa probiótica que seja capaz de fornecer todos os benefícios anteriormente reportados (SHAH, 2007). O número de produtos disponíveis e a familiaridade do consumidor com o conceito de probióticos têm aumentado e, como consequência, os estudos sobre esses produtos têm também crescido. Mais de 600 produtos alimentícios foram lançados na indústria láctea em 2006 carregando o termo probióticos no nome (SVEJE, 2007). Iogurtes e leites fermentados constituem os principais representantes de inserção de culturas probióticas e ingredientes prebióticos em todo o mundo, com mercado consumidor sólido, que representa grande parte do quantitativo financeiro do mercado dessa classe de produtos. Recentes dados estimam que o mercado de iogurtes probióticos na Europa está avaliado em 1 bilhão de euros (SAXELIN, 2008).

Do ponto de vista tecnológico, a manutenção da viabilidade da bactéria probiótica durante o armazenamento representa um desafio tecnológico significativo, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos, o que pode resultar em perda da funcionalidade do produto (STANTON et al, 2003). Dentre essas, a exposição ao oxigênio – denominado estresse oxidativo – vem recebendo atenção especial da comunidade científica, e várias soluções tecnológicas têm sido apresentadas.

Neste trabalho, são apresentados os efeitos da enzima glicose oxidase como potencial absorvedor de oxigênio durante a estabilidade do iogurte probiótico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acessado em 17 jan. 2010.

BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, v.14, p.375-387, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio\\_report\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf). Acessado em 17 jan. 2010.

HAMMES, W.P.; HERTEL, C. Research approaches for pre- and probiotics: challenges and outlook. *Food Research International*, v.35, p.165-170, 2002.

JAYAMANNE, V.S.; ADAMS, M.R. 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 1131-1138, 2009.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, v.17, p.1284-1289, 2007.

SAXELIN, M. Probiotic Formulations and Applications, the current Probiotics Market and Changes in the Market Place: A European Perspective. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p. 76-79, 2008.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, v.17, p.1262-1277, 2007.

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.894-907, 2000.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: MAZZA, G., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Ranton: CRC Press, 2003. p. 27-58.

SVEJE, M. Probiotic and Prebiotics – improving consumer health through food consumption. Nutracoss, sept/oct, p. 28-31, 2007.

# **CAPÍTULO 1**

## **IOGURTE PROBIÓTICO: BENEFÍCIOS À SAÚDE, TECNOLOGIA E ASPECTOS SENSORIAIS**

Formatado de acordo com as normas do livro “Probióticos e Prebióticos em Alimentos- Fundamentos e Aplicações Tecnológicas “  
(Editores: SAAD, S.M.I; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., Editores)  
Varela: São Paulo. 2010. In press.

# **IOGURTE PROBIÓTICO: BENEFÍCIOS À SAÚDE, TECNOLOGIA E ASPECTOS SENSORIAIS**

## **RESUMO**

A prévia reputação positiva na memória dos consumidores, com associação de inúmeros benefícios à saúde, faz do iogurte a matriz alimentícia mais adequada como veículo para suplementação de culturas probióticas. Contudo, o desenvolvimento de um iogurte suplementado com bactérias probióticas deve ter como objetivo principal a manutenção da funcionalidade do produto ao longo de sua vida de prateleira. Isto implica que todas as etapas de processamento devem ser direcionadas para a sobrevivência das bactérias probióticas em níveis quantitativos, capazes de proporcionar benefícios à saúde dos consumidores.

Neste capítulo, são apresentadas as principais diretrizes relacionadas ao processamento de iogurte probiótico. Adicionalmente, são mencionados relatos de benefícios clínicos advindos da ingestão do iogurte probiótico bem como seus aspectos sensoriais. Soluções para enfrentar os obstáculos tecnológicos durante o processamento destes iogurtes são também apresentadas.

## **1 - INTRODUÇÃO**

Alimentos funcionais são aqueles nos quais em sua formulação são adicionados nutrientes ou substâncias que proporcionam benefícios à saúde, além do tradicional benefício nutricional (FALK, 2004; WILLIAMSON, 2009). Prebióticos e probióticos possuem amplo destaque na categoria de alimentos funcionais. Prebióticos são componentes alimentícios não-viáveis que exercem benefícios à saúde do hospedeiro associado com a modulação da microbiota intestinal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007). Enquanto que probióticos são microorganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, visando proporcionar benefícios à saúde (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001). Os produtos lácteos são os pioneiros nessa categoria e, atualmente, constituem o principal veículo de administração de culturas probióticas (SANCHEZ et al, 2009). De fato, existe uma expectativa de que produtos lácteos representem mais que um alimento comum, na medida em que, além de seu sabor e apelo, eles devem adicionar uma expectativa de bem estar por proverem benefícios à saúde e prevenirem certas doenças para os consumidores (JAYAPRAKASHA et al, 2005).

Neste capítulo, são apresentados os parâmetros tecnológicos envolvidos durante o processamento, bem como os benefícios clínicos advindos da ingestão de iogurte, o principal e o mais popular produto lácteo carreador de culturas probióticas e/ou ingredientes prebióticos. É esperado que os conceitos apresentados ao longo do texto sejam úteis para cientistas e pesquisadores, bem como para as indústrias, que desejem diversificar suas linhas de produtos e ingressar neste rentável mercado, que representa o iogurte e os leites fermentados contendo probióticos e prebióticos.

## **2 - MERCADO CONSUMIDOR E ASPECTOS REGULATÓRIOS**

Iogurtes e demais leites fermentados constituem os principais representantes de inserção de culturas probióticas e ingredientes prebióticos em todo o mundo, com mercado consumidor sólido, e que representa grande parte do quantitativo financeiro do mercado dessa classe de produtos. Recentes dados estimam que o mercado de iogurtes probióticos na Europa está avaliado em 1 bilhão de euros (SAXELIN, 2008). Na China, 10-20% dos iogurtes produzidos industrialmente contém cepas probióticas em sua formulação (PATTOM, 2007). Resultados de uma pesquisa realizada 2000 consumidores norte-americanos, revela que 19% dos adultos incluíram em suas compras um iogurte probiótico/prebiótico nos últimos três meses, comparado com 11% em 2006. Esses consumidores são identificados como em sua grande maioria mulheres com faixa etária de 45-54 anos (MINTEL INTERNATIONAL GROUP, 2009). Na América Latina, o mercado de iogurtes probióticos cresceu 32% de 2005 a 2007, representando 30% do total do mercado de iogurtes produzidos (GRANATO et al, 2010). No Brasil, não há estimativas precisas sobre o mercado de iogurtes probióticos e prebióticos, mas ao se observar as prateleiras dos supermercados, verifica-se que o número de marcas e produtos está aumentando e se diversificando. De fato, produtos lácteos fermentados são um excelente meio para geração de uma amplitude de produtos que se ajustam à demanda do consumidor moderno por alimentos com impacto positivo para a saúde (KHURANA & KANAWJIA, 2007). A Tabela 1 mostra os principais iogurtes e leites fermentados no mundo.

Os dados apresentados, se por um lado impressionam, por outro causam certa preocupação, pois muitos produtos que são comercializados são suplementados por cepas probióticas e ingredientes prebióticos que não foram avaliados previamente em estudos clínicos com humanos. Às vezes a identificação da linhagem não está claramente apresentada no rótulo do produto, nem também consta a informação sobre a contagem viável de bactérias probióticas e do teor dos ingredientes prebióticos por porção do produto (SAXELIN, 2008).

**Tabela 1-** Leites fermentados, iogurtes e sobremesas lácteas fermentadas contendo probióticos comercializados no Brasil e em outros

<b>Produto/marca</b>	<b>País</b>	<b>Microorganismo</b>
Yakult/Yakult	Brasil	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
Sofyl/Yakult	Brasil	<i>Lactobacillus casei Shirota</i>
Activia/Danone	Brasil	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010
Actimel/Danone	Brasil	<i>Lactobacillus casei Defensis</i>
Vigor Club	Brasil	<i>Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus</i>
Batavito/Batavo	Brasil	<i>Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus</i>
Biofibras/Batavo	Brasil	<i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>
Plenus/Itambé	Brasil	<i>Bifidobacterium</i>
Chamyto/Nestlé	Brasil	<i>Lactobacillus johnsonii, Lactobacillus helveticus</i>
Bio Fibras/Nestlé	Brasil	<i>Lactobacillus acidophilus</i> and <i>Bifidobacterium lactis</i>
Vilib/Colun	Chile	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Pianola	Espanha	<i>L. casei</i>
Bio/San Cor	Espanha	<i>L. casei</i>
Vita	Argentina	<i>Bifidobacterium animalis</i> BB12
Bioarmonis/Ilolay		
Bio Defesa / Laive	Perú	Casei Vital Bio D
Yo-Plus/Yoplait	EUA	<i>Bifidobacterium animalis</i> BB12
Renforce/Yoplait	França	<i>Bifidobacterium lactis</i>
Vaalia/Valio	Austrália	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
Munch	Reino Unido	<i>Lactobacillus fortis</i>
Bunch/Nestlé		
Vifit Vitamel	Holanda	<i>L. rhamnosus</i> GG
Stonyfield yogurt	USA	<i>Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei</i>
Max Defensas / Puleva	USA	<i>Lactobacillus gasseri, Lactobacillus coryne-formis</i>

Determinada cepa probiótica, testada previamente em diferentes situações clínicas, possivelmente exercerá efeito benéfico, mas não apresentará efeito adverso sobre os humanos. Isso não impede a alegação da condição (*status*) de probiótico para o produto em questão, mas significa que tal cepa só poderá prover

benefício específico que foi comprovado por ensaios clínicos prévios (SANDERS, 2009). Na medida em que os benefícios atribuídos às cepas probióticas são dependentes da linhagem utilizada, e foram previamente comprovados em estudos clínicos, é importante que os produtos contenham, de fato, a linhagem apresentada no seu rótulo, evitando problemas e confusão para os consumidores. A preocupação aumenta devido ao uso de misturas de cepas na formulação de iogurtes, dado a necessidade de fornecer múltiplos benefícios em um mesmo iogurte, aumentando sua funcionalidade (TIMMERMAN et al, 2004).

Problemas de natureza qualitativa e quantitativa com relação à identificação de cepas probióticas em iogurtes e leites fermentados probióticos disponíveis no comércio não são raros de acontecer. Relatos recentes em países europeus (COEURET et al, 2004; AURELI et al, 2010), Colômbia (VÉLEZ et al, 2007), Estados Unidos (DUNLAP et al, 2009), Brasil (SILVA et al, 2010), África do Sul (THEUNISSEN et al, 2005), entre outros, demonstram a importância do monitoramento constante desse tipo de produto por parte das agências de saúde. É importante lembrar que, embora não exista um consenso sobre o assunto, é recomendado que produtos lácteos probióticos, como o iogurte, apresentem contagens viáveis de microorganismos na faixa de  $10^8$  e  $10^9$  UFC/mL do produto, para exercer a funcionalidade no consumidor, devido às possíveis perdas durante a passagem pelo trato gastrointestinal humano (SHAH, 2000). Na legislação brasileira, é exigido que iogurtes e leites fermentados contendo bifidobactérias devam apresentar contagem mínima de  $10^6$ /g UFC do microorganismo por porção do produto (BRASIL, 2007).

É importante e imprescindível salientar que a presença de culturas vivas em um determinado alimento ao longo de sua vida de prateleira (a exemplo dos iogurtes), não implica necessariamente na presença de microorganismos probióticos. Está associado aos microorganismos presentes em processos fermentativos ocorrendo no alimento, sendo denominados culturas iniciadoras ou *starters*, não havendo estudos clínicos com relação aos benefícios à saúde, que eles podem prover, não sendo considerados, dessa maneira, probióticos. Isso é

verdadeiro para o iogurte, que é um alimento obtido por fermentação. Dessa forma, a diferença fundamental entre culturas microbianas vivas e cepas probióticas é a presença/ausência comprovada de estudos clínicos validados em humanos (SANDERS, 2008). Adicionalmente, os microorganismos responsáveis pela transformação do leite em iogurte (*Lactobacillus delbueckii spp bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) não são considerados microorganismos probióticos, porque eles não apresentam origem entérica e, de forma geral, eles não possuem a capacidade de aderência e de colonização do trato gastrointestinal (CHANDAN, 1999). Contudo, é verificado que isso depende da linhagem do microorganismo, pois tem sido observada a sua sobrevivência em fezes humanas (MATER et al, 2005), havendo esta forma, concordância com a vigente definição de probióticos (GUARNER et al, 2005). Porém, como esses resultados ainda estão longe de ser um consenso, a recomendação é que a ingestão de iogurtes apresenta-se positiva para tratamento de distúrbios intestinais, como diarreias. Contudo, essa apresenta impacto inferior em relação à recomendação de ingestão de iogurtes suplementados com bactérias probióticas, as quais sejam comprovadas efeito benéfico a saúde em estudos clínicos em humanos.

Boas práticas de fabricação, incluindo auditorias para verificar cumprimento das normas regulatórias, devem fazer parte do cotidiano de unidades produtoras de lácteos fermentados probióticos. Testes visando obter a estabilidade e viabilidades das cepas em diferentes períodos da vida de prateleira são importantes para determinar a funcionalidade do produto. Essas informações devem ser incluídas no rótulo do produto, no caso iogurte e leite fermentado, devendo ser uma reflexão direta no momento de consumo e não no momento de fabricação (AMAGASE, 2008).

### **3 - BENEFÍCIOS À SAÚDE**

O sistema imune dos vertebrados consiste em vários órgãos e diferentes tipos de células que reconhecem, de forma exata e específica, antígenos estranhos e microorganismos e têm como função básica mediar a proteção do hospedeiro contra doenças, utilizando diferentes mecanismos, sendo que sua ativação depende da natureza do antígeno que possui o patógeno (PERDIGON, 1995a). A imunidade não específica constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo representada pelos fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), leucócitos polimorfo nucleares (neutrófilos) e células *natural killer* (células NK), tendo essas últimas papel fundamental na proteção contra infecção viral e desenvolvimento de tumores (GILL, 1998). A imunidade específica pode ser classificada em duas categorias: humoral (HI) e celular (CI). A primeira é executada pelos anticorpos produzidos pelas células do plasma (linfócitos B maduros) que se liga de forma específica aos antígenos na superfície do patógeno; como exemplos, existem os anticorpos IA, IG e IM. CI é mediada por linfócitos T, os quais, sob exposição aos antígenos ou patógenos, podem proliferar e produzir citocinas que influenciam a atividade de outras células, com aumento da capacidade de macrófagos de eliminar patógenos intracelulares e células tumorais (GILL, 1998).

Bactérias lácticas, como as probióticas, podem beneficiar o hospedeiro em várias situações, como prevenir infecções entéricas ou atuar como agentes de processo imunomodulatórios, embora esses mecanismos ainda não estejam claramente elucidados e sejam dependentes da cepa utilizada (PERDIGÓN et al, 1995a). Os efeitos de bactérias probióticas podem ser classificados em três formas: (a) capacidade de modular a defesa do hospedeiro, incluindo o sistema imune inato ou adquirido; (b) efeito direto sobre outros microorganismos, comensais ou patogênicos, sendo esse princípio importante para prevenção e tratamento de infecções e restauração do equilíbrio da mucosa intestinal; e (c) efeito baseado na eliminação de produtos resultantes do metabolismo microbiano,

como toxinas, sendo tal ação resulta na desintoxicação do intestino e, conseqüentemente, do hospedeiro (OELSCHLAEGE, 2010).

Benefícios clínicos resultantes da ingestão de iogurtes e leites fermentados probióticos estão amplamente divulgados, confirmando a aptidão dessa matriz alimentícia para suplementação desse grupo microbiano. São também relatados a potencial ação atenuadora sobre tumores (URBANSKA et al, 2009), estímulo da imunidade celular (MEYER et al, 2006); prevenção da diarreia em população adulta saudável (PEREG et al, 2005); aumento de níveis de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>6</sub> (FABIAN et al, 2008); melhora do metabolismo ósseo (KIM et al, 2009); prevenção de infecção por *E. coli* enteroinvasiva (MEDICI et al, 2005); diminuição dos níveis de lipídios sanguíneos em homens adultos (XIAO et al, 2003) e de colesterol em indivíduos moderadamente hipercolesterolemicos (ATAIE-JAFARI et al, 2009); combate a infecção por *Helicobacter pylori* (WANG et al, 2008), restauração da microbiota em indivíduos intolerantes a lactose e em idosos (HE et al, 2006; MATSUMOTO et al, 2009); atenuação de infecções infantis em creches (HATAKKA et al, 2001); diminuição de reações alérgicas em crianças (MARTINÉZ-CANÁVATE et al, 2009); gengivite (STAAB et al, 2009), impacto positivo no sono em população idosa (YAMAMURA et al, 2009); e alteração da microbiota oral, com redução de *Streptococcus mutants* na saliva (CILDIR et al, 2009).

Recentemente, Galdeano et al (2009) publicaram os mecanismos de imunoestimulação do leite fermentado probiótico com *Lactobacillus paracasei* DN114001, em um modelo de experimentação animal. Foi verificado que existe uma comunicação entre as bactérias probióticas, ou seus fragmentos, com as células imunes associadas com a mucosa intestinal, proporcionando uma estimulação, que resulta em um número de diferentes contagens de células imunes: linfócitos T, linfócitos IgA+ e B e células relacionadas com a resposta inata e adaptativa, os macrófagos, que conseqüentemente, proporcionaram a liberação de citocina IL-6.

É importante lembrar que muitos dos benefícios relatados acima necessitam de mais evidências científicas, já que são estudos pontuais e específicos aspara as

cepas mencionadas. Porém, os resultados abrem opções para o desenvolvimento de iogurtes probióticos com múltiplos benefícios à saúde humana, devido à possibilidade de combinação entre as cepas probióticas. Vale ressaltar a necessidade de uma confiável metodologia de enumeração bem como a verificação de possível antagonismo entre as mesmas e entre as culturas do iogurte, quando colocadas no mesmo produto. Saulnier et al (2009) advertem que estudos clínicos com bom planejamento são necessários para a otimização da dose, duração e efeito de cada cepa probiótica, em diferentes matrizes alimentícias e em diferentes populações com crianças e idosos, que possuem diferentes composições da microbiota intestinal e do sistema imunológico.

#### **4 - ASPECTOS SENSORIAIS E ATITUDES DO CONSUMIDOR**

O desenvolvimento de alimentos funcionais deve preconizar o entendimento do comportamento e as necessidades reais do consumidor, possibilitando que ele compre e, posteriormente, compre de novo o produto (BLEIEL, 2010). Para probióticos e prebióticos, isso significa que a familiaridade do consumidor com o alimento no qual se pretende adicionar os microorganismos, representa um fator decisivo para o sucesso do produto, e deve ser levado em consideração pelas indústrias de produtos lácteos que pretendem ingressar neste mercado.

O iogurte é considerado um alimento saudável que apresenta um papel importante nos hábitos alimentares de diversas nações, independente do nível de desenvolvimento sócio-econômico (CAPDEVILA et al, 2003; LOWE & WORSLEY, 2003; DE ALMEIDA et al, 2006; ZHU et al, 2009). Adicionalmente, trata-se de um produto com reputação positiva na memória dos consumidores. Sua simples ingestão tem sido associada aos inúmeros benefícios à saúde. São publicados diversos benefícios advindos da ingestão de iogurte, como efeitos imunológicos (MEYDANI & HA, 2000), atividade em tumores (PERDIGÓN et al, 1995b; 1998) e efeitos anti-inflamatórios para alívio da síndrome do intestino irritável (GOBBATO et al, 2008), entre outros. Isso o capacita como alimento mais adequado e que, de

fato, possui maior preferência para a suplementação de bactérias probióticas, na opinião de consumidores em todo o mundo (HAILU et al, 2009; SIEGRIST et al, 2008).

Dessa forma, a suplementação com culturas probióticas em iogurtes e leites fermentados pode ser percebida como uma maneira de agregar valor a um produto que já possui benefícios intrínsecos para a saúde humana. É oportuno ressaltar que mesmo com todas essas vantagens, torna-se importante as estratégias de marketing, utilizando linguagem clara e simples, visando o esclarecimento do conceito e dos benefícios ocasionados pela ingestão de iogurtes e leites fermentados probióticos. Observa-se certa confusão por parte dos consumidores, com relação a esses fundamentos (BRUHN et al, 2002; ANUKAM et al, 2006; VIANA et al, 2008).

Fatores inerentes ao processamento de iogurtes probióticos podem influir em sua aceitação de forma positiva ou negativa junto ao consumidor, como diferentes formas empregadas para aumentar o teor de sólidos do leite (ANTUNES et al, 2005), a quantidade e metabolismo da cultura probiótica utilizada (OLSON & ARAYANA, 2008), o uso de polpa de frutas (ALMEIDA et al, 2009) e a adição de crioprotetores (CAPELA et al, 2006). Isso implica que qualquer solução tecnológica imposta para o processamento de iogurtes probióticos deve passar por um teste sensorial, que gere, preferencialmente, resultados quantitativos para uma posterior análise de resultados. Ressalta-se, ainda, a importância do uso dos testes afetivos, utilizando escala hedônica de 9 pontos, com no mínimo 50 pessoas e realizados sob condições controladas e com balanceamento das amostras (DRAKE, 2008).

Adicionalmente, fatores sensoriais e não sensoriais, como bem estar animal, linguagem utilizada no rótulo, marca, preço, informação e familiaridade prévia com o produto tem sido determinantes na aceitação de iogurtes funcionais (ARES et al, 2010; JOHANSEN et al, 2010; SABA et al, 2010; CARLUCCI et al, 2009; POHJANHEIMO & SANDELL, 2009; FISCHER & FREWER, 2009). Entretanto, felizmente, tem sido relatado que é possível produzir iogurtes probióticos com desempenho sensorial semelhante aos iogurtes convencionais (HEKMAT & REID,

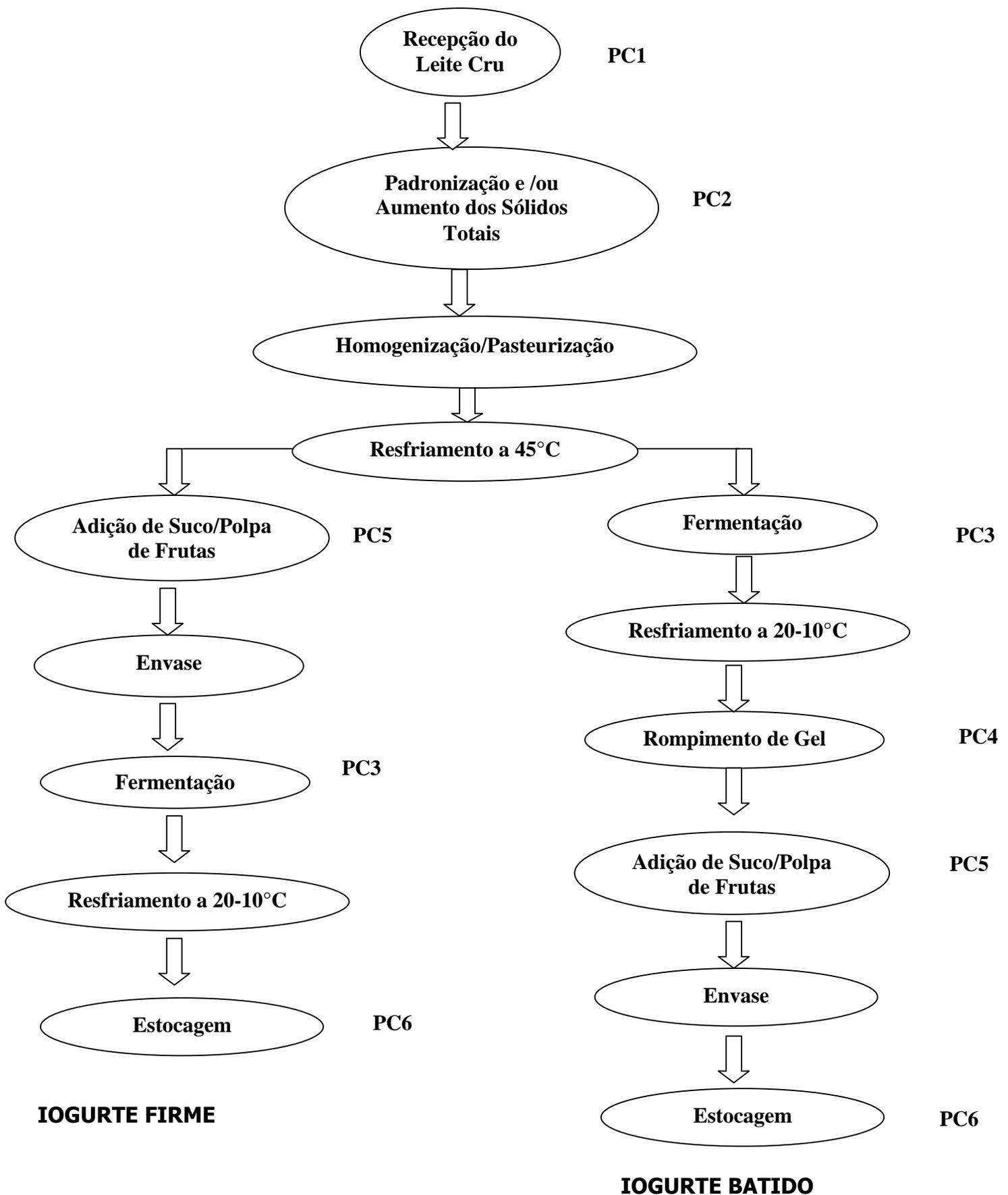
2006; HUSSAIN et al, 2009), mostrando dessa forma a habilidade dos profissionais que trabalham em desenvolvimento de produtos na indústria de produtos lácteos. ALLGEYER et al (2010), ao realizar testes descritivos e de aceitação com consumidores em iogurtes probióticos, prebióticos e simbióticos junto com os iogurtes convencionais, relatam que o desenvolvimento de iogurtes bactérias probióticas e ingredientes prebióticos deve possuir em sua formulação um médio nível de doçura e uma alta viscosidade para possuir máxima aceitação por parte dos consumidores.

O sucesso em testes sensoriais envolvendo iogurtes e/ou leites fermentados probióticos passa, necessariamente, pela escolha da adequada metodologia sensorial e a inclusão de produtos similares comerciais, para a obtenção de resultados mais próximos à realidade e verificar os principais pontos positivos e negativos do produto (CRUZ et al, in press). Mesmo pequenas unidades industriais devem estar atentas para esse fato, e procurar formas de viabilizar essa questão, já que normalmente não possuem em quadro de colaboradores, especialistas em análise sensorial. Dessa forma, devem recorrer a outras soluções, como por exemplo, recrutando serviços de empresas juniores de Universidades, evitando possíveis insucessos durante a comercialização do produto.

## **5 - PROCESSAMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO**

As etapas de produção de iogurte já são amplamente conhecidas pelas indústrias de produtos lácteos bem como a obrigatoriedade de utilização das culturas de *S. thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, atendendo a aspectos regulatórios (BRASIL, 2007). De forma geral, existem dois tipos de iogurte: iogurte firme, iogurte batido e iogurte líquido, onde a diferença fundamental consiste na etapa de rompimento do gel, em maior severidade para o iogurte líquido em relação ao batido e inexistente no iogurte firme. Adicionalmente para o iogurte firme, a fermentação ocorre com o produto dentro das embalagens, enquanto no iogurte líquido e batido, isso não acontece (TAMINE & ROBINSON, 2007).

Todavia, no caso de iogurte suplementado com culturas probióticas, denominado bioiogurte, essas devem ser otimizadas de forma a garantir a funcionalidade do produto e fornecer os benefícios à saúde do consumidor durante a vida de prateleira. Isso deve acontecer de forma a interferir o mínimo possível na rotina da planta industrial, na medida em que a fabricação de um iogurte probiótico não deve diferir do iogurte tradicional. De forma geral, são identificadas seis etapas ou pontos críticos (PCs) que devem ser levados em consideração no desenvolvimento do iogurte probiótico (Figura 2): qualidade da matéria-prima utilizada (PC1), padronização/aumento dos sólidos totais (PC2), fermentação (PC3), rompimento do gel (PC4, para iogurtes batidos), adição de sucos/polpas de frutas (PC5) e estocagem refrigerada (PC6).



**Figura 2** – Pontos Críticos no Processamento de Iogurte Probiótico.

## 5.1 - Qualidade da matéria-prima

Como para qualquer produto lácteo, é importante que sejam adotadas as boas práticas na obtenção e manuseio do leite até a chegada na planta industrial. Isso implica dizer que a presença de micotoxinas, resíduos de antibióticos e pesticidas e contagem de células somáticas devem ser mantidas nos valores mínimos preconizados pela legislação vigente (BRASIL, 2002). Sendo o iogurte um produto lácteo fermentado, onde tem como fundamento a atuação das culturas lácteas (de natureza probiótica ou não), pode haver interferência de um ou mais fatores acima mencionados que podem causar a inibição da cultura, comprometendo o desenvolvimento do produto e seus parâmetros de qualidade. De fato, é relatada a sensibilidade das culturas lácticas aos diversos tipos de antibióticos (TAMINE & ROBISON, 2007), resultando em mudança da velocidade de acidificação das culturas e na logística da fermentação, chegando mesmo a ser um obstáculo para a sua ocorrência (SBAMPATO et al, 2000). Também é mencionado o efeito negativo de substâncias normalmente utilizadas na higienização de equipamentos industriais para a produção de iogurtes (MILLER & ELLIKER, 1951).

Para iogurte probiótico, isso representa perda de sua funcionalidade, já que as bactérias probióticas apresentam baixa atividade proteolítica. Conseqüentemente, há uma direta dependência do metabolismo da cultura do iogurte para manutenção de sua viabilidade ao longo da estocagem do produto. Isso torna compulsório o cuidado redobrado nos procedimentos de higienização dos laticínios, conforme previsto pela legislação vigente (BRASIL, 2003).

A presença de micotoxinas no leite cru e em produtos lácteos tem sido uma constante em todo o mundo, conforme publicado recentemente (SHUNDO et al, 2009). Resíduos de antibióticos também têm sido relatados, tanto no leite cru (NERO et al, 2007), como em produtos lácteos, como em leite UHT (FONSECA et al, 2009), assim como resíduos de pesticidas (HECK et al, 2007). Isso demonstra que ainda é necessária vigilância mais severa com relação à qualidade do leite utilizado para a manufatura de produtos lácteos. Blanco et al (1988) mostraram

que aflatoxinas B1, B2, G1, G2 e M permanecem estáveis durante 21 dias de estocagem refrigerada do iogurte, sendo relatada recuperação de 75 a 110% do seu valor inicial.

Com relação às células somáticas, trabalhos recentes relatam que a produção de iogurte utilizando leite com elevada quantidade destas resultou em produto com comprometimento em seus parâmetros de qualidade, ou seja, curva de acidificação anormal, produto rejeitado sensorialmente quanto à textura (VIVAR-QUINTANA et al, 2006) e maior sinérese (NAJAFI et al, 2010).

Outro ponto importante que merece ser destacado é a microbiota naturalmente presente no leite. Sabe-se que a refrigeração obrigatória, imediatamente após a ordenha, imposta por aspectos regulatórios, e sua consequente estocagem por um longo período (BRASIL, 2002), favorece o crescimento de microorganismos psicrófilos. Esses, quando em grande quantidade, produzem enzimas termoestáveis lipolíticas e proteolíticas, que além de causarem problemas de rendimento na produção de produtos lácteos (SØRHAUG & STEPANIAK, 1996), podem, teoricamente, criar um ambiente favorável para a viabilidade das bactérias probióticas, ao gerar peptídeos necessários para seu desenvolvimento. Entretanto, não há trabalhos neste sentido, e investigações tornam-se necessárias, lembrando que as vantagens obtidas no âmbito tecnológico podem ser anuladas pelo baixo desempenho do produto do ponto de vista sensorial, em decorrência do desenvolvimento de sabor amargo, em função da presença de peptídeos hidrofóbicos gerados pelo processo, além do sabor rançoso pela ação das lipases.

Adicionalmente, a presença de elevada contagem microbiana no leite utilizado como matéria-prima para a produção de iogurtes pode gerar um ambiente de competição por nutrientes, tornando os nutrientes menos disponíveis para serem consumidos pelas culturas iniciadoras e probióticas e, consequentemente, prejudicando o andamento do processo fermentativo. Trabalho recente indica a correlação negativa entre o metabolismo de linhagens de *Bifidobacteria longum* e *Lactobacillus acidophilus* com a carga microbiana do leite

utilizado, sendo esse efeito notado de forma mais intensa para *B. longum* (CSUTAK & SOCACIU, 2008), sugerindo que a sensibilidade pode variar de acordo com a cepa probiótica. Entretanto, foi observado que maiores níveis de carga microbiana presente no leite cru influenciaram de forma positiva o desenvolvimento das cepas probióticas. Os autores correlacionaram esse fato a maior disponibilidade de geração de fontes nitrogenadas, como peptídeos e aminoácidos, que foram utilizados como nutrientes pelos referidos microorganismos.

## **5.2 - Padronização da gordura e/ou aumento do teor de sólidos totais**

Geralmente, o teor de gordura em iogurtes pode variar entre 0,1 e 10% (p/v). Com o objetivo de uniformizar a sua composição, torna-se necessário a padronização da quantidade de gordura do leite. Por outro lado, o aumento do teor de sólidos não gordurosos (lactose, proteína e matéria mineral) no leite tem como objetivo a valorização das propriedades físicas do produto (consistência firme, viscosidade do iogurte batido e atributos sensoriais como o gosto e aroma). De forma geral, é observada a adição desses componentes aumenta o teor de sólidos não gordurosos em aproximadamente 16 %. (OZER, 2010). Para aumento do teor de sólidos no iogurte, são utilizados leite em pó desnatado, produtos derivados de soro, como proteína e concentrado protéico, além de caseinatos (TAMINE & ROBISON, 2007), os quais produzem efeitos diversos na velocidade de acidificação, reologia e nas propriedades físicas do produto (DAMIN et al, 2009).

O aumento de sólidos totais do iogurte e a padronização da gordura podem exercer aspecto positivo sobre a sobrevivência das bactérias probióticas, na medida em que podem resultar em um produto com matriz mais sólida e compacta. Isso irá proteger o microorganismo dos obstáculos normalmente encontrados durante sua ingestão pelo consumidor, a saber: meio ácido do estômago e sais biliares do intestino e, conseqüentemente, contribuirá para que um maior número de células viáveis cheguem ao local de ação e com funcionalidade. De fato, a importância da matriz alimentícia como fator de proteção para a funcionalidade dos microorganismos probióticos tem sido relatada

e apontada como fator crucial e relevante no desenvolvimento de produtos alimentícios probióticos (RANADHEERA et al, 2009). Adicionalmente, têm-se relatado o efeito de variadas concentrações de sólidos não gordurosos e teor de gordura na sobrevivência das bactérias probióticas e nos parâmetros de qualidade do iogurte probiótico (OLIVEIRA & DAMIN, 2003; GÜN & ISIKLI, 2006; GÜN & ISIKLI, 2007). Cabe às unidades processadoras escolherem os melhores parâmetros a serem utilizados, para maximizar a funcionalidade do iogurte probiótico, sem alterar as propriedades intrínsecas.

Dada a limitada capacidade proteolítica de bactérias probióticas em hidrolisar a caseína do leite e utilizar os peptídeos resultantes do processo, a etapa de padronização/aumento de sólidos totais pode ser aproveitada para suplementação da matriz do produto com fontes nitrogenadas. Uso de hidrolisados protéicos, os produtos derivados de soro, os aminoácidos com características redutoras tem sido extensivamente realizado em diversos trabalhos (DAVE & SHAH, 1997; ANTUNES et al, 2004; ANTUNES et al, 2005). Impacto positivo tem sido observado na viabilidade das cepas probióticas, bem como nos parâmetros de qualidade do produto final (sinérese e firmeza) em razão da adição destes componentes. Porém, torna-se necessário considerar a questão econômica dessa estratégia bem como a otimização da quantidade de suplemento a ser adicionado no produto. A compatibilidade entre a substância a ser adicionada e a cepa probiótica utilizada no produto merece também investigação, já que determinadas cepas podem ter desempenho variável quanto ao consumo da substância e seu desempenho no iogurte (SODINI et al, 2005).

Pequenos e médios laticínios, que não dispõem de um quadro profissional qualificado, devem buscar orientação técnica com os fornecedores de culturas e os profissionais da área de alimentos.

### 5.3 - Tratamento térmico

Independente do uso do processo contínuo ou em bateladas, o leite destinado à fabricação de iogurtes pode ser submetido ao binômio tempo-temperatura na faixa 85 a 98°C por 20s a 7min (TAMINE & ROBSON, 2007). Esses parâmetros proporcionam segurança ao produto final, pois destroem patógenos, microbiota e enzimas endógenas e inibidores. Adicionalmente, contribuem para as propriedades funcionais do produto, na medida em que promove a desnaturação das proteínas do soro e posterior formação de um complexo entre elas e a  $\kappa$ -caseína na superfície da micela de caseína (LUCEY, 2004). De fato, é notado que um aumento da temperatura utilizada, implica na desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina, em um primeiro momento, seguido da  $\alpha$ -lactoalbumina, impactando de forma positiva na textura do gel formado (MOTTAR & RASSIER, 1989). Recentes trabalhos sugerem que a dissociação da  $\kappa$ -caseína é um evento prévio à desnaturação das proteínas do soro (ANEMA et al, 2008), embora ainda não haja um consenso sobre a ordem exata de acontecimento dos eventos, sendo assim proposto diversas hipóteses (DONATO & GUYOMARC, 2009).

A escolha dos parâmetros a serem utilizados no tratamento térmico de iogurtes tem se mostrado como fator importante para a posterior viabilidade das bactérias probiótica. MORTAZAVIAN et al (2006a,b) utilizaram diferentes parâmetros para o tratamento térmico de iogurte (85/30, 95/5, e 95°C/15min) suplementado com *L. acidophilus* e *Bifidobacterium spp*, verificando que a máxima viabilidade para ambas as cepas probióticas foi alcançada para 95°C/15 min. Os autores sugerem que a adoção de maiores valores dos respectivos parâmetros, pode estar relacionada a maior redução do oxigênio presente (menor potencial redox) e liberação de aminoácidos provenientes do processo de desnaturação das proteínas do soro. Como as bactérias probióticas, em especial linhagens de Bifidobacteria, apresentam reduzida capacidade proteolítica, complexa exigência nutricional e apresentam um metabolismo anaeróbio (SHAH, 1997), é natural que sejam beneficiadas com as mudanças originadas dos elevados parâmetros utilizados no tratamento térmico do iogurte. Todavia, como para os laticínios, é

importante que haja maior praticidade e não mudanças na rotina industrial, o ideal é que não existam mudanças nos parâmetros desta etapa.

#### **5.4 - Fermentação**

A fermentação constitui a principal etapa do processo de fabricação do iogurte. Tem como característica, o consumo do carboidrato presente no leite (lactose) e a hidrólise das proteínas do leite pelas culturas lácticas, as quais se desenvolvem no mix do iogurte, através de um processo simbiótico. Como resultado final do processo, tem-se a produção de peptídeos, compostos ácidos e de aroma característicos, como ácido láctico e acetaldeído. Também, ocorre a redução da carga repulsiva existente na superfície das micelas de caseína, com o decréscimo dos valores do pH, resultando em agregação das moléculas de caseínas através de ligações hidrofóbicas (LUCEY, 2004). Tais alterações favorecem a solubilização do fosfato de cálcio coloidal, quando o pH atinge valor próximo a 4,6 (ponto isoelétrico da caseína), resultando na formação do gel. De fato, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* exigem um comportamento altamente dependente durante essa etapa, o que é denominado relação simbiótica. *S. thermophilus* cresce de forma rápida, produzindo dióxido de carbono e ácido fórmico, os quais estimulam o crescimento de *L. bulgaricus*, através da redução do pH para seu valor ótimo de crescimento, que por sua vez, produz peptídeos e aminoácidos necessários para crescimento de *S. thermophilus*. Baixos valores de pH (4,2-4,4) inibem *S. thermophilus*, enquanto que *L. bulgaricus*, isso não representa um obstáculo para seu crescimento. Após aproximadamente 3 horas de fermentação o quantitativo de ambos deve ser igual. Ambos produzem ácido láctico, conforme mostrado na Figura 2 (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2000).

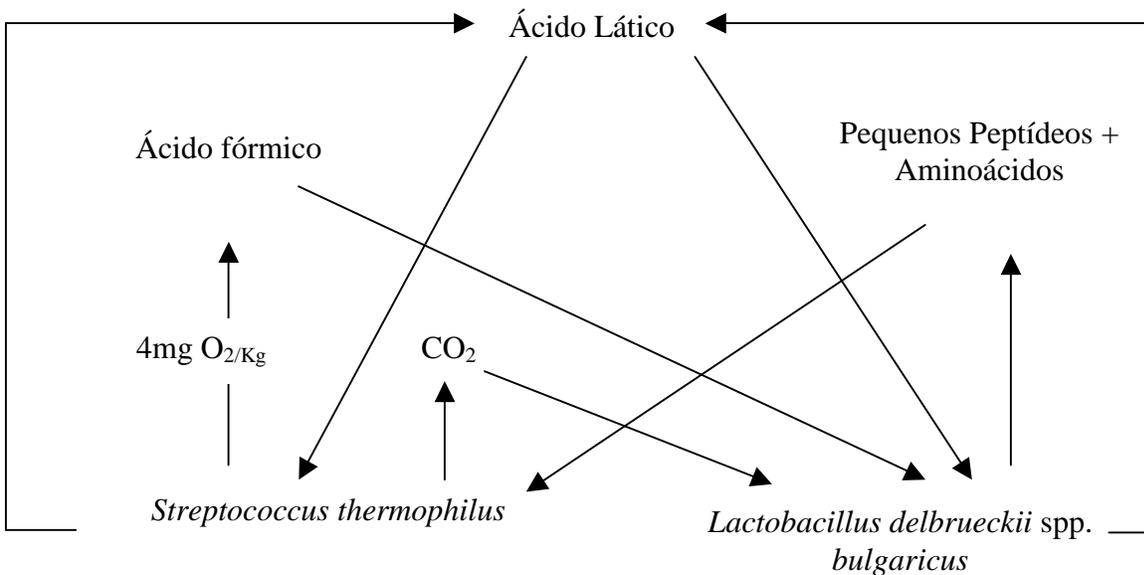
O desenvolvimento de iogurtes suplementados com bactérias probióticas requer obrigatoriamente total atenção na etapa de fermentação. Primeiramente, como regra geral, com relação às cepas microbianas escolhidas, tanto do iogurte, como as probióticas a serem utilizadas no processo. Essas devem ser compatíveis entre si, evitando problemas de inibição pela produção de ácidos,

peróxidos, bacteriocinas e outros produtos de seu metabolismo, que podem influenciar na logística e no rendimento do processo e no produto final, retardando a velocidade de acidificação. Problemas de inibição entre culturas probióticas e do iogurte têm sido descritos e não podem ser desprezados (JOSEPH et al, 1998; VINDEROLA et al, 2002). Parece existir uma compatibilidade ótima entre determinadas linhagens que possibilite desenvolvimento adequado de ambas na matriz do produto (SACCARO et al, 2009). Tem-se observado, ainda, que a apropriada compatibilidade pode influenciar na adesão a mucosa intestinal (COLLADO et al, 2007), o que influencia diretamente a funcionalidade do produto. Testes preliminares, para verificar a compatibilidade das culturas microbianas, não são difíceis de executar e em uma visão mais simplificada, pode ser resolvido por uso contínuo das culturas de um mesmo fornecedor.

Contudo, é possível o desenvolvimento do iogurte suplementado com diferentes cepas probióticas compatíveis entre si. MÄTTO et al (2006) relataram o desenvolvimento iogurte probiótico suplementado com três diferentes linhagens, a saber: *Lactobacillus* F19, *L. acidophilus* NCFB 1748 e *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12, que se mostraram persistentes no trato gastrointestinal humano, com recuperação de 79-100% nas fezes dos consumidores. KONGO et al (2006) desenvolveram leite fermentado de cabra, utilizando uma cultura mista de *L. acidophilus* e *B. animalis* que apresentou excelente desempenho ao longo da estocagem do produto.

De forma geral, as cepas probióticas podem ser adicionadas em dois momentos: no início do processo, junto com as bactérias do iogurte, ou no final do processo, após a fermentação ter ocorrido. No primeiro caso, a bactéria probiótica vai participar de todas as mudanças que ocorrem no mix que está sendo fermentado e pode tirar proveito dos peptídeos que são liberados pela relação simbiótica entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Consequentemente, resultará em maior multiplicação devido à mudança gradativa do pH ao longo do processo, estando com isso, melhor adaptada e com maior capacidade para sobrevivência ao longo da estocagem do produto. No segundo caso, o repentino contato com o mix

do produto, já em elevada acidez, pode causar um estresse para as cepas probióticas, implicando em perda de viabilidade (CHAMPAGNE & GARDNER, 2005).



**Figura 2** - Relação simbiótica de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* na produção do iogurte  
Fonte: WALSTRA et al (2006).

A primeira opção parece ser mais prática e compatível com a rotina do laticínio, bem como a realização do processo fermentativo a 45°C, normalmente utilizado na fabricação do iogurte. Embora bactérias probióticas apresentem temperatura ótima de crescimento na faixa de 37-40°C (SHAH, 1997), é relatado a manutenção da viabilidade quantitativamente superior ao recomendado para exercer benefícios à saúde do consumidor em iogurtes que foram submetidos a temperatura de 45°C (DONKOR et al, 2006; 2007).

## 5.5 - Rompimento do gel

Essa etapa é relevante apenas para a produção de iogurtes batidos e, como não pode ser retirada do processamento, recomenda-se que seja executada de forma padronizada, o que implicará em um mesmo tempo para todos os lotes do produto. Isso significa que a mesma quantidade de oxigênio vai ser reincorporada nos iogurtes, evitando oscilações nesse parâmetro. Bactérias probióticas, por

serem isoladas do intestino humano, apresentam metabolismo anaeróbio ou microaerófilo, e a exposição ao oxigênio implicará em problemas metabólicos e morte celular (TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004a). A esse fenômeno denomina-se estresse ao oxigênio. Breve exposição sobre o assunto será realizada posteriormente ao longo do texto.

## **5.6 - Adição de polpas de frutas e/ou açúcar**

A adição de sucos e/ou polpas de frutas é uma tendência do mercado de iogurtes que tem como objetivo o atendimento ao mercado consumidor, na busca por inovação e diversidade nos produtos. Iogurtes de diversos sabores têm sido produzidos, muitas vezes, aproveitando sabores exóticos, visando agregar valor a frutas, que são já apreciadas *in natura* pela população e que muitas vezes tem sua produção destinada apenas à exportação. Do ponto de vista tecnológico, o amplo domínio de iogurtes com sabores pode esconder uma falta de controle do processo fermentativo e da etapa de resfriamento em pequenos laticínios, e visa encobrir um gosto exageradamente ácido dos iogurtes. O uso de açúcar, em especial no Brasil, é exagerado, e pode atingir 12-15% (p/v) da formulação do iogurte. Tem sido igualmente mostrado que uma elevada quantidade desse ingrediente (12-16% p/v) - pode prejudicar a viabilidade de bactérias do iogurte ao longo da estocagem do produto, pela diminuição da quantidade de água livre, que é essencial para a sobrevivência de qualquer microorganismo (SHAH & RAVULA, 2000).

Para iogurtes probióticos, torna-se fundamental que a polpa ou suco da fruta que será utilizada não tenha substâncias em sua composição que causem inibição do metabolismo da bactéria probiótica. Dessa forma, testes preliminares com diferentes concentrações da polpa devem ser realizados para verificação da sua compatibilidade com a linhagem a ser utilizada. BURITI et al (2007) relatam a inibição de crescimento de *Lactobacillus acidophilus* em mousse adicionado de suco concentrado de maracujá e atribuem a perda de viabilidade a componentes presentes no suco da fruta. Entretanto, a fabricação de iogurtes probióticos adicionados de polpas de frutas tem sido relatada sendo observado, que, em

alguns casos, como o açaí, existe influência positiva para a viabilidade da cepa probiótica (ALMEIDA et al, 2008; ESPIRITO SANTO et al, 2010). Outras alterações na composição do iogurte, como o perfil de ácidos graxo (ESPIRITO SANTO et al, 2010) parece ser benéfico. A utilização de polpa de banana também tem mostrado não interferir de forma negativa na funcionalidade do iogurte (BAKIRCI & KAVAZ, 2008) assim como níveis de 5% ou 10% de polpas de manga, morango e maracujá em iogurtes suplementados com *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 e *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* LAFTI B94 (KAILASAPATHY et al, 2008). Esses resultados reforçam a idéia de que há relação com a linhagem probiótica utilizada.

## **5.7 - Estocagem**

Como qualquer produto perecível, iogurtes são previamente embalados em sistemas de materiais plásticos e mantidos sobre refrigeração (0-10°C) ao longo da sua vida de prateleira, que em média está prevista para 30 dias. A manutenção de temperaturas baixas é necessária para evitar uma demasiada atividade metabólica das culturas, o que poderia gerar um gosto demasiadamente ácido no produto, repercutindo negativamente em sua aceitação pelo consumidor (TAMINE & ROBINSON, 2007). Durante a estocagem, o produto é submetido ao estresse ácido, causado pelo decréscimo de pH, fenômeno denominado pós-acidificação, ao estresse oxidativo, que tem como fonte o oxigênio que permeia de forma contínua pelos sistemas de embalagens plásticas. A fundamentação teórica de ambos fenômenos será explicada posteriormente.

Diferentes temperaturas de estocagem para iogurtes probióticos têm sido mencionadas e parece haver uma temperatura que otimize a sobrevivência da cepa probiótica utilizada na fabricação do iogurte (MORTAZAVIAN et al, 2006a,b). Isso sugere que esse fator pode ter influência na viabilidade das cepas probióticas e é específico para cada cepa. Isso teria implicações no transporte do produto até os pontos de venda e na própria logística da disposição dos produtos nas gôndolas, que deveriam separar os iogurtes probióticos de acordo com a cepa

mencionada no rótulo do produto. Esse fato merece mais detalhada investigação, sendo dispensável afirmar que isso resultará em um grande transtorno do ponto de vista operacional.

Desta forma, é recomendado que não haja distinção na escolha deste parâmetro na temperatura de estocagem dos iogurtes probióticos em relação aos convencionais, na medida em que soluções tecnológicas apresentadas anteriormente podem resultar em altas populações viáveis dos microorganismos, compensando qualquer perda que possa ocorrer nesta etapa.

## **6 - O ESTRESSE DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS EM IOGURTES**

O amplo domínio e a preferência dos consumidores por iogurtes como veículos de culturas probióticas está relacionada mais à reputação prévia associada destes com produto naturalmente saudável em sua memória do que com os obstáculos tecnológicos envolvidos em sua produção (SANDERS & MARCO, 2010). Do ponto de vista de tecnologia, o processamento de iogurte suplementado com culturas probióticas não é tarefa fácil, existindo a necessidade de luta constante com as etapas existentes durante a fabricação do produto para manterem sua viabilidade, tornando o produto funcional.

Fala-se em três grandes adversidades (estresses) enfrentadas pelas bactérias probióticas em iogurtes: o estresse ácido, causado pela contínua queda do pH do produto ao longo da estocagem (pós-acidificação), o estresse oxidativo, causado pela exposição ao oxigênio que permeia através das embalagens plásticas e o estresse pelo frio, causado pela exposição às baixas temperaturas advindas da estocagem refrigerada.

Bactérias probióticas em iogurtes são rigorosamente submetidas aos três estresses, enquanto que apenas o último estresse é comumente encontrado em outros produtos lácteos, como queijos, sorvetes e sobremesas refrigeradas.

### **6.1- Estresse ácido (*acid stress*).**

A relação simbiótica exercida durante a fermentação pelas culturas do iogurte tem como produto principal a produção de ácido láctico, utilizando como substrato a lactose, o que tem reflexo direto no abaixamento do pH. O decréscimo desse parâmetro ao longo da estocagem refrigerada do iogurte é denominado pós-acidificação e é causado pelo metabolismo do *L. bulgaricus*, que se multiplica de forma descontrolada mesmo em baixos valores de pH (LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001). Como bactérias probióticas, em especial Bifidobacteria spp, apresentam pouco ou nenhuma multiplicação em baixos valores de pH (SHAH, 1997), torna-se importante que sejam elaboradas soluções para lidar com essa problemática que se apresenta de forma clara em desenvolvimento de iogurtes probióticos.

Com exceção de algumas poucas espécies do gênero *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, bactérias lácticas são neutrófilas, ou seja, apresentam pH ótimo de crescimento entre 5 e 9. Tolerância ao ambiente ácido (AT) nesse grupo microbiano aumenta em dois distintos estados fisiológicos: durante a fase exponencial, uma resposta adaptativa denominada L-ATR pode ser desenvolvida através da exposição do microorganismo aos ambientes com valores de pH baixos, porém não letais e (b) após a entrada da fase estacionária, onde AT cresce como resultado de uma indução, a exposição ao estresse de forma geral, sendo essa resposta independente do pH do ambiente onde se encontra o microorganismo (DE GUCHTE et al, 2002). Contudo, tem-se mostrado que AT em algumas cepas probióticas se manifesta apenas na fase estacionária (WADDINGTON et al, 2010).

Bactérias lácticas e bifidobacterias possuem algumas maneiras de expressar o AT, sendo a mais importante a presença da enzima FoF1-ATPase. FoF1-ATPase é uma enzima de várias subunidades, compreendendo uma porção catalítica (F1) que incorpora as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$  para hidrólise do ATP e parte da membrana (Fo), incluindo as subunidades a, b e c. A função da FoF1-ATPase é dupla: primeiramente, serve como mecanismo para síntese de ATP e posteriormente, como um meio de exclusão de prótons. Entretanto, como

bactérias probióticas não possuem cadeia respiratória, a atuação da enzima se resume à última função (CORCORAN et al, 2008). De fato, FoF1-ATPase é crucial para manutenção da homeostase, em baixos valores de pH, e sua presença tem sido verificada em diversas linhagens probióticas, como *L. casei* e *B. longum* (MATSUMOTO et al, 2004; TAKAHASHI et al, 2007; CHEN et al, 2009; WADDINGTON et al, 2010), ainda que com atividade máxima em diferentes valores de pH.

Solução tecnológica mais simples para enfrentar o estresse ácido consiste em promover uma prévia exposição da linhagem aos valores mais baixos de pH, por pequeno período de tempo, induzindo dessa forma, uma tolerância do microorganismo (SANZ, 2007), que tem sido aplicado com sucesso (MAUS & INGHAM, 2003). Adicionalmente, pode resultar em vantagens tecnológicas, na medida em que linhagens ácido-resistentes mostraram maior velocidade de fermentação e atividade enzimática, como as glucosidases, que favorece sua função metabólica e residência no intestino (SANZ, 2007). Outras opções, como a utilização de linhagens selecionadas e/ou modificadas geneticamente de *L. bulgaricus* com menor velocidade metabólica, o que resulta em um decréscimo mais lento de pH e menor atividade proteolítica (MÖLLER et al, 2007; ONGOL et al, 2007), e a microencapsulação com prebióticos (IVER & KAILASAPATHY, 2005). É importante reiterar que a retirada de *L. bulgaricus* do processo de fabricação do iogurte, que seria a alternativa mais fácil, prática e econômica, implicará em questões regulatórias, descaracterizando o produto; de acordo com a legislação nacional e de muitos outros países, é obrigatório existir na formulação do iogurte células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (BRASIL, 2007).

Como em unidades industriais, isso representa demanda de quadro de colaboradores especializado na Unidade Produtora e estrutura própria para a realização dos testes. Recomenda-se busca de orientação técnica com o fornecedor da cultura probiótica, para obter informações a respeito da fisiologia e características da mesma. Em termos de processo, deve se ter atenção com relação ao pH final da fermentação durante a fabricação do iogurte.

## 6.2- Estresse oxidativo (*oxygen or oxidative stress*)

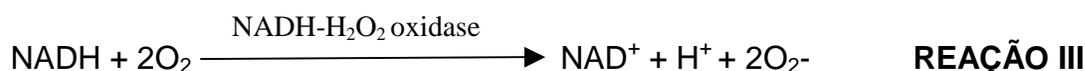
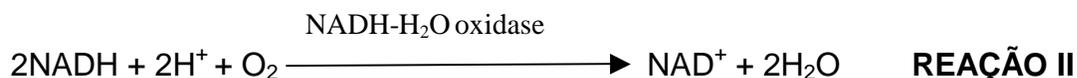
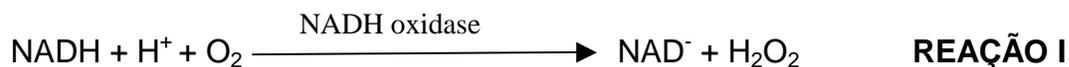
Bactérias probióticas apresentam como habitat original o intestino humano, sendo dotadas de metabolismo anaeróbio ou microaerófilo. Conseqüentemente, exposição dessas bactérias a esse composto resulta morte celular (TALWAKAR & KAILASAPATHY, 2004a). Durante o processamento do iogurte, para *S. thermophilus* consome todo o oxigênio e exercer sua função no processo fermentativo, que é incorporado nas etapas de homogeneização e inoculação das culturas lácticas. Contudo, haverá reincorporação do oxigênio nas etapas de rompimento do gel (iogurte batido) e no enchimento, que permanece de forma contínua ao longo da estocagem do produto, na medida em que são utilizadas embalagens plásticas de permeabilidade variável ao oxigênio (TALWAKAR & KAILASAPATHY, 2004b).

O oxigênio sozinho é incapaz de causar danos a célula microbiana, entretanto, sua parcial redução em água leva ao aparecimento de espécies reativas ao oxigênio e que são tóxicas as bactérias probióticas (CORCORAN et al, 2007). De fato, a toxicidade ao oxigênio é geralmente atribuída as espécies reativas como  $O_2^-$  (superóxido) e  $OH^-$  (ânion hidroxila) que atacam proteínas, lipídios e ácidos nucleicos constituindo-se uma das principais causas da morte celular. Ahn et al (2001) relataram que a exposição ao oxigênio causou diversos danos ao *B. longum*, entre elas, inibição da multiplicação celular, bem como decréscimo do comprimento da cadeia de ácidos graxos da membrana, com alteração da turbidez e rigidez.

Bactérias probióticas apresentam diferentes formas de enfrentar o estresse causado pelo oxigênio, sendo por evitar a formação destas espécies oxidativas (eliminando-as por degradação ou sequestro) ou reparando os danos causados por tal exposição (DE GUCHTE, 2002).

A falta do oxigênio nos microorganismos anaeróbios impede que exista um acceptor final de elétrons no seu metabolismo, e devido a isso, o substrato se submete a uma série de reações oxidativas e redutivas por nucleotídeos de piridina, como o NADH (TALWAKAR & KAILASAPATHY, 2004a). A forma mais

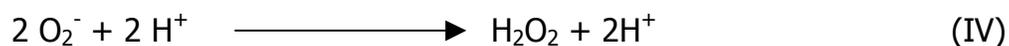
simples de oxidação do NADH é pela redução do oxigênio molecular através da atividade da enzima NADH oxidase, que está presente em todas as bactérias lácticas, em dois tipos: NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidase e NADH-H<sub>2</sub>O oxidase (reações I,II e III - Figura 3).



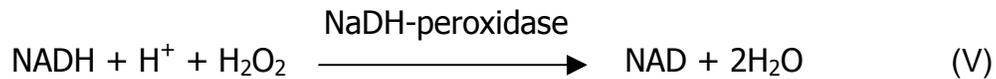
**Figura 3** - Reação de NaOH Oxidase com bactérias lácticas

Fonte: CONDON (1987)

Verifica-se que há possibilidade de produção do ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) que pode ser posteriormente reduzido de forma espontânea em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou pela atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), através da reação IV:



Acumulação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^-$  pode resultar em produtos de oxidação de compostos que podem ter efeito bacteriostático para bactérias lácticas. Adicionalmente, altas concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular inibem a frutose-6-fosfofrutocetolase, uma enzima chave no metabolismo das bifidobactérias (SHAH, 1997). Dessa forma é necessária a conversão dessas duas espécies reativas ao oxigênio, para poder tornar possível a vida das bactérias probióticas em presença desse gás. Isso é possível pela presença da enzima NADH peroxidase, presente em bactérias lácticas que reduz  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ , conforme reação V.



Nesse sentido, tem sido relatada a correlação entre os níveis de duas enzimas (NAD-oxidase e a NAD-peroxidase) e a suscetibilidade das bifidobactérias ao oxigênio, na medida em que essas enzimas exercem significativa atividade na maioria das espécies de *Bifidobacterium* spp., que são aerotolerantes (ROY, 2005).

A exposição ao oxigênio é um tema relevante no processamento de iogurtes probióticos na medida em que a simples mudança do sistema de embalagem plástica para vidro (que apresentam permeabilidade nula ao oxigênio) traz também problemas de manuseio. Ao passo que o uso de sistema de embalagem ativa requer educação do consumidor para este benefício já que ocorre encarecimento dos custos do produto bem como a adição de compostos químicos que enfrentam a reação negativa dos consumidores, que desejam um produto industrializado com o mínimo de aditivos ou compostos químicos presentes em sua formulação, conforme constatado em estudo recente no Brasil (BEHRENS et al, 2010). De fato, sistemas de embalagens para iogurtes probióticos têm recebido pouca atenção da literatura e é um tópico que merece melhor investigação.

Diversas alternativas têm sido mencionadas para minimizar o estresse oxidativo em iogurtes probiótico. Dentre elas, destaca-se a adição de ácido ascórbico (DAVE & SHAH, 1997), eletroredução do leite (BOLDUC et al, 2006), poliestireno laminado com material de alta barreira ao oxigênio – Nupack (MILLER et al., 2002), sistemas de embalagens ativas (MILLER et al, 2003), microencapsulação (TALWALKAR & KAILASAPAHY, 2003), uso de sistemas de embalagens plásticas de diferentes polaridades e cristalinidades (JASSON et al, 2001) e de frações redutoras de membranas de células bacterianas – Oxyrase (ORDONEZ et al, 2000), entre outras. Igualmente, a adição de *Lactococcus lactis* no leite, visando o decréscimo do potencial de oxirredução (JEASON et al, 2009) também tem apresentado impacto positivo, com a vantagem de que esse

microorganismo pode ainda favorecer o crescimento de Bifidobacterias (YONEZAWA et al, 2010).

Recentemente, foi relatado que a adição de nitrogênio durante o processamento de iogurte de forma simultânea à adição das culturas e a posterior fermentação a 37°C pode resultar em um decréscimo da quantidade de oxigênio dissolvido no produto, antes da produção de ácido (HORLUCHI et al, 2009), podendo isso ser uma alternativa promissora, embora necessite de maior investigação.

ZHAO e LI (2008) propõem uma solução química para a resolução do estresse oxidativo e do estresse ácido, denominado "*destressing effect*". Para o primeiro, há a proposta de adicionar um agente alcalino (citrato de sódio ou carbonato de cálcio) para neutralizar o ácido lático produzido durante o processo fermentativo. O agente redutor seria adicionado em níveis aceitáveis, antes ou depois dessa etapa. Para o segundo, a adição de uma substância antioxidante, como ascorbato de sódio ou D-ascorbato, em quantidade de 4g/Kg, reagiriam com o ânion superóxido ou peróxido de hidrogênio, eliminando o estresse causado pelo oxigênio. Entretanto, essas soluções, as quais se mostraram satisfatórias com *L. acidophilus* e *B. bifidum*, necessitam de maior investigação.

Do ponto de vista industrial a maneira mais simples de solução desse problema consiste na indução do estresse oxidativo, expondo a bactéria probiótica a elevadas concentrações de oxigênio, tal como no estresse ácido e uso de linhagens de *S. thermophilus* com maior capacidade de consumo de oxigênio (TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004c). Novamente, busca por orientação técnica com o fornecedor das culturas será uma alternativa simples e eficaz.

### **6.3 - Estresse pelo frio (*cold stress*)**

Considerando sua temperatura ótima de crescimento, bactérias lácticas apresentam comportamento mesofílico ou termofílico. Isso contrasta com as temperaturas enfrentadas durante a estocagem de iogurtes probióticos, que é realizada sob refrigeração. De um ponto de vista fisiológico, isto proporciona a

redução da fluidez da membrana bem como influencia funções do DNA e RNA, relacionadas à transcrição e tradução. Um outro fator relevante é que ocorre reduzida atividade enzimática, e há um aumento de sensibilidade aos sais biliares e ao cloreto de sódio, sugerindo danos à membrana (CORCORAN et al, 2007). Para enfrentar todas essas dificuldades advindas da exposição às baixas temperaturas, bactérias lácticas e probióticas têm desenvolvido um mecanismo de tolerância ao frio (CT). O CT é representado por síntese de determinadas proteínas que mantêm a fluidez da membrana aumentando a proporção de ácidos graxos insaturados e de menor cadeia, objetivando melhorar a fluidez e reduzindo o resfriamento do DNA, com adaptação dos mecanismos de transcrição e tradução às baixas temperaturas, permitindo a viabilidade celular (DE GUTCHE et al, 2002). As proteínas mais fortemente induzidas durante o CT são de baixo peso molecular (7,5 KDa) e são denominadas proteínas do choque frio (*cold-shock proteins*, CSP). CSP têm sido identificadas em diversas bactérias probióticas, como *L. acidophilus*, *L. casei* e *B. animalis* e tem mostrado variar amplamente, sendo relatado mínima sobrevivência até 40% de sobrevivência para *L. acidophilus* (CORCORAN et al, 2007).

O estresse pelo frio é inevitável durante o processamento de leites fermentados e deve ser entendido como uma barreira intrínseca durante o processamento de iogurtes probióticos. Contudo, tem sido mostrado que sua influência na sobrevivência da cepa probiótica ao longo da estocagem do iogurte é mínima, desde que as recomendações observadas nas etapas anteriores ao processamento do iogurte sejam seguidas. Neste contexto, é interessante que sejam observados uma ou mais ações por parte da Unidade Industrial, como: suplementação do leite, uso de culturas probióticas e iniciadoras compatíveis, entre outras.

## **7 - PERSPECTIVAS**

Iogurtes apresentam-se como o principal veículo para suplementação com culturas probióticas em todo o mundo. Embora sua fabricação não deva diferir do iogurte tradicional, alguns cuidados tornam-se necessários para garantir a funcionalidade do produto ao longo de toda sua vida de prateleira. Espera-se que as informações compiladas neste capítulo sejam observadas na rotina industrial de uma unidade produtora de produtos lácteos e que sejam de utilidade para que esta diversifique seus produtos e planeje de forma consolidada sua entrada neste lucrativo e promissor mercado, que é o mercado de iogurtes probióticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, J.B.; HWANG, H-J.; PARK, J.-H. Physiology response of Oxygen-Tolerant anaerobic *Bifidobacterium longum* under oxygen. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.11, p. 443-451, 2001.

ALLGEYER, L.C.; MILLER, M.J.; LEE, S.-Y. Drivers of liking for yogurt Drinks with prebiotics and Probiotics. *Journal of Food Science*, v.75, p. 212-219, 2010.

ALMEIDA, M.H.B.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; MOURA, M.R.L.; FREITAS, M.C.J. CARVALHO, L.M.J. Effect of the açai pulp on the sensorial features of the probiotic yogurts. *International Journal of Prebiotic and Probiotic*, v.4, p.41-44, 2009.

ALMEIDA, M.H.B.; ZOELLNER, S.S.; CRUZ, A.G.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J.; SANT'ANA, A.S. Potentially probiotic açai yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, v.61, p. 178-182, 2008.

AMAGASE, H. Current Marketplace for probiotics: A Japanese Perspective *Clinical Infectious Disease*, v.46, p. S73-S75, 2008.

ANUKAM, K.C.; OSAZUWA, E.O.; REID, G. Knowledge of Probiotics by Nigerian Clinicians. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, v.1, p. 57-63, 2006.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Viability of probiotic micro-organisms during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, v.58, p. 169-173, 2005.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado proteico de soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. *Alimentos e Nutrição*, v.15, p.117-14, 2004.

ANEMA, S.G. On the heating milk, the dissociation of k-casein from the casein micelles can precede interactions with the desaturated whey protein. *Journal of Dairy Research*, v.75, p. 415-421, 2008.

ARES, G.; GIMÉNEZ, A.; DELIZA, R. Influence of three non-sensory factors on consumer choice of functional yogurts over regular ones. *Food Quality and Preference*, v. 21, p. 361-367, 2010.

ATAIE-JAFAN, A.; LARIJANI, B.; MAJID, H.A.; TAHBAZ, F. Cholesterol-Lowering Effect of Probiotic Yogurt in Comparison Ordinary Yogurt in Midly to Moderately Hypercholesterolemic Subjects. *Annals of Nutrition & Metabolism*, v.14, p. 22-27, 2009.

AURELI, P.; FIORE, A.; SCALFARO, C.; CASALE, M.; FRANCIOSA, G. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, v.137, p. 265-273, 2010.

BAKIRCI, I.; KAVAZ, A. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *International Journal of Dairy Technology*, v.61, n.3, p. 270-276, 2008.

BEHRENS, J.H.; BARCELLOS, M.N.; FREWER, L.J.; NUNES, T.P.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control*, v. 21, p. 963-969, 2010.

BLANCO, J.L.; DOMINGUES, L.; GOMEZ-LUCIA, E.; GARAYZABAL, J.F.F.; GOYACHE, J.; SUAREZ, G. Stability of aflatoxin M1 during manufacture and storage of yoghurt. *Milchwissenschaft*, v. 14, p. 1373–1376, 1988.

BLEIEL, J. Functional foods from the perspective of the consumer: How to make it a success? *International Dairy Journal*, v.20, p. 303-306, 2010.

BOLDUC, M.-P., RAYMOND, Y.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C.P.; VUILLEMARD, J.-C. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *International Dairy Journal*, v.16, p. 1038-1048, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.46 de 23 de outubro de 2007. Disponível em : [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Acesso 25 Fev. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso 26 Maio 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 10, de 25 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso 26 Maio 2007.

BRUHN, C.M.; BRUHN, J. C.; COTTER, A.; GARRETT, C.; KLENK, M.; POWELL, C.; STANFORD, G.; STEINBRING, Y.; WEST, E. Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *Journal of Food Science*. v. 67, p.1969-72, 2002.

BURITI, F.C. A.; KOMATSU, T. R.; SAAD, S. M.I.. Atividade das polpas de maracujá (*Passiflora edulis*) e goiaba (*Psidium guajava*) sobre *Lactobacillus acidophilus* em musses refrigeradas. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p. 315-317, 2007.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, v. 39, p. 203-211, 2006.

CAPDEVILA, F.; MARTÍ-HENNEBERG, C.; CLOSA, R.; SUBIAS, J.E.; FERNÁNDEZ-BALLART, J. Yoghurt in the Spanish diet: nutritional implications and socio-cultural aspects of its consumption. *Public Health Nutrition*, v.6. p. 333-340, 2003.

CARLUCCI, A.; MONTELEONE, E.; BRAGHIERI, A.; NAPOLITANO, F. Mapping the effect of information about animal welfare on consumer liking and willingness to pay for yogurt. *Journal of Sensory Studies*, v.24, p. 712-730, 2009.

CHADAN, R.C. Enhancing market milk by adding cultures. *Journal of Dairy Science*, v.82, p. 2245-2256, 1999.

CHAMPAGNE, C.; N.J. GARDNER, N.J. Challenges in the addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, v.45, p. 61-84, 2005.

CHEN, X.; SUN, Z.; MENG, H.; ZHANG, H. The acid tolerance association with expression of H<sup>+</sup>-ATPase in *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, p. 272-276, 2009

CILDIR, S.K.; GERMEC, D.; SANDALLI, N.; OZDEMIR, F.I.; ARUN, T.; TWETMAN, S.; CAGLAR, E. Reduction of salivary streptococci mutants in orthodontic patients during daily consumption of yogurt containing probiótico bacteria. *European Journal of Orthodontics*, v.31, p. 407-411, 2009.

COEURET, C.; MICHELINE GUEGUEN, M.; VERNOUX, J.P. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 47, p.147-156, 2004.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO; J.; SALMINEN, S. Development of New Probiotics by Strain Combinations: Is It Possible to Improve the Adhesion to Intestinal Mucus?. *Journal of Dairy Science*, v.90, p. 2170-2176, 2007.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Review*, v. 46, p. 269-281, 1987.

CORCORAN, B.M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G., ROSS, R.P. Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design*, v.14, p. 1382-1399, 2007.

CRUZ, A.G. Processamento de Iogurte Probiótico com Glicose oxidase. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; CADENA, R.S.; GRANATO, D.; MORTAZAVIAN, A.; BOLINI, H.M.A. Sensory Evaluation of probiotic, prebiotic and symbiotic foods: relevance for product development. Comprehensive review in Food Science and Safety, in press...

CSUTAK, E.; SOCACIU, C. Influence of raw milk quality on the multiplication of probiotic microorganisms. Bulletin UASVM, v.65, n.2, p.222-226, 2008.

DAMIN, M.R.; ALCÂNTARA, M.R.; NUNES, A.P.; OLIVEIRA, M.N. Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. LWT - Food Science and Technology, v.42, p. 1744-1750, 2009.

DAVE, R. I.; SHAH, N.P. Effectiveness of Acid Ascorbic as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yogurts Made with Commercial Starters Cultures. International Dairy Journal, v.7, p.435-443, 1997.

DE ALMEIDA, M.D.V.; PINHÃO, S.; STEWART-KNOX, B.; PARR, H.J.; GIBNEY, M.J. An overview of findings from a six-country European survey on consumer attitudes to the metabolic syndrome, genetics in nutrition, and potential agro-food technologies. Nutrition Bulletin, v.31, p. 239-246, 2006.

DE GUTCHE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKINA, T.; EHRILICH, S.D.; MAGUIN, E. Stress response in lactic acid bacteria. Antonie von Leeuwenboek, v.187, p. 187-216, 2002.

DONATO, L.; GUYOMARC, H. Formation and properties of the whey protein/k-casein complexes in heated skim milk – a review. Dairy Science and Technology, v. 89, p. 3-29, 2009.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, v. 17, p. 657-665, 2007.

DONKOR, O.N.; NILMINI, S.L.I.; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. International Dairy Journal, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DRAKE, M. A. Sensory Analysis of Dairy Foods. Journal of Dairy Science, v. 90, p. 4925-4937, 2007.

DUNLAP, B.S.; HONGWEI, Y. ELITSUR, Y. The probiótic content of Commercial Yogurts in West Virginia. *Clinical Pediatrics*, v.48, p. 522-527, 2009.

ESPÍRITO SANTO, A.P.; SILVA, R.C.; SOARES, A.S.M.; ANJOS, D.; . GIOIELLI, L.A.; OLIVEIRA, M.N. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. *International Dairy Journal*, v.20, p. 415-422, 2010.

FABIAN. E.; MARJCHRZAK. D.; DIEMINGER, B.; MEYER, E.; ELMADFA, I. Influence of probiótico and conventional yogurt on the status of Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> in young healthy women. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v.52, p. 29-36, 2008.

FALK, M. The impact of Regulation on Information Consumers about the Health Promoting Properties of Functional Foods in the USA. *Journal of Food Science*, v.69, p. 143-145, 2004.

FISCHER, A.R.H.; FREWER, L.J. consumer familiarity with food and the perception of risks and benefits. *Food Quality and Preference*, v.20, p. 576, 585, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. FAO/WHO. Technical Meeting on Prebiotics. 12 pp. 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. FAO/WHO. Available from. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/ WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. 2001. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport\\_en.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf)>

FONSECA, G.P.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F., SILVA, R.; MOURA, M.R.L.; CARVALHO, L.M.J. Carvalho. Resíduos de antibióticos em leite UHT. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, p. 451-453, 2009.

GALDEANO, C.M.; LEBLANC, A.M.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; PERDIGÓN, G. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *Journal of Dairy Research*, v.76, p. 446-454, 2009.

GILL, H.S. Stimulation of the Immune System by Lactic Cultures. *International Dairy Journal*, v.8, p. 535-544, 1998.

GOBBATO; N., RACHID, M.; PERDIGÓN,G. Anti-inflammatory effect of yoghurt in an experimental inflammatory bowel disease in mouse. *Journal of Dairy Research* , v.75, p. 497-504, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Comprehensive Review in Food Science and Safety, v.9, p. 292-302, 2010.

GUARNER, F.; PERDIGÓN, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yogurt cultures be considered probiotic? British Journal of Nutrition, v.93, p. 783-786, 2005.

GUN, O.; ISIKLI, N.D. The effect of fat and non fat dry matter concentration and storage time on the physical properties and acidity of yogurts made with probiotic cultures. Food Science and Technology International., v.12, p. 467-476, 2006.

GUN, O.; ISIKLI, N.D. The effect of fat and non-dry matter of milk, and starter type on the rheological properties of set during the coagulation process. International Journal of Food Science and Technology, v.42, p. 352-358, 2007.

HAILU, G.; BOECKER, A.; HENSON, H.; CRANFIELD, J. A conjoint analysis of functional foods and nutraceuticals in Canada: a conjoint study using probiotics. Appetite, v. 52, p. 257-265, 2009.

HATAKKA, K.; SAVILAHTI, E.; MEURMAN, J.H.; POUSSA, T.; NASE, L.; SAXELIN, M.; KORPEIA, R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomized trial. British Medical Journal, v. 323, p. 1327-1329, 2001.

HE, T.; PRIEBE, M.G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H.J.M.; RAANGS, G.C.; ANTOINE, J.M.; WELLING, G.W.; VONK, R.J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microflora in lactose-intolerant subjects. Journal of Applied Microbiology, v.104, p. 595-604, 2006.

HECK, M.C.; SANTOS, J.S.; BOGUSZ JUNIOR, S.; COSTABEBER, I.H., EMANUELLI, T. Estimation of children exposure to organochlorine compounds through milk in Rio Grande do Sul, Brazil. Food Chemistry, v. 102, p. 288-294, 2007

HEKMAT, S.; REID, G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. Nutrition Research, v. 26, p. 163-166, 2006.

HORLUCHI, H.; INOUE, E.; FUKUI, M.; SASAKI, Y.; SAAKI, T. A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen concentration. Journal of Dairy Science v.92, p.4112-4121, 2009.

HUSSAIN, I. ; RAHMAN, A.; ATKINSON, N. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. Pakistan Journal of Nutrition, v.8, p.9-12, 2009.

IYER, C.; KAILASAPAHTY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. Journal of Food Science v.70, p.18-23, 2005.

JAYAPRAKASHA, H.M.; YOON, Y.C.; PAIG, D.-H. Probiotic functional foods and Health Claims: an overview. Food Science and Biotechnology, v.14, p.523-528, 2005.

JASSON, S.E.A., EDSMAN, C.J.; GEEDE, U.W.; HEDENQVIST, M.S. Packaging Materials for Fermented Milk: effect of material Crystallinity and Polarity on Food Quality. Packaging Technology and Science, v.18, p. 119-127, 2001.

JEASON, S.; HILGERT, M-O.; COQUILLARD, C.; SEUKPANYA, C.; FAIVELEY, M.; NEVEU, P.; ABRAHAM, C.; GEORGESCU, V.; FOURCASSIÉ, P.; BEUVIER, E. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. International Journal of Food Microbiology v.131, p.75-81, 2009.

JOHANSEN, S.B.; NAES, T.; OYAAS, J.; HERSLETH, M. Acceptance of calorie-reduced yogurt: Effects of sensory characteristics and product information. Food Quality and Preference, v.21, p. 13-21, 2010.

JOSEPH, P.J.; DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Antagonism between yogurt bacteria and probiotic bacteria isolated from commercial starter cultures, commercial yogurts, and a probiotic capsule. Food Australia, v.50, p.20–23, 1998.

KAILASAPATHY, K.; I. HARMSTORF, I; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* in stirred fruit yogurts. LWT-Food Science and Technology, v.41, p. 1317-1322, 2008.

KHURANA, H.K.; KANAWJIA, S.K. Recent trend in Development of Fermented Milks. Current Nutrition & Food Science, v. 3, p. 91-108, 2007.

KIM, J.G.; LEE, E.; KIM, S.H.; WHANG, K.Y.; OH, S.; IMM, J-Y. Effect of a *Lactobacillus casei* 939 fermented milk product on bone metabolism in ovariectomised rats. International Dairy Journal, v.19, p. 690-695, 2009.

KONGO, J.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X. Manufacturing of fermented goat milk with a mixed starter culture of *Bifidobacterium animalis* and *Lactobacillus acidophilus* in a controlled bioreactor, Letters in Applied Microbiology, v. 42, p. 595–599, 2006.

- LOURENS- HATTINGH, A.; B.C. VILJOEN, B.C. Yogurt as a probiotic food carrier. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 1-17, 2001.
- LOWEL, A.; WORSLEY, A. Social drivers as predictors of yogurt consumption in China. *Food Australia*, v.55, p. 42-45, 2003.
- LUCEY, J.A. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, p. 77-84, 2004.
- MARTINÉZ-CANĀVATE, A.; SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; ROMERO, J.; MALDONADO, J.; BOZA, J.; XAUS, J.; OLIVARES, M. A probiotic dairy product containing *L. glasseri* CECT5714 and *L. coryniformis* CRCT5711 induces immunological changes in children suffering from allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 20, p. 592-600, 2009.
- MATER, D.D.G.; BRETIGNY, L.; FIRMESSE, O.; FLORES, M-J.; MOGENET, A.; BRESSON, J-L.; CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiology Letters*, v.250, p. 185-187, 2005.
- MÄTTÖ, J.; FONDÉN, R.; TOLVANEN, T.; VON WRIGHT, A.; VILPPONEN-SALMELA, T.; SATOKARI, R.; SAARELA, M. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1174-1180, 2006.
- MATSUMOTO, M.; SAKAMOTO, M.; BENNO, Y. Dynamics of fecal microbiota in hospitalized elderly fed probiotic LKM512 yogurt. *Microbiology and Immunology*, v.53, p. 421-432, 2009.
- MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H<sup>+</sup>ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, v.93, p. 109-113, 2004.
- MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; WEILL, R.; PERDIGON, G. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 243-249, 2005.
- MEYDANI, S.N.; HA, W.-K. Immunologic effect of yogurt. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71, p. 861-872, 2000.

MEYER, A.L.; MICKSCHE, M.; HERBACEK, I.; ELMADFA, I. Daily intake of Probiotic of Conventional Yogurt has a stimulating Effect on Cellular immunity in young Healthy Women. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v.50, p. 282-289, 2006.

MILLER, C.W.; NGUYEN, M.H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The control of Dissolved Oxygen Content in Probiotic Yogurts by Alternative Packaging Materials. *Packaging Technology and Science*, v.16, p. 61-67, 2003.

MILLER, C.W.; NGUYEN, M.H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The influence of Packaging Materials on the Dissolved Oxygen Content of Probiotic Yogurt. *Packaging Technology and Science*, v.15, p.133-138, 2002.

MILLER, D.D.; ELLIKER, P.R. Effect of Quaternary Ammonium Compounds on Activity of Lactic Acid Starter Bacteria in Milk and Cheese. *Journal of Dairy Science*, v.34, p. 279-286, 1951.

MINTEL INTERNATIONAL GROUP. 2009. The next big thing in health, 2009. Available from: <http://74.125.93.132/search?q=cache>. Accessed Jul 20, 2009.

MÖLLER, C.; BOCKELMAN, W.; AMMANN, A.; HELLER, K.J. Production of yogurt with mild taste by a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mutant with altered proteolytic properties. *Biotechnology Journal*, v.2, p.1-10, 2007.

MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M.R.; MOUSAVI, S.,M.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J.A. Combined effects of temperature related variables on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.61, p. 248-252, 2006a.

MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M.R.; MOUSAVI, S.,M.; REINHEIMER, J.A.; EMAMDJOMEH, Z.; SOHRABVANDI, S.; REZAEI, K. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of probiotic microorganism in freshly made yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, v.59, p.8-11, 2006b.

MOTTAR, J; RASSIER, A. Effect of heat-induced association of whey proteins and casein micelles on yogurt texture. *Journal of Dairy Science*, v.72, p. 2247-2256, 1989.

NAJAFI, M.N.; KOOCHKEI, A.; VALIBAIGY, S. Effects of somatic cell counts on the physicochemical and rheological properties of yoghurt made from sheep's milk. *International Journal of Food Science and Technology*, v.45, p. 713-718, 2010.

NERO, L.A.; MATTOS, M.E.; BARROS, M.A.F.; BELOTI, V.; FRANCO, B.D.G. Resíduos de antibióticos em leite produzido no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 391-393, 2007

NUTRACOM. Probiotics market EU Challenge. Available in [www.nutraingredients.com](http://www.nutraingredients.com). Accessed in 16 março 2007.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, v.300, p.57–62, 2010.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.172-176, 2003.

OLSON, D.W.; ARAYANA, K.J. An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT- Food Science and Technology*, v.41, p. 911-918, 2008.

ONGOL, M.P., SAWATARI, Y.; EBINA, Y.; SONE, T.; TANAKA, M.; TOMITA, F.; YOKODA, A.; ASANO, K. Yogurt fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* H<sup>+</sup>-ATPase defective mutants exhibits enhanced viability of *Bifidobacterium breve* during storage. *International Journal of Food Microbiology*, v.116, p.358-366, 2007.

ORDONEZ, G.A., FUNG, D.Y.C.; EON, I.J. Effect of Oxyrase on the Metabolic Processes of Lactic Acid Bacteria in Frozen Yogurt Mix. *Journal of Rapid Methods of Automation Microbiology*, v.8, p. 71-81, 2000.

ÖZER, B. Strategies for Yogurt Manufacturing. In: Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products (pp 47-96). 2010. Yıldız, F. (ed.) Boca Ranton: CRC Press.

PATTOM, D. Probiotics sets for explosive growth in China. Available in: [www.ap-foodptechnology.com](http://www.ap-foodptechnology.com). Accessed in 16 Fevereiro 2007.

PERDIGÓN, G.; VALDEZ, J.C.; RACHID, M. Antitumor activity of yogurt: study of possible immune mechanisms. *Journal of Dairy Research*, v.65, p. 129-138, 1998.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; RACHID, M.; AGUERO, G.; GOBATTO, N. Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *Journal of Dairy Science*, v.78, p. 1597-1606, 1995a.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; MEDICI, M., VITINI, E., DE GIORI, G.; KAIRYZ, M.N.; HOLGADO, A.R. Effect of yogurt with different storage periods on the immune system of mice. *Milchwissenschaft*, v.50, p. 367-370, 1995b.

PEREG, D.; KIMHI, O.; TIROSH, A.; ORR,N.; KAYOUF, R.; LISHNER, M.; AVIV, L. The effect of fermented yogurt on the prevention of diarrhea in a healthy adult population. *American Journal of Infection and Control*, v.33, p.122-125, 2005.

POHJANHEIMO, T.; SANDELL, M. Explaining the liking for drinking yogurt: the role of sensory quality, food choices motives, health concern and product information. *International Dairy Journal*, v.19, p. 459-466, 2009.

RANADHEERA, R.D.S.C.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, v.43, p.1-7, 2009.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, v.85, p.39-56, 2005.

SABA, A.; VASALLO, M.; SHEPHERD, R.; LAMPILA, P.; ARVOLA, A.; DEAN, M.; WINKELMANN, M.; CLAUPEIN, E.; LAHTEENMAKI, L. Country-wise differences in perception of health-related messages in the cereal-based food products. *Food Quality and Preference*, v.21, p.385-393, 2010.

SACCARO, D. M, TAMINE, A.Y.; PILLEGGI, A.L.O. P.S; OLIVEIRA, M.N. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4°C. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, p.397-404, 2009.

SANCHEZ, B.; REYES-GAVILAN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic Fermented Milks: present and future. *International Journal of Dairy Technology*, v.62, p. 1-10, 2009.

SANCHEZ, B.; CHAMPONIER-VERGÉS, m.-c.; COLLADO, M.C.; ANGLADE, P.; BARAIGE, F.; SAN, Y.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; ZAGORCE, M. Low-pH adaptation and the acid tolerance Response of *Bifidobacterium longum* Biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p. 6450-6459, 2007.

SANDERS, M., MARCO, M.L. Food Format for effective delivery of Probioticc. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, p. 65-85, 2010.

SANDERS, M. How do we know when something called probiótico is really a probiótico? A Guideline for consumers and Health Care Professionals. *Functional Food Reviews*, v.1, p. 3-12, 2009.

SANDERS, M. Use of Probiotics and Yogurts in Maintenance of Health. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v.42, p. 71-74, 2008.

SANZ, Y. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, v.17, p.1284-1289, 2007.

SAULNIER, D.M.A.; SPINKLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 135-141, 2009.

SAXELIN, M. Probiotic Formulations and Applications, the current Probiotics Market and Changes in the Market Place: A European Perspective. *Clinical Infectious Disease*, v.46, p. 76-79, 2008.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; MENDONÇA, A.T. Aspectos Tecnológicos da fabricação de iogurte e queijo com resíduo de antibióticos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 54, p. 13-19, 2000.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 55, p. 127-131, 2000.

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, v.83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N.P. Bifidobacteria: characteristics and potential application in fermented dairy products. *Michwissenschaft*, v.52, p. 16-19, 1997.

SHUNDO, L.; NAVAS, S.A.; LAMARDO, L.C.A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control*, v.20, p.655-657, 2009.

SIEGRIST, M.; STAMPFLI, N.; KASTENHOLZ, H. Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. *Appetite*, v.51, p. 526-529, 2008.

SILVA, E.G.B; PARISOTTO, T.M.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F, BOLINI, H.M.A., SANT'ANA, A.S. Adequacy of Probiotic and Prebiotic Dairy Foods Labeling. *International Journal of Probiotic and Prebiotic*, v.5, p.1-6., 2010.

SODINI, I.; LUCAS, A.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 29-35, 2005.

STAAB, B.; ELCK, S.B.; KNOFLER, G.; JENTSCH, H. The influence of a probiótico milk drink on the development of gingivitis: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology* , v.36, p.850-856, 2009.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v.8,, p. 35-41, 1997.

TAKAHASHI, N.; XIAO, J.-Z.; MIYAJI, K.; IWATSUKI, K. H<sup>+</sup>-ATPase in the acid tolerance of *Bifidobacterium longum*. *Milchwissenschaft*, v.62, p.151-153, 2007.

TALWALKAR, A.I.; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues Intestinal Microbiology*, v.5, p.1-8, 2004a.

TALWALKAR, A.I.; KAILASAPATHY, K.A. A review of oxygen toxicity in probiotic yoghurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive reviews in food science and safety*, V.3, P.117-124. 2004B

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Oxidative stress adaptation of probiotic bacteria. *Michwissenschaft*, 59:140-143, 2004C.

TALWALKAR, A.I.; KAILASAPATHY, K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*, v.58, p.36-39, 2003.

TAMINE, A. Y.; ROBINSON, R.K. *Yogurt: Science and Technology*. 2007. New York: CRC Press. 2007.

THEUNISSEN, J.; BRITZ, T.J.; TORRIANI, S.; WITTHUHN, R.C. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v.98, p.11-21, 2005.

TIMMERMAN, H.M.; KONING, C.J.M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F.M.; BEYNEN, A.C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*, v.96, p. 219-233, 2004.

URBANSKA, M. A.; BHATHENA, J.; MARTONI, C.; PRAKASH, S. Estimation of the potential Antitumor Activity of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* Yogurt Formulation in the Attenuation of Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice. *European Food Research and Technology*, v.54, p. 264-273, 2009.

VÉLEZ, M. P.; HERMANS, K.; VERHOEVEN, T. L. A ; LEBEER, S.E.; VANDERLEYDEN; J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Identification and characterization of starter lactic acid bacteria

and probiotics from Columbian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, v.103, p.666-674, 2007.

VIANA, J. V.; CRUZ, A. G.; ZOELLNER, S. S.; SILVA, R.; BATISTA, A.L. D. Probiotic foods: consumer perception and attitudes. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 43, n.9, p. 1577-1580, 2008.

VINDEROLA, C.G.; P. MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J.A. Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products. *Journal of Dairy Science*, v.85, p. 721-729, 2002.

VIVAR-QUINTANA, A.M.; DELLA-MANO, E.B., REVILLA, I. Relationship between somatic cell counts and the properties of yoghurt made from ewes' milk. *International Dairy Journal*, v.16, p. 262-267, 2006.

XIAO, J.Z.; KONDO, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAJI, K.; OSHIDA, K. ; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers. *Journal of Dairy Science*, v.86, p. 2452-2461, 2003.

YONEZAWA, S.; XIAO, J.Z.; ODAMAKI, T.; ISHIDA, T.; MIYAJI, K.; YAMADA, A.; YAESHIMA, T.; IWATSUKI, K. Improved growth of bifidobacteria by cocultivation with *Lactococcus lactis* subspecies *lactis*. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.1815-1823, 2010.

WADDINGTON, L.; CYR, T.; HEFFORD, M; HANSEN, L.T.; KALMOKOFF, M. Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 1408-1420, 2010.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.; GEURTS, T.J. *Dairy Science and Technology*. 2006. Boca Raton: CRC Press.

WANG, K.-Y.; LI, S.-N.; LIU, C.-S.; PERNG, D.-S.; SU, Y.-C.; WU, D.-C.; JAN, C.-M.; LAI, T.-S.; WANG, T.-S.; WANG, W.-M. Effects of ingesting *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.80, p. 737-741, 2008.

WILLIAMSOM, C. Functional Foods: what are the benefits? *British Journal of Community Nursing*, v.14, p.230 -236, 2009.

YAMAMURA, S.; MORISHIMA, H.; KUMANO-GO, T.; SUGANUMA, S.; MATSUMOTO, H.; ADACHI, H.; SIGEDO, Y.; MIKAMI, A.; MASAYUMA, A.; TAKANO, T.; SUGITA, Y.; TAKEDA,

M. the effect of *Lactobacillus helveticus* fermented milk on sleep and health perception in elderly subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.63, p. 100-105, 2009.

ZHAO, X.H; LI, D. A new approach to eliminate stress for two probiotics with chemicals in vitro. *European Food Research and Technology*, v.277, p.1569-1574, 2008.

ZHU, K.; FAN, Z.; XU, C.; JIA, L. Studies on impact of health factors on yogurt consumption behaviors of Beijing consumers. *Journal of Chinese Institute of Food Science & Technology*, v. 9, p. 185-188, 2009.

## **CAPÍTULO 2**

# **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

Manuscrito submetido ao Journal of Dairy Science –  
formatado de acordo com as normas do periódico

# **OTIMIZAÇÃO DO PROCESSAMENTO DE IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE UTILIZANDO A METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA**

## **RESUMO**

A adição de glicose oxidase representar uma potencial alternativa para aumentar a sobrevivência de bactérias probióticas em iogurte. Ela pode consumir o oxigênio que penetra através da embalagem durante a estocagem, dispensando a adição de aditivos químicos e sem modificações bruscas no processamento do produto. Este trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito da glicose oxidase sobre o aumento da sobrevivência das bactérias probióticas em iogurte. Avaliou-se a otimização do processamento de iogurte probiótico contendo glicose oxidase e glicose, através da metodologia de superfície de resposta (RSM), bem como se determinou a condição ótima operacional para diminuir a concentração de oxigênio dissolvido e maximizar a contagem de *Bifidobacterium longum*. Modelos matemáticos gerados pela RSM descreveram o processo adequadamente, com coeficientes de determinação de 83% para o oxigênio e 94% para *B. longum*, respectivamente. Pela otimização simultânea da função desejável, verificou-se que as concentrações ótimas de glicose oxidase e glicose foram 62,32 e 4,35 ppm, respectivamente, reduzindo o oxigênio para 0,52 ppm e mantendo a contagem de *B. longum* em 8,74 log UFC/mL .

## 1 - INTRODUÇÃO

Produtos lácteos e bactérias probióticas possuem uma relação estabelecida há mais de 2.000 anos, quando as pessoas consumiam grandes quantidades de leite fermentado como kefir e iogurte. Mais recentemente, pesquisadores estabeleceram uma ligação positiva entre esses produtos com a saúde e a longevidade. De fato, o iogurte é um alimento reconhecidamente saudável, com apelo positivo com relação à saúde, tendo por isso um mercado consumidor crescente em todo o mundo. No Brasil foi registrado crescimento de 2,4% no seu consumo e movimentação de R\$ 2,65 bilhões nas vendas em 2008 (Rocha e Madureira, 2008). O iogurte permanece como o principal veículo carreador de culturas probióticas na preferência do consumidor (Siegrist et al., 2008; Hailu et al., 2009), ainda que sejam ressaltadas as vantagens tecnológicas de outros produtos lácteos, como queijos e sorvetes (Cruz et al., 2009a; Cruz et al., 2009b). São reportados, por isso, diversos trabalhos sobre o desenvolvimento de iogurte suplementado com culturas probióticas (Dave e Shah, 1998; Mortazavian et al., 2006; Mortazavian et al., 2007; Aryana et al., 2007; Antunes et al., 2005; Almeida et al. 2008; Ramasubramanian et al., 2008)

A incorporação e a viabilidade de bactérias probióticas em alimentos ao longo do seu período de estocagem, que resultem em benefício para a saúde do consumidor, é um desafio constante para as indústrias de alimentos, requerendo a compreensão de todos os fatores intrínsecos e extrínsecos ao processamento.

A viabilidade de microorganismos probióticos em iogurte depende das linhagens usadas, da interação entre as espécies presentes, das condições de cultivo, da produção de peróxido de hidrogênio devido ao metabolismo bacteriano, da acidez final do produto e da concentração dos ácidos láctico e acético (Shah, 2000), dentre outros fatores. Adicionalmente, é reportado que materiais de embalagem usados e as condições de estocagem são fatores importantes para a qualidade de produtos contendo microorganismos probióticos, já que o metabolismo desse grupo microbiano é essencialmente anaeróbio ou microaerófilo (Mattila-Sandholm et al., 2002). Dessa forma, o

nível de oxigênio ao longo da estocagem do produto deve ser o mínimo possível para não resultar em toxicidade e morte do microorganismo e consequente perda da funcionalidade do produto.

A glicose oxidase ( $\beta$ -D-glicose:oxigênio 1-oxireductase; EC 1.1.2.3.4) é uma enzima produzida por fungos (*Aspergillus* e *Penicillium*), sendo produzida de forma intra e extracelular catalisando a formação de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio a partir de glicose e oxigênio (Leskovac et al., 2005). Tem sido usada para retardar a oxidação lipídica, evitando a formação de *off-flavors* em diversos tipos de produtos, como maionese (Isaksen and Adler-Nissen, 1997), controlando o escurecimento enzimático em purês de frutas (Parpinello et al., 2002) e, ainda, na estabilização de bebidas alcoólicas, como cerveja, conservação de compotas de morango, molhos para saladas e sucos de frutas, entre outros (Isaksen e Nissen, 1997). Possui ponto isoelétrico entre 4,2- 4,3 e pH ótimo de ação entre 3,5 e 6,5 (Labuza e Brenne, 1989).

A utilização da glicose oxidase pode representar em uma alternativa potencial para aumento da estabilidade das bactérias probióticas de iogurte, mantendo a dose mínima recomendável para os efeitos terapêuticos, já que pode consumir o oxigênio que é permeado para o interior da embalagem ao longo da estocagem do produto, sem a necessidade do uso de aditivos químicos, constituindo dessa forma uma opção biotecnológica (Meyer e Isaksen, 1995). Adicionalmente, não requer mudança nas etapas originais de processamento do produto, é de fácil implementação na rotina industrial de um laticínio, agregando valor ao iogurte produzido sem onerar a produção.

Neste trabalho, foi realizada a otimização do processamento do iogurte probiótico adicionado de glicose oxidase, utilizando a metodologia da superfície de resposta e o método da função desejável. Com base na revisão de literatura, essa pesquisa é inédita quanto ao uso dessa enzima, constituindo-se numa nova opção biotecnológica como ferramenta para minimizar a toxidez ao oxigênio sofrida por bactérias probióticas.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1- Culturas

Culturas puras de *Streptococcus thermophilus* TA 040, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB 340 and *Bifidobacterium longum* BI-05, mantidas a -80°C, foram obtidas da Danisco (São Paulo, Brasil). Leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brasil) reconstituído a 11 % p/v foi utilizado para o preparo dos fermentos das culturas lácticas. Para *Bifidobacterium longum*, utilizou-se leite em pó desnatado reconstituído a 11 % p/v adicionado de 0,5% p/v de extrato de levedura (Oxoid, São Paulo, Brasil) e com 0,05% p/v de cisteína (Sigma, São Paulo, Brasil), enquanto que para as outras culturas, utilizou-se leite reconstituído desnatado suplementado com 2% p/v de glicose (Synth, São Paulo, Brasil). Todos os leites reconstituídos foram esterilizados a 115°C/10min e a solução de cisteína utilizada foi esterilizada por filtração em membrana 0,20 µm (Milipore). Todas as etapas de manipulação dos microorganismos foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

### 2.2- Processamento dos Iogurtes

O processamento dos iogurtes probióticos foi realizado de acordo com a metodologia tradicional (TAMINE e ROBINSON, 2007). Leite cru integral padronizado (3,5 % gordura) (Atilatti, Itatiba, Brasil) foi submetido ao tratamento térmico em um tanque de aço inox de volume 50 litros (95°C/15 min), resfriado até 45°C e inoculado com 1% v/v de *Streptococcus thermophilus salivarius* spp TA 040, 1% v/v de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB 340, e 2% v/v de *Bifidobacterium longum* BI – 05. Posteriormente, o leite inoculado foi submetido à fermentação a 45°C, com monitoramento do pH até 4,7-4,6. Em seguida, foi submetido ao resfriamento até 10°C e posterior rompimento do gel por agitação com simultânea adição da glicose oxidase (Glucomax CO, Prozyn, São Paulo, Brasil) e glicose (Synth, São Paulo, Brasil) conforme concentrações indicadas na Tabela 1. Posteriormente, foi colocado em copos de 100 mL de polipropileno (Dixie Toga, São Paulo, Brasil), selados por indução (Ernercan, Viscosin, EUA) e mantidos em estocagem refrigerada a 5°C por 15 dias para a realização das análises.

## **2.2- Contagem de *Bifidobacterium longum***

1 mL de iogurte foi transferido para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de água peptonada estéril 0,1% p/v e a partir dessa diluição, foram feitas as diluições subseqüentes para contagens bacterianas. A contagem de *Bifidobacterium longum* BI – 05 foi realizada em duplicata, em plaqueamento por profundidade, utilizando ágar cloreto de lítio-propionato de sódio (MRS-LP), sendo as concentrações de agentes inibitórios 0,5g/L de cloreto de lítio e 0,75g/L de propionato de sódio, respectivamente, e incubado em anaerobiose (gerador de anaerobiose Oxoid, São Paulo, SP) por 3 dias a 37°C (Zacarchenco e Massaguer-Roig, 2004).

## **2.3- Oxigênio Dissolvido**

As medidas de oxigênio dissolvido foram realizadas em dois pontos: no iogurte, imediatamente após a etapa de rompimento do gel e imediatamente antes da adição da glicose oxidase e da glicose, e nos produto final, aos 15 dias de estocagem refrigerada. No primeiro caso, foram retirados 200 mL do produto e, no segundo, as medidas foram realizadas nos produtos acondicionados nos potes plásticos.

Foram realizadas cinco medidas nas extremidades e no centro do produto para obtenção dos valores médios das medidas. Foi utilizado um analisador de O<sub>2</sub> MO128 (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), obtendo resultados em concentração de oxigênio na amostra, expressa em partes por milhão (ppm= mg/L) através da inserção do eletrodo no iogurte. A calibração do aparelho quanto ao oxigênio dissolvido foi feita com água destilada (10 ppm) e metabissulfito e sulfito de sódio saturado (0 ppm) (American for Testing and Materials, 2001).

## **2.4- Delineamento Experimental**

Considerando que se trata de uma pesquisa inédita utilizando uma opção biotecnológica, glicose oxidase para remoção do oxigênio em iogurtes probióticos, optou-se por um planejamento experimental específico. Portanto, utilizou-se a metodologia da

superfície de resposta (RSM), utilizando como variáveis independentes as concentrações de glicose oxidase e de glicose, com determinação do ponto ótimo através da função desejável (*desirability function*). A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para otimizar o processamento de iogurte probiótico contendo *B. longum* BL -05, suplementado com glicose oxidase e glicose. As variáveis independentes utilizadas foram: as concentrações da enzima glicose oxidase (GOX) e de seu substrato glicose (GLU), respectivamente, enquanto que as variáveis dependentes (respostas) foram: concentração de oxigênio dissolvido no produto e a contagem de *B. longum* BI -05. Foi utilizado o delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes e dois níveis ( $2^2$ ), com quatro ensaios nas condições axiais ( $\alpha = 1,414$ ) e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios.

Um ensaio controle, sem adição da glicose e da glicose oxidase, foi realizado simultaneamente, totalizando 12 ensaios. Os níveis das variáveis independentes foram escolhidos através de testes preliminares, levando em consideração a viabilidade econômica do processo (no caso da adição da enzima) e valores de glicose em iogurtes expostos no comércio (Manino et al., 1999). A escolha da espécie de *B. longum* está relacionada à maior sensibilidade dessa linhagem à exposição ao oxigênio em relação às outras espécies de bifidobacterias (Kawasaki et al., 2006).

O delineamento experimental bem como os valores codificados e reais das variáveis são mostrados na Tabela 1. A análise estatística foi feita no programa *Statistica for Windows* versão 7.1 (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

**Tabela 1-** Ensaios do Planejamento Experimental Rotacional.\*

Ensaios	Glicose (ppm)		Glicose oxidase (ppm)	
	Codificada $X_1$	Não Codificada	Codificada $X_2$	Não Codificada
1	-1	9,4	-1	31,6
2	1	30,6	-1	31,6
3	-1	9,4	1	88,4
4	1	30,6	1	88,4
5	-1,41	5	0	60
6	1,41	35	0	60
7	0	20	-1,41	20
8	0	20	1,41	100
9	0	20	0	60
10	0	20	0	60
11	0	20	0	60

\* Foi realizado um ensaio onde não se adicionou glicose e glicose oxidase, ensaio controle (12).

Inicialmente, o modelo quadrático polinomial completo de segunda ordem foi ajustado a cada uma das respostas, baseando-se na equação (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

Onde:  $\beta_0$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{12}$  representam os coeficientes de regressão, sendo  $\beta_0$  o termo de interseção,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  os efeitos lineares,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  os efeitos quadráticos e  $\beta_{12}$  o efeito de interação, enquanto  $X_1$ ,  $X_2$  são as variáveis independentes codificadas (glicose oxidase e glicose, respectivamente). A análise foi realizada utilizando as variáveis codificadas, aplicando a retirada de termos não significantes, quando necessário ( $p > 0,05$ ). Os dados usados para modelagem (Análise da Superfície de Resposta) são valores médios de duas replicatas, no caso das análises microbiológicas, e cinco replicadas, no caso do oxigênio dissolvido.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1- Adequação dos Modelos

Para que uma superfície de resposta seja construída a partir de dados experimentais, é necessário que haja pelo menos uma amostra diferente das demais formulações, e esse requisito foi inicialmente atendido (Tabela 2). A partir disso, modelos lineares e quadráticos são avaliados e verifica-se sua adequação aos dados obtidos. A análise de variância mostrou que tanto o modelo proposto para o oxigênio dissolvido quanto para a contagem total de *B. longum* foram significativos ( $p < 0,001$ ) e apresentaram baixo erro experimental (erro puro  $< 0,003$ ) e alto coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj} > 0,80$ ), o que valida os dados experimentais.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os valores das variáveis independentes codificadas e os ensaios realizados para o planejamento experimental e os valores dos coeficientes de regressão dos modelos quadráticos polinomiais para a superfície de resposta, junto com os correspondentes valores de  $R^2$  e  $F$ , respectivamente. A falta de ajuste, que mede o ajuste dos dados experimentais ao modelo obtido, não resultou em um  $F$  significativo para a contagem de *B. longum*, enquanto que para a concentração de oxigênio dissolvido, este valor mostrou-se significativo ( $p = 0,01$ ). Isto sugere que o modelo apresenta capacidade preditiva para prever a contagem de *B. longum*, enquanto para a concentração de oxigênio dissolvido, os dados obtidos devem ser interpretados apenas como uma tendência, não sendo útil para realizar previsões, por cobrir uma pequena faixa de variação dos fatores estudados. Apesar da falta de ajuste ter sido significativa para o modelo proposto para o oxigênio, considera-se marginal devido ao baixo erro experimental.

**Tabela 2-** Planejamento Experimental do Processamento do Iogurte Probiótico com Glicose Oxidase.\*

Ensaio	Variáveis Independentes		Valores Dependentes (Respostas)	
	GLU	GOX	OXI (ppm)	BL (log UFC/g)
1	-1	-1	1,29	7,2
2	1	-1	1,1	8,7
3	-1	1	1,17	7
4	1	1	1,52	7,7
5	-1,41	0	1,3	6,9
6	1,41	0	1,2	8,5
7	0	-1,41	1,34	7,6
8	0	1,41	1,84	7,4
9	0	0	0,93	8,5
10	0	0	0,94	8,4
11	0	0	0,95	8,5
12	-	-	5,94	6,2

\* GLU=glicose, GOX=glicose oxidase; OXI=oxigênio; BL=*B. longum*; 12= ensaio controle, sem adição de glicose e glicose oxidase.

É importante ressaltar que elevados coeficientes de determinação ajustados ( $R^2_{ajus}$ ) foram encontrados, sendo 0,825 para a concentração de oxigênio dissolvido e 0,941 para contagem de *B. longum*, o que significa que os modelos explicaram 82,5% e 94,1% da variação dos dados experimentais. O coeficiente ajustado de determinação é definido como a razão entre a variabilidade explicada dos dados experimentais em relação a sua variação total, sendo uma medida de ajuste do modelo aos dados experimentais. Pequenos valores de ( $R^2_{ajus}$ ) sugerem que as variáveis dependentes escolhidas não são relevantes para o modelo em questão, sendo que esse se ajusta bem aos dados experimentais, quando o valor de  $R^2_{ajus}$  é próximo de 1 (Nath e Chattoadhyay, 2007). Na prática, altos valores de  $R^2_{ajus}$  sugerem que os modelos obtidos são adequados para descrever a influência das variáveis independentes estudadas sobre os parâmetros de qualidade dos iogurtes probióticos.

**Tabela 3-** Coeficientes de regressão.\*

<b>Fatores</b>	<b>O<sub>2</sub> (ppm)</b>	<b><i>B. longum</i> (log UFC/mL)</b>
Constant	0,937	8,436
GOX	NS	0,566
(GOX) <sup>2</sup>	0,119	-0,346
GLU	0,126	-0,177
(GLU) <sup>2</sup>	0,290	-0,469
GLU x GOX	0,135	-0,200
R <sup>2</sup> (adj)	0,825	0,941
F	147,64	16,46
P-valor (modelo)	< 0,001	< 0,001
P-valor (falta de ajuste)	0,01	0,06
erro puro	0,000133	0,00263

\*Análises foram realizadas utilizando matriz codificada; GOX= glicose oxidase; GLU=glicose. NS= não- significante (p >0,05).

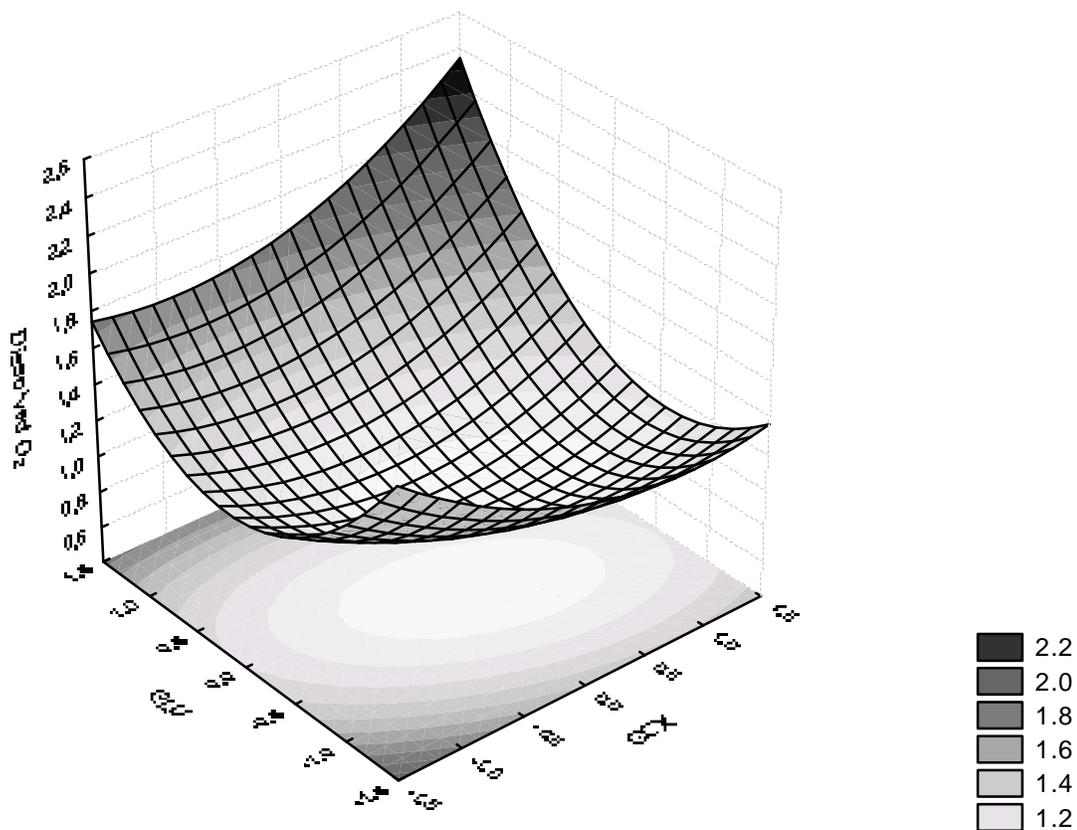
### 3.2- Oxigênio Dissolvido

A toxicidade ao oxigênio constitui um entrave tecnológico no desenvolvimento de iogurtes probióticos e durante a estocagem e comercialização, devido a sensibilidade das bactérias probióticas. Dentre elas, destaca-se a *Bifidobacterium spp.*, microorganismo de origem intestinal, apresentando metabolismo anaeróbio, sendo incapaz de sintetizar ATP através das vias metabólicas respiratórias e que depende exclusivamente do metabolismo fermentativo (Talwakar e Kailasapathy, 2004b). Bactérias do gênero *Bifidobacterium spp* são desprovidas de catalase, uma enzima fundamental para quebra do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o que resulta na existência de um sistema seqüestrador de oxigênio reduzido ou ausente, tendo como resultado imediato, a incompleta redução do oxigênio ao peróxido de hidrogênio. Conseqüentemente, ocorre o acúmulo de metabólitos tóxicos para a célula, derivados do oxigênio (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e a eventual morte celular (Vasiljevic e Shah, 2008). Altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular inibem a frutose-6-

fosfofrutocetolase, uma enzima chave no metabolismo das bifidobactérias (Shah, 1997). Nesse sentido, vem sendo relatada uma correlação entre os níveis de duas enzimas (NAD-oxidase e a NAD-peroxidase) e a suscetibilidade das bifidobactérias ao oxigênio, na medida em que essas enzimas exercem significativa atividade na maioria das espécies de *Bifidobacterium* spp. que são aerotolerantes (Roy, 2005).

Nessa pesquisa foram notados baixos valores de oxigênio dissolvido nos iogurtes aos 15 dias de estocagem refrigerada, que variaram de 0,93 (ensaio 9) a 1,84 ppm (ensaio 12), representando uma redução de 69,02 a 86,03 %, em relação valor de oxigênio dissolvido encontrado no iogurte controle, sem adição da glicose oxidase e da glicose que foi de 5,94 ppm. Foi observado efeito linear e quadrático da glicose, seguido pelo efeito de interação da glicose com a glicose oxidase e do efeito quadrático da glicose oxidase, originando uma superfície com ponto mínimo (Figura 1). Tais efeitos indicam o quanto cada fator influencia na resposta estudada, nesse caso, a concentração de oxigênio dissolvido, cuja influência foi proporcional ao seu valor. Dessa forma, o efeito positivo indica que ao passar do valor mínimo para o valor máximo da variável, houve aumento da resposta. Ao contrário, efeito negativo indica que ao passar do valor mínimo para o valor máximo, a resposta diminui (Ribeiro et al., 2008).

Neste sentido, verificou-se que a quantidade de glicose pode contribuir para o aumento da quantidade de oxigênio dissolvido, provavelmente devido à inibição da enzima pelo substrato, fenômeno que ocorre normalmente com enzimas, impedindo a ação da glicose oxidase como agente sequestrador do oxigênio dissolvido no produto. Isto sugere que a adição de glicose deve ser realizada de forma criteriosa, sendo o mínimo necessário para ação da enzima. Miron et al (2004) descreveram um modelo matemático para a cinética de atuação da glicose oxidase e verificaram que a inibição por excesso do substrato é, de fato, um fator que altera a atuação da enzima, na medida em que proporciona um decréscimo da taxa de reação devido às restrições de difusão causadas por um aumento de viscosidade causada pelo ácido glucônico produzido.



**Figura 1** – Superfície de Resposta para o Oxigênio Dissolvido.

A falta de ajuste encontrada pode ser explicada pela natureza dinâmica da variável estudada, pois ocorre permeabilidade do oxigênio através das embalagens ao longo da estocagem. Estudos indicam haver grande variação de oxigênio dissolvido ao longo da estocagem de iogurtes e leites fermentados probióticos (Miller et al., 2001; Miller et al., 2003). Tais discrepâncias estão relacionadas aos fatores inerentes à metodologia, como diferentes procedimentos e sensibilidades de instrumentos utilizados, bem como a posição do sensor no produto. Os resultados dessa pesquisa evidenciam o potencial biotecnológico da glicose oxidase na minimização do efeito nocivo do oxigênio, atuando como uma alternativa ou complemento aos seguintes: adição de ácido ascórbico (Dave e Shah, 1997),

eletroredução do leite (Bolduc et al., 2006), poliestireno laminado com material de alta barreira ao oxigênio – Nupack (Miller et al., 2002), sistemas de embalagens ativas (Miller et al., 2003), microencapsulação (Talwalkar e Kailasapahy, 2003), sistemas de embalagens plásticas de diferentes polaridades e cristalinidades (Jasson et al., 2001) e frações redutoras de membranas de células bacterianas – Oxyrase (Ordonez et al., 2000). Uma vantagem adicional é a possibilidade de utilização dos mesmos equipamentos já tradicionalmente usados no envase de iogurtes, já que a adição da glicose oxidase não proporciona mudança brusca do processamento, e, conseqüentemente, não altera a rotina operacional dos laticínios. Isso é principalmente importante para unidades industriais de pequeno porte, onde nem sempre pode se contar com um corpo técnico especializado. Cruz et al (2007) ressaltam que as opções tecnológicas para minimizar o dano causado pelo oxigênio sobre os produtos lácteos probióticos devem preconizar sistemas de embalagens de baixa permeabilidade ao oxigênio e serem economicamente viáveis.

Um outro fator a ser levado em consideração é que não há necessidade de adição de compostos antioxidantes no iogurte, o que poderia provocar rejeição do consumidor, indo favoravelmente às tendências atuais da indústria de alimentos. Essas tendências têm como objetivo a obtenção de um produto alimentício processado mais próximo do natural possível, com a presença mínima de aditivos e compostos químicos, conforme demonstrado em recente estudo de *focus-group* realizado em São Paulo, Brasil (Behrens et al, 2010).

### **3.3- Contagem de *Bifidocabterium longum***

Iogurtes probióticos devem apresentar ao longo de sua vida de prateleira, contagens viáveis mínimas da bactéria probiótica para exercer benefício à saúde dos consumidores. Tem sido sugerido que esses microorganismos devem estar presentes em uma contagem mínima de  $10^6$  UFC/g ou mL, sendo que a dose diária de ingestão deverá ser  $10^8$  UFC/g ou mL, o que implicará em uma ingestão contínua de 100 mL ou 100 g do iogurte. Tais valores são necessários para compensar possíveis reduções ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal, representado pelo meio ácido do estômago e pelos

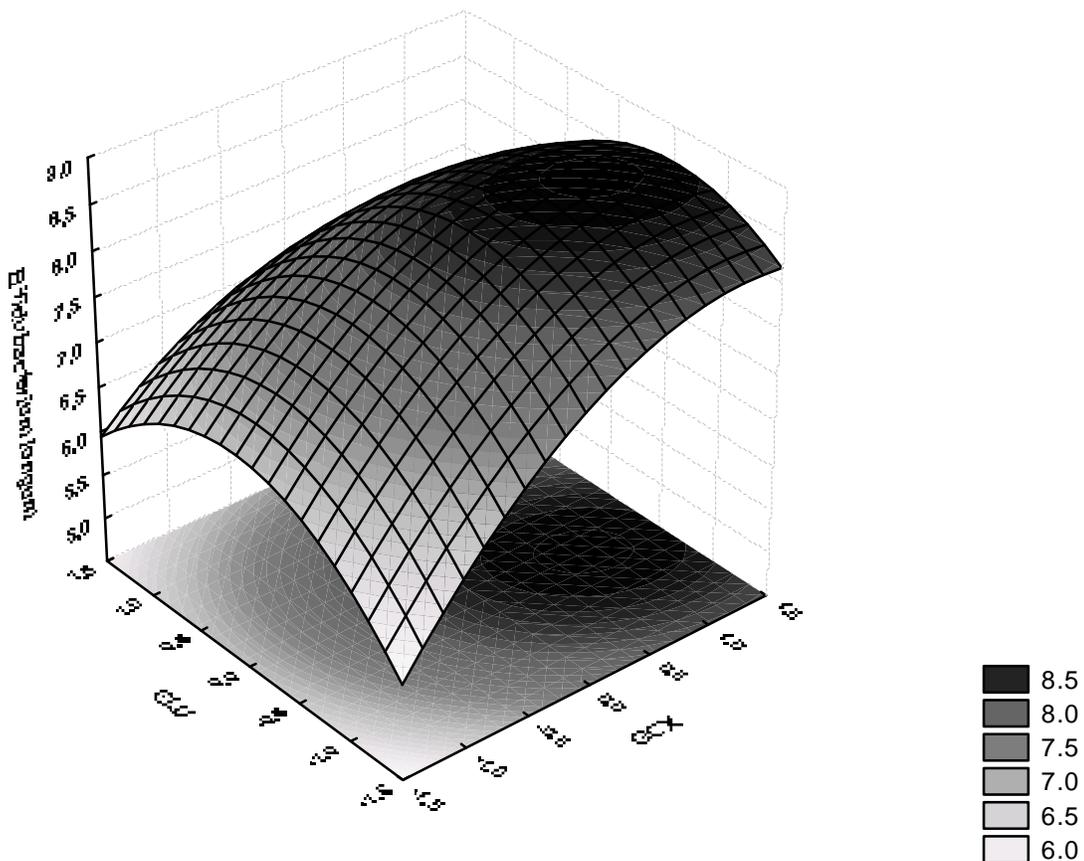
sais biliares do intestino e devido às perdas durante o processamento e estocagem do produto (Vasiljevic e Shah, 2008). Sabe-se que bactérias do gênero *Bifidobacteria* são habitantes do trato intestinal de seres humanos, sendo relativamente estáveis ao longo da fase adulta, declinando em idade mais avançada (Arunachalam, 1999). Dadas suas complexas condições metabólicas, entre elas a sensibilidade ao oxigênio, a manutenção em contagens viáveis capazes de exercer função terapêutica é um desafio tecnológico contínuo para processadores de produtos lácteos probióticos, em especial iogurtes. De fato, tem sido observada perda de viabilidade de diversas linhagens de *bifidobacteria* em iogurtes probióticos disponíveis para comercialização e estocagem em diversos países no mundo, a saber: Austrália (Shah et al., 1995), Argentina (Vinderola et al., 2000), Brasil (Barreto et al., 2003), Espanha (Gueimonde et al., 2004), Estados Unidos (Ibrahim e Carr, 2006), Arábia Saudita (Al-Otaibi et al., 2009). Atribui-se a perda de viabilidade a toxicidade ao oxigênio como uma possível razão, dentre outras, para esses resultados.

A tolerância ao oxigênio é dependente da linhagem de *Bifidobacteria* (Shimamura et al., 1992); em geral tem sido reportado que *B. longum* apresenta desempenho insatisfatório diante de altas concentrações de oxigênio, sendo extremamente sensível a essa adversa condição, apresentando perda de viabilidade (Simpson et al., 2005; Jayamanne and Adams, 2009). Embora alternativas como umas prévias adaptações a elevadas concentrações de oxigênio tenham sido consideradas promissoras para solução desta questão (Tawalkar e Kailasapathy, 2004), isso demandaria trabalho adicional que pode interferir na rotina dos laticínios de pequeno porte assim como em implicações econômicas. Dessa forma, serão necessários soluções tecnológicas que não cause alteração no processamento do iogurte probiótico e que também não venham interferir de forma significativa no custo final do produto.

Nessa pesquisa foram observadas contagens viáveis de *B. longum* variando de 6,9 a 8,7 log UFC/mL, representando aumento de 11,29 a 40,32 % em relação à contagem de *B. longum* encontrada no iogurte controle, a saber, 6,2 log UFC/mL. Esses resultados representam elevados valores para a contagem desse microorganismo, considerando-se

que o iogurte já se encontra na metade de sua vida de prateleira comercial. O modelo proposto ajustou-se de forma excelente aos dados ( $R^2$ ajustado = 0,941), sendo observada maior influência da glicose oxidase em nível linear, seguida pelo efeito quadrático da glicose e da glicose oxidase e do efeito de interação das variáveis, resultando em uma superfície com um ponto de máximo (Figura 2). Os resultados indicam o efeito positivo da glicose oxidase para a predição da contagem de *B. longum*, indicando sua influência sobre o aumento da quantidade viável da cepa probiótica, embora seja observada certa dependência da glicose para a completa eficiência. A predominância da enzima pode ser explicada considerando sua função dentro do produto, que é a de sequestrar oxigênio, criando um ambiente anaeróbio e facilitando a multiplicação do microorganismo probiótico. Vroemen (2003) adverte que, para determinadas aplicações, como alimentos que apresentam valores baixos de pH, pode ser necessária a adição de determinada quantidade de glicose para que a enzima permaneça ativa. Entretanto, é importante que se investigue o limite máximo de sua adição, por questões econômicas e tecnológicas, na medida em que pode haver um efeito adverso para a qualidade do produto, como foi observado em molho para salada (Min et al., 2003) e pão (Bonet et al., 2006).

É importante ressaltar que, mesmo espécies de *Bifidobacterium* spp, possuem capacidade de metabolizar glicose (Gomes e Malcata, 1999), o que poderia contribuir para aumento da viabilidade do microorganismo. Contudo, os resultados enfatizam o efeito da exposição ao oxigênio como fator negativo para a manutenção da dose terapêutica para benefícios à saúde dos consumidores, visto que o iogurte controle (sem enzima e glicose) apresentou contagem de *B. longum* na ordem de 5,9 UFC/g e concentração de oxigênio 6,35 ppm.



**Figura 2** – Superfície de Resposta para o *Bifidobacterium longum*.

### 3.4- Otimização Simultânea

O processo de otimização representa a escolha da melhor alternativa a partir de diversas soluções disponíveis (Granato et al, 2010). Em engenharia de processos, o processo de otimização consiste em maximizar ou minimizar uma determinada variável de interesse. Os valores dos parâmetros operacionais que produzem o valor ótimo desejável são chamados condições ótimas (Tzia, 2003). Se determinada especificação da variável de interesse satisfizer essa condição, ela é chamada adequada e sua especificação determinará o valor da função objetivo ou valor objetivo (Granato et al, 2010).

Encontrar os níveis ótimos das variáveis de interesse presentes nas formulações de alimentos processados é uma tarefa complexa. Normalmente, em otimização de processos, é utilizado o método gráfico, que consiste na superposição de diferentes superfícies de resposta para cada variável de interesse, com posterior inspeção visual para obter a região experimental e encontrar seus valores ótimos. Este método, embora visualmente atrativo, requer a construção de grande número de gráficos, e para mais de uma variável de resposta, não é bem sucedido ao determinar o ponto ótimo. Com o objetivo de superar esse problema, a otimização simultânea tem sido recentemente utilizada no desenvolvimento de produtos e processos da indústria de alimentos (Granato et al, 2010).

A função de desejabilidade (*desirability function*) combina todas as respostas em uma única medida. Ela envolve a transformação de cada variável de resposta  $Y_i$  em um valor desejável  $d_i$ , onde  $0 \leq d_i \leq 1$ ; o valor de  $d_i$  aumenta de forma proporcional a “desirability” da correspondente resposta. Dependendo se uma particular resposta particular  $Y_i$  precisa ser maximada ou minimizada, diferentes funções desejáveis  $d_i(Y_i)$  podem ser obtidas. As funções desejáveis individuais são então combinadas usando a média geométrica de acordo com a equação (1), para resultar no valor da *desirability* total  $D$ .

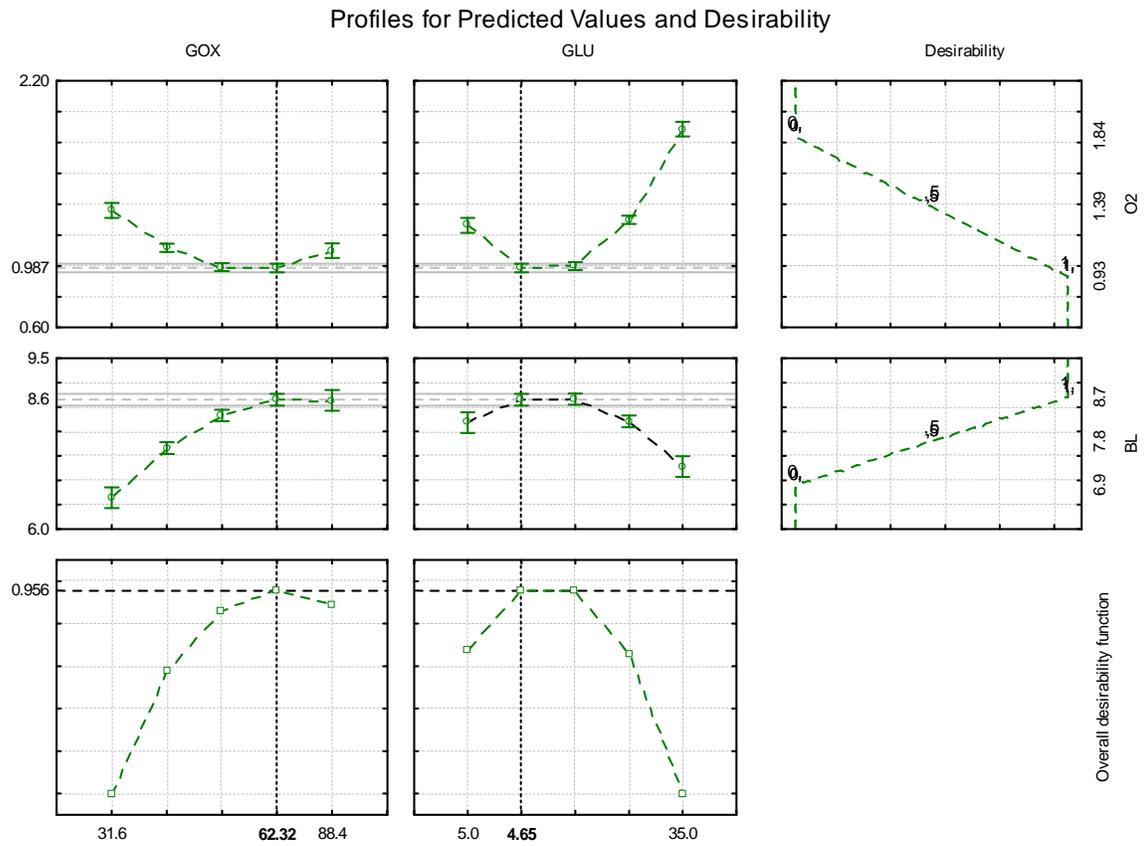
O parâmetro  $D$  fornece o valor total da função desejável, em relação aos valores das variáveis de resposta; claramente a faixa de variação de  $D$  se encontrará no intervalo  $[0,1]$ . Um alto valor de  $D$  na equação 1 indica a mais desejável e apropriada função do sistema, que é considerada a solução ótima deste sistema; os valores ótimos (ou fatores) que constituem a solução ótima são determinados a partir do valor de funções desejáveis individuais que maximizam  $D$ .  $D$  também tem a propriedade de que, para qualquer  $d_i=0$  (isto é, uma das variáveis de resposta é inaceitável) então  $D=0$  (isto é, o produto final é inaceitável). Devido a isso, é utilizado um valor de média geométrica para  $D$  (Derringer e Suich, 1980).

A simultânea otimização, utilizando a função *desirability*, com as variáveis independentes do iogurte probiótico, a saber, concentração oxigênio dissolvido e contagem de *B. longum* foram executadas (Figura 3). Foi imposto valor igual a 0 (zero) para o valor

mínimo da função desejável, e 1 para o valor máximo da função desejável, ou seja, maior valor possível para a contagem de *B. longum*. O programa executou as interações e os cálculos e, finalmente, informou o máximo valor da função desejável e as condições nas quais ela foi obtida, ou seja, quais os valores de concentração de glicose e de glicose oxidase que resultaram na respectiva função desejável, que deve proporcionar a mínima concentração de oxigênio dissolvido e a máxima contagem de *B. longum*. Com base nessa metodologia, foi encontrada uma função desejável global de 0,956, sugerindo os valores de 62,32 ppm de glicose e 4,35 ppm de glicose oxidase, para o alcance da melhor solução para combinação destas variáveis.

Foi realizado um experimento adicional para a validação desses dados: iogurtes foram produzidos utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, com os valores ótimos de glicose oxidase e glicose anteriormente citados, e aos 15 dias de estocagem refrigerada. Foram realizadas análises de oxigênio dissolvido e contagem de *B. longum* em três amostras retiradas aleatoriamente. Os valores médios encontrados pelas análises foram 0,59 ppm para oxigênio dissolvido e 8,69 log UFC/mL de *B. longum*, enquanto os valores preditos pelo modelo foram 0,52 ppm e 8,74 log UFC/mL, resultando em um desvio de 12,96% para oxigênio e 0,57% para *B. longum*, respectivamente. Isso reforça os bons resultados encontrados no planejamento experimental, principalmente para *B. longum*.

De forma geral, os resultados desse estudo sugerem que a glicose oxidase pode ser uma alternativa viável para minimizar a toxidez causada por oxigênio em microorganismos probióticos. Fazem-se necessários estudos para investigação de seu efeito sobre a estabilidade ao longo da vida de prateleira do iogurte probiótico, bem como sua influência nos seus parâmetros intrínsecos de qualidade, como pH, proteólise das culturas e metabolismo das culturas do iogurte e das probióticas. Adicionalmente, tornam-se importantes estudos sensoriais para verificar a aceitabilidade desse produto pelos consumidores.



**Figura 3** - Otimização Simultânea da contagem da Concentração de Oxigênio Dissolvido e da concentração de *B. longum*.

#### **4 - CONCLUSÕES**

Baixos valores de oxigênio dissolvido e elevadas contagens de *B. longum* foram observadas nessa pesquisa, sugerindo a vantagem do uso da glicose oxidase como uma alternativa tecnológica para aumentar a vida de prateleira de iogurtes probióticos. Os modelos gerados apresentaram-se adequados para a previsão e verificação da tendência das variáveis estudadas. A otimização simultânea, através da função desejável, indicou as concentrações ótimas de glicose oxidase e glicose, conforme comprovado por experimentos adicionais de validação, mediante os erros aceitáveis entre os resultados preditos e os experimentais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alamprese, C., L. Datei and Q. Semararo. 2007. Optimization of processing parameters of a Ball mill refiner for chocolate. *J. Food Eng.* 83: 629-636.

Almeida, M.H.B., S.S. Zoellner, A.G. Cruz, M.R.L. Moura, L.M.J. Carvalho and A.S. Sant´Ana. 2008. Potentially probiotic açai yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 61:178-182.

Al-Otaibi, M.M., 2009. Evaluation of some probiotic fermented milk products from al-ahsa markets, Saudi Arabia. *Am. J. Food Technol.* 4: 1-8

American Society for testing and Materials - ASTM . Standard practice for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coloumetric Sensor. ASTM D3985-95. Philadelphia, 2001. 6p.

Antunes, A.E.C, T.F. Cazetto and H.M.A.B. Cardello. 2005. Viability of probiotic microorganism during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *Int. J. Dairy Technol.* 58:169-173.

Arayana K.J., S. Plauche and T. Nia. 2007. Prebiotic and Probiotic fat free yogurt. *Milchwissenschaft* 62: 295-298.

Arunachalam, K.D. 1999. Role of Bifidobacteria in Nutrition, Medicine and Technology. *Nut. Res.* 19: 1559-1597.

Bas, D. and I.H. Boyacı. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78: 836–845

Barreto, G.P. M., N. Silva, E.N. Silva, L. Botelho, D.K. Yim, C.G. Almeida, and G.L. Saba. 2003. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacterias e Bactérias Totais em Produtos Probióticos comercializados no Brasil. *Braz. J. Food Technol.* 6: 119-126.

Behrens, J.H., M. N. Barcellos, L. J. Frewer, T.P. Nunes, B. D.G.M. Franco, M. T. Destro, M. Landgraf. 2010. Consumer purchase habits and views on food safety: A Brazilian study. *Food Control* 21: 963-969.

Bolduc, M.-P., Y. Raymond, P.Fustier, C.P. Champagne and J.-C. Vuilleumard. 2006. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized milk. *Int. Dairy J.* 16:1038-1048.

Bonet, A., C.M. Rosell, P.A. Caballero, M. Gómez, I. Pérez-Munuera and M.A. Lluch. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chem.* 99:408-415.

Castro, F.B. T.M. Cunha, P.J. Ogliari, R.L. Teófilo, M.M.C. Ferreira, and E. S. Prudêncio. 2009. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic beverages: Study using response surface methodology. *LWT – Food Sci. Technol.* 42: 993-997.

Cruz, A.G., J.A.F. Faria, and A.G.F. Van Dender. 2007. Packaging System and Probiotic Dairy Foods. *Food Res. Int.* 40: 951-956.

Cruz, A. G., A.E.C. Antunes, A.L.O.P.S., J. A. F. Faria and S. M.I. Saad. 2009. Ice cream as probiotic food carrier. *Food Res. Int.* 42:1233-1239.

Cruz, A.G., F.C.A. Buriti, C.H.B. Souza, , J. A. F. Faria and S. M. I. Saad. 2009. Probiotic Cheese: Health Benefits, Technological and Stability Aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 20:344-354.

Dave, R. I. and N.P. Shah. 1997. Effectiveness of Acid Ascorbic as an Oxygen Scavenger in Improving Viability of Probiotic Bacteria in Yogurts Made with Commercial Starters Cultures. *Int. Dairy J.* 7:435-443.

Dave, R. I. and N.P. Shah. 1998. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *J. Dairy Sci.* 81: 2804-2816.

Derringer, G. and R. Such. 1980. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* 12: 214 – 219.

Erdogdu, F. 2009. Optimization: an introduction. Pages 1-6 in *Optimization in Food Engineering*. D.W. Sun, ed. CRC Press, Boca Ranton, USA.

Eren, I. and F. Kaymak-Ertekin. 2007. Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. *J. Food Eng.* 79: 344-352

Giadini, F., R. Lanciotti, M.E. Guerzoni, and S. Torriani. 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.* 9: 125-134.

Gomes, A.M.P. and F.X.M. Malcata. 1999. Bifidobacterium ssp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10: 139-157.

Granato, D., G.F. Branco, A.G. Cruz, J.A.F. Faria and F. Nazarro. 2010. Functional Foods and Non-Dairy Probiotic Product Development: Trends and Points, Concepts and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:292-302.

Gueimonde, M., S. Delgado, B. Mayo, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles and C. G. los Reyes-Gavilán. 2004. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented Milk. *Food Res. Int.* 37: 839-850.

Hailu, G., A. Boecker, S. Henson and J. Cranfield. 2009. Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. *Appetite* 52: 257-265.

Ibrahim, S.A. and Carr, J.P. 2006. Viability of bifidobacteria in commercial yogurt products in North Carolina during refrigerated storage. *Int. J. Dairy Technol.* 59:272-276.

Isaksen, A. and J. Adler-Nissen. 1997. Antioxidative Effect of Glucose Oxidase and Catalase in Mayonnaises of Different Oxidative Susceptibility. I. Product Trials. *LWT- Food Sci. Technol.* 35:239-243.

Jahani, M., M. Alizadeh, M. Pirozifard and A. Qudsevali. 2008. Optimization of enzymatic degumming process for rice bran oil using response surface methodology. *LWT - Food Sci. Technol.* 41:1892-1898.

Jasson, S.E.A., C.J. Edsman, U.W. Geede and M.S. Hedenqvist. 2001. Packaging Materials for Fermented Milk: effect of material Crystallinity and Polarity on Food Quality. *Pack. Technol. Sci.* 18: 119-127.

Jayamanne, V.S. and M.R. Adams. 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential (Eh) on the survival of bifidobacteria in fermented milk. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44: 1131-1138.

Kawasaki, S., T. Minura, S. Satoh, K. Takeda and Y. Nimura. 2006. Response of the Microaerophilic *Bifidobacterium* Species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to Oxygen. *Applied Environm. Microbiol.* 72:6854-6858.

Korbekandi, K., M. Jahdi, M. Maracy, D. Abedi and M. Jalali. 2009. Production and evaluation of a probiotic yogurt using *Lactobacillus casei* ssp. *Int. J. Dairy Technol.* 62:75-79.

Kristo, E., C.G. Billiaderis and N. Tzanetakis. 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *Int. Dairy J.* 13: 517-528.

Kros, J.F. and C. M. Mastrangelo. 2001. Comparing methods for the multi-response design problem. *Qual. Reabil. Eng. Int.* 17: 323-331.

Kudelka, W. 2008. Use of response surface methodology to evaluate the survival rate of yogurt bacteria in natural bio-yoghurts of cow and goat milk. *Milchwissenschaft* 63: 290-292

Labuza, T.P. and Breene, W.M. 1989. Applications of " active packaging" for improvement of shelf-life and nutritional Quality and Extended Shelf-life Foods. *J. Food Proc. Preserv.* 13:1-69.

Leskovac, S. G. Trivić, J. Wohlfahrt, J. Kandrač and D. Peričin. 2004. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 37: 731-750.

Mannino, S., M.S. Cosio and S. Buratti. 1999. Simultaneous determination of Glucose and Galactose in Dairy Products by two parallel amperometric Biosensors. *Italian J. Food Sci.* 11: 57-65.

Mattila-Sandholm, T., P. Myllärinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fondén, and M. Saarela. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *Int. Dairy J.* 12:173-182.

Meyers, A.S. and A. Isaksen. 1995. Application of enzymes as food antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 300-304.

Miller, C.W., M.H. Nguyen, M. Rooney and K. Kailasapathy. 2001. The influence of Packaging Materials on the Dissolved Oxygen Content of Probiotic Yogurt. *Pack. Technol. Sci.* 15:133-138.

Miller, C.W., M.H. Nguyen, M. Rooney and K. Kailasapathy. 2003. The control of Dissolved Oxygen Content in Probiotic Yogurts by Alternative Packaging Materials. *Pack. Technol. Sci.* 16:61-67.

Min, S., B.S. Mistry and H.-O. Lee. 2003. Improvement of Oxidative and Emulsion Stability of Model Salad Dressing by Glucose Oxidase-Catalase. *J. Food Sci* 68:1272-1275.

Mirón, J., M.P. González, J.A. Vázquez, L.Pastrana and M.A. Murado. 2004. A mathematical model for glucose oxidase kinetics, including inhibitory, deactivant and diffusional effects, and their interactions. *Enz. Micr. Technol.* 34: 513-522.

Mortazavian, A.M., E.M. Ehsani, S.M. Mousavi, S. Sorrabvandi and J. A. Reinheimer. 2006. Combined effects of the temperature-related on the variables on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 61:248-252.

Mortazavian, A.M., E.M. Ehsani, S.M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sorrabvandi and J. A. Reinheimer. 2007. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 60: 123-127.

Nath, A. and P.K. Chattopadhyay. 2007. Optimization of oven toasting for improving crispness and other quality attributes of ready to eat potato-soy snack using Response surface methodology. *J. Food Eng.* 80: 1282-1292.

Ordonez, G.A., D.Y.C. Fung and I.J. Eon. 2000. Effect of Oxyrase on the Metabolic Processes of Lactic Acid Bacteria in Frozen Yogurt Mix. *J. Rap. Met. Automat. Microbiol.* 8: 71-81.

Papinello, G.P., F. Chinnini and R. Ropini. 2002. Preliminary Study on Glucose Oxidase-Catalase Enzyme System to control the Browning of Apple and Pear Purées. *LWT – Food Sci. Technol.* 35: 239-243.

Patrignani, F., L. Lucci, R. Lanciotti, M. Vallicelli, J. Maina Mathara, W. H. Holzapfel, and M. E. Guerzoni. 2007. Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. *J. Dairy Sci.* 90:4513-4523.

Ramasubramanian, L., C. Restuccia and H.C. Deeth. 2008. Effect of Calcium on the Physical Properties of Stirred Probiotic Yogurt. *J. Dairy Sci.* 91: 4164-4175.

Ravi, R. and N.S. Susheelamma. 2005. Simultaneous Optimization of a Multi-response System by Desirability Function Analysis of Boondi-making: A Case Study. *J. Food Sci.* 70: S539- S547.

Ribeiro, S.C., K.J. Park, M.P. Hubinger, C.F.A. Ribeiro, E.A.F. Araújo and S. Tobinaga. 2008. Otimização da desidratação osmótica de files de mapará (*Hypophthalmus edentates*) através da metodologia de superfície de resposta. *Cien. Tecnol. Alim.* 28: 485-492.

Rocha, A.A. and D. Madureira. 2009. Cresce a disputa por lácteos funcionais. *Valor, seção Empresas, Tendências e Consumo, caderno B6, 1-2.*

Roy, D. 2005. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Dairy Sci. Technol.* 85:39-56.

Saccaro, D. M, A.Y. Tamine, A.L.O. P.S. Pilleggi and M.N. Oliveira. 2009. The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 C. *Int. J. Dairy Technol.* 62:397-404.

- Shah, N.P., W. E.V. Lankaputhra, M. L. Britz and W.S. Kyle. 1995. Survival of *L. acidophilus* and *B. bifidum* in Commercial Yogurt during refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 5: 515-521.
- Shah, N. P.1997.Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented dairy products. *Milchwissenschaft* 52:.16–20.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *J Dairy Sci.* 83: 894-907.
- Shimamura, S., F. Abe, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, T. Araya, and M. Tomita. 1992. Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of Bifidobacterium Species. *J. Dairy Sci.* 75: 3296-3306.
- Siegrist, M., N. Stampfli and H. Kastenholz. 2008. Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. *Appetite* 51: 526-529.
- Simpson, P.J., C. Stanton, G.F. Fitzgerald and R.P. Ross. 2005. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen following spray-drying and storage. *J. Applied Microbiol.* 99: 483-501.
- Stephenie. W., B.M. Kabeir, M. Shuhaimi, M. Rosfarizan and A.M. Yazid. 2007. Growth Optimization of a Probiotic Candidate, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in Milk using Response Surface Methodology. *Biotechnol. Bipro. Eng.* 12: 106-113.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy. 2004a. Oxidative stress adaptation of probiotic bacteria. *Michwissenschaft* 59:140-143.
- Talwalkar, A. I. and K. A. Kailasapathy. 2004. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 5:.1–8. 2004b.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapathy. 2003. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. *Aust. J. Dairy Technol.* 58: 36-39.
- Tamine, A. Y. And R.K. Robinson. 2007. *Yogurt: Science and Technology*. New York: CRC Press.
- Tzia, C. 2003. Optimization: an introduction. Pages 1-44 in *Extraction Optimization in Food Engineering*. C. Tzia and G. Liakakis, eds. CRC Press, Boca Ranton, USA.
- Vasiljevic, T. and N.P. Shah. 2008.Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.

Vinderola, C.G., N. Bailo and J.A. Reinheimer. 2000. Survival of probiotic microflora in Argentinean yoghurts during refrigerated storage. *Food Res. Int.* 33: 97-102.

Vroemen, A.J. Glucose-oxidase. In: *Handbook of Food Enzymology*. 2003. New York : CRC Press.

Wong, C.M., K. H. Wong and X. D. Chen. 2008. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 927-938.

Zacarchenco, P.B. and S.M. Roig. 2004. Diferential enumeration of *Bibidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft* 59:258-261.

## **CAPÍTULO 3**

### **PARÂMETROS DE QUALIDADE DO IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE**

Manuscrito submetido ao Journal of Dairy Science –  
formatado de acordo com as normas do periódico

# **PARÂMETROS DE QUALIDADE DO IOGURTE PROBIÓTICO COM GLICOSE OXIDASE**

## **RESUMO**

O uso de alternativas tecnológicas visando à manutenção da funcionalidade em iogurtes probióticos deve propiciar e preservar seus atributos de qualidade para que haja similaridade com os iogurtes comerciais. Neste trabalho foi investigado o efeito da glicose oxidase para nos parâmetros de qualidade do iogurte probiótico durante 15 dias de estocagem refrigerada. Foram realizadas as avaliações de pH, acidez titulável, oxigênio dissolvido, contagem microbianas (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. longum*), proteólise, produtos metabólicos (ácido lático e ácido acético) e compostos voláteis (diacetil e acetaldeído). Foi observada a necessidade de uma atuação conjunta do sistema glicose oxidase/glicose (enzima/substrato) para possibilitar uma redução do oxigênio no interior dos iogurtes probióticos, que influenciou de forma positiva em todos os outros parâmetros de qualidade dos iogurtes. Estudos futuros devem avaliar seu desempenho de forma periódica ao longo da estocagem do iogurte, bem como o efeito de diferentes sistemas plásticos de embalagem, de modo a avaliar o efeito barreira dos materiais quanto a permeabilidade ao oxigênio.

## 1 - INTRODUÇÃO

A relação entre bactérias probióticas e produtos lácteos foi constatada há mais de 2.000 anos, quando as pessoas consumiam grande quantidade de produtos lácteos fermentados como o *kefir* e o iogurte, ao apresentar efeitos positivos sobre suas saúde (Dairy Foods, 2008). No que tange as diretrizes envolvidas no processamento de outras matrizes alimentícias suplementadas com microorganismos probióticos, sejam elas lácteas como queijos (Cruz, et al., 2009a) e sorvetes (Cruz et al., 2009b) ou não-lácteas (Granato et al., 2010a), iogurtes e leites fermentados se apresentam como os principais veículos para suplementação de bactérias probióticas em todo o mundo (Sanchez et al., 2009). Conseqüentemente, é divulgado o desenvolvimento de vários produtos, através da mudança da formulação, como o uso de polpas de frutas tropicais como o açaí (Espírito Santo et al, 2010; Almeida et al., 2008) e banana (Barkirci e Kavaz, 2008), uso do concentrado protéico de soro (Antunes et al., 2005), de diferentes linhagens (Matto et al, 2006; Hekmat et al, 2009) e processos (Kearney et al, 2009).

A minimização do estresse oxidativo no processamento de iogurtes probióticos tem sido intensamente pesquisada e várias alternativas tecnológicas tem sido pesquisadas. Tal como no estresse ácido, a adaptação da cepa probiótica às condições subletais de estresse, expondo a linhagem às concentrações de oxigênio por um determinado período de tempo (Talwakar e Kailasapahty, 2004) e a adição de *Lactococcus lactis* no leite, visando sua acidificação e diminuição do potencial de oxirredução antes da inoculação das culturas microbianas (Jeanson et al, 2009), entre outras alternativas, têm sido mencionadas. Recentemente, foi relatado que a adição de nitrogênio durante o processamento de iogurte de forma simultânea à adição das culturas e a posterior fermentação a 37°C pode resultar em decréscimo da quantidade de oxigênio dissolvido no produto, antes da produção de ácido (Holuchi et al, 2009), podendo isso ser uma alternativa promissora, embora necessite de maior investigação. Tem sido observado que há variação na atividade oxidantes de várias espécies de *Lactobacillus*, entre elas, as espécies probióticas *L. acidophilus*, *L. casei* (Salde e Gilliand, 2005), bem como em

exopolissacarídeos produzidos por bactéria probiótica do gênero *Bacterium*, o *Bacillus coagulans* Rk-02 (Kodali e Sen, 2008). Tal comprovação pode se tornar uma alternativa interessante para a seleção de linhagens tolerantes ao oxigênio destinadas à produção de iogurtes.

O uso de uma ferramenta biotecnológica, como a glicose oxidase, tem-se apresentado como possível potencial para a solução desse problema (Cruz et al., 2010a), sem apresentar comprometimento dos aspectos sensoriais junto aos consumidores (Cruz et al., 2010b). Entretanto, torna-se importante avaliar sua influência nos parâmetros intrínsecos da qualidade do iogurte, na medida em que deve existir semelhança entre um produto probiótico e seu similar convencional. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da glicose oxidase como removedor de oxigênio e sua influência sobre os parâmetros de qualidade de iogurte probiótico.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- Crescimento das culturas**

Culturas puras de *Streptococcus thermophilus* TA 040, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LB 340 e *Bifidobacterium longum* BI-05 foram obtidas da Danisco (São Paulo, Brazil), mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brazil), reconstituído a 11 % p/v, foi utilizado para o preparo das culturas lácticas. Para *Bifidobacterium longum*, utilizou-se leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brasil) reconstituído a 11% adicionado de 0,5 p/v% de extrato de levedura (Oxoid, São Paulo, Brasil) e 0,05 p/v % de cisteína (Sigma, São Paulo, Brasil), enquanto que para as outras culturas, utilizou-se leite reconstituído desnatado suplementado com 2% p/v de glicose (Synth, São Paulo, Brasil). Todos os leites reconstituídos foram submetidos ao tratamento térmico ( $115^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ ) e a solução de cisteína utilizada foi esterilizada por filtração em membrana  $0,20\ \mu\text{m}$  (Milipore).. Todas as etapas de manipulação dos microorganismos foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

## 2.2- Processamento dos Iogurtes

Os processamentos dos iogurtes probióticos foram realizados de acordo com a metodologia tradicional (Tamine and Robison, 2007), seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes e dois níveis ( $2^2$ ), com quatro ensaios nas condições axiais ( $\alpha = 1,414$ ) e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 1). O leite cru integral padronizado a 3,5% gordura p/v (Atilatti, Itatiba, Brazil) foi submetido ao tratamento térmico em tanque de aço inox volume 50 litros (95°C/15 min), resfriado até 45°C e inoculado com 1% v/v de *Streptococcus thermophilus* TA 040, 1% v/v de *Lactobacillus delbrueki spp. bulgaricus* LB 340, e 2% v/v de *Bifidobacterium longum* BI – 05. Posteriormente, foi submetido à fermentação (45°C) com monitoramento do pH até alcançar 4,6. Em seguida, foi submetido ao resfriamento até 10°C e posterior rompimento do gel através de agitação com simultânea adição da glicose oxidase (Glucomax CO, Prozyn, São Paulo, Brasil) e glicose (Synth, São Paulo, Brasil), conforme concentrações indicadas na Tabela 1. Em seguida, o iogurte foi colocado em copos de polipropileno de 100 mL (permeabilidade 0,20 cm<sup>3</sup>O<sub>2</sub>/copo.dia (Dixie Toga, São Paulo, Brasil), sistema de embalagem comumente utilizado em iogurtes probióticos disponíveis no comércio brasileiro.

## 2.3- Sistema de embalagem e estocagem

O sistema de embalagem utilizado neste experimento foi o tradicionalmente usado no mercado brasileiro para iogurte em copos unitários, a saber: copo de polipropileno (PP) termosselado com tampa de alumínio/PP, capacidade 100 mL, adquiridos da Dixie Toga, São Paulo-SP. Após o acondicionamento do iogurte nos respectivos copos plásticos, esses foram estocados em geladeira a 5°C para a realização das análises, aos 15 dias de vida de prateleira.

**Tabela 1 – Ensaio do Planejamento Experimental Rotacional.\***

Ensaio	Glicose (ppm)		Glicose oxidase (ppm)	
	Codificada X <sub>1</sub>	Não Codificada	Codificada X <sub>2</sub>	Não Codificada
A	-1	9,4	-1	31,6
B	1	30,6	-1	31,6
C	-1	9,4	1	88,4
D	1	30,6	1	88,4
E	-1,41	5	0	60
F	1,41	35	0	60
G	0	20	-1,41	20
H	0	20	1,41	100
I	0	20	0	60
J	0	20	0	60
L	0	20	0	60

\* Foi realizado um ensaio onde não se adicionou glicose e glicose oxidase, ensaio controle (M).

## 2.4- Contagem dos Microorganismos Viáveis

1 mL de iogurte foi transferido para um tubo com rosca contendo 9 mL de solução de água peptonada estéril 0,1% p/v. A partir desta, foram feitas as diluições subsequentes, sendo a contagem dos microorganismos realizada em duplicata, utilizando plaqueamento em profundidade. A contagem de *S. thermophilus* TA 040 foi realizada utilizando Agar M17 (Oxoid, São Paulo Brasil), incubado em aerobiose a 37°C/ 48 horas, enquanto a contagem de *L. bulgaricus* LB 340 foi realizada utilizando MRS (Oxoid, São Paulo, Brasil) com pH 5,2 obtido pela adição de ácido acético glacial (Synth, São Paulo, Brasil), após incubação em anaerobiose a 45°C/72 horas (Rybka e Kailasapathy, 1996).

A contagem de *Bifidobacterium longum* Bl – 05 foi realizada em duplicata, utilizando Agar cloreto de lítio-propionato de sódio (MRS-LP), contendo concentrações de agentes inibitórios (0,5g/L de LiCl e 0,75g/L de propionato de sódio), após incubação em anaerobiose por 3 dias a 37°C (Zacarchenco e Massaguer-Roig, 2004).

## **2.5- Oxigênio Dissolvido**

As medidas de oxigênio dissolvido foram realizadas em dois momentos: no iogurte, imediatamente após a etapa de batimento e antes da adição da glicose oxidase e da glicose (tempo A), e aos 15 dias de estocagem refrigerada (tempo B). No primeiro caso, foram retirados 200 mL do produto e no segundo, as medidas foram realizadas nos produtos acondicionados nos copos plásticos. Foram realizadas cinco medidas, nas extremidades e no centro do pote. Foi utilizado um analisador de oxigênio dissolvido MO128 (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), obtendo resultados em concentração de oxigênio na amostra, expressa em partes por milhão (mg/L). A calibração do aparelho foi feita com água destilada (100% O<sub>2</sub>, 10 ppm) e metabissulfito e sulfito de sódio saturado (0%, 0 ppm) (American for Testing and Materials, 2001).

## **2.6- Composição Nutricional**

A composição centesimal e análise dos minerais – sódio (Na), cálcio (Ca) e potássio (K) - dos iogurtes probióticos foi determinada uma única vez, após 15 dias de estocagem refrigerada a 5°C. Sólidos totais foram determinados de forma gravimétrica após 24 horas de secagem em estufa (Micronal, São Paulo, Brasil). As cinzas foram determinadas gravimetricamente após aquecimento de 2 g da iogurte utilizando uma mufla a 550°C. A proteína foi determinada com base no total de nitrogênio, utilizando o método de Kjeldahl com posterior multiplicação pelo fator 6,38. A gordura foi determinada utilizando o método de Gerber. Todas as análises seguiram procedimentos padronizados e foram executados em triplicata (Brasil, 2006). A análise dos minerais foi realizada em duplicata utilizando um espectrometria de emissão atômica induzida por plasma (ICP-OES, marca Perkin Elmer, modelo OPTIMA 2000DV) com vista axial, potência 1300 W, fluxo do gás no plasma de 15 L/min, e linhas de nebulização 589,592, 766,490 e 317,933 para sódio, potássio e cálcio, respectivamente.

## **2.7- pH**

O pH das amostras de leite e iogurte foi determinado por meio de um potenciômetro digital (MICRONAL B-375) por inserção direta do eletrodo na amostra (Marshall, 1993).

## **2.8- Acidez Titulável**

A acidez titulável presente no leite foi determinada por meio do método de Dornic (NaOH 0,1N), sendo expresso em graus Dornic (°D). A acidez dos iogurtes foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico (Marshall, 1993).

## **2.9- Avaliação da Atividade Proteolítica**

A atividade proteolítica foi quantificada através da mensuração dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas probióticas, utilizando a solução reagente (OPA), contendo os seguintes reagentes: dodecil sulfato de sódio, tetraborato de sódio decahidratado, ditiotreitol e o-ftaldeideo e etanol. A atividade proteolítica das culturas foi expressa como absorvância dos derivados do OPA a 340 nm. O relativo grau de proteólise foi determinado como a diferença entre a atividade proteolítica do iogurte e atividade proteolítica do leite não fermentado (Church et al., 1983).

## **2.10- Consumo de Carboidratos e Produção de Metabólitos**

A quantificação do consumo dos carboidratos, a saber, lactose e glicose, e dos produtos metabólitos das culturas microbianas, a saber, ácido láctico e ácido acético, foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (modelo Varian 9010, Varian, Inc. Scientific Instruments, Palo Alto, CA, USA). O equipamento foi constituído de coluna de troca iônica Aminex HPX-87 H, (Bio-RAD Laboratories, Richmond, CA, USA) mantida a

65°C; detector de índice de refração modelo RI 2000 para determinação dos carboidratos e detector com comprimento de onda de 220 nm para a determinação dos ácidos orgânicos. O eluente foi filtrado e degaseificado utilizando solução de ácido sulfúrico preparado com água ultrapura, utilizando sistema de purificação Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA), pH 2,8, e vazão volumétrica de 0,6 mL/min. A preparação das amostras em duplicata consistiu na mistura de 3 mL de iogurte com 80 µL de 15,5 M ácido nítrico para posterior diluição com 1,0 mL da fase móvel, 0,01M ácido sulfúrico. A mistura resultante foi centrifugada a 14.000G por 30 minutos para remoção de proteínas, sendo o sobrenadante filtrado em membrana 0,20 µm (Milipore). A temperatura da coluna foi 65°C e a fase móvel 0,01 M ácido sulfúrico com fluxo de 0,6 mL/min (Donkor et al, 2005). A quantificação dos carboidratos e dos ácidos orgânicos foi realizada utilizando curva padrão de soluções dos compostos de concentrações conhecidas. O volume de injeção foi 25 µL, utilizando um injetor automático, e a integração dos picos cromatográficos foi feita pelo software Millenium.

## **2.11- Compostos de Aroma**

A quantificação de diacetil e acetaldeído foi realizada utilizando micro-extração em fase sólida e cromatografia gasosa. Para as análises, seguiu-se a metodologia descrita por Conurso et al. (2008) com algumas modificações: Pesaram-se 2 g de iogurte em vials de 40 mL e adicionaram-se a este 2 mL de solução saturada de NaCl; os vials foram então fechados com tampas próprias dotadas de septos de PTFE/silicone (Supelco - Bellefonte, PA, USA) e mantidos à temperatura de 40°C por 15 min para equilíbrio, e após 30 min para exposição da fibra e extração dos compostos voláteis. Durante a extração a amostra permaneceu sob agitação com auxílio de um agitador magnético do tipo "stir bar" a 750 rpm. Após este período de extração, a fibra foi submetida à dessorção térmica a 250°C no injetor do cromatógrafo a gás por um período de 7 minutos. Para evitar efeito memória da fibra, realizou-se um branco da fibra entre cada extração, a fim de garantir a qualidade dos experimentos. Na micro-extração em fase sólida, foi utilizada fibra comercial de SPME

(Supelco, Bellefonte, PA, USA) PN: 57328, 50/30 $\mu$ m divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Para as análises cromatográficas utilizou-se um cromatógrafo a gás (GC) marca Varian 3800, dotado de um detector de ionização de chama (FID) equipado com o software *Star Chromatography Workstation* (versão 4.5). Para a separação cromatográfica, empregou-se uma coluna capilar DB-Wax (3000 mm x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25  $\mu$ m de fase estacionária) J&W Scientific (EUA). As condições de análises foram: injetor 250°C em modo *splitless*, por 1 min.; fluxo de purga do septo 20 mL.min<sup>-1</sup>; gás de arraste (1mL.min<sup>-1</sup>; rampa de temperatura a 40°C (10 s), elevando 3°C.min<sup>-1</sup> até 65°C, permanecendo nesta temperatura por 1 min).

## **2.12- Análises Estatísticas**

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram inicialmente submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das variâncias. Como segunda etapa, foi realizada análise de variância *one-way* tendo como fonte de variação a amostra, seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0, com 95% de significância (Stat Soft™, Tulsa, OK, USA).

### **3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1- Composição Centesimal**

Neste trabalho, foi observado (Tabela 2) que a adição da enzima glicose oxidase em seus diversos níveis não influenciou ( $p < 0,05$ ) a composição nutricional dos iogurtes probióticos para nenhum dos componentes e minerais analisados. Todos os iogurtes apresentaram níveis de proteínas entre 2,90 e 3,08%, que são valores superiores ao quantitativo mínimo de 2,90% exigido pela legislação brasileira para este nutriente. Adicionalmente, todos os iogurtes apresentaram valores de lipídios entre 1,90 e 2,90%, o que faz com que eles estejam classificados como iogurtes parcialmente desnatados, já que seu teor lipídico está situado na faixa entre 0,6 e 2,9% (Brasil, 2007). Com relação ao teor de minerais, foram verificados valores para cálcio, sódio e potássio nos intervalos de 24,73 - 22,02, 13,03 - 14,14 e 7,74 - 8,38 ppm, respectivamente, valores esses concordantes com o preconizado por Tamime e Robinson (2007). Entretanto, com relação aos minerais, a legislação brasileira não menciona nenhuma recomendação com relação ao nível de minerais presentes em iogurtes.

A composição química de um produto alimentício fornece informações úteis para o consumidor das suas características nutricionais, sendo importante para fins regulatórios, pois auxiliam as agências de saúde a elaborarem os rótulos dos produtos que são os meios de comunicação entre o consumidor e a indústria de alimentos. Na medida em que o iogurte possui um papel importante nos hábitos alimentares de diversas nações, independente do nível de desenvolvimento sócio-econômico (Capdevila et al, 2003; Lowe e Worsley, 2003; Zhu et al, 2009), e com reputação positiva na memória das pessoas, essa informação torna-se imprescindível, sendo necessário seu monitoramento de forma periódica. Outra informação relevante é que os níveis quantitativos de nutrientes no iogurte podem influenciar a sobrevivência e estabilidade das bactérias probióticas no produto (Torriani et al, 1996; Gun e Isikli, 2006) bem como seus atributos sensoriais (Muir et al, 1997) e a produção de compostos de aroma (Gardini et al, 1999).

**Tabela 2 - Composição Centesimal do Iogurte.\***

	Sólidos Totais	Proteína	Lipídio	Cinzas	Na	Ca	K
A	11,18 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	1,90 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	140 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>
B	10,78 <sup>a</sup>	2,96 <sup>a</sup>	2,85 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>	120 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>
C	10,54 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	65 <sup>a</sup>	130 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>
D	10,91 <sup>a</sup>	2,97 <sup>a</sup>	2,89 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>
E	11,20 <sup>a</sup>	3,01 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	0,73 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>	137 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>
F	10,76 <sup>a</sup>	3,08 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	79 <sup>a</sup>
G	11,08 <sup>a</sup>	2,99 <sup>a</sup>	2,56 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>	128 <sup>a</sup>	77 <sup>a</sup>
H	10,32 <sup>a</sup>	2,93 <sup>a</sup>	2,80 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>	135 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>
I	11,17 <sup>a</sup>	3,05 <sup>a</sup>	2,72 <sup>a</sup>	0,71 <sup>a</sup>	61 <sup>a</sup>	132 <sup>a</sup>	83 <sup>a</sup>
J	11,17 <sup>a</sup>	2,91 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>	0,74 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	129 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>
L	11,28 <sup>a</sup>	2,90 <sup>a</sup>	2,45 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>	122 <sup>a</sup>	82 <sup>a</sup>
M	11,26 <sup>a</sup>	2,92 <sup>a</sup>	2,42 <sup>a</sup>	0,72 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>	132 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>

\* Análises realizadas em triplicata, exceto Na, Ca e K, que foram realizados em duplicata. Sólidos Totais, proteínas, lipídios e cinzas expressos em % mássica. Na, Ca e K expressos em parte por milhão (ppm). Letras iguais na mesma coluna indicam ausência de significância estatística pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Do ponto de vista nutricional, o iogurte tem composição semelhante ao leite que foi utilizado na sua fabricação, e desta forma constituiu-se em excelente fonte de proteína, cálcio e vitaminas do complexo B que, de forma geral, não são influenciadas pelo método utilizado em seu processamento. Entretanto, a qualidade da matéria-prima, eficiência da operação de padronização, substância utilizada para aumento do teor de sólidos totais, tipo e metabolismo de cultura láctica utilizada no processo fermentativo, podem representar fontes de variação (Buttriss, 1997). Resultados diversos e semelhantes têm sido observados na composição nutricionais de iogurtes (Musaiger et al., 1998; Seçkin, 2004; De Noni et al, 2004; Padovani et al, 2007, Kyriacou et al., 2008; Hussaim et al, 2009), devendo ser entendidos neste contexto, bem como no uso das metodologias utilizadas.

### **3.2- Parâmetros de Qualidade**

De forma geral, foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre a amostra M, onde não foi adicionadas glicose oxidase e glicose em relação aos demais iogurtes adicionados de glicose e glicose oxidase para todos os parâmetros avaliados, exceto para a contagem de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Tabela 3). Foi sugerida a necessidade de uma atuação conjunta do sistema glicose oxidase/glicose (enzima/substrato) para possibilitar uma redução do oxigênio no interior dos iogurtes probióticos, possibilitando um maior desenvolvimento dos microorganismos envolvidos. Isso refletiu em maior contagem da população microbiana, com reflexos na produção de ácidos orgânicos e compostos de aroma. Adicionalmente, foram descritas maior pós-acidificação e proteólise, bem como maior produção de produtos metabólitos, tais como a decomposição da lactose e menor formação de glicose, além de formação de ácidos orgânicos, como ácido lático e ácido acético, e a maior produção de voláteis (diacetil e acetaldeído). De forma geral, as amostras I, J e L com valores intermediários de glicose/glicose oxidase (20/60 ppm, respectivamente) apresentaram valores menores para oxigênio dissolvido, pH, e valores mais elevados para acidez titulável, contagem de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. longum*, bem como elevada produção de ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético) e compostos de aroma (diacetil e acetaldeído).

#### **3.2.1- Pós-acidificação**

O processamento do iogurte é, por natureza, um processo fermentativo do leite, onde as culturas lácticas adicionadas têm como função utilizar a lactose como substrato, possibilitando sua conversão em ácido lático (Lourens-Hattingh e Viljoen, 2001). Como reflexo imediato, ocorre a formação do gosto ácido característico do produto, que do ponto de vista físico-químico, é expresso pelos baixos valores de pH e aumento da acidez titulável. Esse sabor ácido vai se acentuando ao longo da estocagem do produto, devido ao desenvolvimento de *L. bulgaricus*, que mesmo em temperaturas baixas de estocagem,

apresenta capacidade de produção de ácido láctico e peróxido de hidrogênio, caracterizando o que é chamado de pós-acidificação (Kailasapathy e Rybka, 1997).

Bactérias probióticas, em especial bifidobactérias, apresentam sensibilidade em baixos valores de pH, embora exista a dependência da linhagem do microorganismo (Lankaputira et al, 1996; Jayamanne e Adams, 2006; Shigwedah e Mwandemele, 2010), devido a presença da enzima FoF1-ATPase (Van de Guchte, 2002). Contudo, o decréscimo do pH ao longo da estocagem do produto é um dos principais fatores da baixa viabilidade desse grupo microbiano ao longo da estocagem de iogurtes (Shah, 2000). Estratégias são utilizadas para minimizar o efeito do ácido sobre as bactérias probióticas em iogurtes, como a seleção adequada de linhagens (Godward et al, 2000), e a adaptação da cepa probiótica às condições subletais de estresse. A alternativa consiste em uma breve exposição do microorganismo a uma tolerância induzida em meio com baixos valores de pH por um limitado período de tempo (Maus e Igham, 2003; Ding e Shah, 2007; Collado e Sanz, 2007; Sanchez et al, 2007, Sanz, 2007). Também, existem outros artifícios como a utilização de linhagens selecionadas e/ou modificadas geneticamente de *L. bulgaricus* com menor velocidade metabólica, o que resulta em um decréscimo mais lento de pH e menor atividade proteolítica (Möller et al, 2007; Ongol et al, 2007) e a microencapsulação com prebióticos (Iver e Kailasapathy, 2005). É importante reiterar que a retirada de *L. bulgaricus* do processo de fabricação do iogurte, que seria a alternativa mais fácil, prática e econômica, implicará em questões regulatórias, descaracterizando o produto; de acordo com a legislação nacional e de muitos outros países, é obrigatório existir na formulação do iogurte células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* (Brasil, 2007).

Nesta pesquisa foram observados baixos valores de pH (variação de 4,05 - amostra B e 4,29 - amostra M,) e elevados valores de acidez titulável (variação de 0,83, amostra B e 0,57 % ácido láctico, amostra M), constatando a ocorrência de elevada pós-acidificação após 15 dias de estocagem, o que corresponde à metade da vida de prateleira dos iogurtes comerciais disponíveis no mercado brasileiro (aproximadamente 30 dias), em relação ao valor inicial de pH, a saber 4,5 no tempo A. A amostra M, onde não foi

adicionada a enzima e o substrato, apresentou maior valor de pH e menor acidez titulável (4,29 e 0,57% ácido láctico, respectivamente), indicando que o metabolismo das culturas foi menor, em relação aos outros iogurtes, onde não foi adicionado glicose oxidase e glicose (Tabela 3). Tal fato pode ser atribuído à remoção do oxigênio, criando as condições favoráveis para a multiplicação das culturas do iogurte e das probióticas. Conseqüentemente, resultou em maior metabolismo, com a conseqüente produção de ácidos orgânicos e abaixamento do pH, ou seja, elevação da acidez titulável. Almeida et al (2008) relata que a acidez titulável é um importante indicador de qualidade em iogurtes, já que seu aumento pode sugerir inadequadas condições de estocagem dos produtos, as quais proporcionam condições para o desenvolvimento de microorganismos patogênicos e deteriorantes, comprometendo a segurança e a vida de prateleira do produto. Também, Salji e Ismail (1983) sugerem que o pH é um indicador confiável para o monitoramento de acidez em iogurtes durante a estocagem refrigerada. Todavia, diferentes valores de pH são observados em outros estudos (Simitaru e Botez, 2006), em geral, superiores, o que pode estar relacionado às culturas utilizadas, que apresentam diferentes metabolismos. A legislação brasileira não especifica valores para pH de iogurtes, estipulando apenas valores para acidez titulável, a saber, 0,6 a 1,5 % de ácido láctico. Com base em tal exigência, todos os iogurtes probióticos produzidos apresentaram-se de acordo com a legislação vigente (Brasil, 2007), excluindo apenas a amostra M.

### **3.2.2- Oxigênio Dissolvido**

No processo de fabricação de iogurtes, naturalmente, ocorre à incorporação do oxigênio durante as etapas de homogeneização, envase e estocagem. Essa situação torna-se mais crítica no caso particular do iogurte batido, devido ao rompimento mecânico do gel (Talwakar e Kailasapathy, 2003).

Bactérias probióticas se apresentam extremamente sensíveis ao oxigênio na medida em que são isoladas do trato intestinal humano, pois são de metabolismo anaeróbio ou microaerófilo. Essa sensibilidade é especialmente sentida pelo gênero *Bifidobacteria*,

embora isso seja dependente da linhagem utilizada (Simpson et al, 2005; Kawasaki et al, 2006; Jayamanne e Adamns, 2009). Bactérias probióticas apresentam reduzida capacidade de eliminação do oxigênio, e, o que resulta em acúmulo de compostos tóxicos na célula microbiana, como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que eventualmente levam à morte celular (Champagne e Gardner, 2005). Outro ponto a ser apresentado é que o  $O_2^-$  pode ser convertido a  $H_2O_2$  diretamente pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Logo, para apresentarem viabilidade na presença de oxigênio, as bactérias probióticas precisam apresentar capacidade de conversão dessas espécies reativas em espécies não-tóxicas. A aerotolerância de linhagens de bifidobactérias está relacionada à presença ativa das enzimas NADH-  $H_2O_2$  oxidase e NADH-peroxidase, que catalisam a redução de  $O_2$  em  $H_2O_2$  e a redução  $H_2O_2$  em  $H_2O$ , respectivamente (Shimamura et al, 1992; Shin e Park, 2007; Soon-Young e Park, 1997; Talwakar e Kailasapathy, 2004a).

O principal objetivo desta pesquisa foi avaliar o desempenho da enzima glicose oxidase na remoção do oxigênio dissolvido em iogurtes probióticos. Trata-se de uma opção biotecnológica, que já vem sendo utilizada com sucesso na remoção de oxigênio em outros produtos alimentícios (Min et al, 2003; Bonet, et al, 2006). Níveis de oxigênio variaram de 0,93 (iogurtes I e J) a 1,84 ppm (iogurte H) nos iogurtes probióticos contendo a glicose oxidase, enquanto que para o iogurte M, onde não foi adicionada a enzima e nem o substrato glicose, foi medido 5,94 ppm, quantidade superior (69,02 a 86,03%) aos outros iogurtes, considerando o menor e maior valor obtido para esse parâmetro ( $p < 0.05$ ) (Tabela 3). Resultados superiores para este parâmetro foram encontrados em leites fermentados probióticos com *B. animalis ssp. lactis* e *L. acidophilus* aos 15 dias de estocagem (Damin et al, 2008).

### **3.2.3- Contagem de Culturas Microbianas**

A obtenção de efeitos terapêuticos desejáveis em iogurtes probióticos passa obrigatoriamente pela manutenção da viabilidade das bactérias probióticas em quantidade

suficiente ao longo da estocagem do produto. Tem sido sugerido que esse grupo microbiano deva estar presente no produto alimentício em quantidade mínima de  $10^6$  UFC/g, o que representa uma dose diária de  $10^8$  UFC/g, para compensação de uma possível redução desse número durante a passagem pelo trato gastrointestinal (Shah, 2000). Dado à complexidade das exigências nutricionais desse grupo microbiano, bem como seu nível de sensibilidade aos fatores inerentes ao processamento de iogurte, como baixo valor de pH, presença de oxigênio e estresse pelo frio, além de interações com as culturas do iogurte e mesmo outras bactérias probióticas, as falhas no cumprimento desse pressuposto tem sido descritas para os aspectos quantitativo ou qualitativo (Dunlap et al, 2009; Ibrahim e Carr, 2006; Weise, 2003; Weise, 2002). Neste experimento observou-se que a adição de glicose oxidase proporcionou a contagem de probióticos na faixa de 7 a 8,5 log UFC/g, sendo que a amostra controle apresentou 6,2 log UFC/g aos 15 dias de estocagem. Com relação aos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0.05$ ) para as amostras contendo a enzima, em relação a amostra controle, cujas contagens variaram entre 9,85 e 8,92 e 7,54 e 8,93 log UFC/g, respectivamente (Tabela 3). Observou-se menor contagem de *L. bulgaricus*, provavelmente devido a sua maior sensibilidade ao oxigênio, conforme demonstrado por Beshkova et al (2002). Os autores constataram uma drástica redução na contagem deste microorganismo, quando cultivado isoladamente e/ou de forma conjunta com *S. thermophilus*, em meio reacional contendo 30% de oxigênio, ao passo que *S. thermophilus* não teve sua viabilidade afetada até 40% de oxigênio. Contudo, não foi observado influência da quantidade de oxigênio na contagem final dos microorganismos, pois está de acordo com o preconizado pela legislação brasileira para iogurtes, que estabelece uma contagem mínima de 7 log UFC/g de bactérias lácticas no iogurte pronto para o consumo (Brasil, 2007). Resultados semelhantes foram mostrados por Roberts e Maust (1995) e Donkor et al (2007), no monitoramento da população de microorganismos *starters* e probióticos, em iogurtes comercializados nos Estados Unidos e Austrália. Os resultados encontrados podem estar

relacionados as linhagens do microrganismos utilizados bem como os menores valores de oxigênio dissolvido encontrados.

### **3.2.4- Proteólise**

Observou-se nesta pesquisa uma maior atividade proteolítica ( $p > 0,05$ ) em todos os iogurtes que continham glicose oxidase/glicose em sua formulação, em relação à formulação em que o sistema enzima/substrato estava ausente, conforme mostrado na tabela 3. Os resultados sugerem que existiu uma maior contribuição de *B. longum* neste processo, o que isso foi possível devido às condições mais favoráveis criadas pela remoção do oxigênio no sistema reacional, que possibilitaram o desenvolvimento do cepa probiótica, na medida em que os iogurtes adicionados de glicose oxidase/glicose apresentaram maiores contagens desse microorganismo e maior valores de proteólise em detrimento as contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* que não apresentaram diferença ( $p > 0,05$ ). Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar o comportamento destes parâmetros ao longo da estocagem dos iogurtes probióticos, aproximadamente 30 dias. Contudo, é interessante saber que a maior viabilidade de *B. longum* pode ser obtida sem a necessidade de outras soluções tecnológicas, como a suplementação do meio com prebióticos (Akalin et al, 2007) e proteína do soro e hidrolisados de caseína (Dave e Shah, 1998).

A produção do iogurte é por natureza um processo simbiótico. Requer a inoculação de quantidades iguais de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* no leite com posterior incubação na faixa de 37-45°C. Sabe-se que o *S. thermophilus* cresce primeiro e consome a lactose, utilizando a enzima  $\beta$ - galactosidase, produzindo ácido fórmico e dióxido de carbono, que servirão como nutrientes para o crescimento de *L. bulgaricus*. Este último, por ser um microorganismo altamente proteolítico, fornecerá os aminoácidos requeridos para o crescimento do *S. thermophilus* (Wouters et al, 2002). Bactérias lácticas têm um complexo sistema proteolítico capaz de converter a proteína do leite em peptídeos e aminoácidos livres que se fazem necessário para a produção de ácido e muitas vezes necessitam de

uma fonte externa de aminoácidos ou peptídeos (Savikoji et al, 2006). O sistema proteolítico é composto de uma proteinase presente em um envelope (CEP-proteinase) que está envolvida na quebra inicial da caseína (peptidases) que hidrolisam os longos peptídeos formados e os específicos sistemas de transporte que estão envolvidos no carregamento de pequenos peptídeos e aminoácidos (Law e Haandrikman, 1997). Em relação às culturas dos iogurtes, microorganismos apresentam perfis proteolíticos que são dependentes da linhagem, existindo uma grande variação de atividade proteolítica expressa por aminopeptidases, dipeptidases e tripeptidases, sendo que linhagens do gênero *Bifidobacteria* apresentam uma menor capacidade em relação à linhagem de *Lactobacillus* (Shihata e Shah, 2000).

### **3.2.5- Consumo de Carboidratos e Produção de Ácidos Orgânicos**

Os resultados (Tabela 3) indicam a existência de diferença ( $p < 0,05$ ) entre a produção dos ácidos orgânicos e a quantidade de consumo dos carboidratos entre os iogurtes probióticos suplementados com glicose oxidase/glicose em relação ao iogurte controle (formulação M). Iogurtes que continham maiores quantidades de glicose oxidase apresentaram maior produção de ácido lático e ácido acético, maior consumo de lactose e menor quantidade de glicose disponível. Tais resultados indicam que a glicose adicionada nas diversas formulações foi útil em sua maior parte para a ativação da enzima. Provavelmente houve a contribuição do *B. longum* para estes resultados, na medida em que a maior produção e consumo destes compostos ocorreram nas formulações que apresentaram a maior concentração do referido microorganismo, a saber, iogurtes E, F, I, J e L. Isso pode estar relacionado à atuação da enzima, que ao consumir o oxigênio do meio reacional, criou condições para o crescimento da cepa probiótica.

Resultados diferentes foram observados em outros trabalhos envolvendo iogurtes probióticos no mesmo período de análise (15 dias) o que pode estar relacionado às diferentes cepas utilizadas; a suplementação do meio com prebióticos (Donkor et al., 2007); ao uso da microencapsulação (Adhikari et al., 2002); bem como em pesquisas de

monitoramento de sua qualidade (Gambelli et al., 1999; Batista et al, 2008; Shapiro e Silanikove, 2010). O uso da enzima glicose oxidase foi interessante ao proporcionar uma maior viabilidade do microorganismo probiótico, mantendo sua funcionalidade, sem uma expressiva produção de metabólitos ácidos, o que poderia comprometer a aceitação do produto perante aos consumidores.

Durante a fabricação do iogurte as mudanças que ocorrem nos constituintes do leite estão relacionadas aos ingredientes adicionados e ao processo fermentativo. O papel fundamental das bactérias lácticas é utilizar a lactose como substrato, convertê-la em glicose e galactose, através da enzima  $\beta$ -galactosidase. A primeira, através da via glicolítica, é convertida em ácido láctico, o produto final da fermentação do leite que caracteriza o iogurte (Lourens-Hattingh e Vijoen, 2000). A presença adicional da cepa probiótica *B. longum* no iogurte pode contribuir para o aumento do nível de compostos ácidos, na medida em que como parte do seu metabolismo, pode haver a produção de ácido acético e láctico na proporção de 3:2 (Tamime et al., 1995). De fato, tem sido relatada a produção de ácidos orgânicos por bactérias do gênero bifidobactéria em iogurte, embora a quantidade produzida esteja dependente da linhagem (Samona et al., 1996).

### **3.2.6- Compostos de Sabor e Aroma**

Bactérias probióticas não apresentam uma capacidade de geração de compostos de aroma acentuada e, em geral, iogurtes e leites fermentados probióticos são pobres em aroma, devido à baixa atividade da enzima treonina aldolase, que catalisa a formação do acetaldeído, tendo como substrato a treonina. Entretanto, a ausência da enzima álcool-desidrogenase em algumas linhagens destes microorganismos é um fator positivo, na medida em que impede a conversão deste em etanol (Gardini et al., 1997).

Neste trabalho foi observado que as maiores concentrações de diacetil e acetaldeído foram observadas nas amostras I, J, L, que por sua vez, apresentaram elevadas contagens das culturas lácticas e do microorganismo probiótico, confirmando uma tendência já relatada anteriormente. Além disso, a amostra M, isenta de glicose e glicose

oxidase, apresentou menor quantidade ( $p < 0,05$ ) de ambos os compostos, diferindo de todas as amostras que possuíam em sua formulação o complexo enzima/substrato (Tabela 3). Ressalta-se, novamente, a influência positiva da adição da enzima na formação de compostos de aroma do iogurte, representando seu potencial sobre a melhoria da qualidade de iogurtes .

Baranowska (2006) relata que os níveis de lactose e glicose presentes no leite não influenciaram a produção de diacetil e acetaldeído no iogurte, mas sim a suplementação do mesmo com os precursores dos compostos de aroma. Igualmente, é relatado por outros autores que a produção de compostos de aroma é bastante diversificada e depende das linhagens utilizadas e das interações entre elas (Imhof et al., 1995; Ott et al., 1999;; Bozanic et al, 2003; Gallardo-Escamilla et al, 2005). Recente trabalho confirma essa informação, ao investigar os comportamentos de diacetil e acetaldeído em iogurtes processados com culturas isoladas ou juntas, ao longo da vida de prateleira. Os autores verificaram que a quantidade produzida de cada composto dependerá da cultura utilizada e das interações entre elas. De forma geral, a produção de diacetil foi maior em iogurtes fermentados por *S. thermophilus*, de forma única, enquanto que a produção de acetaldeído foi superior em iogurtes fermentados por *L. bulgaricus* (Pinto et al., 2009). Ott et al. (2000) reportam que a diferença nos compostos de aroma em iogurtes pode estar relacionada à intensidade da acidez dos produtos.

De fato, o processo fermentativo possui um grande impacto nos atributos sensoriais do produto, na medida em que a transformação química da matéria-prima e a liberação de metabólitos contribuem para o aroma, sabor e textura (Vlieg e Hugenholtz, 2007). Em iogurtes, o atributo sabor depende da concentração de ácido láctico e dos compostos carbonílicos, como o acetaldeído e diacetil que tem como precursores os constituintes do leite utilizado na fabricação do iogurte e dos produtos da hidrólise enzimática das culturas lácticas utilizadas no seu processamento (Zourari et al., 1992. Longo et al., 2006). O acetaldeído é considerado o principal componente do aroma no iogurte, enquanto o diacetil pode apresentar importância, quando a concentração de acetaldeído é baixa

(Zourari et al., 1992), embora tenha sido reportado que outros compostos como 1-nonen-3-one também podem ser relevantes (Ott et al., 1997).

*S. thermophilus* é responsável pela produção de diacetil no iogurte, como produto resultante do metabolismo do piruvato, enquanto *L. bulgaricus* apresenta esse mesmo comportamento em relação ao acetaldeído (Zourari et al., 1992). Diacetil (2,3-butanodiona), uma diacetona, provém do metabolismo do piruvato, na medida em que culturas lácticas termofílicas não são capazes de metabolizar citrato. Linhagens de *S. thermophilus* possuem as enzimas  $\alpha$ -acetolactato sintase e acetohidroxi sintase que produzem acetolactato e 2-hidroxiacetolactato, respectivamente, a partir do piruvato. Estes dois compostos, por sua vez, por espontânea descarboxilação, podem ser convertidos em diacetil e 2,3-pentanodiona ou por meio de reações enzimáticas em aminoácidos de cadeia ramificada, como valina, leucina e isoleucina (Monnet & Corrieu, 2007). Os primeiros aminoácidos têm sido descritos como essenciais para *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, mas não essenciais para *Streptococcus* (Ott et al., 2000a). A produção de acetaldeído por *L. bulgaricus* é realizada através do aminoácido treonina e glicina em uma reação catalisada pela enzima treonina-aldolase, a qual pode vir a ser reduzido a etanol pela catálise enzimática da álcool-desidrogenase (Marshall e Colew, 1983). Embora linhagens de *S. thermophilus* também apresentem essa enzima, sua atividade decresce de forma significativa com o aumento de temperatura. Na medida em que a produção de iogurte é realizada em temperaturas altas (43-45°C), a produção de acetaldeído em iogurte é realizada principalmente por *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Lees e Jago, 1976).

#### **4 - CONCLUSÕES**

A utilização da glicose oxidase se apresentou como uma ferramenta em potencial para a remoção do oxigênio em iogurtes probióticos, aumentando a população viável de *B. longum* e alterando de forma significativa os parâmetros característicos de qualidade do produto. Em particular, foi observada maior produção de ácidos orgânicos e compostos de aroma bem como maior pós-acidificação e proteólise nos iogurtes adicionados de glicose e glicose oxidase. Estudos futuros devem avaliar seu desempenho de forma periódica ao longo da estocagem do iogurte, bem como o efeito de outros sistemas de embalagem com menor permeabilidade ao oxigênio. Em resumo, não houve nenhuma interferência negativa do uso da enzima glicose oxidase nos diversos iogurtes probióticos avaliados, confirmando a adequação da proposta tecnológica aqui apresentada.

**Tabela 3- Parâmetros de Qualidade de Iogurtes Probióticos com glicose oxidase.\***

	<b>pH</b>	<b>Acidez titulável</b>	<b>Oxigênio Dissolvido</b>	<b>Proteólise</b>	<b><i>S. thermophilus</i></b>	<b><i>L. bulgaricus</i></b>	<b><i>B. longum</i></b>	<b>Lactose</b>	<b>Glicose</b>	<b>Ácido Acético</b>	<b>Ácido Lático</b>	<b>Diacetil</b>	<b>Acetaldeído</b>
A	4,12 <sup>b</sup>	0,78 <sup>b</sup>	1,29 <sup>b</sup>	0,525 <sup>b</sup>	9,14 <sup>a</sup>	7,94 <sup>a</sup>	7,2 <sup>b</sup>	1,06 <sup>c</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,69 <sup>a</sup>	4,07 <sup>a</sup>	55,30 <sup>b</sup>	48,42 <sup>d</sup>
B	4,05 <sup>c</sup>	0,83 <sup>c</sup>	1,10 <sup>c</sup>	0,585 <sup>a</sup>	8,96 <sup>a</sup>	8,07 <sup>a</sup>	8,7 <sup>a</sup>	1,77 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	2,67 <sup>b</sup>	4,04 <sup>c</sup>	31,40 <sup>d</sup>	44,88 <sup>d</sup>
C	4,06 <sup>c</sup>	0,82 <sup>c</sup>	1,17 <sup>c</sup>	0,581 <sup>a</sup>	9,23 <sup>a</sup>	8,18 <sup>a</sup>	7,0 <sup>b</sup>	1,68 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,53 <sup>c</sup>	4,03 <sup>c</sup>	30,25 <sup>d</sup>	38,00 <sup>e</sup>
D	4,09 <sup>c</sup>	0,81 <sup>c</sup>	1,52 <sup>b</sup>	0,574 <sup>a</sup>	9,85 <sup>a</sup>	8,12 <sup>a</sup>	7,7 <sup>b</sup>	1,75 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,51 <sup>c</sup>	4,05 <sup>b</sup>	35,67 <sup>d</sup>	44,87 <sup>d</sup>
E	4,09 <sup>c</sup>	0,81 <sup>c</sup>	1,30 <sup>c</sup>	0,571 <sup>a</sup>	9,04 <sup>a</sup>	8,31 <sup>a</sup>	6,9 <sup>b</sup>	1,61 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	2,58 <sup>b</sup>	4,05 <sup>b</sup>	42,05 <sup>c</sup>	40,91 <sup>d</sup>
F	4,09 <sup>b</sup>	0,78 <sup>b</sup>	1,20 <sup>c</sup>	0,552 <sup>b</sup>	8,92 <sup>a</sup>	8,05 <sup>a</sup>	8,54 <sup>a</sup>	1,69 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,61 <sup>a</sup>	4,07 <sup>a</sup>	42,66 <sup>c</sup>	63,37 <sup>b</sup>
G	4,13 <sup>b</sup>	0,76 <sup>b</sup>	1,34 <sup>b</sup>	0,497 <sup>c</sup>	9,19 <sup>a</sup>	8,35 <sup>a</sup>	7,55 <sup>b</sup>	1,81 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,57 <sup>b</sup>	4,05 <sup>b</sup>	48,94 <sup>c</sup>	45,37 <sup>d</sup>
H	4,18 <sup>b</sup>	0,76 <sup>b</sup>	1,84 <sup>b</sup>	0,483 <sup>c</sup>	9,01 <sup>a</sup>	8,53 <sup>a</sup>	7,4 <sup>b</sup>	2,28 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	2,60 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>	47,50 <sup>c</sup>	77,34 <sup>a</sup>
I	4,09 <sup>c</sup>	0,74 <sup>c</sup>	0,93 <sup>d</sup>	0,501 <sup>b</sup>	9,43 <sup>a</sup>	8,05 <sup>a</sup>	8,48 <sup>a</sup>	1,54 <sup>b</sup>	0,01 <sup>b</sup>	2,65 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>	59,57 <sup>a</sup>	79,16 <sup>a</sup>
J	4,05 <sup>c</sup>	0,74 <sup>c</sup>	0,93 <sup>d</sup>	0,553 <sup>b</sup>	9,28 <sup>a</sup>	8,10 <sup>a</sup>	8,38 <sup>a</sup>	1,68 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,68 <sup>a</sup>	4,02 <sup>c</sup>	55,04 <sup>b</sup>	51,82 <sup>c</sup>
L	4,07 <sup>c</sup>	0,72 <sup>c</sup>	0,95 <sup>d</sup>	0,547 <sup>b</sup>	9,75 <sup>a</sup>	8,26 <sup>a</sup>	8,45 <sup>a</sup>	1,68 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	2,66 <sup>a</sup>	4,05 <sup>b</sup>	64,95 <sup>a</sup>	68,41 <sup>a</sup>
M	4,29 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	5,94 <sup>a</sup>	0,423 <sup>d</sup>	9,14 <sup>a</sup>	8,54 <sup>a</sup>	6,2 <sup>c</sup>	2,96 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	1,55 <sup>c</sup>	3,02 <sup>c</sup>	52,36 <sup>b</sup>	56,62 <sup>c</sup>

\* Análises realizadas em duplicata. Oxigênio dissolvido está expresso em ppm. Acidez Titulável está expresso em %.ácido lático. *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *B. longum* estão em expressos em log UFC/mL. Glicose, Lactose, Ácido Lático e Ácido Acético estão expressos em mg.mL<sup>-1</sup>. Diacetil e Acetaldeído estão expressos em µg.g<sup>-1</sup>. Letras diferentes na mesma coluna indicam presença de significância estatística (p< 0.05) de acordo com o Teste de Tukey.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adikari, K., L.U. Grünp, A. Mustapha and L.N. Fernando. 2002. Changes in the profile of organic acids in plain set and stirred yogurt during manufacture and refrigerated storage. *J. Food Qual.* 25: 435-451.
- Akalin, A.S., S. Gönç, G. Ünal and S. Fenderya. 2007. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage . *J. Food Sci.* 72:222-227.
- Almeida, M.H.B., S.S. Zoellner, A.G. Cruz, M.R.L. Moura, L.M.J. Carvalho and A.S. Sant´Ana. 2008. Potentially probiotic açai yogurt. *Int. J. Dairy Technol.* 61:178-182.
- American Society for testing and Materials - ASTM . Standard practice for oxygen gas transmission rate through plastic film and sheeting using a coloumetric Sensor. ASTM D3985-95. Philadelphia, 2001. 6p.
- Antunes, A.E.C, T.F. Cazetto and H.M.A.B. Cardello. 2005. Viability of probiotic microorganism during storage, postacidification and sensory analysis of fat-free yogurts with added whey protein concentrate. *Int. J. Dairy Technol.* 58:169-173.
- Baranowska, M. 2006. Intensification of the synthesis of flavour compounds in yogurt by milk enrichment with their precursors. *Pol. J. Food and Nut. Sci.* 15: 5-11.
- Barkirci, I. and A. Kavaz. 2008. An investigation of some properties of banana yogurts made with commercial ABT-2 starter culture during storage. *Int. J. Dairy Technol.* 61:270-276.
- Batista, A.L.D., R. Silva, A.G. Cruz, J.A.F. Faria, M.R.L Moura and L.M.J. Carvalho. 2008. Lactose intolerance: possibility of ingesting fermented dairy products. *Michwissenschaft* 63:364-366.
- Beshkova, D.M., E.D. Simova, G.I. Frengova, Z.I. Simov and Z.N. Spasov. 2002. Effect of oxygen on batch yogurt cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 361-365.
- Beshkova, D.M., E.D. Simova, G.I. Frengova, Z.I. Simov. 1998. Production of flavor compounds by yogurt starter cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 180-186.
- Bonet, A., C.M. Rosell, P.A. Caballero, M. Gómez, I. Pérez-Munuera and M.A. Lluch. 2006. Glucose oxidase effect on dough rheology and bread quality: A study from macroscopic to molecular level. *Food Chem.* 99:408-415.
- Bozanic, R., L. Tratnik and M. Hruskar. 2003. Influence of culture activity on aroma

components in yogurts produced from goat's and cow's milk. *Acta Alim.* 32:151-160.

Brazil. 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.68 de 2006. Métodos Oficiais de análises físico-químicas para produtos lácteos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>.

Brasil. 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46 de 23/10/2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>

Buttriss, J. 1997. Nutritional properties of fermented milk products. *Int. J. Dairy Technol.* 50: 21-27.

Capdevilla, F., C. Martí-Henneberg, R. Closa, J.E. Subias and J. Fernández-Ballart. 2003. Yoghurt in the Spanish diet: nutritional implications and socio-cultural aspects of its consumption. *Public Health Nutrition* 6: 333-340

Champagne. C. and N.J. Gardner. 2005. Challenges in the addition of Probiotic Cultures to Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 45: 61-84.

Church, F.C, H. E. Swaisgood, D. H. Porter, and G. L. Catignani. 1983. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.

Collado, M.C. and Y. Sanz. 2007. Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strain. *J. Appl. Microbiol.* 1-11.

Concurso, C., A. Verzera, V. Romeo, M. Ziino and F. Conte. 2008. Solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry analysis of dairy product volatiles for the determination of shelf-life. *Int. Dairy J.* 18: 819-825

Cruz, A. G., A.E.C. Antunes, A.L.O.P. Souza, J. A. F. Faria and S. M.I. Saad. 2009a. Ice cream as probiotic food carrier. *Food Res. Int.* 42:1233-1239.

Cruz, A.G., F.C.A. Buriti, C.H.B. Souza, J.A.F. Faria and S.M.I. Saad. 2009b. Probiotic Cheese: Health Benefits, Technological and Stability Aspects. *Trends Food Sci. Technol.* 20:344-354.

Cruz, A.G., J.A.F. Faria, T.M. Parisotto, E.G.B. Silva, R.N. Cavalcanti and D. Granato. 2010. Optimization of the processing of probiotic yoghurt added with glucose oxidase using the response surface methodology. *J. Dairy Sci.* submitted.

Cruz, A.G., J.A.F. Faria, T.M. Parisotto, E.G.B. Silva, R.N., E. Bona, D. Granato and M.A.A. Silva. 2010. Sensory assessment of probiotic yoghurt added with glucose oxidase. *Food Res. Int.* in press...

Dairy Foods. 2008. Dairy foods and probiotics: a perfect opportunity. Available in [http://findarticles.com/p/articles/mi\\_m3301/is\\_10\\_105/ai\\_n6251935/](http://findarticles.com/p/articles/mi_m3301/is_10_105/ai_n6251935/)

Damin, M.R., E. Minowa, M.R. Alcantara and M.N. Oliveira. 2008. Effect of cold storage in viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *J. Text. Stud.* 39:40-55.

Dave, R.I. and N.P. Shah. 1998. Ingredient Supplementation Effects on Viability of Probiotic Bacteria in Yogurt. *J. Dairy Sci.* 81: 2804-2816.

Donkor, O.N., S.I.I. Nilmini, P. Stolic, T. Vasijeciv and N.P. Shah. 2007. Survival and activity of selected probiotic organism in set-type yogurt during cold storage. *Int. Dairy J.* 17: 657-665.

De Noni, I., L. Pellegrino, F. Masotti. 2004. Survey of selected chemical and microbiological characteristics of (plain or sweetened) natural yogurts from the Italian market. *Dairy Sci. Technol.* 84: 421-433.

Ding, W.K. and N.P. Shah. 2007. Acid, Bile and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. *J. Food Sci.* 72: 446-450.

Donkor, O.N., A. Henriksson, T. Vasiljevic and N.P. Shah. 2005. Probiotic strains as starter cultures improve angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in soy yogurt. *J. Food Sci.* 70: M375-M381.

Dunlap, B.S., H. Yu and Y. Elitsur. 2009. The probiotic content of Commercial Yogurts in West Virginia. *Clin. Pediat.* 48:522-527.

Espírito Santo, A.P., R.C. Silva, F.A.S. Soares, D. Anjos, L.A. Gioielli and M.N. Oliveira. 2010. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yogurt. *Int. Dairy J.* 20: 1-8.

Gallardo-Escamilla, A., A.L. Kelly and C.M. Delahunty. 2005. Influence of Starter culture on flavor and headspace volatile profiles of Fermented whey and whey from produced from fermented milk. *J. Dairy Sci.* 88:3745-3753.

- Gambeli, L., P. Manzi, G. Panfili, V. Vivanti and L. Pizzoferrato. 1999. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialized in Italy. *Food Chem.* 66: 353-358.
- Gardini, F., R. Lanciotti, M. E. Guerzoni and S. Torriani. Evaluation of aroma production and survival of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.* 9: 125-144.
- Godward, G., Sultana, K., K. Kailasaphaty, P. Peiris, R. Arumugaswamy and N. Reynolds. 2000. The importance of strain selection on the viability and survival of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft* 55:441-445.
- Gomes, A.M.P. and F.M.X. Malcata. 1999. *Bifidobacterium* ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* 10:139-157.
- Gonzalez, S., V. Morata de A., M.M. de Nadra, A.P.R. Holgado and G. Oliver. 1994. Acetaldehyde production by strains used as probiotic in Fermented Milks. *J Food Protec.* 57: 436-440.
- Granato, D., G.F. Branco, A.G. Cruz, J.A.F. Faria and F. Nazarro. 2010. Functional Foods and Non-Dairy Probiotic Product Development: Trends and Points, Concepts and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9:292-302.
- Güler-Akın, M. B. and M. S. Akın. 2007. Effects of cysteine and different incubation temperatures on the microflora, chemical composition and sensory characteristics of bio-yogurt made from goat's milk. *Food Chem.* 100:788-793.
- Gün, Ö. and N.D. Isikli. 2006. The effects of the Fat and Non Fat Dry Matter concentration and Storage time on the Physical properties and Acidity of Yogurts made with Probiotic Cultures. *Food Sci. Tech. Int.* 12: 467-476.
- Hekmat, S. H. Soltani and G. Reid. 2009. Growth and survival of *Lactobacillus deuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GC-1 in yogurt for use as functional food. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 10: 293-296.
- Horluchi, H. H. Inoue, E. Liu, M. Fukui, Y. Sasaki and T. Saaki. 2009. A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen concentration. *J. Dairy Sci.* 92:4112-4121.
- Hussain, I. And N. Atkinson. 2009. Quality comparison of probiotic and natural yogurt. *Pakis. J. Nut.* 8:9-12.

Ibrahim, S.A. and J.P. Carr. 2006. Viability of bifidobacteria in commercial yogurt products in North Carolina during refrigerated storage. *Int. J. Dairy Technol.* 59:272-277.

Imhof, R., H. Glättli and J.O. Bosset. 1995. Volatile Organic Compound Produced by Thermophilic Mesophilic Single Strain dairy Starter cultures. *LWT- Food Sci. Technol.* 28:78-86.

Iyer, C. and K. Kailasapahty. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *J. Food Sci.* 70:18-23.

Jayamane, V.S. and M.R. Adams. 2009. Modelling the effects of pH, storage temperature and redox potential on the survival of bifidobacteria in fermented milk. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44:1131-1138.

Jayamane, V.S. and M.R. Adams. 2006. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yogurts. *Letters Appl. Microbiol.* 42: 189-194.

Jeanson, S., N. Hilgert, M.-O. Coquillard, C. Seukpanya, M. Faiveley, P. Neveu, C. Abraham, V. Georgescu, P. Fourcassié and E. Beuvier. 2009. Milk acidification by *Lactococcus lactis* is improved by decreasing the level of dissolved oxygen rather than decreasing redox potential in the milk prior to inoculation. *Int. J. Food Microbiol.* 131:75-81.

Kailasapahty, K. and S. Rybka. 1997. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. *Aust. J. Dairy Technol.* 52:28-32.

Kawasaki, S., T. Mimura, T. Satoh, K. Takeda, and Y. Nimura,. 2006. Response of microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum* to oxygen. *Appl. Env. Microbiol.* 72: 6854-6858.

Kearney, N., X.C. Meng, C. Stanton, J. Kelly, G.F. Fitzgerald and R.P. Ross. 2009. Development of a spray probiotic yogurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Int. Dairy J.* 19: 684-689.

Kodali, V.P. and R. Sen. 2008. Antioxidant and free scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnol. J.* 3:245-251.

Kyriacou, A., E. Tsimpidi, E. Kazatzi, E. Kirtzalidou, Y. Oikonomou, G. Grazis and M. Kotsou. 2008. Microbial content and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from yogurts. *Int. J. Food Sci. Nut.* 59: 512-525.

- Lankaputhra, W.E.V., N.P. Shah and M. L. Britz. 1996. Survival of refrigerated storage in the presence of acid and hydrogen peroxide. *Michwissenschaft* 51: 65-69.
- Law, J. and A. Haandrikman. 1997. Proteolytic profile of Lactic Acid Bacteria. *Int. Dairy J.* 7:1-11.
- Lees, G.J. and G.R. Jago, G.R.. 1976. Formation of acetaldehyde from threonine by lactic acid. bacteria. *J. Dairy Sci.* 43:75–83.
- Longo, M.A. and M.A. Sanromán. 2006. Production of Food Aroma Compounds: microbial and Enzymatic Methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44: 335-353.
- Lourens- Hattingh, A. and B.C. Viljoen. 2001. Yogurt as a probiotic food carrier. *Int. Dairy J.* 11:1-17.
- Lowel, A. and A. Worsley. 2003. Social drivers as predictors of yogurt consumption in China. *Food Aust.* 55:42-45.
- Marshall, V.M. and W.M. Cole. 1983. Threonine and alcohol dehydrogenase activities in their *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *J. Dairy Res.* 50-375-379.
- Marshall, R.T. 1993. *Standard Methods for Examination of Dairy Products*. Washington: American Public Health Association.
- Maus, J.E. and S.C. Ingham. 2003. Employment of stressfull conditions during culture production to enhance subsequent cold and acid tolerance of bifidobacteria. *J. App. Microbiol.* 95: 146-154.
- Mätto, J., R. Fondén, T, Tolvanen, A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, R. Satokari and M. Saarela. 2006. Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and Bifidobacterium strains administered in triple-strain yogurt. *Int. Dairy J.* 16: 1174-1180.
- Min, S., B.S. Mistry and H.-O. Lee. 2003. Improvement of Oxidative and Emulsion Stability of Model Salad Dressing by Glucose Oxidase-Catalase. *J. Food Sci* 68:1272-1275.
- Möller, C., W Bockelman, A. Ammann and K.J. Heller. 2007. Production of yogurt with mild taste by a *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* mutant with altered proteolytic properties. *Biotechnol. J.* 2:1-10.

- Monnet, C. and G. Corrieu. 2007. Selection and properties of [alpha]-acetolactate decarboxylase-deficient spontaneous mutants of *Streptococcus thermophilus*. Food Microbiol. 24:601–606.
- Muir, D.D., E.A. Hunter, C. Dalaudier. 1997. Association of the sensory properties of commercial, strawberry flavoured fermented milks with product composition. Int. J. Dairy Technol. 50: 28-34.
- Musaiger, A.O., J.A. Al-Saad, D.S. Al-Hoot and Z.A. Khunj. 1998. Chemical composition of fermented dairy products consumed in Bahrain. Food Chem. 61: 49-52.
- Ongol. M.P., Y. Sawatari, Y. Ebina, T. Sone, M. Tanaka, F. Tomita, A. Yokoda and K. Asano. 2007. Yogurt fermented by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* H<sup>+</sup>-ATPase defective mutants exhibits enhanced viability of *Bifidobacterium breve* during storage. Int. J. Food Microbiol. 116: 358-366.
- Ott, A., J.E. Germond, and A. Chaintreau. 2000a. Vicinal diketone dormation in yoghurt: 13C precursors and effect of branched-chain amino acids. J. Agric. and Food Chem. 48: 724–731.
- Ott, A., A. Hugli, M. Baumgartner, and A. Chaintreau. 2000b. Sensory Investigation of Yogurt Flavor Perception: Mutual Influence of Volatiles and Acidity. J. Agric. Food Chem. 48: 441–450.
- Ott, A., J.-E. Germond, M. Baumgartner and A. Chaintreau. 1999. Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: Headspace gas chromatography quantification of volatiles and origin of  $\alpha$ -diketones. J. Agric. Food Chem. 47: 2379-2385.
- Ott, A., L.B. Fay and A. Chaintreau. 1997. Determination and Origin of the Aroma Impact of Yogurt Flavor. J. Agric. Food Chem. 45:850-858.
- Padovani, R.M., D.M. Lima, F.A.B. Colugnati and D.B. Rodriguez-Amaya, 2007. Comparison of proximate, mineral and vitamin composition of common Brazilian and US foods. J. Food Comp. Anal. 20: 773-778.
- Pinto, S.M.P., Clemente, M.G. and L.R. Abreu. 2009. Behaviour of volatile compounds during the shelf-life of yogurt. Int. J. Dairy Technol. 215-222.
- Roberts, R.F. and J.M. Maust. 1995. Composition and number of viable of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* in refrigerated non-fat and low-fat yogurts available at retail yogurts. Cult. Dairy Prod. J. 30:1-6.

- Rybka, S. and K. Kailasapathy. 1996. Media for the enumeration of yoghurt Bacteria. *Int. Dairy J.* 6:839-850.
- Salde, J.A.O. and S.E. Gilliland. 2005. Antioxidative activity of Lactobacilli measured by Oxygen Radical Absorbance Capacity. *J. Dairy Sci.* 88: 1352-1357.
- Salji, J.P. and A.R.A. Ismail. 1983. Effect of Acidity of Plain Yogurt on the acidity changes due to refrigerated storage. *J. Food Sci.* 48:258-259.
- Samona, A., R.K. Robinson and S. Marakis. 1996. Acid production by bifidobacteria and yogurt storage during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* 13: 275-280.
- Sánchez, B., C.G. De Los Reyes-Gavilán, C.G., A. Margolles, A. and M. Gueimonde, M.2009. Probiotic fermented milks: Present and future. *Int. J. Dairy Technol.* 62: 472-483.
- Sanz, Y. 2007. Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of Bifidobacterium: a way of selection improved probiotic strains. *Int. Dairy J.* 1284-1289.
- Savijoki, K., H. Ingmer and P. Varmanen. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394-406.
- Seçkin, A.K. 2004. Nutritional value of strained yogurt produced by traditional method. *Michwissenschaft* 59: 41-43.
- Shah, N.P. 2000, Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.* 83:894-907.
- Shapiro, F. and N. Silanikove. 2010. Rapid and accurate determination of d- and l-lactate, lactose and galactose by enzymatic reactions coupled to formation of a fluorochromophore: Applications in food quality control *Food Chem.* 119: 829-833.
- Shigwedha, L.J.N. and O.D. Mwandemele. 2010. Use of Dacid, Dbile, zacid, zbile values to evaluating Bifidobacteria with regard to stomach pH and Bile salt sensitivity. *J. Food Sci.* 75: 14-18.
- Shin, S.-Y. and J.-H. Park. 1997. Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in Bifidobacterium sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 5:356-359.
- Shihata, A. and N.P. Shah. 2000. Proteolytic profile of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 10: 401-408.

- Shimamura, S., F. Abe, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, T. Araya, and M. Tomita. 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J. Dairy Sci.* 75:3296-3306.
- Simitaru, I. and E. Botez. 2006. Researches on physical-chemical properties of some fluid yogurts types. *J. Agroalim. Technol.* 1: 247-254.
- Simpson, P.J., C. Stanton, G.F. Fitzgerald and R.P. Ross. 2005. Intrinsic Tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following drying and storage. *J. Appl. Microbiol.* 99: 493-501.
- Soon-Young, S. and J. -H.Park. 1997. Activities of oxidative enzymes related with oxygen tolerance in *Bifidobacterium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 356-359.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapahty. 2003. Metabolic and Biochemical responses of probiotic bacteria to oxygen. *J. Dairy Sci.* 86:2537-2546.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapahty. 2004a. The role of oxygen of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. *Curr. Issues Intest. Microb.* 5:1-8.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapahty. 2004b. Oxidative stress of probiotic bacteria. *Michwissenschaft* 59: 140-143.
- Talwalkar, A. and K. Kailasapahty. 2004c. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 3:117-124.
- Tamine, A.Y. and R. K. Robinson. 2007. *Yoghurt: Science and Technology, Second Edition.* Boca Ranton: CRC Press.
- Tamine, A.Y., V.E. Marshall, R.K. Robinson. 1995. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. *J. Dairy Res.* 62:151-187.
- Torriani, S., F. Gardini, M.E. Guerzoni, and F. Dellagio. 1996. Use of response surface methodology to evaluate some variables affecting the growth and acidification characteristics of yogurt cultures. *Int. Dairy J.* 6:625-636.
- Van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S.D. Ehrlich and E. Maguin. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 187-216.
- Vasiljevic, T. and N.P. Shah. 2008. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.* 18:714-728.

Vlieg, J. E. T. H and J. Hugenholtz. 2007. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal*, 17:1290–1297.

Weese, J.S. 2003. Evaluation of deficiencies in labelling of commercial probiotics. *Can. Vet. J.* 44: 982-983.

Weese, J.S. 2002. Microbiologic evaluation of commercial probiotics. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 6:794-796.

Wouters, J.T.M., E.H.E. Ayad, J. Hugenholtz and G. Smit. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12: 91-109.

Zacarchenco, P.B. and S.M. Roig. 2004. Differential enumeration of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of *Streptococcus thermophilus*. *Milchwissenschaft* 59:258-261.

Zhu K., Z. Fan, C. Xu and L. Jia. 2009. Studies on impact of health factors on yogurt consumption behaviors of Beijing consumers. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.* 9:185-188.

Zourari, A., J.P. Accolas and M.J. Desmazeaud. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. *Lait* 72:1-34.

## **CAPÍTULO 4**

# **IOGURTE PROBIÓTICO CONTENDO GLICOSE OXIDASE: AVALIAÇÃO SENSORIAL E DESEMPENHO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E REDES NEURAIS ARTIFICIAIS PARA MODELAGEM DA IMPRESSÃO GLOBAL**

Manuscrito submetido ao Food Research International –  
formatado de acordo com as normas do periódico

# **IOGURTE PROBIÓTICO CONTENDO GLICOSE OXIDASE: AVALIAÇÃO SENSORIAL E DESEMPENHO DE MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E REDES NEURAIIS ARTIFICIAIS PARA MODELAGEM DA IMPRESSÃO GLOBAL**

## **RESUMO**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a aceitabilidade sensorial de iogurte probiótico adicionado de glicose oxidase bem como avaliar o desempenho de métodos quimiométricos e de redes neurais na modelagem da impressão global. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), para todos os atributos sensoriais analisados, a saber, aparência, aroma, sabor e textura entre os diversos tratamentos. A aceitação positiva variou entre 40,74% e 57,41%, enquanto a intenção de compra variou entre 29,63 e 42,59%, respectivamente. Utilizando regressão linear múltipla e redes neurais artificiais, foi possível verificar que o sabor e a textura exerceram influência maior na modelagem da impressão global. O uso da regressão logística identificou o sabor como sendo o atributo relevante para a compra e aceitação do produto. O uso da glicose oxidase no processamento de iogurtes pode ser apresentado como uma solução tecnológica para minimizar a exposição ao oxigênio, sem afetar a aceitação sensorial do iogurte.

## 1 - INTRODUÇÃO

A existência da etapa de fermentação proporcionou fácil adaptação para viabilidade de microorganismos probióticos em produtos lácteos, o que contribuiu para que essa classe de produtos se tornasse seu mais importante representante (Heller, 2001). A maior aplicação de microorganismos probióticos é encontrada em produtos lácteos, como *kefir*, leites fermentados e iogurtes. Entre esses, os iogurtes representam 36,6% (Granato, Franco, Cruz, Faria, & Nazarro, 2010), sendo que na América Latina, o mercado de iogurtes probióticos cresceu 32% entre 2005 e 2007 (Crowley, 2008). Já é fato que o iogurte ganhou a preferência do consumidor, agindo como principal veículo para suplementação de bactérias probióticas (Siegrist, Stampfli & Kastenholz, 2008; Hailu, Boecker, Henson, & Cranfield, 2009).

Soluções tecnológicas em iogurte e leites fermentados probióticos têm como objetivo principal a manutenção da viabilidade da cepa ao longo da estocagem do produto, em valores suficientes para garantir sua funcionalidade (Champagne & Gardner, 2005), entretanto, nem sempre são conduzidos testes sensoriais. Dentre essas tecnologias, incluem o uso da liofilização (Kearney, Meng, Stanton, Kelly, Fitzgerald, & Ross, 2009), adição de novas linhagens (Korbekandi, Jahadi, Maracy, Abedi, & Jalali, 2008; Wang et al., 2010), adição de diferentes níveis de polpas de frutas (Almeida et al., 2008; Kailasapathy, Harmstorf, & Philips, 2008), teor de sólidos e sacarose (Shah Ravula, 2000; Oliveira & Damin, 2003), microencapsulação (Mortazavian et al., 2008; Ding and Shah, 2009), tratamento térmico e temperatura de incubação (Mortazavian, Ehsani, Mousavi, Sohrabvandi & Reinheimer, 2006).

A glicose oxidase tem se mostrado como uma eficiente alternativa tecnológica para minimização da toxidez causada pelo oxigênio em iogurtes probióticos, proporcionando redução do oxigênio dissolvido e contagem de *B. longum* em 8 log UFC/mL por 15 dias de estocagem refrigerada (Cruz, Faria, Silva, Parisotto & Granato, submetido). Entretanto, para determinar o êxito de sua comercialização, torna-se prudente a avaliação sensorial

perante aos consumidores deste produto (Kemp, 2008), pois uma baixa aceitação pode prejudicar as decisões de aceitação e compra. Diante do exposto, este trabalho teve os seguintes objetivos: em primeiro lugar, avaliar a aceitação sensorial de iogurtes probióticos adicionados de glicose oxidase; e em segundo lugar, identificar os atributos relevantes para a impressão global utilizando métodos quimiométricos e redes neurais e para intenção de compra, utilizando regressão logística.

## **2 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1- Crescimento das culturas**

Culturas puras de *Streptococcus thermophilus* TA 040, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* LB 340 and *Bifidobacterium longum* BI-05 foram obtidas da Danisco (São Paulo, Brazil), mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Leite em pó desnatado (Molico, São Paulo, Brazil), reconstituído a 11% p/v, foi utilizado para o preparo das culturas lácticas. Para *B. longum*, utilizou-se leite em pó reconstituído a 11% adicionado de 0,5% p/v de extrato de levedura (Oxoid, São Paulo, Brasil) e 0,05% p/v de cisteína (Sigma, São Paulo, Brasil), enquanto que para as outras culturas, utilizou-se leite reconstituído desnatado suplementado com 2% p/v de glicose (Synth, São Paulo, Brasil). Todos os leites reconstituídos foram submetidos ao tratamento térmico ( $115^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ ) e a solução de cisteína utilizada esterilizada por filtração em membrana  $0,20\ \mu\text{m}$  (Milipore). Todas as etapas de manipulação dos microorganismos foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

### **2.2- Processamentos dos Iogurtes**

O processamento dos iogurtes probióticos foi realizado de acordo com a metodologia tradicional (Tamime e Robison, 2007), seguindo um delineamento composto central rotacional (DCCR) para duas variáveis independentes e dois níveis ( $2^2$ ), com quatro ensaios nas condições axiais ( $\alpha = 1,414$ ) e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios (Tabela 1). O leite cru integral padronizado 3,5% p/v gordura (Atilatti, Itatiba,

Brazil) foi submetido ao tratamento térmico em tanque de aço inox 50 L (95°C/15 min), resfriado até 45°C e inoculado com 1% v/v de *Streptococcus thermophilus* TA 040, 1% v/v de *Lactobacillus delbrueki spp. bulgaricus* LB 340 e 2% v/v de *Bifidobacterium longum* BI – 05. Posteriormente, o leite inoculado foi submetido à fermentação (45°C) com monitoramento do pH até alcançar 4,6. Em seguida, foi submetido ao resfriamento até 10°C e posterior rompimento do gel através de agitação com simultânea adição da glicose oxidase (Glucomax CO, Prozyn, São Paulo, Brasil) e glicose (Synth, São Paulo, Brasil), conforme concentrações indicadas na Tabela 1. Em seguida, o iogurte foi colocado em copos de polipropileno de 100 mL (permeabilidade 0,20 cm<sup>3</sup>O<sub>2</sub>/copo.dia).

**Tabela 1 – Ensaios do Planejamento Experimental Rotacional.\***

Ensaios	Glicose (ppm)		Glicose oxidase (ppm)	
	Codificada X <sub>1</sub>	Não Codificada	Codificada X <sub>2</sub>	Não Codificada
A	-1	9,4	-1	31,6
B	1	30,6	-1	31,6
C	-1	9,4	1	88,4
D	1	30,6	1	88,4
E	-1,41	5	0	60
F	1,41	35	0	60
G	0	20	-1,41	20
H	0	20	1,41	100
I	0	20	0	60
J	0	20	0	60
L	0	20	0	60

\* Foi realizado um ensaio onde não se adicionou glicose e glicose oxidase, ensaio controle (M).

### 2.3- Sistema de embalagem e estocagem

O sistema de embalagem utilizado neste experimento foi o tradicionalmente usado no mercado brasileiro para iogurte em copos unitários, a saber: copo de polipropileno (PP) termosselado com tampa de alumínio/PP, capacidade 100 mL, adquiridos da Dixie Toga,

São Paulo-SP. Após o acondicionamento do iogurte nos respectivos copos plásticos, esses foram estocados em geladeira a 5°C para a realização das análises, aos 15 dias de vida de prateleira.

## **2.4- Teste com Consumidores**

Cem consumidores de iogurte (Drake, 2008) foram recrutados de forma aleatória na Universidade Estadual de Campinas para participar do estudo, tendo como critério de seleção a não existência de reações alérgicas ao leite. Os consumidores foram instruídos para avaliar os iogurtes quanto a aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, utilizando escala hedônica híbrida de 9 pontos (1 = desgostei extremamente, 9 = gostei extremamente) (Villanueva & Da Silva, 2009). Adicionalmente, avaliaram a aceitação do produto e a intenção de compra em uma escala tipo binomial (sim/não) (Soler, 2005). Antes da execução do teste, todos os convidados leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Entre a degustação de cada amostra, foi solicitado que os provadores comessem biscoito cream-craker e água. Os efeitos *first-order e carry-over* foram balanceados através de delineamento próprio (Mac Fie et al,1989). Dado ao elevado número de amostras, o teste foi dividido em três blocos, sendo cada bloco com 4 amostras, com apresentação monádica. No intervalo de um bloco para o outro, foi solicitado aos consumidores o fornecimento de informações demográficas, incluído idade, sexo e hábitos de consumo de iogurtes. Todas as análises sensoriais foram realizadas em cabines individuais, com temperatura e umidade controlada, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da FEA-UNICAMP. O teste foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, recebendo parecer número 295/2008.

## 2.5- Análises Estatísticas

Os resultados foram inicialmente submetidos ao teste de Levene, para verificar a homogeneidade das variâncias. Como segunda etapa, foi realizada análise de variância, tendo como fontes de variação o provador e a amostra, seguida pelo teste Tukey (nível de significância 5.0%). Os dados demográficos e de consumo e os hábitos de consumo de iogurte foram calculados através de frequências. Aplicou-se o teste t de Student para verificar a influência do sexo na aceitação do produto, enquanto que para verificar a influência da idade e grau de escolaridade, os dados foram novamente submetidos à análise de variância (ANOVA *one way*) e teste Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft TM, Tulsa, OK, USA), ao nível de 95% de significância.

A Análise Hierárquica de Cluster foi realizada para segmentar os consumidores com base na impressão global, utilizando distância euclidiana e método de Ward; para cada cluster formado, foram computadas notas dos diversos atributos sensoriais. Para realização dessas análises os dados foram centrados na média (Meullenet, Xiong, & Findlay, 2007).

A modelagem da impressão global dos consumidores, em função das notas atribuídas aos atributos sensoriais, foi realizada através de três métodos de regressão: regressão linear múltipla (MLR), regressão por componentes principais (PCR) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), além de redes neurais artificiais (ANN). ANN é um conjunto de métodos de mapeamento não-linear que são indicados como ferramentas promissoras para a análise de dados sensoriais (Bomio, 1998), tendo apresentando desempenho superior frente a outros métodos tradicionais (Huang et al., 2007). A construção dos modelos foi realizada com os dados dos iogurtes de A até J, sendo a validação dos modelos executada com os dados do iogurte M (controle). Para todas as análises realizadas não houve pré-processamento dos dados e utilizou-se validação cruzada. Para as análises de MLR, PCR e PLS foi utilizado o software Pirouette 2.2 (Infometrix, Seattle, WA). Na construção da RNA foi utilizado o Algoritmo de Treinamento de Levenberg-Marquardt, função de ativação: tangente hiperbólica na camada oculta e

linear na camada de saída. O número de neurônios na camada intermediária, foi obtido através de tentativa e erro. O critério de parada foi 1,000 *epochs* ou máximo soma de erros quadrados igual a 0,001 durante o treinamento. Foi utilizado o software Matlab 7.5 (The MathWorks Inc, Natick, MA, USA).

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos na análise sensorial dos iogurtes probióticos contendo glicose oxidase. Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), para todos os atributos sensoriais analisados. Para aparência, aroma e textura, os resultados obtidos estão situados entre 6,0 (gostei ligeiramente) e 7,0 (gostei moderadamente), enquanto para sabor e impressão global, estes se apresentam entre 5,0 (não gostei, nem desgostei) e 6,0 (gostei ligeiramente). A aceitação positiva variou entre 40,74% e 57,41%, enquanto a intenção de compra variou entre 29,63 e 42,59%, respectivamente.

Os baixos valores obtidos podem estar relacionados à ausência da sacarose e de polpa de frutas na formulação dos produtos, já que existe um domínio no mercado brasileiro de iogurtes com polpa de frutas e com elevado conteúdo de açúcar. Merece consideração, também, o nível de produtos metabólitos ácidos produzidos pelos microorganismos, já que bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, como *B. longum*, produzem ácido lático e ácido acético como parte de seu metabolismo (Gomes & Malcata, 1999).

Os resultados indicam que a adição de glicose oxidase não afetou o desempenho sensorial dos produtos, mostrando que o primeiro objetivo da pesquisa foi atingido, ou seja, os iogurtes adicionados de glicose oxidase não tiveram desempenho inferior ao iogurte controle, onde não foi adicionada a enzima. A opção tecnológica de escolha de uma ferramenta biotecnológica, como a glicose oxidase para minimização do oxigênio dissolvido ao longo da estocagem dos iogurtes não prejudica a aceitação sensorial dos produtos, na medida em que adição de polpas/sucos de frutas, e sacarose pode solucionar a questão do sabor e da aparência dos produtos. Contudo, cuidados devem ser observados na medida em que produtos industrializados podem conter glicose em sua formulação, o que poderia gerar inibição da glicose oxidase pelo substrato.

Com relação à textura, podem ser utilizadas culturas lácticas produtoras de exopolissacarídeos ou mesmo estabilizantes, com a ressalva de que altos níveis de inóculos ou aditivos podem prejudicar a aceitação sensorial (Teles & Flores, 2007; Sabbe, Verber, Deliza, Matta, & Van Damme, 2009). Tem sido reportado que exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas podem trazer benefícios contra a hipertensão e diabetes, além da esperada melhora nas propriedades reológicas de iogurtes, que se traduz em melhor textura e viscosidade no produto (Ramchandran & Shah, 2009). Adicionalmente, tem-se mostrado que linhagens de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* podem, igualmente, produzir esses compostos e influenciar na viscosidade e textura dos leites fermentados ao longo da sua estocagem (Salazar, Prieto, Leal, MayoBada-Gancedo, Reyes-Gavilán, & Ruas-Madiedo, 2009).

É importante ressaltar que os iogurtes probióticos disponíveis no mercado brasileiro utilizam estabilizantes em sua formulação e a maior parte é comercializada no sabor morango, preferido do consumidor. Todavia, neste trabalho foi utilizado iogurte natural, sem açúcar e sem sabor.

Como regra geral, a adição de culturas probióticas não deve causar impacto negativo nos atributos sensoriais dos alimentos, o que implica dizer que um alimento probiótico deve possuir no mínimo desempenho semelhante junto ao seu similar convencional. Logo, as soluções tecnológicas que atentam para a sobrevivência do microorganismo, em quantidades viáveis capaz de proporcionar benefícios aos consumidores, devem ser acompanhadas de avaliações criteriosas do ponto de vista sensorial, para que não ocorram problemas durante a comercialização do alimento. Incompatibilidade tecnológica e sensorial no desenvolvimento de produtos probióticos tem sido descritas com o sorvete de acerola probiótico brasileiro (Favaro-Trindade, Bernadi, Barbosa, Baliero, & Almeida, 2006) e com iogurte *drink* iraniano contendo *L. acidophilus* microencapsulado (Khorokhavar & Mortazavian 2009), demonstrando a dificuldade em se desenvolver um produto probiótico com boa aceitação por parte dos consumidores.

**TABELA 2** - Valores médios para os atributos sensoriais e intenção de compra dos iogurtes probióticos contendo glicose oxidase

Atributo	Tratamentos*											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M
Aparência	6,79 <sup>a</sup>	6,79 <sup>a</sup>	6,48 <sup>a</sup>	6,89 <sup>a</sup>	6,64 <sup>a</sup>	6,66 <sup>a</sup>	6,72 <sup>a</sup>	6,39 <sup>a</sup>	6,65 <sup>a</sup>	6,65 <sup>a</sup>	6,55 <sup>a</sup>	6,62 <sup>a</sup>
Aroma	6,35 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	6,16 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	6,29 <sup>a</sup>	6,24 <sup>a</sup>	6,11 <sup>a</sup>	6,44 <sup>a</sup>	6,53 <sup>a</sup>	6,28 <sup>a</sup>	6,18 <sup>a</sup>	6,21 <sup>a</sup>
Sabor	5,83 <sup>a</sup>	5,57 <sup>a</sup>	5,39 <sup>a</sup>	5,52 <sup>a</sup>	4,80 <sup>a</sup>	5,35 <sup>a</sup>	5,29 <sup>a</sup>	4,92 <sup>a</sup>	4,92 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>	5,14 <sup>a</sup>	5,25 <sup>a</sup>
Textura	6,17 <sup>a</sup>	6,09 <sup>a</sup>	6,13 <sup>a</sup>	6,19 <sup>a</sup>	6,19 <sup>a</sup>	6,19 <sup>a</sup>	6,19 <sup>a</sup>	6,09 <sup>a</sup>	5,93 <sup>a</sup>	6,01 <sup>a</sup>	6,11 <sup>a</sup>	6,10 <sup>a</sup>
Impressão Global	6,09 <sup>a</sup>	5,96 <sup>a</sup>	5,83 <sup>a</sup>	5,88 <sup>a</sup>	5,55 <sup>a</sup>	6,06 <sup>a</sup>	5,83 <sup>a</sup>	5,61 <sup>a</sup>	5,72 <sup>a</sup>	5,82 <sup>a</sup>	5,98 <sup>a</sup>	5,74 <sup>a</sup>
Aceitação Positiva (%) <sup>b</sup>	50,00	57,41	55,56	50,00	40,74	48,15	48,15	40,74	42,59	48,15	40,74	53,70
Intenção Compra Positiva (%) <sup>b</sup>	38,89	42,59	38,89	46,30	27,78	33,33	29,63	31,48	29,63	37,04	35,19	35,19

\* Médias baseadas em escala hedônica de 9 pontos (1=desgostei extremamente. 5=não gostei. nem desgostei. 9=gostei extremamente); <sup>b</sup> Baseada na escala binomial (sim/não). M= iogurte controle, sem glicose oxidase e glicose.

As Tabelas 3 e 4 mostram as notas dos atributos sensoriais, em relação aos segmentos de consumidores formados, que são representados por *clusters*, bem como o perfil demográfico e hábitos de consumo desses segmentos. Três segmentos de consumidores que se mostraram homogêneos com relação à aceitação global, podem ser visualizados: *Cluster I* (60 pessoas), *Cluster II* (10 pessoas) e *Cluster III* (30 pessoas). Cada segmento formado apresentou distinto perfil em relação aos atributos sensoriais: no *cluster 2* são visualizadas as maiores notas para todos os atributos avaliados, com variação de 7,92 (aparência) para 7,22 (sabor), fazendo que este cluster se diferencie dos outros dois ( $p > 0,05$ ). No segmento 1, embora também haja uma percepção positiva em relação a todos os atributos avaliados, é observado um decréscimo das notas atribuídas aos iogurtes em todos os atributos sensoriais avaliados. No segmento 3, esse decréscimo apresenta-se

mais acentuado, atingindo níveis de rejeição para textura e impressão global, com notas 4,58 e 4,33, localizadas entre 4,0 (desgostei ligeiramente) e 5,0 (não gostei, nem desgostei). No que se ressalte a diferença das notas dadas por estes dois segmentos, não foi observada diferença em nenhum dos atributos avaliados ( $p > 0.05$ ). Independente das notas e da tendência de cada segmento, verifica-se que o atributo sabor apresentou o menor valor absoluto em todos os atributos, a saber: 5,21, 7,22 e 5,00, para os segmentos I, II e III, confirmando novamente a sua importância para um bom desempenho dos iogurtes probióticos adicionados de glicose oxidase.

A segmentação é uma importante estratégia para o desenvolvimento de produtos, pois permite agrupar os consumidores de acordo com sua percepção sobre os atributos sensoriais do produto, permite verificar se há condições desse produto ser colocado em comercialização e ajustar possíveis itens em sua formulação. Com base nisso, esta metodologia deve ser utilizado como etapa preliminar e obrigatória em qualquer estudo envolvendo alimentos processados, devendo ser observada a necessidade de segmentos com número suficiente de consumidores, para que se possa tomar decisões confiáveis (Raz, Piper, Haller, Nicod, Dusart, & Giborau, 2008).

O uso de análise de *cluster* tem sido reportado em outros estudos, como leite achocolatado (Thompson, Gerard, & Drake, 2007); sucos de açaí com diferentes concentrações (Sabbe, Verberre, Deliza, Matta, & Van Damme, 2009), produtos processados de bacalhau (Sveinsdottir, Martinsdóttir, Green-Petersen, Hydig, Schelvis, & Delahunty, 2009) e *steaks* bovinos cozidos em diferentes temperaturas (Schmidt et al, 2010).

**Tabela 3-** Valores médios dos atributos sensoriais para cada cluster

	<b>Cluster 1</b>	<b>Cluster 2</b>	<b>Cluster 3</b>		
	(N=60)	(N=30)	(N=10)	p <sup>2</sup>	p <sup>1</sup>
Aparência	6,54 <sup>b</sup>	7,94 <sup>a</sup>	5,58 <sup>b</sup>	0,002	< 0,001
Aroma	5,87 <sup>b</sup>	7,72 <sup>a</sup>	5,25 <sup>b</sup>	0,21	< 0,001
Sabor	5,21 <sup>b</sup>	7,22 <sup>a</sup>	5,00 <sup>b</sup>	0,18	< 0,001
Textura	5,79 <sup>b</sup>	7,72 <sup>a</sup>	4,58 <sup>b</sup>	0,08	< 0,001
Impressão Global	5,75 <sup>c</sup>	7,72 <sup>b</sup>	4,33 <sup>a</sup>	0,08	< 0,001

<sup>1</sup>Probabilidades obtidas por teste de Levene; <sup>1</sup>Probabilidades obtidas por ANOVA; Different letters in the same line represent statistical different results according to the Tukey test.

**Tabela 4-** Perfil sócio-demográfico de acordo com a segmentação (%)\*

		C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
<b>Sexo</b>	Masculino	33,0	22,2	50,0
	Feminino	67,0	78,8	50,0
<b>Idade</b>	20-30	62,5	33,3	46,2
	30-40	16,7	33,3	15,4
	40-50	4,1	22,4	38,5
<b>Nível Educacional</b>	Médio	4,2	11,1	25,0
	Superior	37,5	33,3	33,3
	Pós- Graduação	58,3	55,6	41,7
<b>Consumo de Iogurtes</b>	Diário	40,0	70,0	20,0
	Semanal	40,0	20,0	50,0
	Mensal	20,0	10,0	50,0
<b>Fatores de Compra</b>	Marca	10,0	6,0	20,0
	Valor Calórico	60,0	50,0	70,0
	Teor de Gordura	10,0	20,0	5,0
	Presença de probióticos	20,0	24,0	5,0

\* Significativo para Idade, Sexo e Nível Educacional (p<0.005); C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>= segmentos 1,2 e 3.

Neste estudo, evidenciou-se que entre os diferentes segmentos de consumidores, existe um segmento que atribui notas positivas para o produto, da forma em que ele se apresenta, sugerindo que há mercado para esse tipo de produto, não sendo necessária adição de nenhum ingrediente (Tabela 3). Observou-se que na medida em que há um aumento de mulheres nos diferentes segmentos, verificou-se um aumento das notas dadas para todos os atributos analisados. O segmento 3 (10 pessoas, 50% mulheres), atribuiu notas entre 4,0 (desgostei ligeiramente) e 5,0 (não gostei, nem desgostei), indicando certa rejeição ao produto, enquanto que no segmento 2 (30 pessoas, 78,8% mulheres) verificaram-se as maiores notas para o iogurte probiótico: entre 7,0 (gostei moderadamente) e 8,0 (gostei muito), indicando aceitação do produto. Como era esperado, foi notado um grande consumo pelo iogurte por parte das pessoas selecionadas, sendo que 70% apresentaram consumo diário do produto, enfatizando a importância do iogurte na dieta das populações.

Notou-se ainda, que a presença de microorganismos probióticos não foi um fator decisivo para a aquisição desses produtos, representando apenas 20%, indicando a concordância com estudos anteriores, que não havia adequado conhecimento dos consumidores com relação à definição e benefícios de microorganismos probióticos (Bruhn et al., 2006; Viana, Cruz, Zoellner, Silva & Batista, 2008).

Diferenças com relação à aceitação dos iogurtes foram observadas em todos os fatores avaliados: sexo, escolaridade e faixa etária. Foi observada diferença significativa ( $p < 0,0001$ ), em relação ao sexo na aceitação dos iogurtes demonstrando que homens e mulheres não apresentam opinião concordante. Resultados semelhantes foram encontrados por Ares & Gambarro (2007), em estudo realizado no Uruguai, para perceber a influência de diversos fatores não sensoriais, na aquisição de alimentos funcionais, embora tenha dependência da matriz alimentícia que se pretende inserir o ingrediente funcional.

Com relação à escolaridade, foi observado que pessoas com maior nível educacional, como pós-graduação, apresentam também maiores valores para aceitação global dos iogurtes ( $p=0,001$ ), em relação às pessoas com nível educacional mais baixo. Urala, Arvola, & Lahtemaki (2003) não encontraram influência do nível educacional para aquisição de alimentos funcionais em estudo realizado na Finlândia, o que pode estar relacionado à amostragem utilizada no estudo. Também, com relação à idade, foi indicado comportamento diferente com relação à aceitação dos iogurtes, sendo observado que pessoas com maior idade (30-50 anos) apresentam diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) das pessoas mais novas. Isso pode ser explicado pelo maior acesso à informação e, também, pela crescente preocupação com a saúde, à medida que ocorre um envelhecimento das pessoas.

A escolha do alimento é um processo altamente subjetivo, que apresenta dependência no momento de contato entre a pessoa e o alimento, já que são diferentes os momentos em que essa apreciará o alimento. Isso significa que as múltiplas personalidades que o consumidor apresenta, de acordo com esses momentos, que estão vinculadas fortemente à exata situação em que ele se encontra, podem influenciar na percepção que ele possui do alimento e, conseqüentemente, da sua aquisição (Koster, 2009). Fatores não sensoriais, como a marca do produto, acesso à informação, conhecimento prévio de informação nutricional e dos benefícios do produto e familiaridade, tem sido apontados como importantes para a aceitação dos alimentos por consumidores (Ares, Gimenez, & Gambarro, 2009; Fischer, & Frewer, 2009; Ares, Gimenez, & Gambarro, 2008a; Ares, Gimenez, & Gambarro, 2008b;; Messina, Saba, Turini, Raats & Lumbers, 2008; Guinard, Uotani, & Schilich, 2001). No caso particular da informação, tem-se observado que essa influência pode ser positiva, desde que se forneça linguagem clara e acessível, utilizando termos familiares ao cotidiano das pessoas. São relatadas experiências bem sucedidas nesse sentido com queijo fresco de alto e baixo teor de gordura, com comprovada ação benéfica para a saúde (Kankonen, Tuorilla, & Rita, 1996; Bower, Saadat, & Whitten, 2003), muffins com amido resistente (Baixaulli, Salvador, Hough, & Fiszman,

2008), iogurte líquido (Pohjanheimo & Sandell, 2009) e iogurte com baixo valor calórico (Johansen, Naes, Oyaas, & Hersleth, 2010). Nesta pesquisa não foi fornecida nenhuma informação prévia aos consumidores sobre o produto, o que pode justificar a razão para os resultados mais baixos obtidos no teste de avaliação sensorial. Isso se confirma devido à baixa importância dada à presença de microorganismos probióticos, como fator de influência para compra dos iogurtes. De fato, quando um ingrediente funcional é adicionado na formulação de um alimento, os consumidores devem possuir conhecimento dos benefícios proporcionados à saúde e perceber esse alimento como mais saudável que seu similar convencional. Assim como, comunicar esses efeitos benéficos é uma das mais importantes tarefas enfrentadas pela indústria de alimentos funcionais (Nicolay, 2003).

A Tabela 5 mostra os resultados da modelagem da aceitação global dos iogurtes em função dos atributos sensoriais avaliados, a saber: aparência, aroma, sabor e textura, utilizando regressão linear múltipla (MLR) e dois métodos quimiométricos de calibração multivariada, regressão por componentes principais (PCR), regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e redes neurais artificiais (ANN). Esses métodos têm sido utilizados com grande frequência em controle de qualidade e análise sensorial em diversos produtos alimentícios processados, como chocolates com edulcorantes (Melo, Bolini, & Efraim, 2009) e iogurtes (Cruz, Walter, Cadena, Faria, Bolini, & Fratinni, 2009). Fundamentos teóricos sobre MLR, PCR, PLS e ANN são frequentemente publicados (Ferreira, Antunes, Melgo & Pedro, 2002; Kaliva, 2001; Marini, 2010). Observou-se que o desempenho dos métodos MLR, PLS e PCR foram similares, com excelente ajuste e explicação da variabilidade dos dados na etapa de calibração – 0,874 0,851 e 0,872% e 76,31, 98,56 e 98,28%, respectivamente (com a utilização de 2 fatores no PCR e PLS) e com boa capacidade de previsão (coeficiente de previsão de 0,880, 0,853 e 0,874 e erro experimental médio de 18,00, 17,48 e 17,49%, respectivamente), em se tratando de um estudo envolvendo análise sensorial (Figura 1). Entretanto, o melhor desempenho foi obtido com o uso da ANN do tipo perceptron de múltiplas camadas (MLP), cuja estrutura apresentou 4 neurônios de entrada, 7 na camada intermediária e 1 na camada de saída

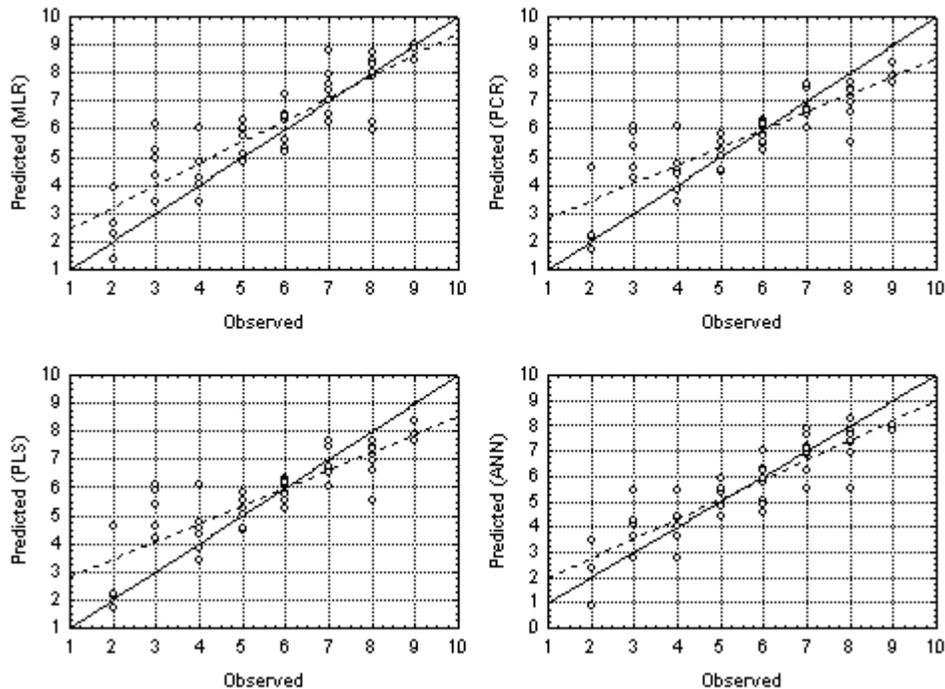
(Figura 2) resultando em coeficiente de calibração e validação de 0,901 e 0,899, respectivamente e erro experimental médio de 14,92%. Isto sugere uma tendência a não-linearidade do conjunto de dados apresentados, confirmando a superioridade de ANN em estudos de modelagem em análise sensorial, em relação á metodologias que constroem modelos lineares para os dados, como MLR, PLS e PCR. Resultados semelhantes têm sido mencionados em outros alimentos, como previsão de propriedades sensoriais de textura em salsichas (Dong, 2009), previsão de aceitação do consumidor de produtos cárneos utilizando provadores treinados (Krishnamurthy, Srivastava, Paton, Bell, & Levy, 2007) e modelagem das características sensoriais de uísque Escocês (Jack & Steele, 2002).

**Tabela 5** - Calibração Multivariada pra Impressão Global de iogurtes probióticos com glicose oxidase

	<b>Coefficientes Regressão</b>			
	<b>MLR</b>	<b>PCR</b>	<b>PLS</b>	<b>ANN*</b>
Constante	0,088	2,199	2,192	-
Aparência	0,110	0,260	0,259	1,253
Aroma	0,046	0,246	0,244	1,198
Sabor	<b>0,436</b>	0,209	0,212	<b>2,594</b>
Textura	<b>0,449</b>	0,241	0,243	<b>1,967</b>
Fatores	-	2	2	-
% Variância	76,31	98,56	98,28	-
R calibração**	0,874	0,851	0,872	0,901
R previsão**	0,880	0,852	0,853	0,899
Erro médio (%)	18,00	17,49	17,48	14,92

\* MLR= regressão Linear Multipla; PCR= regressão por componentes principais; PLS= regressão por mínimos quadrados parciais; ANN= redes neurais artificiais. Construção do modelo utilizou dados dos Iogurtes A a L, e validação do modelo foi feita com dados do iogurte M.

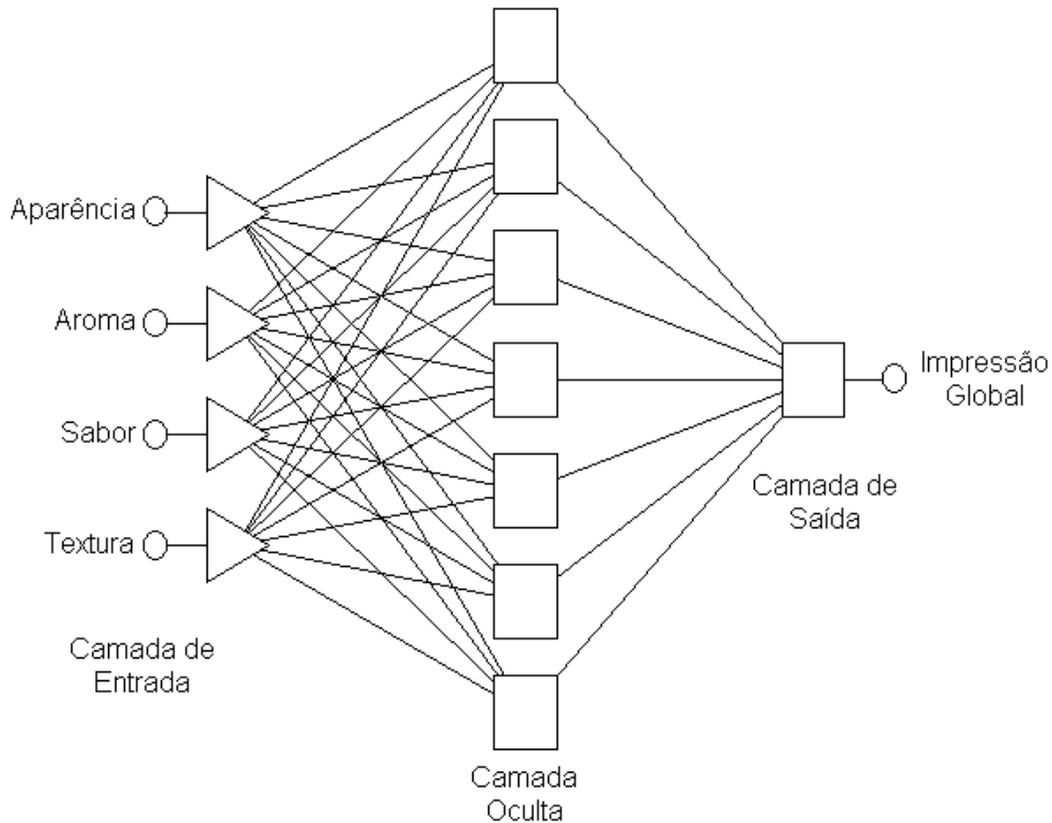
\*\* Não fornecido pelo software.



**Figura 1**– Validação dos métodos MLR, PCR, PLS e ANN para aceitação dos iogurtes probióticos.

Joglekar & May (1991) recomendam que valores superiores a 80% são considerados bons para explicação dos dados na avaliação do desempenho dos modelos. Henika (1982) considera como muito bom o valor mínimo de 85%, para explicação da variabilidade em estudos envolvendo análise sensorial. Por esses critérios, observou-se que todos os modelos gerados através do MLR, PLS e PCR apresentam boa capacidade preditiva e podem ser utilizados para explicar a variabilidade dos dados, com destaque claro para ANN. É observado também que todos os coeficientes de regressão influenciam de forma similar a aceitação global dos iogurtes, já que apresentaram a mesma ordem de grandeza e apresentaram pouca variação: 0,209 a 0,260, para o modelo PCR e 0,212 a 0,259, para o modelo PLS (Tabela 5). Contudo, a MLR e ANN forneceram informações diferentes,

relatando que o sabor e a textura apresentaram coeficientes superiores de 0,436 e 0,439 e 2,594 e 1,967, respectivamente, em relação aos outros atributos, sugerindo que eles devem ser enfatizados no processo de otimização do produto antes de sua comercialização.



**Figura 2** – Rede Neural Artificial para predição da impressão global do iogurte probiótico com glicose oxidase.

Soluções apontadas anteriormente, como adição de culturas exopolissacarídeos, adição de polpas de frutas e sacarose, bem como uma padronização na etapa de rompimento do gel, são importantes e devem ser enfatizadas. Ressalta-se que no cotidiano de uma planta de processamento de iogurtes, contendo automatização, isso possa ser facilmente conseguido.

A Tabela 6 mostra os atributos que mais influenciaram a aceitação e a intenção de compra dos iogurtes probióticos contendo de glicose oxidase, ou seja, os parâmetros do modelo, as probabilidades e as respectivas razões de chance (*odds-ratios*), utilizando a regressão logística (RLA). A regressão logística pode ser visualizada de modo similar ao da regressão linear múltipla, com a diferença que a obtenção dos parâmetros do modelo é gerada através da estimativa por máxima verossimilhança, enquanto que na RLM é utilizado o método dos mínimos quadrados. Cada variável que é adicionada no modelo fornece uma melhor predição em relação à aceitação do produto ou sua intenção de compra pelos consumidores; se uma variável não é significativa, ela pode ser retirada do modelo. A RLA pode ser usada para identificar atributos sensoriais que são utilizados como fatores limitantes para a obtenção da melhor formulação do produto, que através de análises apropriadas, poderão ser relacionados. Isso difere do tradicional processo de otimização no desenvolvimento de produtos alimentícios, onde é levada em consideração a relação crítica em que se estabelece entre a escala hedônica de 9 pontos e a decisão de aceitação e/ou compra do produto pelos consumidores (Prinyawiwatkul & Chompreeda, 2007). A RLA vem sendo usada com sucesso para estudos de otimização da aceitação e/ou compra de alimentos, como em bolos de arroz (Sae-Eaw, 2007), *sherbet* de baixo teor de açúcar contendo proteína de soja (Walker, Boeneke, & Prinyawiwatkul, 2008), requeijão de batata doce (Sivakumar, Panda, Ray, Pradhan, & Sivaramane, 2008), maionese de arroz e proteína de soja (Garcia, Sriwattana, No, Corredor, & Prinyawiwatkul, 2009) e tortilhas de milho (Corredor et al, 2009).

Modelos idênticos foram gerados para ambos as variáveis, sugerindo uma concordância por parte dos consumidores para essas variáveis. Dessa forma, pode-se inferir que pessoas que gostaram do produto, emitiram uma intenção de compra positiva, enquanto que pessoas que não gostaram do produto, não o comprariam, ou seja, para ambas as posições emitiram respostas negativas. Os resultados sugerem que o sabor foi o atributo que exerceu maior influência na aceitação e na intenção de compra dos iogurtes, seguido pela aceitação global. Para este atributo, sua razão de chances (*odds-ratio*) foi

0,5260 para a aceitação e 2,0783 para intenção de compra, respectivamente, indicando que o aumento de uma unidade na escala hedônica de sabor de 9 pontos para esse atributo, aumentará a probabilidade do produto ser aceito, ou seja, ser mais apreciado pelos consumidores em 0,5260 vezes (do que não ser apreciado,  $p < 0,0001$ ), enquanto que para intenção de compra, essa probabilidade sobe para 2,0783. Os maiores valores de *odds-ratio* desse atributo para impressão de compra, em relação à impressão global sugerem que esse atributo é percebido de forma mais crítica pelos consumidores no momento da compra. Da mesma forma, a aceitação global apresentou similar comportamento, com *odds-ratio* de 0,4886 para aceitação e 3,2512 para intenção de compra, igualmente, sugerindo que para os consumidores há uma importância para esse parâmetro para a primeira variável em relação à segunda.

**Tabela 6-** Modelo preditivo pra aceitação e intenção de compra de iogurtes probióticos com glicose oxidase

Variável	Aceitação Global			Intenção de compra		
	Parâmetro	Pr>X2	<i>Odds ratio</i>	Parâmetro	Pr>X2	<i>Odds ratio</i>
Aparência	-0,0577	0,5694	0,9439	-0,1018	0,4093	0,9031
Aroma	0,1476	0,1098	1,159	-0,2042	0,0524	0,8152
<b>Sabor</b>	<b>-0,6424</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,5260</b>	<b>0,7315</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>2,0783</b>
Textura	-0,0801	0,4420	0,9229	-0,0603	0,6196	0,9414
<b>Impressão Global</b>	<b>-0,7161</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0,4886</b>	<b>1,1790</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>3,2512</b>

<sup>a</sup> Baseado em regressão logística utilizando um modelo com 5 atributos sensoriais. A análise de máxima verossimilhança foi utilizada para estimação dos parâmetros. A significância dos parâmetros foi estimada no teste de Wald ( $X^2$ ) com  $p < 0.05$ .

Em que se ressalte o limitado número de consumidores utilizados neste trabalho, é possível observar resultados interessantes. De forma geral, o aumento da aceitação e da intenção de compra dos iogurtes probióticos com glicose oxidase pelos consumidores está

relacionado de forma direta à melhora do sabor, e esse atributo deve ser enfatizado para otimização no desenvolvimento do produto. Na medida em que a impressão global apresenta um caráter abstrato e torna-se difícil de ser compreendida, é valioso saber que o modelo construído enfatiza o destaque do atributo sabor. O modelo construído pela regressão logística com os 4 atributos sensoriais, apresentou capacidade de predição de 81,94% e 85,49%, respectivamente, para a intenção de compra e aceitação global, indicando sua adequação aos dados experimentais.

Tendo em vista que em iogurtes o sabor pode ser aumentado através da adição de polpas de frutas e açúcar, verifica-se que a solução tecnológica apresentada apresenta-se compatível com os aspectos sensoriais do produto, não impactando negativamente em sua aceitação. Ressalta-se a importância de testes prévios para a escolha da polpa de fruta a ser adicionada ao produto, à medida que muitas vezes esses alimentos possuem componentes que podem inibir o crescimento das bactérias probióticas, como demonstrado em mousse de maracujá (Buriti, Komatsu, & Saad, 2007). A matriz do alimento é considerada um dos principais fatores que regulam o desenvolvimento dos microorganismos no trato gastrointestinal, por exercer um efeito tamponante e apresentar ingredientes em sua composição, que podem interagir com as cepas probióticas, alterando sua funcionalidade. Dessa forma, é importante uma prévia investigação para definir a compatibilidade das cepas probióticas com os componentes do alimento escolhido como veículo carreador (Ranadheera, Baines, & Adams, 2009).

#### **4 - CONCLUSÃO**

Os iogurtes probióticos contendo a enzima glicose oxidase como agente removedor de oxigênio apresentaram desempenho satisfatório do ponto de vista sensorial, pois verificou-se boa aceitabilidade pelos consumidores. Foi possível observar uma adequada segmentação dos consumidores e verificar que, embora MLR, PCR, PLS e RNA apresentassem bom ajuste ao conjunto de dados, informações mais claras puderam ser obtidas com MRL e RNA. Igualmente foi verificado que o uso da RL identificou o sabor como atributo que dirige a aceitação e compra dos produtos. Os problemas identificados na aceitação sensorial podem ser solucionados com recursos amplamente conhecidos pelas indústrias de produtos lácteos. O uso da glicose oxidase no processamento de iogurtes pode ser apresentado como uma solução tecnológica para minimizar a exposição ao oxigênio, sem afetar a aceitação sensorial do iogurte, desde que sejam enfatizadas melhoria dos atributos sabor e textura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, M.H.B., Cruz, A.G, Faria, J.A.F., Moura, M.R.L., Freitas, M.C.J., & Carvalho, L.M.J. (2009). Effect of the açai pulp on the sensorial features of the probiotic yogurts. *International Journal of Prebiotic and Probiotic*, 4(1), 41-44.

Ares, G., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2009). Consumer perceived healthiness and willingness to try functional milk desserts. Influence of ingredient, ingredient name and health claim. *Food Quality and Preference*, 20(1), 50-56.

Ares, G., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2008a). Influence of nutritional knowledge of perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 51(3), 663-668.

Ares, G., Giménez, A., & Gámbaro, A. (2008b). Does information about the source of functional ingredients influence consumer perception of functional milk desserts? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(12), 2081-2088.

Ares, G., & Gámbaro, A. (2007). Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite*, 49(1), 148-158.

Baixaui, R., Salvador, A., Hough, G., & Fiszman, S.M. 2008. How information about fibre (traditional and resistant starch) influences consumer acceptance of muffins. *Food Quality and Preference*, 19(7), 628-635.

Bomio, M. 1998. Neural networks and the future of sensory evaluation. *Food Technology*, 52(2), 62-63.

Bower, J.A., Saadat, M.A., & Whitten, C. (2003). Effect of liking, information and consumer characteristics on the purchase intention and willingness to pay more for a fat spread with a proven health benefit. *Food Quality and Preference*, 14(1), 65-74.

Bruhn, C.M., Bruhn, J. C.; Cotter, A., Garret, C., Klenk, M., Powell, C., Stanford, G., Steinbring, Y., & West, E. (2002). Consumer attitudes toward use of probiotic cultures. *Journal of Food Science*, 67(5), 1969-72.

Buriti, F.C. A., Komatsu, T. R., & Saad, S. M.I. (2007). Atividade das polpas de maracujá (*Passiflora edulis*) e goiaba (*Psidium guajava*) sobre *Lactobacillus acidophilus* em mousses refrigeradas. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 315-317.

Champagne, C. & Gardner, N.J. (2005). Challenges in the addition of Probiotic Cultures to Foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 45(1), 61-84.

Corredor, J.A.H., Prinyawiwatkul, W., No, H.K., Chompreeda, P., Garcia, K., Saidu, J.E., & Armen, S. (2010). Influence of education/profession of Mexican consumers on acceptance and purchase intent of corn tortilla. *Journal of Sensory Studies*, 25(1), 108-126.

Crowley, L. (2008). Danisco meets growing South American demand for probiotics. Available in: <http://www.nutraingredients-usa.com>. Accessed 15 April 2010.

Cruz, A.G., Faria, J.A.F., Parisotto, T.M., Silva, E.G.B.; Cavalcanti, R.N., & Granato, D. Optimization of the processing of probiotic yoghurt added with glucose oxidase using the response surface methodology. *Journal Dairy Science*, submitted.

Cruz, A.G., Walter, E.H.M., Faria, J.A.F., Bolini, H.M.A., & Fileti, A.M.F. (2009). Monitoring the Authenticity of Low Fat Yogurts by an Artificial Neural Network. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4797-4804.

Ding, W.K. & Shah, N.P. (2009). Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. *Journal of Food Science*, 74(2), 110-117.

Drake, M.A. 2008. Sensory analysis of dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 4925-4937.

Dong, Q.-L. (2009). BP Neural network for evaluation sensory texture properties of cooked sausage. *Journal of Sensory Studies*, 24(6), 838-850.

Favaro-Trindade, C. S., Bernardi, S., Bodini, R. B., Baliero, J. C. C., Almeida, E. (2006). Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. *Journal of Food Science*, 71(6), 492-495.

Ferreira, M. M. C., Antunes, A.M., Melgo, M. S., & Volpe, P.L.O. (1999). Quimiometria I: Calibracao Multivariada, um Tutorial. *Quimica Nova*, 22(5), 724-731.

Fischer, A.R.H., & Frewer, L.J. (2009). Consumer familiarity with foods and the perception of risks and benefits. *Food Quality and Preference*, 20(8), 576-585.

Garcia, G., Sriwattana, S., No, H.K., Corredor, J.A.H., & Prinyawiwatkul., W. (2009). Sensory Optimization of a Mayonnaise-Type Spread Made with Rice Bran Oil and Soy Protein. *Journal of Food Science*, 74(6), 248-254.

Gomes, A.M.P. Malcata, F.M.X. (1999). Bifidobacterium ssp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Science and Technology*, 10(1), 139-157.

Granato, D., Branco, G.F., Cruz, A.G., Faria, J.A.F., & Nazarro, F. (2010). Functional Foods and non-dairy probiotic food development: trends, concepts and products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, in press...

Guinard, J.-X., Uotani, B., & Schlich, P. (2001). Internal and External mapping of preferences for commercial large beers: comparison of hedonic ratings by consumers blind versus knowledge of brand and price. *Food Quality and Preference*, 12(4), 243-255.

Hailu, G., Boecker, A., Henson, S. & Cranfield, J. (2009). Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. *Appetite*, 52(2), 257-265.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 3(suppl), 374- 379.

Henika, R. G. (1982). Use of response surface methodology in sensory evaluation. *Food Technoolgy*, 36(11), 34-38.

Huang, Y.; Kangas, L. J.; Rasco, B. A. 2007. Applications of artificial neural networks (ANNs) in food science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 113-126.

Hunter, A.; Kennedy, L.; Henry, J.; Ferguson, I. Application of neural networks and sensitivity analysis to improved prediction of trauma survival. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, v.62, p.11-19, 2000.

Jack, F. R. and Steele, G. M. (2002). Modelling the sensory characteristics of Scotch whisky using neural networks – a novel tool for generic protection. *Food Quality and Preference*, 13, 163-172.

Joglekar, A.M. and May, A.T. (1991). Product excellence through experimental design In: *Food product development from concept to the market place* (edited by E. Graf and I.S. Saguy). Pp. 211- 230. AVI Pub. New York.

Jezewska-Zychowicz M. (2009). Impact of Beliefs 1233 and Attitudes on Young consumers' willigness to use functional foods. *Polish Journal of Food Nutrition Science*, 59(1), 183-187.

Johansen, S.B., Næs, T., & Øyaas, J., & Hersleth, M. (2010). Acceptance of calorie-reduced yoghurt: Effects of sensory characteristics and product information. *Food Quality and Preference*, 21(1), 13-21.

- Kailasapathy, K., I. Harmstorf, I., & Phillips, M. (2008). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* in stirred fruit yogurts. *LWT-Food Science and Technology*, 41(7), 1317-1322, 2008.
- Kaliva, J.H. (2001). Basic sets for multivariate regression. *Analytica Chimica Acta*, 428(1), 31-40.
- Känkönen, P., & Rita, H. (1996). How information enhances acceptability of a low-fat spread. *Food Quality and Preference*, 7(2), 87-91.
- Kemp, S.E. (2008). Application of sensory evaluation in food research. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(9), 1507-1511.
- Kearney, N., Meng, X.C., Stanton, C., Kelly, J., Fitzgerald, G.F., & Ross, R.P. (2009). Development of a spray probiotic yogurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *International Dairy Journal*, 19(11), 684-689.
- Khorokhavar, R. & Mortazavian, A. M. (2010). Effects of probiotic-containing microcapsules on viscosity, phase separation and sensory attributes of drink-based on fermented milk. *Milchwissenschaft*, 65(2), 177-179.
- Korbekandi, K., Jahdi, M., Maracy, M., Abedi, D., & Jalali, M. (2009). Production and evaluation of a probiotic yogurt using *Lactobacillus casei ssp.* *International Journal of Dairy Technology*, 62(1), 75-79.
- Koster, E, P. (2009). Diversity in the determinants of food choice: A psychological perspective. *Food Quality and Preference*, 20(1), 70-82.
- Krishnamurthy, R., Srivastava, A.K., Paton, J.E., Bell, G.A., & Levy, D.C. (2007). Prediction of consumer liking from trained sensory panel information: Evaluation of neural networks. *Food Quality and Preference*, 18(2), 275-285.
- MacFie, H.J., Bratchell, N., Greenhoff., K., & Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4(1), 129-148.
- Marani, F. (2009). Artificial neural networks in foodstuff analyses: Trends and perspectives - A review. *Analytica Chimica Acta*, 635(1), 121-131.
- Melo, L.L.M., Bolini, H.M.A., & Efraim, P. (2009). Sensory profile, acceptability, and their relationship for diabetic/reduced calorie chocolates. *Food Quality and Preference*, 20(2), 138-143.

- Messina, F., Saba, A., Turrini, A., Raats, M., & Lumbers, M. (2008). Older people's perceptions towards conventional functional yogurts through the repertory grid method: a cross-country study. *British Food Journal*, 110(8), 790-804.
- Meullenet, J.-F., Xiong, R., & Findlay, C.J. (2007). *Multivariate and Probabilistic Analyses of Sensory Science Problems*. Blackwell Publishing: Iowa, USA.
- Mortazavian, A.M., Ehsani, M.R., Azizi, A., Ravazi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S. & Reinheimer, J.A. (2008). Viability of calcium-alginate-microencapsulated in probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. *Australian Journal of Dairy Technology*, 63(1), 25-29.
- Mortazavian, A.M., Ehsani, E.M., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., & Reinheimer, J.A. (2006). Combined effects of the temperature-related on the variables on the viability of probiotic microorganisms in yogurt. *Australian Journal of Dairy Technology* 61(2), 248-252.
- Nicolay, C. (2003). Language is key to marketing digestive health products. *Functional Foods and Nutraceuticals*, 6(1), 20-22.
- Oliveira, M.N. & Damin, M.R. (2003). Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23(1), 172-176.
- Pohjanheimo, T. & Sandell, M. (2009). Explaining the liking for drinking yoghurt: The role of sensory quality, food choice motives, health concern and product information. *International Dairy Journal*, 19(8), 459-466.
- Ranadheera, R.D.S.C., Baines, S.K., & Adams, M.C. (2009). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Ramchandran, L., & Shah, N.P. (2009). Effect of exopolysaccharides and inulin on the proteolytic, angiotensin-I-converting enzyme- and  $\alpha$ -glucosidase-inhibitory activities as well as on textural and rheological properties of low-fat yogurt during refrigerated storage. *Dairy Science and Technology*, 89(6), 583-600.
- Raz, C., Piper, D., Haller, R., Nicot, H., Dusart, N., Giboreau, A. (2008). From sensory marketing to sensory design: How to drive the formulation using consumers' input? *Food Quality and Preference*, 19 (8), 719-728.

- Sae-Eaw, A., Chompreeda, P., Prinyawiwatkul, W., Haruthaithanasan, V., Suwonsichon, T., Saidu, J.E. , & Xu, Z. (2007). Acceptance and Purchase Intent of US Consumers for Nonwheat Rice Butter Cakes. *Journal of Food Science*, 72(2), 92-96.
- Sabbe, S., Verbeke, W., Deliza, R., Matta, V.M., & Van Damme, P. (2009). Consumer Liking of Fruit Juices with Different Açai (*Euterpe oleracea Mart.*) Concentrations. *Journal of Food Science*, 74(5), 171-176.
- Shah, N.P. & Ravula, R.R. (2000). Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yogurt and probiotic bacteria. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 55(1), 127-131.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J.A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J.C., Reyes-Gavilán, C. G. de los, & Ruas-Madiedo, P. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4158-4168.
- Schmidt, T.B., Schilling, M.W., Behrends, J.M., Battula, V., Jackson, V., Sekhon, R.K., Lawrence, T.E. (2010). Use of cluster analysis and preference mapping to evaluate consumer acceptability of choice and selecte bovine *M. longissimus Lumborum* steaks cooked to various end-point temperatures. *Meat Science*, 84(1), 46-53.
- Siegrist, M., Stampfli, N., & Kastenholz, H. (2008). Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. *Appetite*, 51(3), 526-529.
- Sivakumar, P.S., Panda, S.H., Ray, R.C., Pradhan, D.C., & Sivaramane, N. (2008). Modeling the consumer acceptability of  $\beta$ -carotene rich swett potato curd. *Journal of Sensory Studies*, 23 (6), 791-803.
- Soler L. 2005. Development of non-dairy frozen dessert containing soy protein and coconut milk [MS thesis]. Baton Rouge, La.: Louisiana State Univ. 74p.
- Sveinsdóttir, K., Martinsdóttir, Green-Petersen, D., Hyldig, G. and Delahunty, C. (2009). Sensory characteristics of different cod products related to consumer preferences and attitudes. *Food Quality and Preference*, 20(1), 120-132.
- Prinyawiwatkul, W., & Chompreeda, P. (2007). Applications of Discriminant and Logistic Regression for consumer acceptance and Consumer-oriented Product Optimization Study. (271-296). In: Accelerating New Food Product Design and Development (Beckley, J., Roley, M.M., Topp, E.J., Huang, J.C., & Prinyawiwatkul, W., editors). Blacwell Publishing: Iowa, USA.

Tamine, A.Y. & Robinson, R.K. (2007). *Yoghurt: Science and Technology*, Second Edition. Boca Ranton: CRC Press.

Teles, C.D., & Flores, S.H. (2007). The influence of additives on the rheological and sensory properties of nonfat yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(4), 271-276.

Thompson, J.L., Gerard, P.D., & Drake, M.A. (2007). Chocolate milk and the Hispanic consumer. *Journal of Food Science*, 72(9), 666-675.

Urala, N., Arvola, A., & Lähteenmäki, L. (2003). Strength of health-related claims and their perceived advantage. *International Journal of Food Science and Technology*, 38 (7), 815-826.

Viana, J. V., Cruz, A. G., Zoellner, S. S., Silva, R., & Batista, A.L. D. (2008). Probiotic foods: consumer perception and attitudes. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(9), 1577-1580.

Villanueva, N., & Da Silva, M.A.A. (2009). Comparative performance of the nine-point hedonic, hybrid and self-adjusting scales in the generation of internal preference maps. *Food Quality and Preference*, 20(1), 1-12.

Walker, J., Boneke, C.A., & Prinyawiwatkul, W. (2008). Identifying drivers for consumer Acceptance and Purchase Intent of a Novel-Low Fat Sugar-Free Sherbet Containing Soy Protein. *Journal of Food Technology*, 6(4), 178-184, 2008.

Wang, J., Guo, Z., Zhang, Q., Yan, L., Chen, Y., Chen, X., Liu, X-M., Chen, W., & Zhang, H.P. (2010). Effect of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang on fermentation characteristics of set yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 105-112.

## **CONCLUSÕES GERAIS**

Este trabalho apresenta resultados interessantes para a minimização do estresse advindo da exposição ao oxigênio no processamento de iogurtes probióticos. O uso de uma ferramenta biotecnológica, como a glicose oxidase apresentou potencialidade no que diz respeito ao consumo do oxigênio e a manutenção da funcionalidade do produto. Adicionalmente, não proporcionou influência negativa nos atributos intrínsecos de qualidade do iogurte probiótico, demonstrando sua semelhança com o iogurte convencional. Finalmente, o iogurte probiótico adicionado de glicose oxidase apresentou desempenho sensorial satisfatório, tratando-se de um produto natural, sem adição de polpa de frutas e açúcar, cada vez mais incomum no mercado brasileiro de iogurtes.

Estudos futuros devem ser realizados para verificar o perfil sensorial do produto adicionado de polpa de fruta e verificação da sua aceitação perante aos iogurtes comerciais probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Junto a isso, torna-se necessário o monitoramento dos parâmetros de qualidade do produto ao longo da estocagem e comercialização do produto.