

Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira

Characterization of Fermented Milk, and Probiotics and Prebiotics Free Milk, and Viability Evaluation of Lactic Acid and Probiotic Bacteria During the Shelf Life

Darlila Aparecida Gallina^{a*}; Adriana Torres Silva e Alves^a; Fabiana Katia Helena de Souza Trento^a; Juliana Carusi^a

^aInstituto de Tecnologia de Alimentos, São Paulo, Brasil

*E-mail: darlila@ital.sp.gov.br

Recebido: 22 de março de 2011; Aceito: 22 de julho de 2011.

Resumo

Leites fermentados são os produtos resultantes da fermentação do leite por fermentos lácticos viáveis ativos e abundantes no produto durante seu prazo de validade. Três formulações de leites fermentados foram elaboradas com e sem a adição de probióticos e frutooligosacarídeos (FOS) sendo, T1 = *St. thermophilus* + *Lb. bulgaricus*, T2 = *St. thermophilus* + *Lb. bulgaricus* + *Bifidobacterium* ssp, T3 = *St. thermophilus* + *Lb. bulgaricus* + *Bifidobacterium* ssp + FOS. Os produtos obtidos foram armazenados a 5 °C e avaliados quanto aos parâmetros de pH e viabilidade das bactérias lácticas e probióticas após 1, 7, 15, 21 e 28 dias. Avaliou-se também a eficiência dos meios seletivos para as contagens das bactérias probióticas. A variação de pH inicial dos produtos foi de 4,42 a 4,37 e final de 4,21 a 4,13. Os leites fermentados estão em conformidade com a legislação vigente, em termos de acidez (0,75-0,78g de ácido láctico/100g) e proteínas lácteas (4,02 e 4,28g/100g). Em relação ao teor de gordura podem ser classificados como semidesnatados (2,8g/100g). Os leites fermentados apresentaram contagens de bactérias lácticas dentro dos limites estabelecidos pela legislação durante os 28 dias de estocagem. Nos leites fermentados contendo probióticos, sem a adição de FOS, a contagem se manteve adequada (10⁶ UFC/g) até 15 dias. Já nos leites fermentados contendo bifidobactérias e FOS observou-se que a contagem dos probióticos permaneceu constante durante os 28 dias, provavelmente devido ao efeito prebiótico da fibra. OS meios de cultura empregados para isolamento e identificação das bactérias lácticas e probióticas foram seletivos e adequados.

Palavras-chave: Leite. Alimento Funcional. Probióticos. Prebióticos.

Abstract

Fermented milk is the result of milk fermentation through active viable and abundant lactic ferment in the final product throughout its shelf life. Three formulations of fermented milk were prepared with or without probiotics and fructooligosaccharides (FOS) addition, containing (T1) *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, (T2) *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Bifidobacterium* ssp, (T3) *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium* ssp and FOS. The products were stored at 5°C and they were evaluated concerning pH patterns, and viability of probiotic and lactic acid bacteria after 1, 7, 15, 21 and 28 days. The efficacy of the selective culture media for the score of probiotic bacteria was also assessed. The initial pH variation of products ranged from 4,42 to 4,37, and the final one from 4,21 to 4,13. Fermented milk is in accordance with current Brazilian legislation, concerning acidity and milk proteins. Concerning the fat content, fermented milk can be classified as semi-skimmed. It exhibited scores of lactic acid bacteria at levels in compliance with the requirements of legislation during the 28 days of storage. Fermented milk with probiotics addition, without FOS, the score kept satisfactory (10⁶ CFU/g) up to 15 days. On the other hand, in fermented milk containing bifidobacteria and FOS, the score of probiotics kept the same throughout the 28 days, probably due to the prebiotic effect of the fiber. The selective culture media used for isolation and identification of lactic acid and probiotic bacteria were considered appropriate.

Key words: Milk. Functional Food. Probiotics. Prebiotics.

1 Introdução

Os alimentos funcionais foram introduzidos primeiramente no Japão na década de 80. Desde então se percebe um crescente interesse nos alimentos que apresentam componentes ou substâncias funcionais, ou seja, aqueles que ajudam ou modulam o sistema fisiológico do organismo de modo a promover a saúde.

Os alimentos funcionais representam grande área de estudo em todo o mundo e um mercado altamente promissor. O volume de vendas global de alimentos funcionais em 2006 foi estimado em 46 bilhões de dólares e espera-se que em 2013 cresça para 90. De acordo com estimativas, o mercado brasileiro de produtos funcionais cresce cerca de 20% ao ano, sendo que os iogurtes em geral representam 80% do

mercado de refrigerados. Em relação à venda de iogurtes, 84% das vendas são de produtos regulares (integrais), 8% são de produtos light/diet e 8% são de funcionais. No entanto, os iogurtes funcionais já ultrapassaram os light em faturamento (volume). O mercado global de iogurtes deverá superar 67 bilhões de dólares até 2015, impulsionado pelo crescente desejo dos consumidores por produtos convenientes e promotores de saúde, especialmente os alimentos funcionais¹.

A legislação brasileira atualizou recentemente, a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas dos alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde². Nesta lista constam 17 substâncias (nutrientes ou não nutrientes) e 10 diferentes espécies de micro-organismos probióticos. Para

a aplicação em leites fermentados destacam-se desta lista, as fibras alimentares e os probióticos.

A alegação para produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do microrganismo (probiótico) presente que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Também deve ser declarado que o consumo do produto deve estar associado a alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia².

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde³, como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro. As características mais importantes dos probióticos são sua capacidade para resistir ao suco gástrico ácido do estômago, aos sais biliares e às enzimas digestivas, capacidade de aderir à mucosa intestinal, conviver com a microbiota intestinal endógena e produzir substâncias que inibem o crescimento de bactérias indesejáveis. Estas características são específicas de cada cepa. Além disso, os probióticos devem ser estáveis quando aplicados em alimentos.

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (tipicamente acima de 10^6 UFC/ml ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor⁴. Entretanto, autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g⁵⁻⁷.

As fibras alimentares auxiliam no funcionamento do intestino². No Brasil, esta alegação pode ser utilizada para fibras solúveis e insolúveis desde que a porção diária forneça no mínimo 1,5 g por 100 mL, se o alimento for líquido e 3 g de fibras no alimento sólido, sendo que seu consumo deve estar associado à alimentação equilibrada. A fibra solúvel não é digerida no estômago ou no intestino delgado e tem um papel importante na prevenção de doenças como hipercolesterolemia, obesidade e diabetes^{8,9}.

O conceito prebiótico é baseado no fato de que estes ingredientes não são digeríveis e podem ser utilizados para promover a manutenção de bactérias como *Bifidobacterium ssp.* e *Lactobacillus ssp.* As fibras inulina e frutooligosacarídeos (FOS) são consideradas prebióticas, contribuem para o equilíbrio intestinal e visto que são fibras solúveis elas não são aproveitadas pelo organismo, não alteram o valor calórico do leite, nem aumentam o nível de açúcar no sangue e podem aumentar a absorção de cálcio, além disso, podem servir como substrato para microrganismos benéficos como os probióticos¹⁰.

Os efeitos benéficos da presença de bifidobactérias no trato

gastrointestinal são dependentes de sua viabilidade e atividade metabólica, adicionados pela presença de carboidratos complexos e outros fatores bifidogênicos. Para maximizar a eficácia dos produtos que contêm bifidobactérias, os fatores bifidogênicos são frequentemente incluídos nos produtos, como a inulina e o FOS, disponíveis comercialmente para uso em iogurtes probióticos e outros produtos fermentados.

Produtos lácteos fermentados, tais como buttermilk, kefir e outros tipos de leites fermentados, e especialmente o iogurte, têm sido o foco de muitos estudos em termos de suas alegações fisiológicas funcionais. Em contraste com os compostos biologicamente ativos que o leite já possui, os efeitos promotores da saúde dos produtos lácteos fermentados podem ser relacionados com a atividade biológica das bactérias empregadas na produção desses alimentos e os metabólitos gerados durante o processo de fermentação¹².

Os leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, os quais devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante o prazo de validade. De acordo com a legislação os cultivos ou microrganismos empregados na fermentação definem a denominação do produto que pode ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada¹³.

O leite fermentado mais conhecido e consumido no Brasil é o iogurte, cuja fermentação deve ser realizada com cultivos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais podem acompanhar outras bactérias ácido-láticas¹³. O futuro aponta para o uso de probióticos, associados ou não às bactérias tradicionais, como agentes “biotecnológicos”, melhorando as características do produto tradicional como reduzir a pós-acidificação do iogurte, fato evidenciado pela ação de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium ssp.* ou como “agentes terapêuticos”, promovendo efeitos benéficos nos indivíduos que os ingerem¹⁴.

O emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados tem sido amplamente estudado devido às dificuldades de manutenção da viabilidade destes microrganismos ao longo da estocagem refrigerada. Fatores como acidez e oxigênio dissolvido e interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem influenciar na sobrevivência da microbiota probiótica em produtos lácteos fermentados.

Este trabalho teve como objetivos avaliar a composição, o pH e a viabilidade celular de diferentes formulações de leites fermentados, com e sem a adição de probióticos e prebióticos, após um dia de fabricação bem como verificar a viabilidade celular e a variação de pH ao longo do período de 28 dias de estocagem sob refrigeração.

2 Material e Métodos

2.1 Material

A matéria-prima utilizada para a elaboração das diferentes formulações de leites fermentados foi: leite pasteurizado desnatado tipo A, marca Xandô; açúcar refinado especial União®; espessante - Sherex YO8425-B® (composto por Gelatina, Goma Guar e Pectina), corante carmin BC, aroma de morango, fornecidos pela empresa Kerry do Brasil, e a fibra Beneo P95® (Frutooligossacarídeo fornecido pela empresa Beneo Orafiti).

Foram utilizadas as seguintes culturas comerciais liofilizadas: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Cultura tradicional); *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve* (Cultura probiótica mista), as quais foram fornecidas pela empresa Kerry do Brasil.

Para a contagem das bactérias lácticas e probióticas, foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar M17 (Difco™), Agar MRS (Difco™), Dicloxacilina (Sigma), Cloreto de Lítio (Merck), L-Cisteína (Sigma) e Clindamicina (Sigma) e Anaerobac (Anaerogen, Oxoid).

2.2 Métodos

O conteúdo dos envelopes com as culturas tradicionais liofilizadas em pó foi suspenso em 1 litro de leite tipo A desnatado estéril e aliqüotado em porções correspondentes ao volume necessário para a fermentação de 01 litro de leite. Para a cultura mista de bifidobactérias suspendeu-se todo

o fermento liofilizado em 500 ml de leite tipo A desnatado estéril e aliqüotou-se da mesma forma. Os inóculos foram estocados a -20 °C.

Os leites fermentados foram elaborados em planta piloto do TECNOLAT/ITAL de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 1. Leite pasteurizado tipo A (45L) proveniente de um mesmo lote foi acondicionado em tanque encamisado e adicionado de 10% de açúcar e 0,2% de espessante, sendo tratado termicamente a 85°C/30 minutos. O leite foi então resfriado a 42-44 °C e dividido em três tanques de 15L, onde foram inoculados com os diferentes fermentos. No leite fermentado T3 adicionou-se 1,5% de frutooligossacarídeo (FOS), previamente tratado termicamente (85 °C por 20 a 25 minutos). Manteve-se a temperatura controlada a 43±2 °C durante a fermentação até pH 4,8-4,7. O tempo de fermentação foi de aproximadamente 3 horas para todos os tratamentos.

Para o acompanhamento da atividade acidificante foram retiradas amostras dos tanques de fermentação, com auxílio de um amostrador em aço inox, e efetuadas medidas de pH, no início e durante o processo. O intervalo de amostragem foi de uma hora até às duas horas de fermentação e a cada trinta/quinze minutos até o final. Após a fermentação, os leites fermentados foram resfriados até 20 °C, adicionados de corante e aroma, resfriados, acondicionados em frascos de vidro de 1L (Schott) e armazenados em câmara fria a 4-6 °C durante 30 dias.

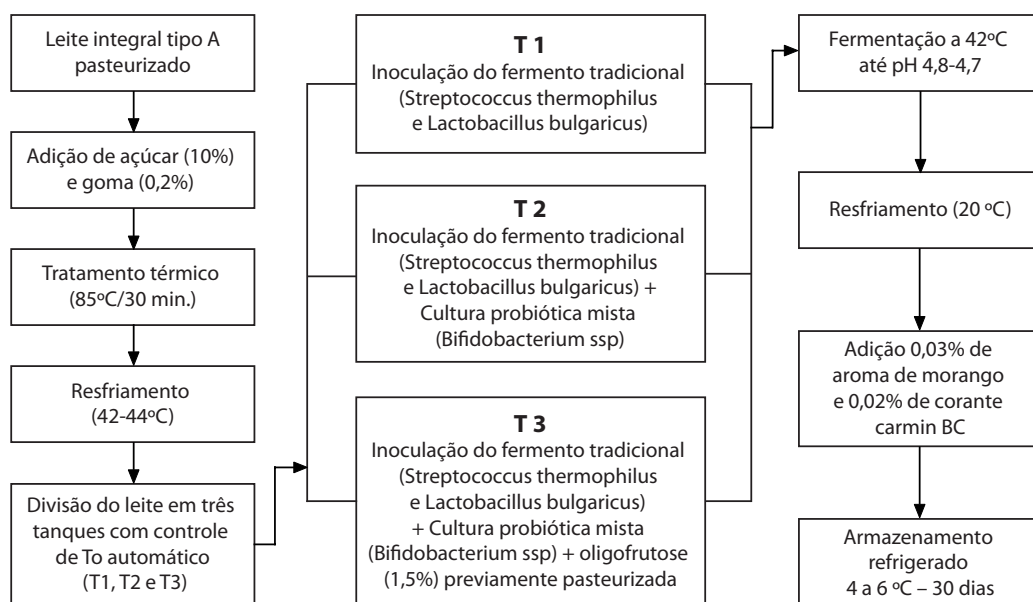


Figura 1: Fluxograma do processo de fabricação das formulações de leites fermentados (T1, T2 e T3)

Os leites fermentados foram avaliados após 1, 7, 15, 21 e 28 dias quanto ao pH e à determinação de células viáveis dos microrganismos empregados na elaboração dos produtos.

A quantificação dos diferentes tipos de microrganismos nos diferentes tempos foi feita partindo-se de amostras dos

três diferentes tratamentos dados ao leite fermentado (T1, T2 e T3). A abertura das garrafas foi feita em ambiente estéril (câmara de fluxo laminar). Aliqüotas de 1 mL de amostra foi transferida para tubos contendo 9 mL de solução de água peptonada estéril 0,1%. 91

Foram utilizados meios seletivos e condições de incubação adequadas, com o objetivo de favorecer o crescimento dos microrganismos de interesse.

Para a quantificação de *Lactobacillus bulgaricus*, utilizou-se o Agar MRS acidificado¹⁸, com incubação a 37±1 °C durante 72 horas sob condições de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid). Para a contagem de *Streptococcus thermophilus* foi utilizado o meio Agar M17¹⁸ com incubação a 37±1 °C por 48 horas em condições de aerobiose. Finalmente, microrganismos do gênero *Bifidobacterium* ssp foram quantificados em ágar MRS suplementado com cloreto de lítio (0,1%), cisteína HCl (0,05%) e dicloxacilina (0,5 mg/L)¹⁹, com incubação a 37±1 °C por 72 horas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid)

As colônias obtidas nos diferentes meios seletivos de cultura foram submetidas à coloração de Gram para verificação da morfologia dos grupos avaliados.

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas na matéria prima e no produto final: pH (via potenciômetro digital com eletrodo de vidro combinado modelo MICRONAL B-375), acidez titulável²⁰, extrato seco total²⁰, gordura²⁰, nitrogênio total (NT)^{21,22} e proteína total (teor calculado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator 6,38). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3 Resultados e Discussão

Os resultados das contagens das células viáveis nos leites fermentados e as medidas de pH durante a estocagem a 4-6 °C durante a estocagem estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Valores das contagem de células viáveis dos leites fermentados T1, T2 e T3

Produto	Determinações	CONTAGENS (Log UFC/g)*				
		1 dia	7 dias	15 dias	21 dias	28 dias
T1	<i>St. Thermophilus</i>	9,90	9,36	9,43	9,14	9,00
	<i>Lb. bulgaricus</i>	5,07	5,27	4,23	4,36	4,17
T2	<i>St. thermophilus</i>	9,23	9,57	9,28	9,08	8,86
	<i>Lb. bulgaricus</i>	5,93	5,82	5,92	5,39	5,88
sem FOS	Bifidobactérias	6,23	6,38	6,34	5,88	5,20
	<i>St. thermophilus</i>	9,08	9,00	9,34	9,04	8,97
T3	<i>Lb. bulgaricus</i>	5,90	5,92	5,17	5,38	5,20
	Bifidobactérias	6,00	6,50	6,38	6,36	6,20

*UFC/g – Unidade formadora de colônia por grama do produto

Tabela 2: Evolução dos valores de pH das três formulações de leites fermentados

Produto	pH				
	01 dia	07 dias	15 dias	21 dias	28 dias
T1	4,42	4,39	4,29	4,21	4,19
T2	4,38	4,32	4,28	4,22	4,13
T3	4,37	4,30	4,27	4,24	4,21

3.1 Contagens de células viáveis nos leites fermentados

Ao avaliar os resultados obtidos na Tabela 1 observa-se que os leites fermentados apresentaram contagens de bactérias lácticas durante todo o período de estocagem compatível à legislação vigente, a qual preconiza para leites fermentados contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo de 10⁶ unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) do produto¹³. A contagem de bactérias lácticas totais do fermento Jointec X3 (cultura tradicional) foi de 9,9 Log UFC/g, o que, exponencialmente, corresponde a 10⁹ UFC/g.

Com relação à contagem de *Streptococcus thermophilus*, observou-se que a mesma se manteve constante em todos os produtos até 21 dias de estocagem. No entanto, nos leites fermentados T2 e T3 ocorreu redução de um ciclo logarítmico com 28 dias de estocagem.

Os *Lactobacillus bulgaricus* mantiveram-se constantes nos leites fermentados T2 e T3 e apresentaram redução de um ciclo logarítmico no leite fermentado T1 após 15 dias de estocagem. As contagens relativamente baixas destes microrganismos em comparação às de *St. thermophilus* podem indicar desbalanceamento dos microrganismos no fermento ou durante a fermentação, o que pode ter ocorrido devido ao fato do resfriamento dos tanques de fermentação ter sido iniciado em torno do pH 4,9. Pelo fato deste processo ser relativamente lento, o mesmo foi iniciado num pH um pouco superior, para não ocasionar o excesso de acidificação, indesejável e prejudicial às bifidobactérias.

Em relação às contagens de bifidobactérias, ao comparar os leites fermentados T2 e T3 (com e sem FOS), observa-se que no leite fermentado T3 a contagem de bifidobactérias se manteve constante durante toda a estocagem (6 ciclos logarítmicos). Já no leite fermentado T2, houve a redução de um ciclo logarítmico, após 21 dias de estocagem. De acordo com a legislação quando se menciona o uso de bifidobactérias, a contagem deverá ser de no mínimo, 6 Log UFC/g. Desta forma, após 28 dias de estocagem apenas o leite fermentado contendo FOS (T3) atende este requisito. Para alimentos funcionais, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de 10⁸ a 10⁹ UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo de 10⁶ a 10⁷UFC/mL ou g, ou seja, de 6 a 7 Log UFC/g. Este resultado também

se apresenta em concordância com a quantidade recomendada por diversos autores para que os microrganismos probióticos produzam o efeito fisiológico desejado. A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental, necessitando alcançar populações suficientemente elevadas (acima de 6 Log UFC/ml ou g) para ser considerado de importância fisiológica ao consumidor⁴. Vários autores propõem que a dose diária mínima da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10⁸ e 10⁹ UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10⁶ a 10⁷ UFC/g.

Sendo assim, fica evidenciado o efeito prebiótico da fibra empregada (FOS), que possibilitou a manutenção da viabilidade das bifidobactérias durante os 28 dias de estocagem do produto (T3).

De acordo com trabalhos relatados^{23,24}, as doses de FOS que apresentam efeito bifidogênico em humanos estão entre 4 e 15 g/dia. Verificou-se que os oligossacarídeos da frutose são prebióticos em 4 g/dia²⁵. Neste contexto, pesquisas avaliaram a viabilidade de duas espécies de Bifidobactérias (*B. longum* e *B. animalis*) adicionadas ao iogurte, com e sem FOS, durante 28 dias a 4 °C²⁶. Constatou-se que a viabilidade foi afetada pelo tipo de estirpe de microrganismo e pela presença de FOS, sendo que a espécie *B. animalis* apresentou melhor estabilidade em relação a *B. longum*, e o maior número de bifidobactérias foi obtido com a adição de FOS. Outro trabalho avaliou o efeito dos prebióticos Hi-maize, Raftiline (inulina) e Raftilose P95 (FOS) sobre a viabilidade dos microrganismos probióticos em iogurte e concluiu que a adição de 1,5% de Raftilose possibilitou melhor manutenção da viabilidade (de 7 a 8 Log UFC/g) durante 4 semanas de estocagem a 4 °C²⁷. Neste trabalho observou-se também o efeito bifidogênico da oligofrutose (FOS) sobre o produto, garantindo a viabilidade das bifidobactérias durante o período de estocagem.

De acordo com os resultados obtidos fica evidenciado o provável efeito prebiótico da fibra empregada (FOS), sobre a manutenção ou a viabilidade das bifidobactérias no leite fermentado (T3) durante o período de 28 dias de estocagem refrigerada. Este resultado condiz com os dados obtidos em pesquisas anteriores²⁸, nas quais foram avaliadas as contagens de bifidobactérias em leites fermentados com e sem a adição de inulina. No leite fermentado adicionado de inulina a contagem de bifidobactérias se manteve constante ao longo de 30 dias de estocagem refrigerada (4-6 °C), já no leite fermentado sem a presença de inulina houve um decréscimo de um ciclo logarítmico após 21 dias de estocagem.

Após o isolamento e coloração de algumas colônias, observou-se que os meios empregados foram seletivos e adequados para contagem dos diferentes microrganismos presentes nos leites fermentados, visto que a morfologia e coloração observadas são compatíveis aos observados em literatura para microrganismos do gênero *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

3.2 Medidas do pH

A Tabela 2 apresenta a evolução dos valores de pH para as três formulações de leites fermentados adicionadas ou não de culturas probióticas.

Avaliando os valores de pH na Tabela 2 verifica-se que houve um decréscimo do valor de pH ao longo do armazenamento refrigerado dos leites fermentados, atribuído à contínua produção de ácidos pelas bactérias lácticas. Os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, isso devido à persistente atividade das bactérias durante a estocagem do produto. Valores de pH similares foram obtidos para os leites fermentados²⁸, com e sem probióticos e prebióticos, entre 4,31-4,33 (inicial) e 4,05-4,12 (final).

3.3 Composição físico-química

A composição do leite empregado na fabricação dos leites fermentados estava dentro dos valores normais previstos na legislação (pH: 6,74, acidez: 17°D, EST: 12,61%, gordura: 3,0% e proteína total: 3,18%). Da mesma forma verifica-se na Tabela 3 que todos os leites fermentados avaliados estão em conformidade, em termos de acidez e proteínas lácteas, com a legislação vigente¹³, a qual estabelece acidez entre 0,6 e 2,0g de ácido láctico/100g, e um teor mínimo de proteínas lácticas de 2,9g/100g, para leites fermentados. Em relação ao teor de gordura, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados¹³, os leites fermentados são classificados em: com creme, integral, semidesnatado e desnatado, onde os teores de gordura deverão ser de no mínimo 6%, entre 5,9 e 3,0%, entre 2,9 e 0,6% e no máximo 0,5%, respectivamente. Portanto, os leites fermentados T1, T2 e T3 podem ser considerados como semidesnatados, em relação ao teor de gordura.

Tabela 3: Análises físico-químicas dos leites fermentados

Parâmetros	Produtos		
	T1	T2	T3
Acidez (% de ácido láctico)	0,7845	0,7590	0,7479
Proteína total (g/100g)	4,2768	4,0263	4,2065
Extrato seco total (g/100g)	20,4324	21,0725	20,6163
Gordura (g/100g)	2,8	2,8	2,8

4 Conclusão

Os leites fermentados desenvolvidos neste trabalho empregando diferentes bactérias lácticas e probióticas ficaram de acordo com a legislação vigente, tanto em termos de composição como na contagem de bactérias lácticas totais.

Nos leites fermentados contendo probióticos, sem a adição de FOS, a contagem desses microrganismos se manteve adequada (6 log UFC/g) até 15 dias. Já nos leites fermentados contendo FOS observou-se que a contagem dos probióticos permaneceu constante durante os 28 dias, provavelmente devido ao efeito bifidogênico dos oligossacarídeos na cultura probiótica mista utilizada neste estudo composta por *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* e *B. breve*. Já os meios de cultura empregados neste trabalho para isolamento e identificação das bactérias lácticas e probióticas foram seletivos e adequados para contagem dos diferentes microrganismos presentes nos leites fermentados.

Referências

- Gallina DA. Leites fermentados funcionais: tendências e inovações. Rev Ingrid Tecnol 2010;9:26-30.
- Anvisa. Comissões Tecnocientíficas de Acessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista das alegações aprovadas. [acesso em 28 ago. 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/teco_lista_allega.htm.
- Fao/Who. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Ontario, Canada; 2002.
- Jelen P, Lutz S. Functional milk and dairy products. In: Mazza G. Functional foods: biochemical and processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing Company; 1998.
- Lee YK, Salminen S. The coming age of probiotics. Trends Food Sci Technol 1995;6:241-5.
- Blanchette L, Roy D, Belanger G, Gauthier SF. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. J Dairy Sci 1996;79:8-15.
- Hoier E, Janzen T, Henriksen CM, Rattray F, Brockmann E, Johansen E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: Law BA, Technology of cheesemaking. Boca Raton: CRC Press; 1999.
- Goldberg I. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. New York: Chapman & Hall; 1994.
- Spiller GA. Handbook of dietary fiber in human nutrition. Boca Raton: CRC Press; 2001.
- Gallina DA. Leites fluídos disponíveis no mercado brasileiro: algumas considerações. Rev Ind Latic 2009;79:38-44.
- Saad SMI Probióticos e prebióticos: o estado da arte. RBCF, Rev Bras Ciênc Farm 2006;42(1):1-16.
- Mazza G. Functional foods: biochemical & processing aspects. Lancaster: Technomic Publishing Company; 1998.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Portaria nº46, de 23 de novembro de 2007: Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados; 2007.
- Antunes LAF. Microrganismos probióticos e alimentos funcionais. Rev Ind Latic 2001;6(34):30-4.
- Vinderola CG, Bailo N, Reinheimer JA. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Res Int 2000;33:97-102.
- Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J Dairy Sci 2000;83(4):894-907.
- Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. Int Dairy J 2001;11(1):1-17.
- American Public Health Association. Standard methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association; 2004.
- Antunes AEC, Silva ERA, Marasca ETG, Moreno I, Lerayer ALS. Probióticos: agentes promotores de saúde. Nutrire Ver Soc Bras Aliment Nutr 2007;32:113-32.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Instrução Normativa 68 de 12/12/2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. V - Métodos quantitativos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF; 2006.
- International Dairy Federation. Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method. Brussels: FIL/IDF; 1962.
- International Dairy Federation. Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method. Brussels: FIL/IDF; 1993.
- Gibson GR, Willems A, Reading S, Collins MD. Fermentation of non-digestible oligosaccharides by human colonic bacteria. Proc Nutr Soc 1996;55:899-912.
- Roberfroid MB. Functional effects of foods components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. Nutr Rev 1996;54:S38-S42.
- Buddington RK, Williams CH, Chen, SC, Witherly SA. Dietary supplementation of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. Am J Clin Nutr 1996;63:709-16.
- Akalin AS, Fenderya S, Akbulut N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. Int J Food Sci Technol 2004;39:613-21.
- Capela P, Hay, TKC, Shah NP. Effect of crytoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiótico organisms in yogurt and freeze-dried yogurt. Food Res Int 2006;39:203-11.
- Trento FKHS, Moreno I, Gallina DA, Silva e Alves AT, Zacarchenco PB, Liserre AM *et al.* Contagem de bactérias lácticas e probióticas em diferentes formulações de leites fermentados contendo ou não probióticos, após o processamento e durante a estocagem. Anais do 26º Congresso Nacional de Laticínios. 2009;74: 1-7.