

MARIA CAROLINA ROCHA DOS SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA E FARINHA LÁCTEA FERMENTADA
DE AÇÃO PROBIÓTICA A BASE DE SORO DE LEITE E FARINHA DE
MANDIOCA POR CULTURA MISTA DE *Lactobacillus plantarum* A6,
Lactobacillus casei Shirota e *Lactobacillus acidophilus*.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre, pelo Curso de Pós-
Graduação em Tecnologia Química – Área de
concentração: Tecnologia de Alimentos, Setor de
Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Nina Waszczynskyj

**CURITIBA
2001**

MARIA CAROLINA ROCHA DOS SANTOS

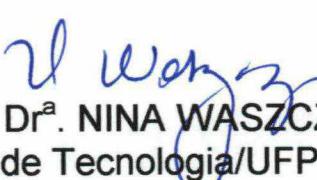
**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA E FARINHA LÁCTEA
FERMENTADA DE AÇÃO PROBIÓTICA A BASE DE SORO DE
LEITE E FARINHA DE MANDIOCA POR CULTURA MISTA DE
Lactobacillus plantarum A6, *Lactobacillus casei* Shirota e
*Lactobacillus acidophilus***

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química – com concentração em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

Orientador:



Prof. Dr. CARLOS RICARDO SOCCOL
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof. Dr. JOSE LUIS PARADA
FECN/UBA-AR
Prof. Dr. SANDRO GERMANO
DCQF/SCS/UNIVALI-SC
Prof. Dr. NINA WASZCZYN SKYJ
Setor de Tecnologia/UFPR

Curitiba, 16 de Março de 2001

*Aos meus pais Carlos e Roseli,
que me ensinaram que o
conhecimento é algo que
realmente vale a pena.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Carlos Ricardo Soccol, por sua valiosa orientação neste trabalho e constante estímulo no desempenho profissional.

À Professora Nina Waszczynskyj, pelo apoio, incentivo e pela co-orientação desta dissertação.

Ao Professor Doutor Maurice Raimbault (do Instituto de Recherche et Développment, Montpellier – FRANÇA) pelo envio da cepa amilolítica e acompanhamento dos estudos realizados.

Aos Professores Dr. Sandro Germano e Dr. José Luis Parada, por terem aceitado julgar este trabalho.

À Maria Rosa M. Prado, Cláudia Degáspari, Adenise L. Woiciechowski, Mitiyo F. Miyaoka e Maria Giovana B. Pagnoncelli, pela preciosa amizade e apoio nos momentos de maior necessidade.

Aos colegas do Laboratório de Processos Biotecnológicos, Débora, Cristina, Adriane, Malú, Nádia, Andréa, Júlio, Fan, Ana, Saul, Cristiane, Prof. Giovani e Flávera pela amizade e experiências compartilhadas.

À Lídice e Sônia pela colaboração e amizade durante a redação deste trabalho.

À Professora e amiga de sempre Grace Wille, que me deu os maiores incentivos e orientação acertada na carreira profissional.

Aos meus irmãos Francisco e Maria Helena e à minha prima Daniele, com quem tem sido um prazer partilhar a vida.

À toda a minha família pelos constantes estímulos e carinho no decorrer desta etapa.

RESUMO

Com o objetivo de ampliar o uso do soro de leite, subproduto da indústria láctea; agregar valor à farinha de mandioca, produto amplamente produzido no estado do Paraná e contribuir para o estudo da utilização da bactéria amilolítica *Lactobacillus plantarum* A6 isolada da mandioca; foram desenvolvidas uma bebida e uma farinha láctea fermentada de ação probiótica por cultura mista de *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus*. A pasteurização à 80°C por 20 minutos mostrou ser eficiente na destruição da flora microbiana natural presente no soro de leite, sem haver precipitação das proteínas. A otimização do fermentado total (fase líquida + sólida) demonstrou que os parâmetros ideais foram: tempo de fermentação de 16 horas, taxa de inóculo de 8%, temperatura de incubação de 35°C e concentração de farinha de mandioca de 20%. Após 16 horas de cultura a bebida láctea apresentou pH de 4,07, acidez titulável em ácido láctico de 1,050, 40g/L de açúcares redutores e $2,8 \times 10^9$ UFC/mL de bactérias lácticas amilolíticas/g e $2,28 \times 10^9$ células probióticas/g. A produção de ácido láctico em cromatógrafo líquido (HPLC), resultou em 1,25% após as 16 horas de cultura. A formulação contendo 36% de suco de goiaba, 10% de açúcar e 54% de bebida láctea fermentada recebeu as maiores pontuações, pelos 12 julgadores selecionados, na avaliação sensorial do produto em relação às demais formulações. A bebida láctea manteve a qualidade físico-química e microbiológica no decorrer do período de 28 dias de estocagem a 4°C, exibindo desejável contagem celular das culturas específicas utilizadas. A análise centesimal da farinha de mandioca desidratada, com atividade de água de 0,31 a 22°C apresentou teores de proteína e lipídios superiores àqueles comparados com a farinha não fermentada, este fato se deu devido à fermentação (quantidade de células presentes) e ao acréscimo provável de proteínas solúveis presentes no soro de leite. A farinha láctea desidratada apresentou um total de $9,8 \times 10^4$ células probióticas/g e $3,6 \times 10^5$ células amilolíticas/g.

Palavras-chave: Soro de leite; Farinha de mandioca; *Lactobacillus plantarum* A6; *Lactobacillus casei* Shirota; *Lactobacillus acidophilus*; Bebida láctea fermentada; Farinha de mandioca fermentada.

ABSTRACT

The present work had as objectives: increase milk whey utilization, by product originated from the lactic industry, add value to cassava flour, a product largely produced in Paraná state and to contribute to the utilization of the amylolytic bacteria *Lactobacillus plantarum* A6, isolated from cassava; a lactic beverage and a fermented cassava flour with probiotic activity were developed with mixed culture of *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus acidophilus*. A time/temperature range of 80° C and 20 minutes was efficient in the destruction of the natural microflora present in milk whey, without protein precipitation. The optimization of the total fermented (liquid phase + solid) showed that the best parameters were: 16 hours fermentation time, 8% inoculation rate, incubation temperature of 35° C and 20% of cassava flour. After 16 hours of fermentation the beverage had pH of 4,07 1,050 of titratable acidity in lactic acid, 40 g/L of reducing sugars and $2,8 \times 10^9$ cells/ mL of lactic amylolytic bacterias and $2,28 \times 10^9$ cells/mL of probiotic bacterias. The production of lactic acid measured by high performance liquid chromatography (HPLC) was 1,25% after 16 hours of culture. The final lactic beverage had the following composition: 36% of guava juice, 10% of sugar and 54% of fermented lactic beverage; This beverage was sensory evaluated and received the best grades by a panel of 12 selected judges in relation to other tested formulations. The lactic beverage maintained its microbiologic and physical-chemical quality for 28 days storage period at 4° C, showing desirable cell number of the specific cultures utilized. The analysis of the dried cassava flour, with Aw of 0,31 at 22° C demonstrated superior protein and lipid content to those compared to a non-fermented flour, this fact was due to fermentation (cell number) and to milk whey addition. The dried flour presented $9,8 \times 10^4$ of probiotic cells/g and $3,6 \times 10^5$ amylolytic cells/g.

Key-words: Milk whey; Cassava flour; *Lactobacillus plantarum* A6; *Lactobacillus casei* Shirota; *Lactobacillus acidophilus*; Fermented lactic beverage; Fermented cassava flour.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
SUMÁRIO.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. OBJETIVOS.....	2
1.1.1. Objetivo geral.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. LEITE.....	4
2.1.1. Produção e consumos mundiais de leite.....	4
2.1.2. Composição química do leite.....	5
2.1.2.1. Sistema protéico do leite.....	6
2.2. SORO DE LEITE.....	7
2.2.1. Composição química do soro de leite.....	9
2.2.2. Subprodutos do soro de leite.....	11
2.2.3. Utilização do soro de leite.....	13
2.2.4. O soro de leite como resíduo industrial.....	14

2.2.5. Produção e custos do soro de leite.....	14
2.3. MANDIOCA.....	15
2.4. FERMENTAÇÃO.....	17
2.4.1. Fermentação de carboidratos.....	18
2.4.1.1. Fermentação láctica.....	18
2.4.1.1.1. Fermentação homoláctica.....	19
2.4.1.1.2. Fermentação heteroláctica.....	20
2.4.1.1.3. Fermentação das bifidobactérias.....	20
2.5. BACTÉRIAS LÁCTICAS.....	21
2.5.1. Características gerais das bactérias do ácido láctico.....	21
2.5.1.1. Bactérias lácticas amilolíticas.....	22
2.6. COMPOSIÇÃO DA MICROFLORA INTESTINAL.....	24
2.7. PROBIÓTICOS.....	28
2.7.1. <i>Lactobacillus casei</i>	31
2.7.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	33
2.8. USO DE CULTURAS MISTAS EM ALIMENTOS FERMENTADOS.....	35
2.9. ALIMENTOS FERMENTADOS.....	36
2.9.1. Leites fermentados.....	36
2.9.1.1. Bebidas lácteas fermentadas.....	37
2.9.1.2. Farinhas fermentadas.....	39
2.10. ANÁLISE SENSORIAL.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1. MATERIAL.....	41
3.1.1. Microrganismos.....	41
3.1.2. Matérias-primas.....	42
3.1.3. Equipamentos.....	42

3.2. MÉTODOS.....	43
3.2.1. Métodos analíticos.....	43
3.2.1.1. Determinação do pH.....	43
3.2.1.2. Determinação da acidez titulável.....	43
3.2.1.3. Determinação de cinzas.....	43
3.2.1.4. Determinação de proteínas.....	44
3.2.1.5. Determinação da umidade.....	44
3.2.1.6. Determinação de lipídios	44
3.2.1.7. Determinação de fibras.....	44
3.2.1.8. Determinação de carboidratos (por cálculo).....	45
3.2.1.9. Determinação de açúcares redutores.....	45
3.2.1.10. Teor de amido.....	45
3.2.1.11. Quantificação do ácidos orgânicos em cromatógrafo líquido.....	46
3.2.1.12. Determinação da atividade de água.....	47
3.2.2. Manutenção das culturas.....	47
3.2.3. Diluição do soro de leite.....	47
3.2.4. Caracterização das matérias-primas.....	47
3.2.5. Tratamento térmico dos componentes do substrato.....	48
3.2.6. Otimização dos parâmetros fermentativos.....	49
3.2.6.1. Primeira otimização.....	49
3.2.6.2. Segunda otimização.....	49
3.2.7. Estudo cinético da fermentação.....	50
3.2.7.1. Preparo dos inóculos para a fermentação.....	50
3.2.7.2. Estudo cinético da fermentação com a cepa amiolítica (<i>Lactobacillus plantarum</i> A6) ..	51
3.2.7.3. Estudo cinético completo da fermentação utilizando a cepa amiolítica (<i>Lactobacillus plantarum</i> A6) + cepas probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> Shirota e <i>Lactobacillus acidophilus</i>).....	51

3.2.7.4. Avaliação do fermentado.....	52
3.2.8. Formulação da bebida.....	54
3.2.8.1. Equipe de julgadores.....	54
3.2.8.2. Condições do teste.....	54
3.2.8.3. Seleção e treinamento de julgadores.....	55
3.2.8.4. Formulação da bebida pelos julgadores selecionados.....	56
3.2.8.4.1. Perfil de características.....	57
3.2.8.4.2. Teste de escala.....	58
3.2.8.4.3. Teste de ordenação.....	58
3.2.9. Avaliação da estabilidade da bebida láctea.....	59
3.2.9.1. Estabilidade físico-química.....	59
3.2.9.2. Estabilidade microbiológica.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	62
4.2. DEFINIÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE.....	63
4.3. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	66
4.3.1. Primeira otimização.....	67
4.3.2. Segunda otimização.....	70
4.4. ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO	73
4.4.1. Estudo cinético da fermentação com a cepa amiolítica (<i>Lactobacillus plantarum</i> A6)....	73
4.4.2. Estudo cinético completo da fermentação utilizando a cepa amiolítica (<i>Lactobacillus plantarum</i> A6) + cepas probióticas (<i>Lactobacillus casei</i> Shirota e <i>Lactobacillus acidophilus</i>).....	76
4.5. FORMULAÇÃO DA BEBIDA.....	83
4.5.1. Seleção e treinamento de julgadores.....	83
4.5.2. Formulação da bebida pelos julgadores selecionados.....	86
4.6. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA BEBIDA LÁCTEA.....	91

4.6.1. Estabilidade físico-química.....	92
4.6.2. Avaliação microbiológica.....	94
4.6.2.1. Avaliação da evolução da cultura mista.....	94
4.6.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica.....	96
4.7. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE MANDIOCA BIOTRANSFORMADA.....	97
5. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS.....	107

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE NO PERÍODO DE 1996 A 1999.....	04
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO LEITE.....	06
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SORO DE LEITE.....	09
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO LEITE.....	11
TABELA 5 -	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> , Cratz).....	16
TABELA 6 -	LACTOBACILOS PROBIÓTICOS COM CARACTERÍSTICAS BENÉFICAS COMPROVADAS "in vitro" e em seres humanos.....	30
TABELA 7 -	CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	46
TABELA 8 -	TEMPOS DE RETENÇÃO DE ALGUNS PADRÓES, MONITORADOS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA, NAS CONDIÇÕES ACIMA.....	46
TABELA 9 -	CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA UTILIZADOS NA PASTEURIZAÇÃO DO SORO DE LEITE.....	48
TABELA 10 -	VARIÁVEIS DA PRIMEIRA OTIMIZAÇÃO.....	49
TABELA 11 -	VARIÁVEIS DA SEGUNDA OTIMIZAÇÃO.....	50
TABELA 12 -	FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA PRIMEIRA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.....	56
TABELA 13 -	FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA SEGUNDA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.....	56
TABELA 14 -	FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA TERCEIRA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.....	57
TABELA 15 -	COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO.....	62
TABELA 16 -	EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA DA PASTEURIZAÇÃO NO ASPECTO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE.....	65

TABELA 17 - ETAPAS DE UM EXPERIMENTO UTILIZANDO-SE DE FERRAMENTAS ESTÁTICAS.....	67
TABELA 18 - VALORES DE pH E CONTAGEM DE CÉLULAS DE 5 BEBIDAS FERMENTADAS SIMILARES ENCONTRADAS NO MERCADO.....	82
TABELA 19 - SOMATÓRIO DE ACERTOS DE CADA JULGADOR, OBTIDOS NOS TESTES TRIANGULARES REALIZADOS DURANTE A SELEÇÃO.....	84
TABELA 20 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM DE 28 DIAS A $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$	96
TABELA 21 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CONTAGEM DE CÉLULAS DA FARINHA DE MANDIOCA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO.....	98

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CONCENTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO LEITE E SORO DE LEITE.....	10
QUADRO 2 - PRINCIPAIS USOS DO SORO DE LEITE.....	13
QUADRO 3 - EFEITOS METABÓLICOS DA FLORA INTESTINAL NO ORGANISMO HUMANO.....	27
QUADRO 4 - EFEITO “in vivo” E “in vitro” RELATADOS POR AUTORES CITADOS POR SALOFF-COSTE (1997) UTILIZANDO <i>Lactobacillus acidophilus</i> E TESTES CONTROLE (PLACEBOS).....	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - MAIORES ESTADOS PRODUTORES DE LEITE DO BRASIL (2000).....	5
FIGURA 2 - PROCESSOS DE TRATAMENTO E TRANSFORMAÇÃO DO SORO DE LEITE.....	12
FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA FLORA DO TRATO GASTROINTESTINAL.....	25
FIGURA 4 - FISIOLOGIA DA MICROFLORA COLÔNICA.....	26
FIGURA 5 - COLÔNIAS DE <i>L. plantarum</i> A6 EXPOSTAS À VAPORES DE IODO COM HALOS CARACTERÍSTICOS DE CONSUMO DE AMIDO.....	53
FIGURA 6 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DA ACIDEZ.....	68
FIGURA 7 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DO pH.....	69
FIGURA 8 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	69
FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DA ACIDEZ.....	71
FIGURA 10 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DO pH.....	71
FIGURA 11 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	72
FIGURA 12 - EVOLUÇÃO DO pH E ACIDEZ NO SUBSTRATO FERMENTADO PELA CEPA <i>L. plantarum</i> A6.....	75
FIGURA 13 - EVOLUÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPA <i>L. plantarum</i> A6.....	75
FIGURA 14 - EVOLUÇÃO DA CONTAGEM CELULAR DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPA <i>L. plantarum</i> A6.....	76
FIGURA 15 - EVOLUÇÃO DO pH NO SUBSTRATO FERMENTADO PELAS CEPAS DE <i>L. plantarum</i> A6 + <i>L. casei</i> Shirota e <i>L. acidophilus</i>	77

FIGURA 16 - EVOLUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPAS DE <i>L. plantarum</i> A6, <i>L. casei</i> Shirota e <i>L. acidophilus</i> COMPARANDO-SE OS MÉTODOS DE TITULAÇÃO E DOSAGEM EM CLAE.....	78
FIGURA 17 - EVOLUÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPA <i>L. plantarum</i> A6 + <i>L. casei</i> Shirota + <i>L. acidophilus</i>	79
FIGURA 18 - EVOLUÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NA FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELAS CEPAS DE <i>L. plantarum</i> A6, <i>L. casei</i> Shirota e <i>L. acidophilus</i>	80
FIGURA 19 - FERMENTADO CONTENDO AS DUAS FASES (LÍQUIDA – bebida láctea; SÓLIDA – farinha de mandioca biotransformada).....	81
FIGURA 20 - RESULTADOS DO DESEMPENHO DOS CANDIDATOS DURANTE A SELEÇÃO – TESTE TRIANGULAR.....	85
FIGURA 21 - PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES A, B e C.....	87
FIGURA 22 - PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES D, E, F, G e H.....	88
FIGURA 23 - PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES I, J e L.....	90
FIGURA 24 - FORMULAÇÕES J E L.....	91
FIGURA 25 - VARIAÇÃO DO pH E ACIDEZ TITULÁVEL NA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO A 4°C ± 1,0 °C.....	93
FIGURA 26 - EVOLUÇÃO DA CONTAGEM CELULAR DE <i>L. plantarum</i> A6, <i>L. casei</i> Shirota e <i>L. acidophilus</i> NA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DURANTE ESTOCAGEM A 4°C ± 1,0 °C.....	94
FIGURA 27 - FARINHA DE MANDIOCA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO.....	97

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos constatou-se um incremento notável do consumo de bebidas lácteas fermentadas que se caracterizam principalmente por apresentarem baixa viscosidade e serem consumidas como bebidas suaves e refrescantes (OTERO et al., 1995). As bebidas lácteas estão associadas não somente ao seu sabor agradável, ligeiramente ácido, mas também à sua vida de prateleira bem maior que a do leite.

Para os laticínios, a conversão do soro líquido em bebidas, fermentadas ou não, é uma das mais atrativas opções, para a utilização do soro para consumo humano, devido a simplicidade do processo, utilização de equipamentos de beneficiamento do leite, além das excelentes propriedades funcionais das proteínas do soro (GANDHI & PATEL, 1994).

Apesar do soro de leite ser um alimento rico em nutrientes valiosos, o teor elevado de sais minerais e a excessiva diluição de seus componentes devido a grande quantidade de água (93-95%) constituem um inconveniente que limita, em alguns casos, o consumo deste produto “in-natura” (VEYSSEYRE, 1988). Em função disto torna-se necessário o acréscimo de aromas, açúcar e/ou sucos de frutas resultando em produtos com melhor aceitação pelo mercado consumidor.

Tem-se destacado a utilização de microrganismos probióticos em produtos lácteos fermentados, que causam efeitos benéficos, prevenindo ou revertendo estados clínicos gerados pela antibioticoterapia, “stress” ou dietas que tenham alterado a microflora normal, restaurando-a ao seu estado natural. Às culturas probióticas também são atribuídas propriedades hipocolesterêmicas e antitumorais, além da síntese de vitaminas e enzimas digestivas (FULLER, 1989).

A mandioca é uma importante cultura agrícola do estado do Paraná e se constitui como a base alimentar de uma parte considerável da população em extensas regiões da África, Ásia e América Latina.

Em 1991, uma cepa selvagem de *Lactobacillus plantarum* (denominada A6) com capacidade de hidrolisar o amido, foi isolada por GIRAUD et al. (1991) do amido de mandioca fermentado no Laboratório de Biotecnologia do IRD (Institute de Recherche et Développement), em Montpellier – França.

Este presente trabalho faz parte do projeto PRI 017, IRD – CIRAD – DANONE – MINISTÉRIO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA (BRASIL) - UFPR, que tem por objetivo a aplicação da bactéria *Lactobacillus plantarum* A6 no desenvolvimento de novos produtos fermentados, de interesse na indústria de alimentos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Produção de bebida e farinha láctea fermentada com atividade probiótica à base de soro de leite doce e farinha de mandioca, utilizando cultura mista de bactérias das espécies *Lactobacillus plantarum* A6, *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus*.

1.2.2. Objetivos específicos

- o aproveitamento de subproduto da indústria láctea, o soro de leite, que apresenta elevado valor nutricional e constitui material orgânico com grande capacidade de gerar poluição ambiental quando despejado em águas fluviais;

- a produção de bebida láctea fermentada com atividade probiótica, com boas características sensoriais e nutricionais, contribuindo para a introdução do produto no mercado consumidor;
- a contribuição para o estudo da utilização da bactéria *Lactobacillus pantarum* A6, em produtos lácteos;
- agregar valor à farinha de mandioca, em razão da grande produção no Estado do Paraná, bem como seu elevado teor de amido e baixo custo, produzindo uma farinha de mandioca biotransformada, com características probióticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LEITE

2.1.1. Produção e consumos mundiais de leite

A produção mundial de leite em 1999 foi de 387,5 bilhões de litros com crescimento de 0,67% superior ao ano de 1998. Para o ano de 2000, estima-se no Brasil, uma produção entre 20 e 22 bilhões de litros, quando no ano de 1999, ficou em 19,13 bilhões de litros (BITTENCOURT & BITENCOURT, 2000).

Na tabela 1 está representada a produção brasileira de leite distribuída por regiões.

TABELA 1 - EVOLUÇÃO DA PRODUÇÃO BRASILEIRA DE LEITE NO PERÍODO DE 1996 A 1999

Regiões	Produção em mil litros			
	1996	1997	1998	1999
Norte	769,3	810,1	781,4	815,4
Nordeste	2.134,4	2.254,7	2.315,7	2.270,6
Sudeste	8.593,8	8.635,0	8.492,0	8.285,0
Sul	4.767,1	4.853,7	4.864,7	4.697,6
Centro-Oeste	2.886,9	2.815,3	2.793,8	2.741,5
Total	19.151,6	19.368,9	19.247,8	18.810,2

FONTE: ANUALPEC 2000

A produção leiteira no Brasil, concentra-se nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul. Juntos estes estados respondem por 70% da produção de leite do país (BITTENCOURT & BITENCOURT, 2000).

O Paraná é o 5º maior estado brasileiro produtor de leite. Em 1999 foi responsável por 1,801 bilhões de litros (ANUALPEC, 2000). A FIGURA 1 demonstra os maiores estados produtores de leite do Brasil.

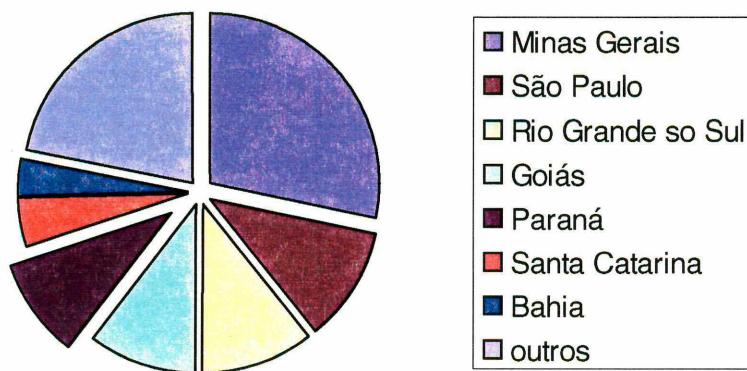


FIGURA 1 – MAIORES ESTADOS PRODUTORES DE LEITE DO BRASIL (2000)

2.1.2. Composição química do leite

O leite é uma suspensão coloidal de partículas numa fase aquosa dispersante. As partículas são de um lado, parte de glóbulos de gordura (de 3 a 5 μm de diâmetro em geral), de outro lado micelas protéicas (de diâmetro de 0,1 μm), formadas pela interação de caseína com outras proteínas e com sais minerais presentes na fase aquosa. As partículas em suspensão são responsáveis pela consistência e opalescência e pela cor branca do leite. O pH do leite é de 6,5 – 6,7 (WALSTRA, 1987).

Na TABELA 2 está representado a composição aproximada do leite.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO APROXIMADA DO LEITE

Componentes (%)	Quantidades
Água	85,5 – 88,7
Lactose	3,8 – 5,3
Gordura	2,4 – 5,5
Proteína	2,3 – 4,4
caseína	1,7 – 3,5
Sais minerais	0,53 – 0,80
Ácidos orgânicos	0,13 – 0,22

FONTE: WALSTRA (1987)

2.1.2.1. Sistema protéico do leite

As caseínas (fosfoproteínas) representam 80% das proteínas do leite de vaca, o restante é constituído de β -lactoglobulina (quase 10% das proteínas totais) e da α -lactoalbumina (quase 2% das proteínas totais), denominadas proteínas do soro do leite e de enzimas e imunoglobulinas. A fração caseínica cujo ponto isoelétrico global está próximo de 4,7, compreende vários tipos de moléculas. Cerca de 50% são α -caseína, 30% são β -caseína, 15% são κ -caseína e 5% são γ -caseína. Ao pH 7,0 a α -caseína está na forma de pequenos polímeros, a β -caseína no estado de monômero e a κ -caseína na forma de polímeros maiores. Se em pH 7,0 (a 37°C) adicionam-se íons Ca^{2+} à cada uma destas frações caseínicas separadamente, a α -caseína coagula, a β -caseína precipita e a κ -caseína não é afetada. Quando α e β estão juntas a adição de Ca^{2+} na solução provoca ainda a sua precipitação, mas se a κ -caseína também estiver presente, o cálcio não exerce efeito algum. Esta ação protetora da κ -caseína é exercida até 10 moléculas de α para uma de κ (CHEFTEL; CHEFTEL, 1977).

Os complexos α e κ se associam entre eles com a β -caseína para formar micelas de forma esférica com tamanho de 0,05 à 0,3 μm de diâmetro e de peso molecular de aproximadamente 3×10^9 . A estabilidade deste conjunto se dá principalmente à hidratação (estas micelas contém cerca de 70% de água) e às cargas eletrostáticas (pontes salinas), as caseínas possuem também proporções elevadas de aminoácidos não polares, fonte de ligações hidrófobas (CHEFTEL; CHEFTEL, 1977).

2.2. SORO DE LEITE

O soro de leite ou lactossoro é um líquido amarelado que se separa da coalhada (caseína) durante a fabricação do queijo. Representa em torno de 90% do peso do leite utilizado para a elaboração do queijo (AMIOT, 1991).

Durante a fabricação do queijo, a atividade de uma enzima (renina presente no coalho) ou o aumento da acidez causa desestabilização das proteínas que compõe as micelas de caseína. A medida que as micelas vão se desintegrando forma-se o coágulo, ou seja, um gel de consistência mole, tri-dimensional de caseína, que ocupa o mesmo volume de leite no tanque de fabricação. O coágulo é então cortado em, pequenos cubos, aquecendo-se a massa lentamente até atingir uma temperatura de aproximadamente 36 a 38°C. Este processo de cozimento provoca a contração do gel e consequentemente expulsão da água e constituintes solúveis do leite no interior dos cubos. Os cubos – ou massa de queijo – contém caseína, gordura do leite e sais minerais que aderem ou são fisicamente aprisionados no interior da matriz de proteínas. O líquido expelido dos cubos – o soro – contém os constituintes solúveis do leite (USDEC, 1997).

Dependendo do tipo de queijo que está sendo fabricado existem dois tipos básicos de soro de leite:

a) Soro de leite ácido

Resulta da fabricação de queijos de pasta fresca e pasta branda, assim como da fabricação de caseína láctica, apresentando acidez de 120 graus Dornic ($^{\circ}\text{D}$). Quando a coagulação é totalmente ácida (uso de ácido láctico), o cálcio abandona o complexo caseína-cálcio, formando lactato de cálcio, e a caseína sem a proteção do cálcio precipita. O soro de leite ácido assim formado contém uma grande quantidade de lactato de cálcio e o conteúdo de extrato seco varia entre 4,5 e 5,5%. Um outro tipo de soro de leite industrial é obtido mediante a coagulação das proteínas do leite pelo emprego de outros ácidos, como o ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido acético (MACEDO, 1997).

b) Soro de leite doce

Segundo CHEFTEL & CHEFTEL (1977), resulta do ataque de uma enzima (renina - coalho) à fração k-caseína rompendo uma ligação peptídica (fenilalanina-metionina) com liberação de um glicopeptídeo. A para-caseína k formada não estabiliza mais o complexo com a α -caseína e em presença de cálcio, os aglomerados micelares se polimerizam e coagulam formando um gel, que por sinerese expulsa o soro. O soro de leite doce contém restos de coalho ativo, gordura e um grande número de bactérias procedentes sobretudo do crescimento do fermento láctico, durante a fabricação do queijo. Sua acidez varia de 15 a 25 $^{\circ}\text{D}$ de acordo com os procedimentos utilizados. Apresenta pH próximo a 6,2 e é obtido à temperatura em torno de 38 $^{\circ}\text{C}$ (MACEDO, 1997).

2.2.1. Composição química do soro de leite

O soro de leite é um alimento de grande interesse nutricional, por apresentar grande quantidade de lactose, proteínas solúveis ricas em aminoácidos essenciais (como lisina e triptofano) e pela presença de numerosas vitaminas do grupo B (tiamina, ácido pantotênico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina), ácido ascórbico e sais minerais (VEISSEYRE, 1988)

A composição aproximada do soro de leite doce e ácido está ilustrada na TABELA 3.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO SORO DE LEITE

Componentes (%)	Soro doce	Soro ácido
Água	93 - 94	94 - 95
Extrato seco	6 - 7	5 - 6
Lactose	4,5 - 5	3,8 - 4,2
Ácido láctico	traços	Até 0,8
Proteínas	0,8 - 1	0,8 - 1
Ácido cítrico	0,15	0,1
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8
Valores de pH	6,45	Perto de 5

FONTE: SPREER (1991)

As proteínas do soro do leite são basicamente a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina (QUADRO 1). Apresentam alto valor nutritivo, especialmente a α -lactoalbumina, cuja composição em aminoácidos é muito próxima da considerada biologicamente ótima.

As proteínas do soro de leite são desnaturadas pelo calor e não precipitam em seus pontos isoelétricos (MACEDO, 1997).

QUADRO 1 – CONCENTRAÇÃO DAS PRINCIPAIS PROTEÍNAS DO LEITE E SORO DE LEITE.

Proteína	Concentração (g/L)	% aproximado da proteína Total
Caseínas	24-28	80
α -caseína	15-19	42
β -caseína	9-11	25
κ -caseína	3-4	9
γ -caseína	1-2	4
Proteínas do soro	5-7	20
β -lactoglobulina	2-4	9
α -lactoalbumina	1-1,5	4
Proteose-peptonas	0,6-1,8	4
Proteínas sanguíneas	1,4-1,6	2
Albumina sérica	0,1-0,4	1
imunoglobulinas	0,6-1,0	2

FONTE:: FENNEMA (1965)

O soro de leite e seus subprodutos contêm aminoácidos essenciais, apresentam boa digestibilidade e um alto Índice de Eficiência Protéica (IEP). Quanto mais elevado o valor IEP, melhor a qualidade da proteína. A caseína apresenta valor de IEP de 2,5. Proteínas com IEP acima de 2,5 são consideradas proteínas de alta qualidade. Nas proteínas do soro o IEP é maior que 3,0, classificando-as como excelentes proteínas do ponto de vista nutricional (USDEC, 1997).

Na TABELA 4 está relacionada a composição de aminoácidos essenciais das proteínas do soro de leite e das proteínas totais do leite.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE E DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO LEITE.

Aminoácidos (%)	Proteínas do soro de leite	Proteínas totais do leite
Isoleucina	6,55	6,10
Leucina	14,00	10,00
Lisina	10,90	7,90
Metionina	2,35	2,60
Cistina	3,15	1,00
Fenilalanina	4,05	4,80
Tirosina	4,80	5,20
Treonina	6,70	4,70
Triptofano	3,20	1,50
Valina	6,85	6,80
TOTAL	62,55	50,60

FONTE: SOTTIEZ (1993)

2.2.2. Subprodutos do soro de leite

Apesar do soro de leite ser um alimento que contém nutrientes valiosos, a alta quantidade de sais e a excessiva diluição de seus componentes devido a grande quantidade de água (93-95%) constituem um inconveniente que limita, em alguns casos, o consumo deste produto in-natura. É necessário que o soro de leite sofra determinados tratamentos tecnológicos para uma melhor adaptação do produto aos seus diversos usos industriais. Entre estes os mais importantes são a desmineralização, a concentração e a desidratação (VEYSSEYRE, 1988).

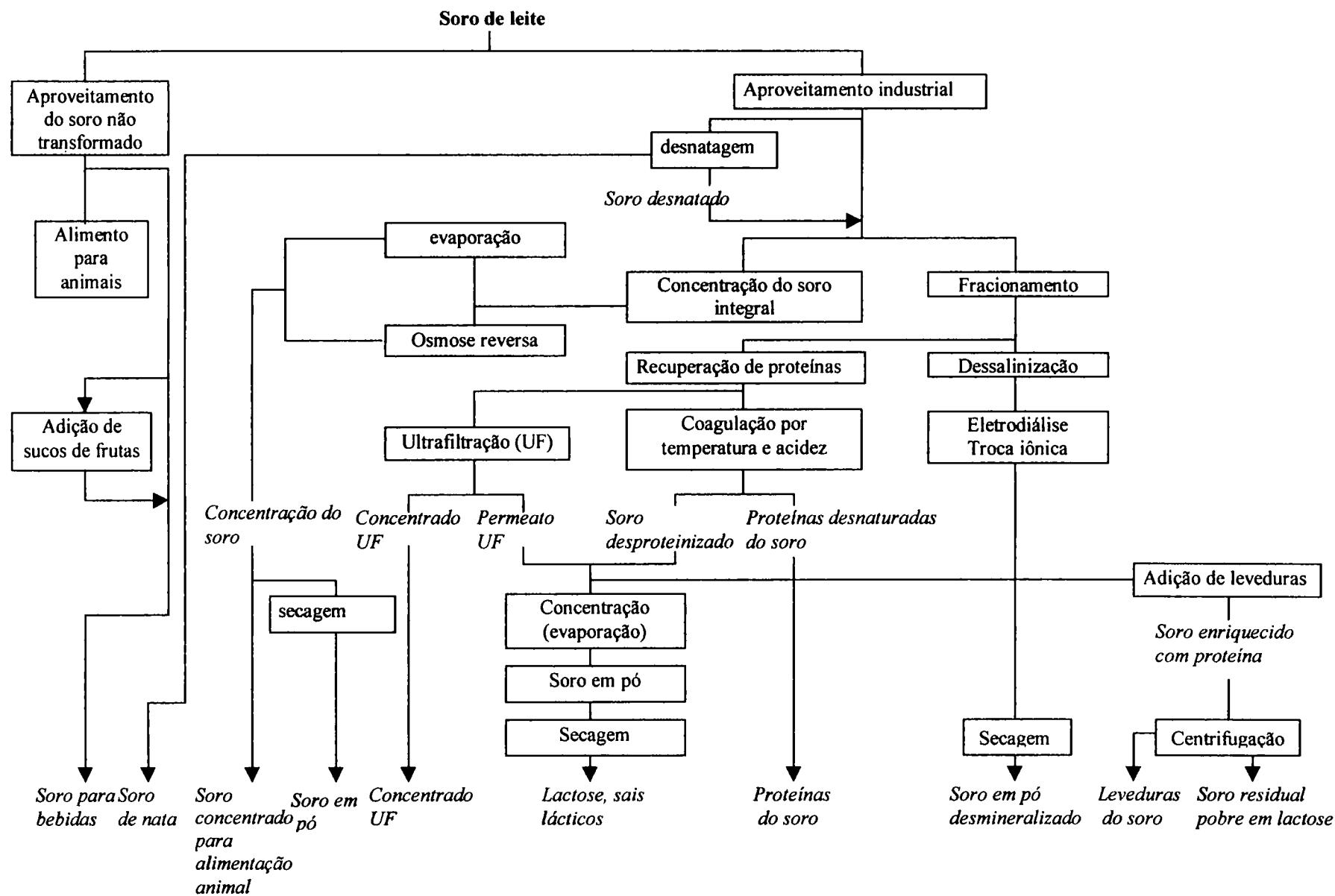


FIGURA 2 – PROCESSOS DE TRATAMENTO E TRANSFORMAÇÃO DO SORO DE LEITE

2.2.3. Utilização do soro de leite

O soro de leite vem sendo utilizado para os mais diversos fins na indústria alimentícia. O QUADRO 2 apresenta as utilizações do soro de leite.

QUADRO 2 – PRINCIPAIS USOS DO SORO DE LEITE

1. Desnatado, extração do creme (manteiga de soro)
2. Soro de leite líquido
 - a) Alimentação animal (especialmente suínos)
 - b) Alimentação humana
 - bebidas fermentadas ou aromatizadas
 - preparo de biscoitos, sorvetes
3. Soro de leite concentrado ou dessecado (xarope, pasta e soro de leite em pó)
 - a) Alimentação animal
 - b) Biscoitos, padaria, confeitoria
 - c) Fabricação de lactose pelo procedimento do álcool (à partir de pó)
 - d) Fabricação de queijos fundidos
4. Aquecimento a 95°C (proteínas precipitadas)
 - a) Proteínas precipitadas
 - produtos para alimentação humana
 - produtos para alimentação animal (proteínas dessecadas, hidrolisados de proteína)
 - b) Águas mães (por concentração e cristalização produzem lactose)
 - alimentação infantil, farmácia
 - indústria da penicilina
5. Concentração e Cristalização
 - a) Lactose
 - b) Soro de leite sem uma parte de lactose
 - c) Extração de proteínas
 - d) Soro de leite em pasta (após a concentração), rico em proteínas e vitaminas
6. Fermentações
 - a) Bactérias lácticas (ácido láctico)
 - b) Alimentação (conservas)
 - c) Indústria têxtil, curtumes
 - d) Clostrídios (fermentos butíricos, ácido butírico para a indústria química)
 - e) Leveduras (álcool)
 - f) Bebidas alcóolicas, "cerveja de soro"
 - g) Solvente industrial, indústria química
 - h) Fermentação por bactérias acéticas (vinagre do soro)
7. Soro fermentado por cultivo com leveduras de padaria
 - a) Produto concentrado ou dessecado para a alimentação animal
8. Obtenção de vitamina B₂ (riboflavina), extraída de diversas águas mães

FONTE: ALAIS (1984)

2.2.4. O soro de leite como resíduo industrial

Devido a alta quantidade de substâncias orgânicas, representadas principalmente pela lactose – aproximadamente 70% dos sólidos totais – e pelas proteínas – aproximadamente 20% dos sólidos totais, o soro de leite impõe um alto valor de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) às plantas de tratamento de águas residuárias, variando de 30.000 a 60.000 mg/L dependendo do processamento específico utilizado. Segundo dados fornecidos pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ, grande parte do soro de leite produzido no Brasil ainda é incorporada às águas residuárias de laticínios, sendo despejada em cursos de água e canais de irrigação ou sobre o solo, prática que impõe elevadas cargas poluentes aos sistemas de tratamento de águas e ao meio ambiente (PONSANO, 1995).

Atualmente, a luta contra a poluição ambiental proíbe descarte do soro de leite pelas indústrias em cursos de água antes de um tratamento despoluente prévio com o objetivo de eliminar a lactose e as proteínas que são os componentes mais valiosos do soro de leite. Em uma época em que as necessidades da alimentação humana e animal são cada vez mais importantes é preferível o reaproveitamento do soro pela indústria do que o tratamento despoluente (VEISSEYRE, 1988; PONSANO, 1995).

2.2.5. Produção e custos do soro de leite

Para cada litro de leite coagulado na fabricação de queijos produz-se cerca de 0,6 a 0,9 litros de soro, dependendo do tipo de queijo (ALMEIDA, 2000).

Segundo os dados da Associação Brasileira de Produtores de Leite do Brasil (LEITEBRASIL) a produção de queijo no ano de 1999 atingiu a cifra de 434.000 t e estima-se que nestas indústrias foram produzidas cerca de 3,5 milhões de toneladas de soro de leite.

Para que o soro seja reaproveitado nas suas formas mais comuns, como o soro de leite em pó e o concentrado protéico de soro, necessita-se de tecnologia adequada que muitas vezes representa um alto custo para pequenas e médias indústrias.

ALMEIDA (2000) cita que em 1993, apenas 6% do total de soro de leite produzido pelas indústrias registradas no SIF (Serviço de Inspeção Federal) era industrializado visando a produção de soro em pó.

Estes fatos, aliados ao crescente conceito de controle de poluição ambiental por parte de órgãos governamentais e de proteção ao meio ambiente e ao reconhecimento do valor nutricional e comercial dos constituintes do soro de leite fez com que se iniciassem pesquisas sobre novos métodos de disposição desse produto. Entre estes novos métodos estão a produção de bebidas lácteas fermentadas.

2.3. MANDIOCA

Segundo SANTOS (1995), ao longo da história da produção de alimentos básicos e do abastecimento no Brasil, um dos produtos de maior significado foi a mandioca. Este produto foi consumido de diversas formas e em praticamente, todos os tempos e regiões do país.

No Paraná a mandioca tornou-se um produto típico do litoral, ainda que fosse produzida, em menor escala, em outras regiões.

As farinhas de mandioca constituíram a base da alimentação dos paranaenses, o “pão comum dos ricos e pobres”, e encaminharam a introdução de novos hábitos alimentares (SANTOS, 1995).

READE e GREGORY, citado por STERTZ (1997), afirmam que a mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é também conhecida como aipim, castelona e macaxeira no Brasil, como *yuca* nos países espanofônicos e *tapioca* nos países asiáticos. É cultivada em todo território brasileiro com exceção do sul do Rio Grande do Sul, região muito fria para a planta. Sua utilização é feita em duas opções: uma direta, o consumo culinário ou “de mesa”, o outra industrial, pelo qual se obtém a farinha de fécula de mandioca ou simplesmente farinha de mandioca.

A composição físico-química da farinha de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) está apresentado na TABELA 5.

TABELA 5 – COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA MANDIOCA (*Manihot esculenta*, Crantz)

Composição por 100g	Farinha de mandioca
Calorias, g	363,0
Umidade, g	9,1
Proteínas, g	1,1
Lipídios, g	0,5
Amido, g	88,2
Fibras, g	2,2
Cinzas, g	1,1
Cálcio, g	84,0
Fósforo, g	37,0
Ferro, g	1,0
Sódio, g	11,0
Potássio, mg	926,0
Tiamina, mg	0,02
Vitamina B2, mg	0,03
Niacina, mg	0,6

FONTE: HONHOLZ (1980)

2.4. FERMENTAÇÃO

TORTORA, FUNKE e CASE (2000) citam que a palavra fermentação possui várias definições que variam do uso geral às definições mais científicas:

- 1) Qualquer deterioração de alimento por microrganismo (uso geral)
- 2) Qualquer processo que produza bebidas alcóolicas ou laticínios ácidos (uso geral)
- 3) Qualquer processo microbiológico em grande escala ocorrendo com ou sem oxigênio (definição comum usada em indústria)
- 4) Qualquer processo metabólico que libere energia e que ocorra somente sob condições anaeróbias.

Mas definem como fermentação qualquer processo metabólico que libere energia de um açúcar ou outra molécula orgânica, não requerendo oxigênio ou sistema transportador de elétrons e usando uma molécula orgânica como receptor final de elétrons.

Basicamente, distinguem-se duas técnicas de fermentação: a fermentação no estado sólido (FES), na qual se dá o crescimento do microrganismo em substratos sólidos na ausência de líquido na forma livre e a fermentação líquida em cultivo submerso que é o processo mais comum, utilizado industrialmente onde os microrganismos crescem na presença de água livre (ROITMAN, 1988; STERTZ, 1997).

A fermentação submersa pode ainda ser: contínua, onde é adicionado continuamente o meio esterilizado que contém o substrato, enquanto os produtos da reação são removidos constantemente e a fermentação descontínua ou em batelada onde o inóculo e o substrato são adicionados de uma única vez. Quando a

concentração do produto desejado atinge valor máximo, a fermentação está terminada (ROITMAN, 1988).

2.4.1. Fermentação de carboidratos

Embora outros compostos possam ser utilizados para as fermentações, os açúcares são os substratos mais freqüentes deste processo. Na fermentação de açúcares, a degradação do substrato é normalmente realizada pela via glicolítica, com a produção de piruvato. Esta seqüência de reações inclui uma reação de oxidorredução, a conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3 difosfoglicerato, com a produção de NADH. Estas coenzimas reduzidas são oxidadas por transferência de seus elétrons para o piruvato, ou para compostos dele derivados. Os compostos resultantes (lactato, etanol, ácido fórmico etc.) caracterizam cada tipo de fermentação e podem ser usados para a identificação de microrganismos (BARBOSA; TORRES, 1999).

2.4.1.1. Fermentação láctica

Segundo STAINER, citado por MACEDO (1997), a fermentação láctica é característica dos tecidos animais, de alguns protozoários, fungos e bactérias. A fermentação láctica é característica das bactérias lácticas e engloba a degradação da lactose e outras hexoses até ácido láctico.

Durante a glicólise, que é a primeira fase da fermentação láctica, uma molécula de glicose é oxidada a duas moléculas de ácido pirúvico. Esta oxidação gera a energia que é utilizada para formar duas moléculas de ATP. No próximo passo, o piruvato é reduzido para formar o ácido láctico (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000).

De acordo com a espécie da bactéria e as condições de cultivo, o catabolismo da glicose pode seguir uma via homofermentativa (fermentação homoláctica) ou heterofermentativa (fermentação heteroláctica) ou ainda a via fermentativa das bifidobactérias.

2.4.1.1.1 Fermentação homoláctica

É realizada por espécies de estreptococos, enterococos, pediococos e alguns lactobacilos. Estes microrganismos são capazes de converter quase que toda a glicose em ácido láctico (90-95%).

Nesta fermentação ocorre um transporte e uma fosforilação simultâneos da glicose pelo intermediário do sistema PTS-PEP (precursor fosforilado do piruvato – fosfotransferase) específico da glicose. A glicose 6-fosfato gerada é posteriormente fermentada pela via de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP) à 2 moléculas de lactato. Paralelamente, são geradas 2 moléculas de ATP e NADH₂ que é oxidado a NAD para garantir a continuidade do processo fermentativo (DESMAZEAUD; ROISSART, 1994), segundo a reação:



2.4.1.1.2. Fermentação heteroláctica

Os principais gêneros de bactérias heterolácticas são os *Leuconostoc* e alguns *Lactobacilos*. Estes microrganismos carecem de aldolase e utilizam a via das pentoses-fosfato para metabolizar a glicose.

Na fermentação heteroláctica ocorre a transformação de 1 molécula de glicose pela via das pentoses-fosfatos (ou via hexose monofosfato) em 1 molécula de lactato, 1 molécula de CO_2 e 1 molécula de etanol ou acetato (DESMAZEAUD; ROISSART, 1994), segundo a reação:



2.4.1.1.3. Fermentação das bifidobactérias

As bifidobactérias formam um grupo de bactérias gram-positivas, estritamente anaeróbias, não-patogênicas e não esporuladas. Possuem normalmente o formato de bastões irregulares e fazem parte da flora normal do intestino humano. Nestas bactérias o metabolismo da glicose produz 1 mol de lactato e 1,5 moles de acetato, mas nenhuma molécula de CO_2 é formada durante a fermentação, diferenciando-as das bactérias homo e heterofermentativas (THOMPSON; GENTRY-WEEKS, 1994).

2.5. BACTÉRIAS LÁCTICAS

Segundo SALOFF-COSTE (1994) as bactérias lácticas possuem como característica principal a produção de ácido láctico como principal produto final do metabolismo.

As bactérias lácticas encontram-se amplamente distribuídas na natureza e são conhecidas por sua capacidade de atuar em diferentes grupos de alimentos, especialmente no leite, carne e produtos vegetais. São empregadas para a conservação de muitos alimentos, reduzindo o pH e fermentando uma grande quantidade de carboidratos (HIGASKINO, 1998; MACEDO, 1997).

Estão relacionadas com a produção de alimentos de alta e média acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação, como leites fermentados, iogurtes, queijos, salames, presuntos, chucrute, pepino e outros vegetais fermentados. Este grupo de bactérias contribui para a formação de aromas nos produtos fermentados. Produzem compostos voláteis como diacetil e seus derivados, H_2S e aminas nos queijos (MACEDO, 1997).

2.5.1. Características gerais das bactérias do ácido láctico

As bactérias lácticas são células procarióticas, heterotróficas, gram-positivas, geralmente imóveis, anaeróbias porém aerotolerantes e catalase-negativas. Necessitam de meios de cultivo complexos pois são nutricionalmente exigentes, sendo capazes de assimilar diretamente os principais precursores presentes no meio ambiente. Elas necessitam de moléculas intermediárias provindas da biossíntese vegetal como: açúcares simples, aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos. Algumas podem ainda utilizar moléculas mais complexas como polissacarídeos, polipeptídeos e lipídeos

fracionando-os em moléculas intermediárias assimiláveis (DESMAZEAUD; ROISSART, 1994).

Todas as bactérias lácticas possuem um metabolismo fermentativo sacarolítico capaz de utilizar os glicídios para produção exclusiva de ácido láctico (bactérias lácticas homofermentativas) ou de ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ (bactérias lácticas heterofermentativas). Algumas espécies podem ainda produzir ácido fórmico e ácido succínico. Nenhuma cepa do grupo das bactérias lácticas é capaz de produzir ácidos voláteis com mais de 2 átomos de carbono (DELLAGLIO et al. 1994).

O grupo das bactérias lácticas é formado por células na forma de cocos: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* e *Atopobium* e bactérias na forma de bacilos: *Lactobacillus* e *Carnobacterium*. São considerados como bactérias lácticas os gêneros: *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* e *Propionibacterium* (DELLAGLIO et al. 1994).

2.5.1.1. Bactérias lácticas amilolíticas

Nas transformações alimentares da mandioca e do milho, onde o amido é o substrato glicosídico mais abundante, a fermentação láctica participa de forma essencial porém ainda pouco conhecida. Sabe-se que as bactérias lácticas raramente possuem a capacidade de converter o amido em ácido láctico. As únicas cepas até então identificadas são *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*, *Lactobacillus amyloliticus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus cellobiosus* além de algumas cepas isoladas do trato digestório de animais (GIRAUD et al. , 1993).

Em 1991, uma cepa selvagem de *Lactobacillus plantarum* (denominada A6) com capacidade de hidrolisar o amido foi isolada da mandioca (*Manihot esculenta* var. Ngansa) por GIRAUD, E.; BRAUMAN, A.; KELEKE, S.; LELONG, B. e RAIMBAULT, M. no Laboratório de Biotecnologia do IRD (Institute de Recherche et Développment), em Montpellier – França. Esta cepa possui características particularmente interessantes por ser a primeira cepa de *Lactobacillus plantarum* com atividade amilolítica já descrita.

O *Lactobacillus plantarum* A6 é capaz de sintetizar grandes quantidades de α -amilase extracelular e sua cinética de crescimento frente ao amido ou a glicose é muito próxima. É capaz de degradar não somente o amido gelatinizado como também o amido cru. Após 48h de fermentação sob pH controlado observa-se que o amido cru é totalmente transformado em ácido láctico assim como um aumento significativo no número de células e uma alta produção de α -amilase (GIRAUD, E., 1994).

GIRAUD, E. et al. (1994) sugerem também novas aplicações na indústria de alimentos à partir dos resultados obtidos com a nova cepa. Entre eles, a utilização da cepa amilolítica como cultura starter em algumas fermentações alimentares tradicionais e a produção industrial de ácido láctico à partir do amido cru.

2.6. A COMPOSIÇÃO DA MICROFLORA INTESTINAL

O termo microflora refere-se ao conjunto de bactérias que reside normalmente no intestino do homem. Essa microflora começa a se formar ainda no canal do parto, adquire suas características principais próximo aos dois anos de idade e, a partir de então, acompanha o homem pelo resto de sua vida. A composição exata desta microflora ainda é bastante desconhecida, calcula-se que pelo menos 40% das suas espécies ainda não foram isoladas (TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

As bactérias da flora intestinal são encontradas nas duas porções do intestino, o delgado e grosso, sendo este segundo o mais densamente colonizado (FIGURA 3). A concentração de bactérias no intestino delgado proximal é da ordem 10^3 UFC/mL, sendo as espécies mais representativas, os estafilococos, estreptococos e lactobacilos. Raramente são encontradas bactérias anaeróbias. No íleo distal, o número de bactérias já é bem maior (10^8 UFC/mL) e a flora torna-se bastante diversificada, passando a abranger coliformes e várias espécies de bactérias anaeróbias como bacteróides, fusobactérias e clostrídeos. Depois da válvula íleocecal, a concentração bacteriana, atinge 10^{11} - 10^{12} UFC/mL. No intestino grosso predominam os bacteróides, bifidobactérias, fusobactérias, lactobacilos, estreptococos e clostrídeos. Calcula-se que a flora intestinal possua próximo de 200 espécies bacterianas diferentes, mas somente 20 são representados de maneira significativa (HOLZAPFEL et al., 1998; TRABULSI; SAMPAIO, 2000).

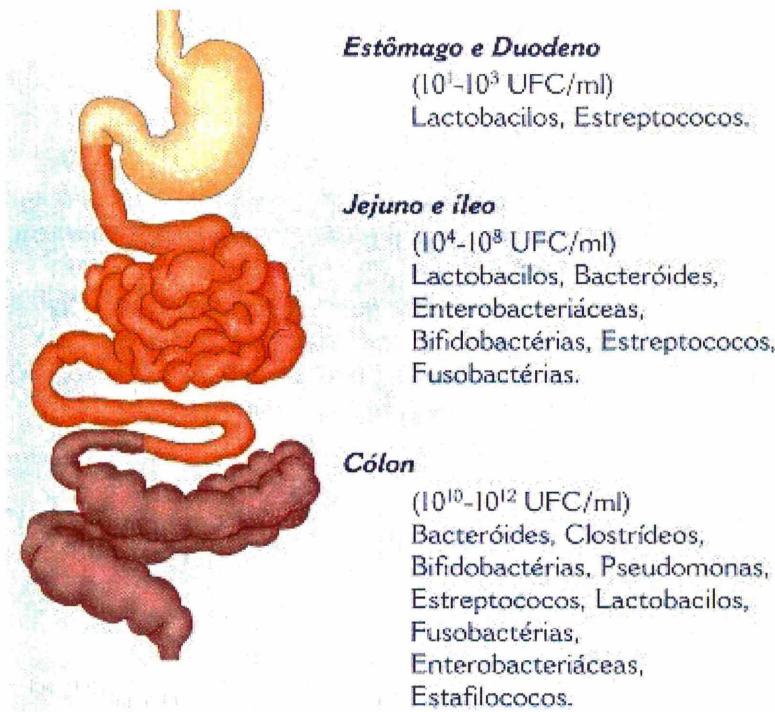


FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO E COMPOSIÇÃO DA FLORA DO TRATO GASTROINTESTINAL.

Segundo TRABULSI & SAMPAIO (2000), a microflora intestinal pode ser dividida basicamente em 3 grupos: um, regularmente benéfico, outro que pode ser benéfico ou não e um terceiro que é nocivo à saúde humana (FIGURA 4). Pertenceriam ao primeiro grupo os lactobacilos, estreptococos lácticos e, particularmente, as bifidobactérias. São várias as evidências que demonstram ou sugerem que essas bactérias colaboram para o bem-estar do homem através de vários mecanismos, tais como aumento da resistência à colonização, implementação de defesas imunológicas, produção de vitaminas, inativação de substâncias cancerígenas e transformação de colesterol ao nível da mucosa intestinal. A proporção direta contra as infecções exógenas pode ser determinada pela acidificação do conteúdo intestinal em consequência da produção abundante de ácido láctico ou através da produção de substâncias antibióticas ativas contra certos patógenos gram-negativos. Pertenceriam ao grupo das bactérias que, ao

mesmo tempo, apresentam atividades benéficas e nocivas, as enterobactérias e os enterococos que, embora causem infecções extra-intestinais, freqüentemente favorecem o aumento de nossas defesas imunológicas. O terceiro grupo de bactérias que seriam apenas nocivas poderia ser representado pelos clostrídeos e pelas bactérias sulforreduutoras que produzem toxinas ou H₂S tóxico, respectivamente.

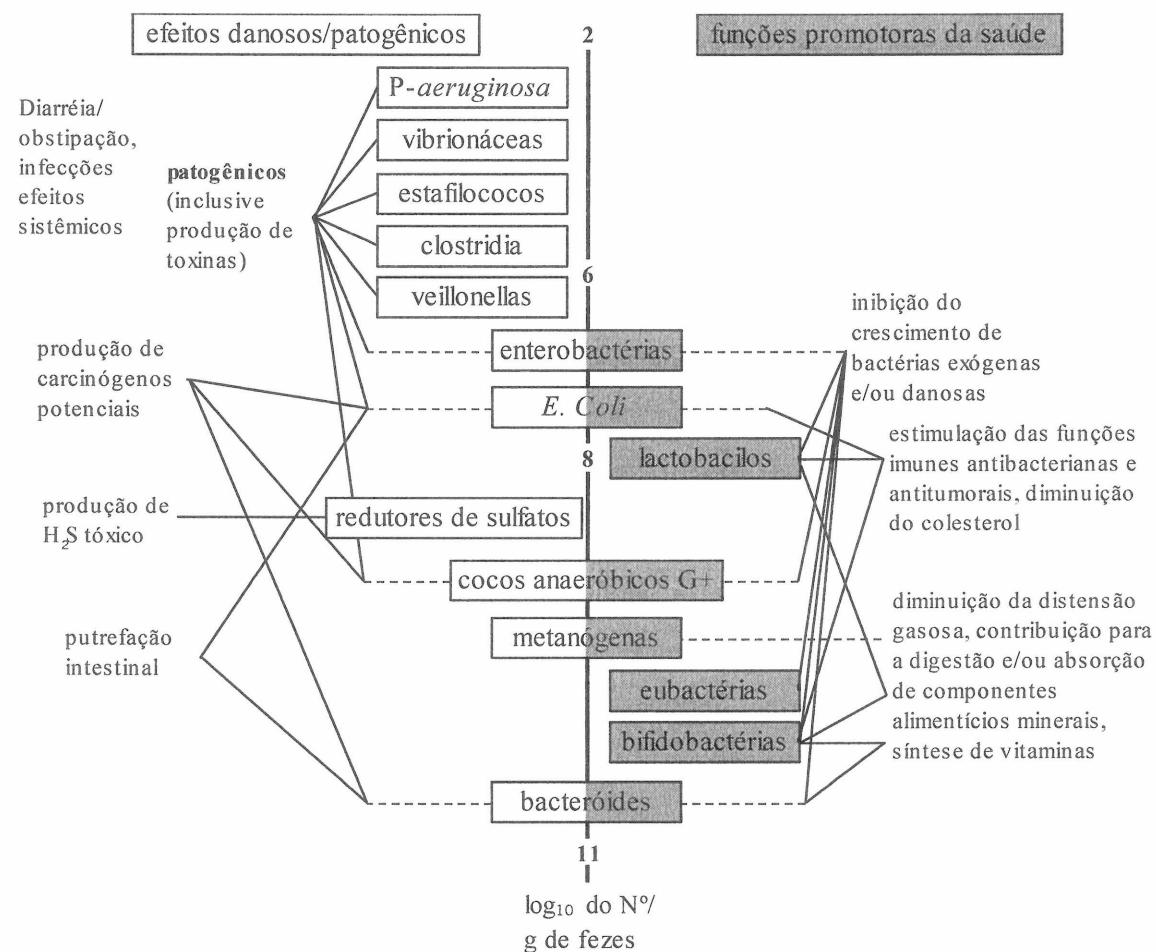


FIGURA 4 - FISIOLOGIA DA MICROFLORA COLÔNICA.

FONTE: GIBSON & COLLINS (1998)

Os efeitos metabólicos, nutricionais e fisiológicos da microflora intestinal no organismo humano estão demonstrados no QUADRO 3.

QUADRO 3 - EFEITOS METABÓLICOS DA FLORA INTESTINAL NO ORGANISMO HUMANO

1. Efeitos metabólicos e nutricionais

Síntese de vitaminas (B₁₂ e K)

Ação sobre os produtos de secreção endógena

- desconjugação de ácidos biliares
- degradação do colesterol
- hidrólise e transformação dos pigmentos biliares
- amôniogênese
- desconjugação de hormônios sexuais

Ação sobre nutrientes e medicamentos

- degradação de carboidratos não-absorvidos
- hidrólise de lipídeos alimentares não absorvidos (pelas lipases bacterianas)
- degradação de certas proteínas e aminoácidos
- ação no metabolismo de alguns medicamentos

2. Efeitos fisiológicos (observados em animais axênicos e criados de maneira convencional)

Modificação da anatomia do tubo digestivo

Modificações histológicas

Modificação do trânsito intestinal

Suprimento energético

FONTE: BOURLIOUX (1994)

2.7. PROBIÓTICOS

Em 1965, LILLY e STILLWELL utilizaram o termo probiótico pela primeira vez para designar um grupo de substâncias produzidas por protozoários que seriam capazes de “estimular” o crescimento de outros protozoários. Em 1974, PARKER o propôs para designar um suplemento alimentar à base de bactérias lácticas que, modificando a flora intestinal existente, provocaria um efeito favorável sobre o animal hospedeiro. Mas em 1989, FULLER postulou a definição que é aceita até os dias de hoje: “Probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal” (TOURNUT, 1994; FULLER, 1989).

FERREIRA & TESHIMA (2000) descrevem que mais de 400 espécies vivem harmoniosamente no trato gastrointestinal num delicado balanço até o momento em que este seja desequilibrado pela dieta, consumo de drogas, situação de estresse, tratamentos quimioterápicos entre outras situações, provocando diferentes tipos de problemas gastrointestinais causados pelo desenvolvimento excessivo daqueles microrganismos patogênicos que também habitam o trato intestinal. A reintrodução de grupos microbianos promotores da saúde no hospedeiro é feita por administração de espécies selecionadas, que deverão estar em números elevados e viáveis no momento do consumo.

Segundo TRABULSI & SAMPAIO (2000), uma bactéria probiótica deve ser capaz de modificar a composição ou atividade da flora intestinal, para exercer os seus efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Um probiótico deve ser capaz de:

- 1) aderir à mucosa intestinal
- 2) excluir ou reduzir a aderência de enteropatógenos
- 3) persistir e multiplicar

- 4) produzir ácidos, peróxidos de hidrogênios e bacteriocinas antagônicas ao crescimento de patógenos
- 5) co-agragar

HOLZAPFEL et al. (1998) cita que alguns dos efeitos funcionais mais importantes das bactérias probióticas são:

- modificação da microflora intestinal
- aderência à mucosa intestinal com capacidade de prevenir a colonização do patógeno
- modificar as proteínas dietéticas presentes na microflora intestinal
- modificar a capacidade enzimática bacteriana relacionada a indução tumoral
- modificar a permeabilidade da mucosa intestinal.

Em 1999, REID publica as bases científicas para cepas probióticas de *Lactobacillus* onde classifica os probióticos como “agentes bioterapêuticos” que estão sendo utilizados para modular a imunidade, baixar o colesterol, tratar a artrose reumática, prevenir o câncer, melhorar problemas de intolerância a lactose, prevenção da doença de Crohn, diarréias, candidíase e infecções do trato urinário.

REID (1999) chama atenção para o fato de que muitas cepas estão sendo consideradas como probióticas, porém poucas ainda foram realmente testadas e suas características comprovadas “in vitro” e em seres humanos. A TABELA 6 demonstra algumas destas cepas de Lactobacilos com características benéficas comprovadas.

TABELA 6 – LACTOBACILOS PROBIÓTICOS COM CARACTERÍSTICAS BENÉFICAS COMPROVADAS “IN VITRO” E EM SERES HUMANOS.

Cepa	Sítio de ação
<i>L. rhamnosus</i> GG	Intestino
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Intestino
<i>L. casei</i> Shirota	Intestino
<i>L. reuteri</i> MM53	Intestino
<i>L. casei</i> CRL431	Intestino
<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Trato urogenital
<i>L. fermentum</i> RC-14	Trato urogenital

FONTE: REID, 1999

HIGASKINO (1998) ressalta a importância de estudos toxicológicos de curta ou longa duração para que as novas cepas probióticas isoladas sejam reconhecidas como seguras (Microrganismos GRAS “Generally Recognized As Safe”).

É importante citar que após a administração, os microrganismos não devem ser inativados pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Dependendo da forma de administração, os microrganismos devem ser resistentes às condições específicas naquele determinado local do organismo. Isto justifica, por exemplo que microrganismos probióticos para uso oral devem ser resistentes à enzimas da cavidade oral (por exemplo, amilases e lisozimas), à enzimas da cavidade gástrica (pepsina, lipase), à acidez do estômago. Devem ter também tolerância aos sais biliares, à concentração de bile, ao suco pancreático, às secreções mucosas no intestino delgado e ao suco intestinal total sendo ainda capazes de aderir e colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro (ANTOINE et al. 1994).

2.7.1. *Lactobacillus casei*

As cepas de *Lactobacillus casei* estão naturalmente presentes no meio ambiente, em vegetais fermentados, carnes e no intestino e saliva de seres humanos. Assim como todas as espécies do gênero *Lactobacillus*, os *L. casei* são Gram + e possuem a forma de bastonetes que variam entre 0,7 a 1,1 µm de largura e 2,0 a 4,0 µm de comprimento. São imóveis, não flagelados e com tendência a formar colônias lisas, brancas ou amareladas. Classificados por ORLA-JENSEN (1919), pertencem ao subgrupo II do gênero *Lactobacillus*, fermentam as hexoses produzindo exclusivamente ácido láctico, mas são capazes de fermentar também as pentoses com produção final de ácido láctico e ácido acético, por isso são denominadas de heterofermentativas facultativas (DELLAGLIO et al. 1994; SALOFF-COSTE, 1995).

Segundo SALOFF (1995), estudos in vitro e in vivo confirmam a hipótese de que a cepa de *L. casei* é tolerante ao pH dos ácidos estomacais e à bile, particularmente se ingerido com alimentos lácteos que contenham uma faixa de pH entre 3,0 e 7,0. É uma das bactérias mais utilizadas em leites fermentados por atribuir características probióticas e incrementar as propriedades organolépticas.

HAMADA et al. (1971) citado por SALOFF-COSTE (1995) observa pela primeira vez no Japão que a administração de leites fermentados contendo *L. casei* Shirota (Yakult) promovia uma determinada proteção contra a desintoxicação em adultos e crianças quando comparado com amostras controle.

HOLZAPFEL et al. (1998) enumera os efeitos clínicos já revisados e publicados da cepa de *Lactobacillus casei* Shirota:

- Prevenção de distúrbios intestinais
- Tratamento de diarréias provocadas por rotavírus

- Promoção do equilíbrio bacteriano intestinal
- Diminuição da atividade enzimática fecal
- Efeitos positivos no tratamento do câncer em estágio inicial de vesícula
- Aumento imune contra o câncer de cólon em fase inicial

SALOFF-COSTE (1995) relata outros efeitos clínicos demonstrados “in vivo” por alguns autores utilizando leites fermentados com *Lactobacillus casei* e testes controle (placebos):

- Diminuição da concentração de enzimas associadas ao aumento do risco de câncer de cólon (β -glucuronidase e nitroreduktase) (LING *et al.* 1994).
- Aumento da população de bifidobactérias (HAYATSU *et al.* 1993).
- Diminuição dos componentes mutagênicos encontrados na urina após a ingestão de carnes vermelhas (HAYATSU *et al.* 1993).
- Aumento de ativadores não específicos do sistema imune como o interferon (SOLIS PEREYRA & LEMONNIER 1993)
- Aumento do número de imunoglobulinas de crianças com diarréia (KAILA *et al.* 1992).

2.7.2. *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus acidophilus* é uma bactéria anaeróbia facultativa que habita normalmente no trato gastro-intestinal do homem e animais, além da saliva e vagina humanos. Apresenta-se sob a forma de bastonetes com arredondamento final, geralmente possui de 0,6 a 0,9 μm de largura por 1,5 a 6,0 μm de comprimento, dispostos isoladamente, aos pares ou em curtas cadeias. São imóveis, não flagelados e com tendência a formar colônias rugosas e sem pigmentação (REQUE, 1999; SALOFF-COSTE, 1997).

Pertencem ao subgrupo I do gênero *Lactobacillus* e se caracterizam por ser homofermentativos estritos que fermentam as hexoses pela via de EMBDEN-MEYERHOF produzindo exclusivamente ácido láctico. Não fermentam as pentoses nem o gluconato (DELLAGLIO et al. 1994).

HOLZAPFEL (1998) enumera os efeitos de estudos clínicos realizados em duas cepas de *L. acidophilus* (LA1 e NCFB 1748):

- *Lactobacillus acidophilus* LA1: aumento imune, aderência às células intestinais humanas, regulação da microflora intestinal.
- *Lactobacillus acidophilus* NCFB 1748: diminuição da atividade de enzimas fecais carcinogênicas, diminuição da mutagenicidade fecal, prevenção da diarréia e tratamento da constipação.

No QUADRO 4 estão demonstrados os efeitos “in vivo” e “in vitro” relatados por diversos autores citados por SALOFF-COSTE (1997) com *Lactobacillus acidophilus*.

QUADRO 4 – EFEITOS “IN VIVO” E “IN VITRO” RELATADOS POR AUTORES CITADOS POR SALOFF-COSTE (1997) UTILIZANDO *Lactobacillus acidophilus* E TESTES CONTROLE (PLACEBOS).

Efeitos observados	Autor
In vivo	
Aumento da população de lactobacilos do íleo na ordem de 3 log.	MARTEAU et al. 1992
Diminuição dos níveis de colesterol sérico	KHEDHAR et al. 1993
Prevenção de infecções provocadas por <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Shigella sonnei</i> .	NADER de MACIAS et al. 1993 NADER de MACIAS et al. 1992
Diminuição do fator 3 da freqüência de infecções vaginais provocadas por cândida.	HILTON et al. 1992
Ligeiro aumento dos valores séricos de IgA	MARTEAU et al. 1996
Aumento da atividade fagocitária de leucócitos sanguíneos	SCHIFFRIN et al. 1995
Diminuição de enzimas procarcinogênicas nas fezes (β -glucuronidase e nitróredutase)	MARTEAU et al. 1990
In vitro	
Atividade antagônica contra <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Shigella sonnei</i> .	MIDOLLO, 1995; BERNET et al. 1994; COCCONNIER et al. 1993; APELLA, 1992
Diminuição da atividade mutagênica por aminas heterocíclicas (com atividade procarcinogênicas)	LEE et al. 1995; ORRHAGE, 1994
Produção de citokinas como interferon (IFN)-g, fator de necrose tumoral (TNF α) e interleukina (IL)-1b	KITAZAWA, 1994; SOLIS-PEREYRA, 1993
Aumento da quantidade de células produtoras de IgA e IgG	KITAZAWA, 1994; SOLIS-PEREYRA, 1993
In vivo e in vitro	
Produção de compostos antimicrobianos específicos como: peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e análogos de antibióticos (lactocidina e acifilina)	KLAENHAMMER, 1998; MALIK et al. 1994; MITAL & GARG, 1995
Produção de bacteriocinas, lactacina-B e lactacina-F	BERNET et al. 1994

FONTE: SALOFF-COSTE, 1997

2.8. USO DE CULTURAS MISTAS EM ALIMENTOS FERMENTADOS

SALOFF-COSTE (1997) sugere que cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* sejam utilizadas em conjunto pois o *L. acidophilus* tem sobrevida reduzida em condições de pH muito baixos. Associações destas duas cepas em leites fermentados possuem efeitos inibitórios de cepas patogênicas mais importantes que isolados.

SAMONA & ROBINSON (1994) e KLAVIER et al. (1993) citados por MACEDO (1997), afirmam que a utilização de culturas de microrganismos com duas ou mais espécies distintas de microrganismos, conferem ao produto características organolépticas e promotoras do bem estar, que não estariam presentes com o uso de culturas simples. O crescimento de alguns microrganismos em determinados substratos só é possível na presença de outros, que forneçam, pelo seu metabolismo e ação de suas enzimas, nutrientes necessários aos primeiros. Desta forma, o uso concomitante de lactobacilos, em especial *L. acidophilus* e *L. casei* e bactérias bífidas em bebidas lácteas oferece vantagens ao consumidor por proporcionar um produto de aroma mais suave e de menor acidez que o iogurte, com suas propriedades profiláticas e terapêuticas, características destes microrganismos.

2.9. ALIMENTOS FERMENTADOS

A fermentação microbiana de vegetais, frutas e leite tem sido empregada para preservar alimentos e fornecer sabor e/ou características físicas desejáveis. A produção de alimentos fermentados ainda permanece como o método de preservação mais comum em todo o mundo, criando alguns dos alimentos mais apreciados na dieta humana. Em alguns casos, a fermentação é realizada pelo aproveitamento da flora microbiana normal, presente no alimento. Em outros, particularmente na produção de queijos e leites fermentados, culturas específicas de microrganismos (culturas iniciadoras) são adicionadas propositadamente nos alimentos no início da fermentação (PELCZAR, 1996).

2.9.1. Leites fermentados

Os leites fermentados representaram durante séculos, para numerosos povos especialmente aqueles do Oriente Médio, um alimento privilegiado por ser rico em proteínas e muito digesto. Existem relatos sobre leites fermentados na Bíblia (Gênesis XVIII, 8). A transformação da lactose promove uma brusca queda do pH e fornece uma determinada “proteção” contra o desenvolvimento de um grande número de microrganismos patógenos. Em 1908, METCHNIKOFF, postula suas teorias sobre a influência positiva dos leites fermentados ricos em lactobacilos vivos, tendo estudado a longevidade de povos búlgaros, consumidores destes produtos na época.

BATISH et al. 1999, citam a definição do IDF (International Dairy Federation) de 1969, ainda aceita nos dias atuais: leites fermentados são produtos preparados à partir do leite ou porções deste, integral ou desnatado, concentrado ou não, homogeneizado ou não, pasteurizado ou esterilizado e fermentado por cepas específicas de microrganismos.

LOONES, 1994 cita que os leites fermentados podem se apresentar de duas formas:

- líquidos a serem consumidos como bebidas,
- coagulados a serem consumidos com colher.

No Brasil, o consumo e a produção de leites fermentados vem crescendo significativamente (380 mil toneladas em 1995, ou aproximadamente 4 kg/hab./ano), porém ainda estamos distantes de alguns países desenvolvidos, como a Finlândia (36 kg/hab./ano), Suécia (26 kg/hab./ano) e França (16 kg/hab./ano) (SEIBEL & CANSIAN, 2000).

2.9.1.1. Bebidas lácteas fermentadas

Nos últimos anos, tem-se incrementados de maneira notável o consumo de bebidas lácteas fermentadas que se caracterizam por apresentar baixa viscosidade e serem consumidas como bebidas suaves e refrescantes. São várias as razões para o consumo destas bebidas: o valor nutricional é uma delas, pois é um alimento rico em cálcio, proteínas e vitaminas, bom para o desenvolvimento de crianças, contém fermentos vivos, é um alimento com sabor e textura agradável e é uma alimentação prática e conveniente, pronta para o consumo (ALMEIDA, 2000).

Segundo a ABIQ (1999), a produção de bebidas lácteas experimentou um salto de 103% em 1995 em relação ao ano anterior. Desde 1994, as bebidas lácteas têm tido lugar destacado no mercado brasileiro e em 1998 representaram 12,8% da participação financeira no mercado de produtos lácteos frescos no Brasil (ALMEIDA, 2000; LEITEBRASIL, 2000).

BATISH (1999) cita que as bebidas lácteas fermentadas podem ser produzidas também com soro de leite e seriam então classificadas em:

- a) Bebidas naturais (doces): preparação que não envolve fermentação, apenas adiciona-se sucos de frutas ou chocolate e estabilizantes como carragenatos.
- b) Bebidas ácidas: produzidas com a adição de ácido cítrico ou por fermentação bacteriana. São classificadas como bebidas leves e refrescantes que podem ser adicionadas de aromas, corantes e/ou sucos de frutas. Possuem um aspecto clínico interessante se forem adicionadas de bactérias lácticas de ação probiótica.
- c) Bebidas lácteas não alcoólicas: de características muito próximas ao item b, porém são de acidez mais baixa. Como exemplo “Rivella”, desenvolvida na Suíça e “Nature’s Wonder” desenvolvidas na Suécia.

2.9.2. Farinhas fermentadas

Processos fermentativos normalmente agregam valor nutricional à alimentos com baixas proteínas e alta quantidade de carboidratos. A fermentação pode também melhorar características organolépticas ao alimento (BALAGOPALAN et al, 1988).

A bioconversão de farinhas por bactérias lácticas consiste em obter essas farinhas lácticas amilolíticas de boa qualidade permitindo a valorização destes produtos na alimentação humana e de elaborar novos alimentos de interesse alimentar e nutricional.

A mandioca se constitui como uma fonte potencial de energia, mas que até o momento tem sido utilizada somente em fermentações tradicionais. É o substrato de vários alimentos fermentados da Ásia, África e América Latina. São exemplos de alimentos fermentados utilizando como substrato a farinha de mandioca: o “kokonte” (Ghana), “tape ketell” (Indonésia) e “gari” e “fufu” (Nigéria) (STERTZ, 1997).

2.10. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidos pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993). Os resultados obtidos através da análise sensorial aplicada a produtos alimentícios, podem fornecer informações muito valiosas com relação à qualidade dos mesmos, necessidades de melhoramento, orientações quanto ao desenvolvimento de novos produtos, além de fornecer subsídios à área de *marketing* ou de planejamento de mercado, sobre as necessidades e preferências do público consumidor (DEGÁSPARI, 1995).

Estes dados são obtidos a partir de diversos tipos de testes, aplicados a diferentes grupos de indivíduos. Estes, podem ou não ser peritos em análise sensorial de alimentos, dependendo do tipo de teste a ser aplicado e dos resultados que se deseja alcançar. No entanto, antes de se iniciar qualquer teste de análise sensorial, deve-se estabelecer quais devem ser os critérios que se deseja usar e qual é o objetivo central do trabalho, pois é em função disto que se determina a metodologia a ser adotada, além do tipo de grupo e o número de indivíduos que farão parte destes testes (DEGÁSPARI, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Microrganismos

Foram utilizadas 3 cepas diferentes de bactérias, sendo as três do gênero *Lactobacillus*, obtidas das coleções de cultura:

- *Lactobacillus acidophilus* (CCT 0329)

Procedente da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, Campinas-SP.

- *Lactobacillus casei* Shirota (IAL 0527)

Procedente do Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo-SP.

- *Lactobacillus plantarum* A6

Procedente do Instituto IRD (Institut de Dévelopment e Recherche), Montpellier, França.

As cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* Shirota, apresentavam-se liofilizadas e sua ativação procedeu-se de acordo com as recomendações do fornecedor, pela dissolução das culturas em água destilada estéril, posteriormente semeadas e incubadas a 35°C por 48 horas em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharp – MERCK) autoclavado a 121°C por 15 min (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). A cepa de *Lactobacillus plantarum* A6 apresentava-se repicada em ágar MRS e foi ativada segundo recomendações do fornecedor, em caldo MRS modificado estéril incubado a 35°C por 48 horas, composto de peptona bacteriológica 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, diamônio citrato de hidrogênio 0,217%, acetato de sódio 0,5%, fosfato dibásico de potássio 0,262%, sulfato de magnésio heptahidratado

0,0207%, sulfato de manganês monohidratado 0,0056%, amido solúvel 1%; o pH foi ajustado para 6,75 antes da esterilização.

3.1.2. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas na composição do substrato de fermentação foram soro de leite de vaca e farinha de mandioca branca.

Utilizou-se soro de leite em pó, procedente da Danone (São Paulo-SP), da marca Sancor. A farinha de mandioca branca fina, da marca Yara e os sucos de tomate, goiaba e pêssego, procedentes da marca Superbom foram obtidos no comércio da cidade de Curitiba.

3.1.3. Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados na produção e análise da bebida fermentada estão relacionados a seguir:

- balança analítica (SCIENTECH, 120 x 0,0001);
- balança semi-analítica (MARTE, 252545);
- câmara de fluxo laminar (TROX, MDL FLV);
- autoclave vertical de laboratório (PHOENIX, MDL AV 75);
- estufa bacteriológica (TECNAL, TE – 392/2), com termostato automático;
- banho-maria (FANEM, 120/1);
- espectofotômetro (MILTON ROY, MDL 20D);
- cromatógrafo líquido (SHIMADZU, MDL CTO-10 A);
- agitador de tubos (MARCONI, MA 162);
- potenciômetro (LABSCORE, PL 800)
- microscópio ótico binocular (LEITZ WETZLAR 590505);
- contador de colônias (BIOMATIC, 110);
- medidor da atividade de água (AQUALAB, CX2T).

3.2. MÉTODOS

Os métodos físico-químicos e os demais métodos de análise utilizados para definir a composição centesimal das matérias-primas e da farinha biotransformada assim como acompanhar a evolução da fermentação estão descritas a seguir:

3.2.1. Métodos analíticos

3.2.1.1. Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados por processo eletrométrico em potenciômetro, devidamente calibrado com soluções tampão de pH 7,0 e pH 4,0.

3.2.1.2. Determinação da acidez titulável

A determinação da acidez titulável foi realizada segundo as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985). O teor de ácido láctico presente em 100 g de amostra foi determinado pela titulação de alíquota de 10 mL de amostra com solução de NaOH 0,1N na presença de fenolftaleína como indicador.

3.2.1.3. Determinação de cinzas

O teor de cinzas foi determinado por calcinação em mufla a 500°C de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

3.2.1.4. Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, considerando valores de nitrogênio (fator de conversão) de 6,38 para o soro de leite e para a farinha de mandioca (SÃO PAULO, 1985).

3.2.1.5. Determinação da umidade

A umidade foi determinada por gravimetria em estufa a 105°C, segundo metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

3.2.1.6. Determinação de lipídios

O teor de lipídios do soro de leite de vaca foi determinado pelo método de Gerber em lactobutirômetro. Para a determinação dos lipídios da farinha de mandioca utilizou-se o método de Soxhlet e extração com éter de petróleo, ambos os métodos descritos nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

3.2.1.7. Determinação de fibras

O teor de fibras da farinha de mandioca foi determinado pelo método gravimétrico, por extração com ácido clorídrico, segundo metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

3.2.1.8. Determinação de carboidratos (por cálculo)

A determinação de carboidratos se dá pela diferença dos percentuais obtidos das análises de extrato seco, fibras, lipídios, proteínas e cinzas.

$$\text{Carboidratos, \%} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ fibras} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ cinzas})$$

3.2.1.9. Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), o qual se baseia na reação colorimétrica dos açúcares da amostra com o reativo cupro-alcalino, que na presença de reativo arsênio molíbdico, forma composto de coloração azul, cuja absorbância máxima ocorre em 535 nm. Para a curva padrão foi utilizada solução de lactose contendo 100 µg do açúcar/mL de solução.

Para evitar interferência nas leituras em espectrofotômetro causada pela presença de proteínas nas amostras, procedeu-se a desproteinização prévia da amostra, pela adição de 2 mL de solução saturada de acetato de chumbo, 2 mL de solução de sulfato de sódio e 5 mL da amostra em balão volumétrico de 100 mL, cujo volume foi completado com água destilada. A mistura foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro duplo, obtendo-se a amostra desproteinizada.

3.2.1.10. Teor de amido

O conteúdo de amido da farinha de mandioca e do fermentado foi realizado pelo método da hidrólise ácida de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (A.O.A.C., 1990).

3.2.1.11. Quantificação do ácidos orgânicos em cromatógrafo líquido

Foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência, operando nas condições apresentadas na TABELA 7:

TABELA 7 – CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO NO CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA PARA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS.

Componentes do cromatógrafo	Condições de operação
Temperatura da coluna	60 °C
Fase móvel - Eluente	Ácido Sulfúrico
Concentração da fase móvel	0,05 M
Vazão	0,6 mL/min.
Pressão da bomba	45 kg/cm ³
Volume injetado	20 µL

Nestas condições os tempos de retenção de cada componente pode ser expresso como mostrado na TABELA 8.

TABELA 8 – TEMPOS DE RETENÇÃO DE ALGUNS PADRÕES, MONITORADOS EM COLUNA CROMATOGRÁFICA, NAS CONDIÇÕES ACIMA.

Padrão	Tempo de retenção (min)
Ácido cítrico	7,92
Glicose	8,99
Ácido láctico	12,66
Ácido Acético	14,84
Etanol	21,68

3.2.1.12. Determinação da atividade de água

A atividade de água da farinha de mandioca foi determinada em aparelho aqualab CX2T.

3.2.2. Manutenção das culturas

Após cultura em caldo, as cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* Shirota foram repicadas em profundidade para tubos com ágar MRS (MERCK), incubadas a 35°C por 48 horas e mantidas a 4°C por seis meses. A cepa de *Lactobacillus plantarum* A6 foi repicada e mantida nas mesmas condições em ágar MRS modificado.

3.2.3. Diluição do soro de leite

O soro de leite em pó foi diluído na proporção de 1:10 em água destilada conforme recomendações do fornecedor.

3.2.4. Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas foram caracterizadas pela análise de sua composição centesimal, conhecida como a proporção que grupos homogêneos de diversos constituintes aparecem em 100 g de produto. Foram determinados o extrato seco, proteínas, açúcares, lipídios e cinzas, seguindo as metodologias descritas no item 3.2.1.

3.2.5. Tratamento térmico dos componentes do substrato

A farinha de mandioca seca foi submetida a autoclavagem a 121°C/ 15 minutos em frascos erlenmeyers hermeticamente fechados para evitar a entrada de água.

Para o soro de leite, o componente de maior sensibilidade ao tratamento térmico, foram testadas diferentes condições de tempo e temperatura de pasteurização.

Amostras de 200 mL de soro de leite em erlenmeyers de 500 mL foram pasteurizadas em banho-maria em diferentes condições de tempo e temperatura (TABELA 9). Após a pasteurização, as amostras foram avaliadas visualmente para verificar a presença de floculação e microbiologicamente para testar a eficiência do tratamento na ativação de bactérias indesejáveis. A avaliação microbiológica foi realizada pela contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, cuja técnica baseia-se na semeadura “pour plate” em placas com ágar padrão para contagem (PCA – MERCK) de diluições sucessivas da amostra em água peptonada 0,1%. As placas foram incubadas invertidas a 35°C por 48 horas e os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de amostra (BRASIL, 1997; SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

TABELA 9 – CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA UTILIZADOS NA PASTEURIZAÇÃO DO SORO DE LEITE.

Tempo (min)	Temperatura (°C)
5	95
10	90
15	85
20	80
30	75

3.2.6. Otimização dos parâmetros fermentativos

Para avaliar a influência das condições físicas, da taxa de inóculo inicial e da quantidade de farinha de mandioca, foram realizados dois planos experimentais.

3.2.6.1. Primeira otimização

A primeira otimização consistiu em avaliar a taxa de inóculo, concentração de farinha de mandioca e tempo de fermentação. Esta otimização foi realizada seguindo um plano experimental completo $2^{(3-0)}$ (com dois níveis e três variáveis), com 2 repetições do ponto central, resultando em 11 ensaios. As variáveis-resposta obtidas foram a variação de pH, variação da acidez e concentração de células.

As variáveis desta primeira otimização estão demonstradas na TABELA 10.

TABELA 10 – VARIÁVEIS DA PRIMEIRA OTIMIZAÇÃO

Nível	Taxa de inóculo (%)	Concentração de farinha de mandioca (%)	Tempo de fermentação (h)
-1	1	10	8
0	4,5	25	24
+1	8	40	40

3.2.6.2. Segunda otimização

Com os resultados obtidos na primeira otimização optou-se por realizar uma segunda otimização, onde foram avaliados a temperatura de fermentação, a concentração da farinha de mandioca e tempo de fermentação. Esta otimização foi

também realizada seguindo um plano experimental completo $2^{(3-0)}$ (com dois níveis e três variáveis), com 1 repetição do ponto central, resultando em 10 ensaios. As variáveis-resposta obtidas foram a variação de pH, variação da acidez e concentração de células.

As variáveis desta Segunda otimização estão demonstradas na TABELA 11.

TABELA 11 – VARIÁVEIS DA SEGUNDA OTIMIZAÇÃO

Nível	Temperatura de fermentação (°C)	Concentração de farinha de mandioca (%)	Tempo de fermentação (h)
-1	32	15	8
0	35	20	16
+1	38	25	24

3.2.7. Estudo cinético da fermentação

Após a otimização dos parâmetros fermentativos foi realizado um estudo cinético da fermentação em 10 erlenmeyers de 250 mL a razão de 200 mL.

3.2.7.1. Preparo dos inóculos para a fermentação

O preparo do pré-inóculo iniciou-se com a reativação das cepas mantidas em ágar sob refrigeração a 4°C. A cepa de *Lactobacillus plantarum* A6 foi semeada em 10 mL de caldo MRS modificado e a cepa de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* Shirota em 10 mL de caldo MRS. Todas as cepas foram incubadas a 35°C por 48 horas.

Após as 48 horas de incubação, os pré-inóculos foram passados para erlenmeyers de 250 mL a razão de 100mL dos respectivos caldos e novamente incubados a 35°C por 48 horas, obtendo-se assim os inóculos da fermentação.

3.2.7.2. Estudo cinético da fermentação com a cepa amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6)

Após a pasteurização em banho-maria a 80°C por 20 minutos, o soro de leite (64%) foi resfriado à uma temperatura de inoculação de 35°C, em banho de gelo. Procedeu-se então, a adição da farinha de mandioca (20%), sob agitação vigorosa por 2 minutos para que houvesse homogeneização completa da mistura.

A mistura foi adicionada de 8% de inóculo (v/v) da cepa amilolítica em relação ao volume total, sob agitação lenta para evitar a incorporação excessiva de ar e incubada em estufa a 35°C por 8 horas.

3.2.7.3. Estudo cinético completo da fermentação utilizando a cepa amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6) + cepas probióticas (*Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus*)

Neste estudo completo da cinética da fermentação utilizando a cepa amilolítica e as cepas probióticas, a pasteurização do soro, a adição da farinha, adição do inóculo inicial (*Lactobacillus plantarum* A6) e condições de incubação foram realizadas como no item 3.2.7.1.

Após as 8 horas de fermentação procedeu-se a adição do inóculo das cepas probióticas de *Lactobacillus acidophilus* (4%) e *Lactobacillus casei* Shirota (4%), sob agitação lenta. A mistura foi novamente incubada em estufa a 35°C por mais 8 horas. Paralelamente a fermentação foi incubado, nas mesmas condições acima, uma prova em branco com ausência de inóculo.

3.2.7.4. Avaliação do fermentado

Durante a fermentação foram realizadas amostragens em intervalos de 2 horas até 16 horas de fermentação, para verificar a evolução do pH, acidez titulável, ácidos orgânicos, açúcares redutores e contagens de células.

A contagem total de células viáveis expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL foi realizada pelo método de semeadura “pour plate” de 1 mL das amostras fermentadas, previamente diluídas em 9 mL de água peptonada 0,1% e misturadas com ágar MRS modificado (contagem de *Lactobacillus plantarum* A6) e ágar MRS (contagem de *Lactobacillus acidophilus* + *Lactobacillus casei* Shirota).

As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35°C por 48 horas. As placas contendo ágar MRS modificado foram expostas à vapores de iodo para verificação de halos provenientes do consumo de amido do meio pelas colônias das células amilolíticas (FIGURA 5).



FIGURA 5 – COLÔNIAS DE *L. plantarum* A6 EXPOSTAS À VAPORES DE IODO COM HALOS CARACTERÍSTICOS DE CONSUMO DE AMIDO.

3.2.8. Formulação da bebida

A formulação base da bebida láctea fermentada foi acrescentada de diferentes sucos de frutas tropicais existentes no mercado consumidor, com o intuito de definir as melhores características sensoriais, bem como a preferência dos consumidores. A confirmação desta preferência foi realizada com a utilização de equipe de julgadores treinados com produtos similares.

3.2.8.3. Equipe de julgadores

Foram fixados convite (ANEXO 1), em locais de grande circulação no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, convidando a comunidade universitária a participar de uma equipe de degustação de bebida láctea fermentada.

Ao todo foram 50 candidatos que se interessaram e preencheram um questionário, conforme ANEXO 2, onde responderam sobre suas condições de saúde, disponibilidade de tempo e perfil de apreciação de bebidas lácteas.

3.2.8.4. Condições do teste

Os testes de seleção e treinamento dos candidatos e de definição de aromas da bebida láctea foram conduzidos no laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal do Paraná em dias úteis no horário entre 15 e 16 horas, para que não houvesse interferência das refeições principais (almoço e jantar) no teste sensorial.

As amostras foram servidas em copos descartáveis de 50 mL, codificadas com números de três dígitos aleatórios, em sala com luz natural, acompanhadas da ficha de resposta e lápis. Para neutralizar o sabor entre as amostras foram servidos água e

biscoitos de água e sal. Os sucos de fruta foram servidos a 15°C, e as amostras da bebida a 4°C.

3.2.8.5. Seleção e treinamento de julgadores

Para selecionar os julgadores foi aplicado o teste triangular. Neste teste as avaliações são conduzidas de acordo com o procedimento descrito pela ABNT (1993), na qual pode-se identificar pequenas diferenças entre as amostras, selecionar e treinar julgadores. Este teste consiste na apresentação simultânea de três amostras codificadas aleatoriamente com três dígitos, duas das quais devem ser idênticas. Ao julgador é solicitado selecionar a amostra diferente (MONTEIRO, 1984; ABNT, 1993).

FERREIRA et al. (2000) sugere que a seleção dos candidatos deve ser baseada, no mínimo, no resultado de 12 testes, ou seja, servindo-se à cada candidato 3 a 6 repetições previstas no delineamento do teste triangular e selecionando-se os candidatos com 60 de acertos, com o objetivo de minimizar o número de julgadores requeridos para desenhar a conclusão do mesmo.

Após a conclusão dos testes triangulares os resultados (acerto/erro) podem ser interpretados por análise seqüencial, num gráfico onde duas retas, a de aceitação (A) e de rejeição (B) são traçadas de acordo com as equações abaixo definindo o gráfico em três regiões: de aceitação, de rejeição e de indecisão ou continuidade (ISSAO & MORI, 1996; FERREIRA et al., 2000).

$$A = 2,08 + 0,50n$$

$$R = -1,62 + 0,50n$$

No gráfico do teste seqüencial, o número de testes corresponde ao eixo x e o número de respostas corretas ao eixo y. Para cada resposta correta incrementa-se em 1 no eixo x e igualmente no eixo y. Se o resultado for incorreto, incrementa-se 1 somente no eixo x e zero no eixo y. O teste prossegue até o ponto correspondente em que o julgador se aproxima ou ultrapassa a linha delimitadora da região de continuidade, entrando na região de aceitação.

3.2.8.6. Formulação da bebida pelos julgadores selecionados

A formulação da bebida láctea foi realizada em três etapas que estão representadas nas TABELAS 12, 13 e 14. As modificações foram introduzidas de acordo com o estudo em questão.

TABELA 12 – FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA PRIMEIRA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.

Formulação	Tipo de suco	Conc. do suco (%)	Conc. de açúcar (%)	Conc. da bebida fermentada (%)
A	Tomate	66	-	34
B	Goiaba	65	1	34
C	Pêssego	66	-	34

TABELA 13 – FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA SEGUNDA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.

Formulação	Tipo de suco	Conc. do suco (%)	Conc. de açúcar (%)	Conc. da bebida fermentada (%)
D	Goiaba	66	-	34
E	Goiaba	55	1	44
F	Goiaba	44	2	54
G	Pêssego	66	-	34
H	Pêssego	65	1	34

TABELA 14 – FORMULAÇÕES DA BEBIDA LÁCTEA APRESENTADAS NA TERCEIRA ETAPA DA ANÁLISE SENSORIAL PARA OS JULGADORES SELECIONADOS.

Formulação	Tipo de suco	Conc. do suco (%)	Conc. de açúcar (%)	Conc. da bebida fermentada (%)
I	Goiaba	46	10	44
J	Goiaba	36	10	54
L	Pêssego	65	1	34

Nestas etapas os julgadores avaliaram as bebidas utilizando o teste de ordenação, perfil de características e escala hedônica.

3.2.8.4.1. Perfil de características

No método perfil de características é possível medir, através de julgadores selecionados e treinados, pequenos graus de similaridade e da impressão geral do produto. Os resultados são interpretados graficamente, pois não podem ser analisados estatisticamente (WASZCZYNSKYJ, 1997).

O teste de perfil de características foi realizado em todas as etapas, onde os julgadores deram notas de 1 a 5 (em ordem crescente) quanto aos atributos: acidez, doçura, aroma, textura, cor e sabor. A ficha do teste de perfil de características aplicado aos julgadores está representado no ANEXO 3 e os resultados foram analisados pela representação destes em gráficos do tipo aranha.

3.2.8.4.2. Teste de escala

A escala hedônica estruturada de nove pontos expressa o grau de gostar ou desgostar de uma amostra pelo consumidor. Permite a expressão de opiniões, visando medir o nível de aceitação de um produto (WASZCZYNSKYJ, 1997; ABNT, 1998).

Para o teste de preferência foi utilizado a escala hedônica na avaliação das amostras onde os julgadores atribuíram notas segundo uma escala de 9 pontos conforme ANEXO 4. Os resultados obtidos neste teste foram analisados na representação do gráfico tipo aranha.

3.2.8.4.3. Teste de ordenação

Consiste em apresentar as amostras ao julgador, solicitando que as coloquem em ordem crescente ou decrescente em relação a intensidade de um determinado atributo que está sendo medido, ou em relação à preferência de uma maneira geral (MONTEIRO, 1984; ABNT, 1994).

Na terceira etapa da análise sensorial, foi solicitado aos julgadores, ordenar as amostras de acordo com a preferência, atribuindo notas de 1 a 3 (1 – mais gostou; 3 – menos gostou). O teste de ordenação aplicado aos julgadores está apresentado no ANEXO 5.

3.2.9. Avaliação da estabilidade da bebida láctea

A bebida láctea foi estocada sob refrigeração a 4°C, dividida em 5 frascos erlenmeyers estéreis de 500 mL para a avaliação da sua estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial, realizada a partir do primeiro dia, em intervalos de 7 dias, até o 28º dia de estocagem.

3.2.9.1. Estabilidade físico-química

A estabilidade físico-química foi avaliada em amostras tomadas ao acaso e homogeneizadas previamente às determinações de pH e acidez titulável, descritas nos itens 3.2.1.1. e 3.2.1.2.

3.2.9.2. Estabilidade microbiológica

Paralelamente a avaliação físico-química e sensorial da bebida láctea, foi realizada a avaliação microbiológica. O número de células de *Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus* foi determinado em contagem total de células em ágar MRS.

O número de células de *Lactobacillus plantarum* A6 foi determinado em contagem de células em ágar MRS modificado.

As demais determinações microbiológicas foram efetuadas de acordo com as técnicas oficiais do Manual do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL-Campinas), cujos resultados foram interpretados segundo a portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (BRASIL, 1997), que estabelece padrões microbiológicos para leites fermentados, os quais consistem na pesquisa de salmonelas em 25 mL da amostra, no número

mais provável (NMP) de coliformes fecais e contagem de bolores e leveduras por mL da bebida.

Embora não estabelecido pela legislação, foi determinado também o número mais provável de coliformes totais na amostra, visto que a presença destes microrganismos em alimentos processados é considerada uma indicação útil da contaminação pós processo (principalmente nos casos de pasteurização), evidenciando práticas de higiene aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos (SILVA & JUNQUEIRA; 1995).

a) Número mais provável de bactérias do grupo coliforme

Esta determinação também denominada de teste presuntivo, foi realizada pela semeadura de três séries de três tubos, contendo 10 mL de caldo lauril sulfato triptose e tubo de Durhan, com 1 mL das diluições 0,1, 0,01 e 0,001 da amostra. Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas para verificar a formação de gás e turvação do meio, indicativos da presença destes microrganismos. Os tubos positivos, foram repicados com alça de platina em tubos contendo caldo verde brilhante bile para confirmação destes microrganismos. O número mais provável de coliformes totais/ mL de amostra foi verificado pelo número de tubos positivos (produção de gás e turvação do meio), utilizando a tabela da Association of Official Analytical Chemists (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

b) Número mais provável de coliformes fecais

O número mais provável de coliformes fecais foi determinado pela semeadura dos tubos positivos do teste presuntivo, mencionado acima, em placas com ágar eosina azul de metíleno (EMB), as quais foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após as 24 horas foi verificada a presença de colônias

características (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico). Os meios empregados foram testados utilizando-se cepas padrão de *Escherichia coli*.

c) Contagem de bolores e leveduras

Esta contagem foi realizada pela semeadura de diferentes diluições (0,1, 0,01 e 0,001) da amostra em ágar batata dextrosado (PDA) acidificado com ácido tartárico 10% até pH 3,5 com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano no meio. As placas foram incubadas a 25°C por 3 – 5 dias e o resultado expresso em UFC/mL. Os meios empregados foram testados utilizando-se cepas padrão de *Aspergillus* sp.

d) Pesquisa de salmonela

A pesquisa de salmonela foi realizada em 25 mL de amostra homogeneizada em 225 mL de caldo de pré-enriquecimento (caldo lactosado), incubada por 24 horas a 37°C.

Após a incubação, 1 mL da solução foi transferido para tubos contendo 9 mL de meio de enriquecimento seletivo (caldo selenito cistina e caldo tetracionato) e incubados a 35°C por 24 horas, cujo conteúdo foi posteriormente semeado em placas contendo ágar SS (*Salmonella-Shigella*) e ágar XLD (xilose lisina desoxicolato), incubadas a 35°C por 48 horas. Os meios empregados foram testados utilizando-se cepas padrão de *Salmonella* sp.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

A composição físico-química das matérias-primas utilizadas no substrato estão apresentadas na TABELA 15.

TABELA 15 – COMPOSIÇÃO FÍSICO QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS NO SUBSTRATO PARA FERMENTAÇÃO.

Componentes	Soro de leite em pó (%)	Farinha de mandioca (%)
Proteínas	12,45	0,75
Lipídeos	0,6	0,76
Carboidratos (por diferença)	76,68	90,85
Amido	-	80,10
Umidade	1,73	4,02
Cinzas	8,54	0,70
Fibras	-	2,92
(-): não detectável		

A obtenção de um produto fermentado de boa qualidade depende da composição química das matérias-primas utilizadas como substrato, visto que estas devem fornecer os nutrientes necessários ao crescimento das culturas específicas empregadas e após fermentadas, constituir alimento de alto valor nutricional (MACEDO, 1997).

Na elaboração desta bebida fermentada, com cultura amilolítica, a farinha de mandioca foi utilizada como fonte de energia (amido) e o soro de leite como fonte de proteínas para o crescimento das culturas específicas.

Os valores obtidos na composição físico-química do soro de leite apresentam variação dos valores obtidos por SPREER (1991) devido ao soro utilizado na bebida ser em pó. Optou-se pela utilização do soro em pó devido a facilidade de obtenção, manuseio, ausência de fragmentos de caseína (provenientes da fabricação dos queijos) e a maior vida de prateleira (shelf-life) do produto durante a realização dos trabalhos experimentais. A diluição recomendada pelo fabricante do soro, realizada para obter o produto na fase líquida, é da ordem de 1:10 em água destilada, logo os resultados obtidos por SPREER (1991) para carboidratos, cinzas, proteínas e lipídeos estariam teoricamente 10 vezes menores que aqueles obtidos para o soro em pó.

Os resultados obtidos para proteínas (12,5%) e cinzas (8,54%) são ligeiramente superiores aos valores apresentados por SPREER (1991), consequentemente o percentual de carboidratos obtido por diferença também tem valor superior.

A composição do soro de leite varia consideravelmente em função da origem do leite e do processo de fabricação do queijo. Quanto a origem do leite sabe-se que o leite de vaca possui algumas variações de acordo com a espécie, raça, período de iactação, alimentação e características individuais da fêmea lactante (ALAIS, 1984; U.S. DAIRY EXPORT COUNCIL, 1997).

O soro de leite doce foi escolhido por possuir pH próximo da neutralidade, ideal para o início da fermentação das cepas escolhidas.

O valor da umidade (1,73%) não pode ser comparado aos valores do soro de leite líquido citado por SPREER (1991). Os baixos valores de lipídeos obtidos (0,6%), não são citados por SPREER (1991) devido aos teores desprezíveis encontrados no soro de leite líquido.

A farinha de mandioca caracterizou-se por possuir elevado teor de carboidratos e baixo teor protéico. Os resultados obtidos de proteína (0,75%) e cinzas (0,70%) apresentam-se ligeiramente inferiores àqueles apresentados por HONHOLZ (1980), (1,1 % de proteínas e 1,1% de cinzas). Porém os valores obtidos para as análises de lipídeos (0,76%) e fibras (2,92%) são ligeiramente superiores aos do mesmo autor (0,5% de lipídeos e 2,2% de fibras).

Os teores de amido encontrados na farinha de mandioca, (80,10%) são menores que aqueles apresentados na literatura (88,2%) por HONHOLZ (1980) esta diferença pode ser justificada pela diferença de origem e processamento da farinha de mandioca.

A farinha de mandioca utilizada foi obtida do comércio e é proveniente de Morretes-PR e provavelmente deve ter composição diferente da farinha de mandioca proveniente do sul da Ásia citada por HONHOLZ devido à variações climáticas e de processamento das mesmas.

4.2. DEFINIÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE

O tratamento térmico, tem por função aumentar a conservação do leite, diminuir as contagens bacterianas e inativar enzimas. Quanto ao soro de leite, é importante submetê-lo à um pré-tratamento como a pasteurização e posteriormente armazená-lo à frio se o uso não for imediato (WALSTRA, 1987; SOTTIEZ, 1993).

Porém a maioria das proteínas do soro são globulares e estão sujeitas à desnaturação quando submetidas à elevadas temperaturas por períodos prolongados (WALSTRA, 1987).

Os resultados obtidos para diferentes condições de tempo e temperatura empregados no tratamento térmico do soro de leite estão apresentados na TABELA 16.

TABELA 16 – EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA DE PASTEURIZAÇÃO NO ASPECTO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO SORO DE LEITE.

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Avaliação visual	Contagem padrão em placa (UFC/mL)
5	95	Presença de floculação	Ausência de crescimento microbiano
10	90	Ausência de floculação	Ausência de crescimento microbiano
15	85	Ausência de floculação	Ausência de crescimento microbiano
20	80	Ausência de floculação	Ausência de crescimento microbiano
30	75	Ausência de floculação	$1,0 \cdot 10^2$

As proteínas do soro de leite possuem uma sensibilidade muito grande ao calor, por isso optou-se por escolher a temperatura de 80°C durante o tempo de 20 minutos, por se caracterizar pela temperatura mais baixa e que apresentou ausência de crescimento microbiano.

Desta forma reduziu-se a possibilidade de desnaturação das proteínas presentes no soro de leite.

4.3. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Segundo HAALAND (1989) citado por MACHADO (2000), a maior parte dos processos biotecnológicos não possui modelos teóricos que possam ser usados para explicar o desenvolvimento do processo. Consequentemente, uma pesquisa bem sucedida nesta área é caracterizada por resolução do problema empiricamente. Porém existem, em geral, limitações de tempo e recursos, tornando a produtividade do processo de importância crítica. Dessa forma, o planejamento e a resolução dos problemas utilizando ferramentas estatísticas dá melhor possibilidade de maximizar a eficiência e produtividade de problemas empíricos.

Um experimento deve ser submetido pelas seguintes etapas: *screening*, otimização e verificação dos dados (TABELA 17). Assim, experimentos de **screening**, são aqueles em que são excluídas diversas variáveis. Eles fazem parte da primeira etapa da investigação, e por incluírem diversos fatores, não possuem muita informação por fator. Seu objetivo é a redução do problema, ou seja, descobrir quais são as variáveis realmente importantes e qual a direção a tomar nos próximos experimentos. A proposta de **otimização** é a construção de um modelo matemático que possa predizer o comportamento do processo investigado, encontrando a região de ótima resposta. Para tanto requer muita informação sobre cada fator, necessitando, assim, que se inclua somente os fatores com influência significativa em relação aos outros. Para planejamento e verificação dos resultados dessas etapas utilizou-se o programa *Statística* da *Statgraphics*. E, finalmente, a verificação é feita para comprovar-se o modelo determinado, e explicar o processo nas condições experimentadas. (MACHADO, 2000; HAALAND, 1989).

TABELA 17 – ETAPAS DE UM EXPERIMENTO UTILIZANDO-SE DE FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS.

Etapa	Objetivo	Descrição
Screening	Identificar fatores mais importantes	Muitos fatores – resultados imprecisos
Otimização	Construir modelo	Poucos fatores – região ótima
Verificação	Confirmar os resultados	Repetir as melhores condições

FONTE: HAALAND, 1989.

Neste trabalho, as etapas de *screening* e otimização sugeridas foram utilizadas da seguinte maneira: o primeiro experimento se constituiu em verificar qual a concentração máxima de farinha de mandioca que poderia ser utilizada e ter uma idéia da influência do tempo e da quantidade máxima de inóculo nas variáveis-resposta (pH, acidez titulável em ácido láctico e contagem de células). No segundo experimento utilizando-se das mesmas variáveis-resposta, optou-se por testar a farinha de mandioca, mas desta vez em quantidades menores, para saber se a quantidade máxima de farinha determinada no primeiro experimento não era um fator limitante da fermentação, assim como a temperatura da estufa de incubação. No segundo experimento o tempo também foi novamente incluído como variável, mas desta vez em intervalos menores escolhidos de acordo com os resultados obtidos no primeiro experimento.

Para planejamento e verificação dos resultados após serem encontradas as condições ótimas, fez-se uma cinética do crescimento para verificação dessas condições.

4.3.1. Primeira otimização

Na primeira otimização, foram testadas as variáveis: concentração de farinha de mandioca, taxa de inóculo e tempo, com os níveis descritos no item 3.2.6.1. e analisadas as variáveis-resposta (pH, acidez titulável em ácido láctico e concentração de células).

Nas variáveis-resposta optou-se por analisar a variação de pH e da acidez titulável em ácido láctico para que os resultados ficassem mais claros uma vez que não houve fermentação com a concentração máxima de farinha de mandioca (40%) e se o resultado (de pH) analisado fosse 0,0, poderia-se supor uma fermentação máxima.

Uma boa maneira de visualização das influências das variáveis analisadas no processo fermentativo é o diagrama de Pareto. Este diagrama coloca, graficamente, a magnitude dos efeitos (mostrados do maior para o menor) dos dados na variável-resposta. Dessa forma, demonstra quais são a variáveis realmente importantes e qual direção tomar nas próximas otimizações a serem feitas (HAALAND, 1989; MACHADO, 2000).

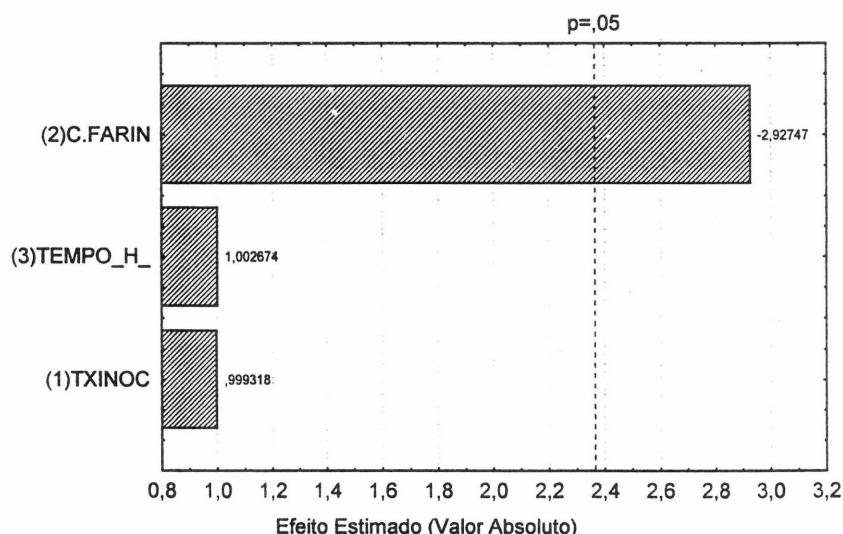


FIGURA 6 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DA ACIDEZ.

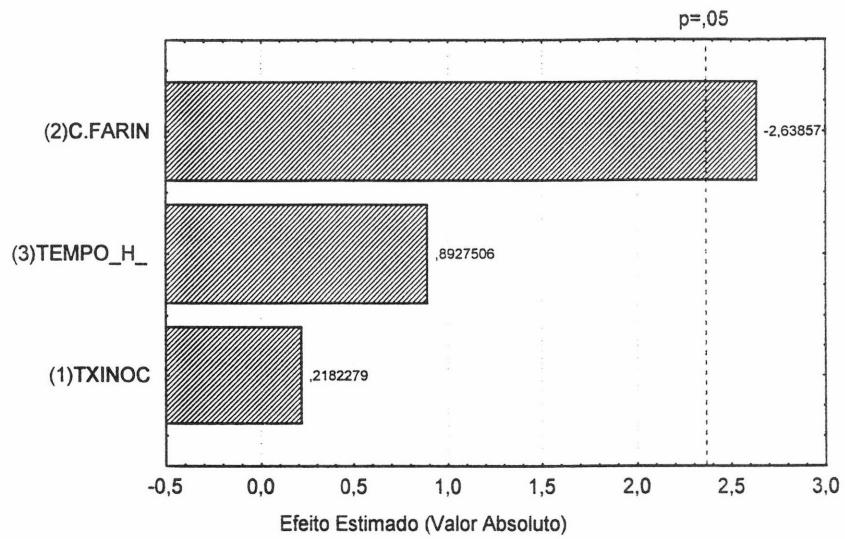


FIGURA 7 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DO pH.

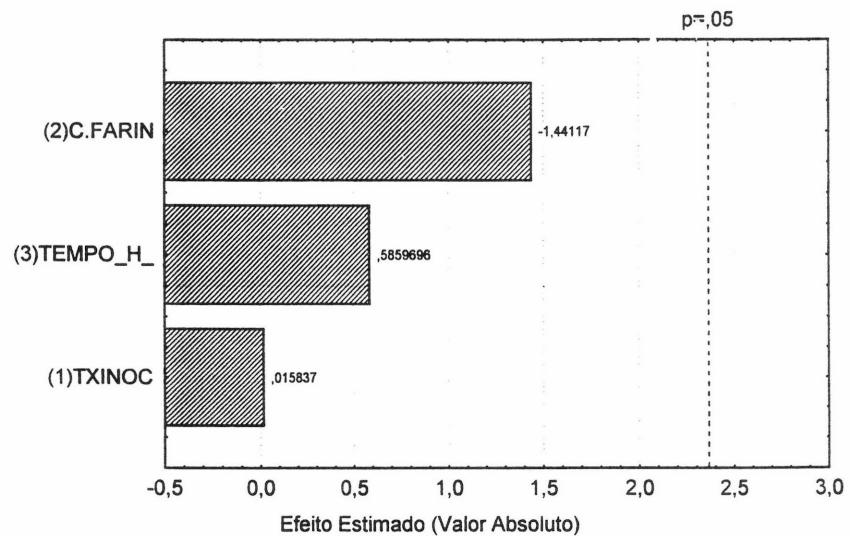


FIGURA 8 - DIAGRAMA DE PARETO DO PRIMEIRO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: CONCENTRAÇÃO DE CÉULAS.

Analizando-se os três diagramas de Pareto (FIGURA 6, 7 e 8) observa-se que a concentração de farinha de mandioca é uma variável significativa pois o seu

aumento resulta numa diminuição das variáveis-resposta (variação de pH, da acidez titulável e concentração final de células) até chegar num ponto (40%) em que não houve fermentação pois a farinha não se misturava mais com o soro de leite nos frascos erlenmeyers.

Nos diagramas acima observa-se também que tempos maiores de fermentação influenciam positivamente as variáveis-resposta, caracterizando esta como uma segunda variável significativa.

O aumento taxa de inóculo também influencia significativamente nas variações de pH e acidez, porém optou-se por fixar esta taxa em 8%, devido ao fato de que nestas otimizações utilizou-se apenas a cepa *Lactobacillus plantarum* A6, que é a cepa amilolítica por isso considerada aqui como *starter* da fermentação e as outras cepas (*Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*) foram adicionadas após 8 horas de fermentação onde já havia uma determinada concentração de glicose no meio, para ser utilizada por estas cepas probióticas. A taxa de inóculo das cepas probióticas também foi fixada em 8%, resultando em 16%, o total de inóculo da fermentação.

4.3.2. Segunda otimização

Na segunda otimização, foram testadas novamente as variáveis: concentração de farinha de mandioca e tempo de fermentação que apresentaram-se como variáveis significativas na primeira otimização e incluiu-se a temperatura de fermentação que não havia sido testado no primeiro experimento. Os níveis utilizados estão descritos no item 3.2.6.2. As variáveis-resposta analisadas foram as mesmas (variação do pH, da acidez titulável em ácido láctico e concentração final de células).

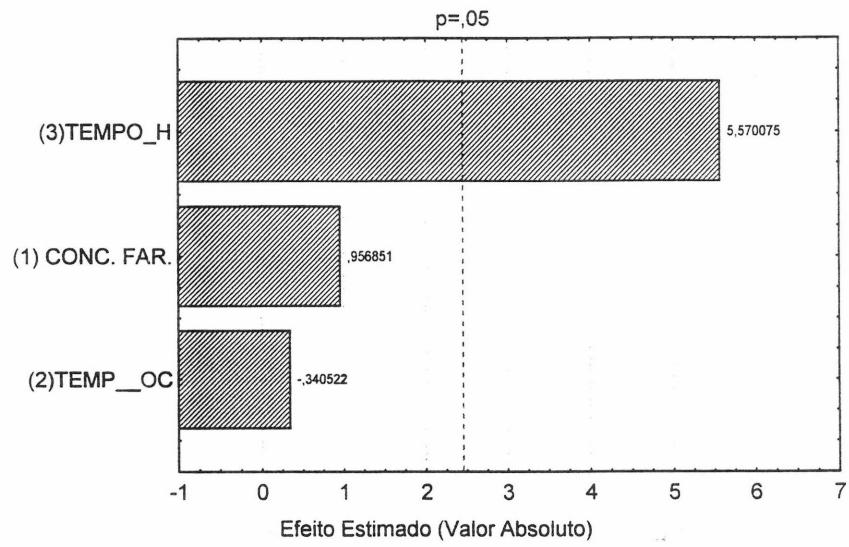


FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO , $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DA ACIDEZ.

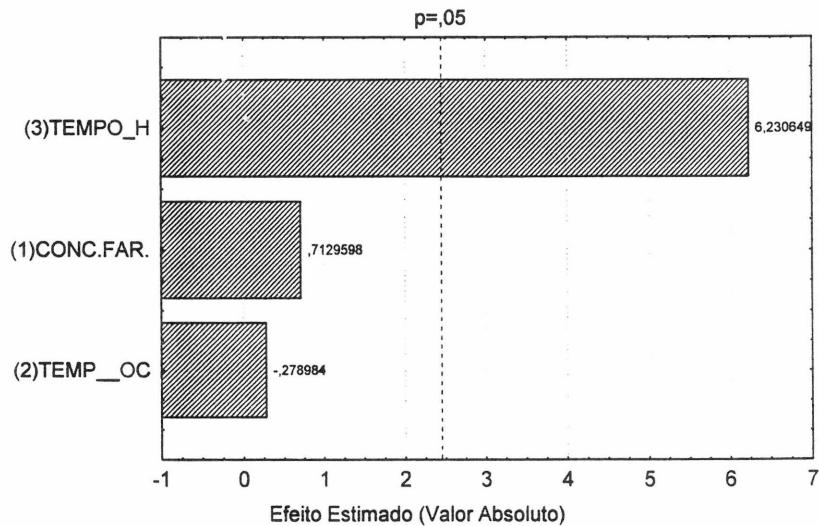


FIGURA 10 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO , $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA: VARIAÇÃO DO pH.

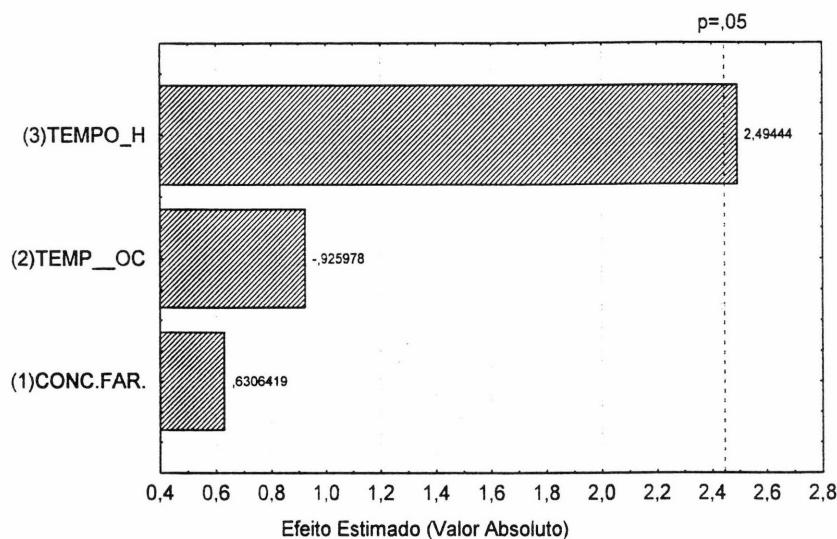


FIGURA 11 - DIAGRAMA DE PARETO DO SEGUNDO EXPERIMENTO DE OTIMIZAÇÃO, $2^{(3-0)}$. VARIÁVEL-RESPOSTA:CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.

Analisando-se os três diagramas de Pareto, da segunda otimização, (FIGURAS 9, 10 e 11) observa-se que apesar de verificar-se que o aumento das três variáveis (concentração de farinha, tempo e temperatura de incubação) resultou num determinado aumento das variáveis-resposta, além do tempo, as outras variáveis analisadas não apresentaram-se como variáveis significativas.

Apesar do tempo de fermentação aparecer como variável-significativa, o aumento deste, tem por conseqüência um aumento excessivo nas variáveis-resposta (variação do pH e acidez). Sabe-se que valores muito baixos de pH e muito altos de acidez não são interessantes pois inibem as células e resultam em bebidas lácteas muito ácidas que consequentemente são pouco aceitas pelos consumidores. Deve-se prever, ainda, uma queda de pH durante a vida de prateleira da bebida, pois sabe-se que as células fermentam o substrato mesmo em temperaturas baixas, ainda que discretamente.

Optou-se então por fixar os pontos centrais como os pontos ideais da fermentação. Com este experimento encerraram-se as otimizações dos

parâmetros fermentativos, com as seguintes condições ideais: temperatura de incubação de 35°C, tempo de fermentação de 16 horas, concentração de farinha de mandioca de 20% e taxa de inóculo de 16% (8% para *Lactobacillus plantarum* A6 no início da fermentação, 4% para *Lactobacillus casei* e 4% para *Lactobacillus acidophilus* após 8 horas de fermentação).

4.4. ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO

Após definidas as condições ideais da fermentação, foi realizado um estudo cinético para acompanhar a evolução do pH, acidificação, consumo de açúcares redutores e crescimento celular no fermentado.

4.4.1. Estudo cinético da fermentação com a cepa amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6)

Foi realizado um estudo cinético da fermentação somente com a cepa amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6) para poder avaliar o tempo ideal da inoculação das bactérias probióticas (*Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus*). Este estudo se fez necessário, pois quando testou-se a inoculação de todas as cepas (probióticas + amilolíticas) no início da fermentação, houve um crescimento pouco significativo das células totais no final das 16 horas, assim como uma evolução do pH e acidez muito lenta (24 horas para atingir o pH 5,0).

A fermentação ocorreu num período de 16 horas e foram retiradas amostras de duas em duas horas como descrito no item 3.2.7.3.

Quando as cepas probióticas foram inoculadas sem a presença da cepa amilolítica, não ocorreu crescimento celular, queda de pH nem incremento da acidez (titulável em ácido láctico) em 24 horas de cultura. Esses dados sugerem que havia necessidade da inoculação das bactérias amilolíticas no início da

fermentação, para que ocorresse a hidrólise do amido presente no meio. O tempo ideal de inoculação das bactérias probióticas foi caracterizado como o tempo médio da fermentação (8 horas), onde a cepa de *L. plantarum* A6 já estava adaptada ao meio.

No gráfico da FIGURA 12 observa-se a evolução do pH e da acidez durante as 16 horas de fermentação. Observa-se que após 6 horas há mudanças mais consideradas nos valores de pH e acidez titulável. Provavelmente neste ponto a cepa entrou na fase logarítmica de multiplicação, após adaptar-se ao substrato.

Observa-se também, que houve uma queda brusca do pH que coincide com um aumento expressivo da acidez e contagem total das células após 6 e 8 horas de fermentação (FIGURAS 12 e 14).

No gráfico da FIGURA 13 observa-se que não houve variação significativa na concentração de açúcares redutores, provavelmente devido à uma possível dificuldade de quantificação da glicose. O método de Somogyi-Nelson provavelmente não quantificou açúcares redutores em concentração real de glicose durante a fermentação e sim de vários monômeros que possivelmente teriam aparecido devido à uma possível hidrólise do amido e da lactose presente pelos próprios reagentes utilizados na análise.

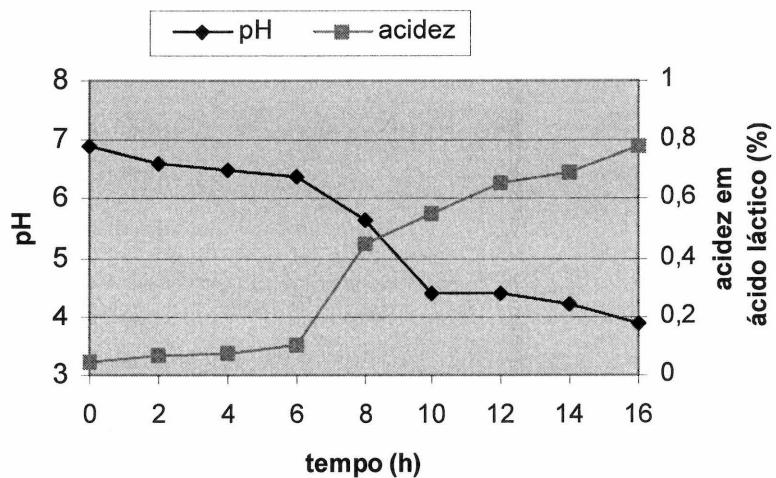


FIGURA 12 – EVOLUÇÃO DO pH E ACIDEZ NO SUBSTRATO FERMENTADO PELA CEPA *L. plantarum* A6.

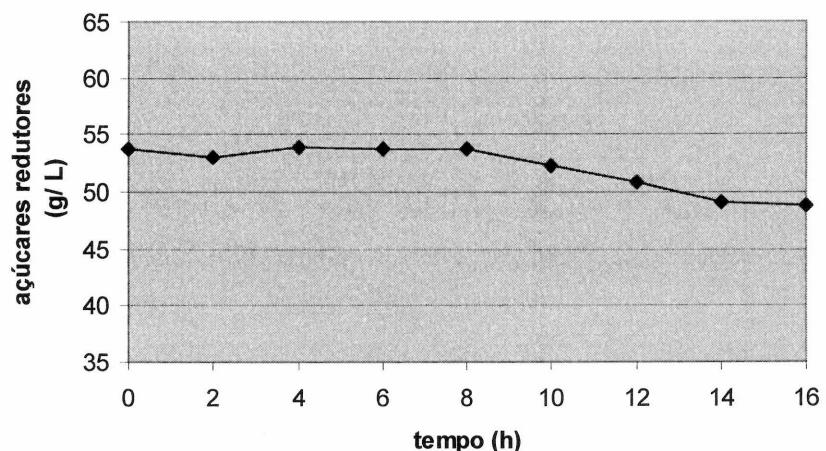


FIGURA 13 – EVOLUÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPA *L. plantarum* A6.

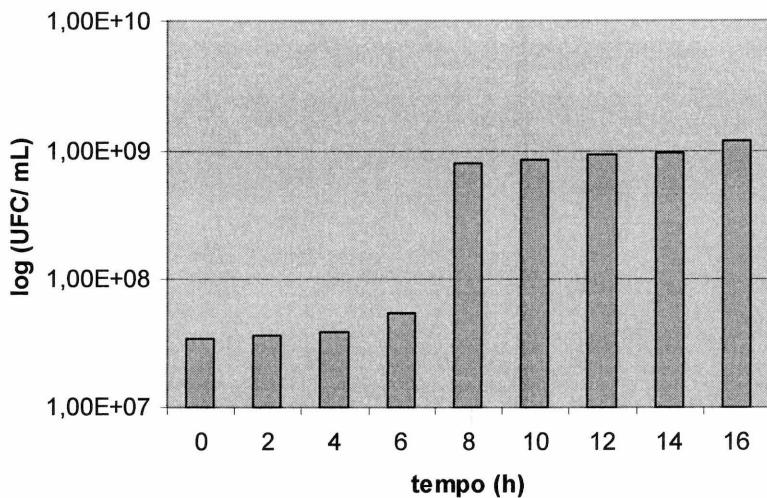


FIGURA 14 – EVOLUÇÃO NA CONTAGEM CELULAR DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELA CEPA *L. plantarum* A6.

Observa-se também na FIGURA 14 que as células de *Lactobacillus plantarum* A6 apresentaram uma fase LAG importante de 6 horas, após este tempo observa-se um crescimento expressivo das células (que passam de $5,4 \times 10^7$ UFC/mL no tempo 6h, para $8,0 \times 10^8$ UFC/mL no tempo de 8h). Esta fase provavelmente está relacionada à síntese de enzimas amilolíticas pelo *Lactobacillus plantarum* A6.

4.4.2. Estudo cinético completo da fermentação utilizando a cepa amilolítica (*Lactobacillus plantarum* A6) + cepas probióticas (*Lactobacillus casei* Shirota e *Lactobacillus acidophilus*)

A fermentação ocorreu num período de 16 horas e foram retiradas amostras de duas em duas horas como descrito no item 3.2.7.3.

Verificou-se uma pequena variação do pH e acidez titulável nas primeiras 6 horas de cultura coincidindo com um crescimento pouco expressivo das células amilolíticas, caracterizado pelo tempo de adaptação das células ao substrato (FIGURAS 15, 16 e 18).

Após 6 horas de fermentação observa-se também uma queda brusca do pH e um aumento significativo da acidez titulável e contagem de células. Esta mudança significativa que ocorreu na fermentação provavelmente se deu pelo incremento celular (FIGURAS 15, 16 e 18). Observa-se igualmente a partir deste tempo uma queda linear do pH até o final das 16 horas de cultura, o mesmo acontece com a evolução da acidez (pH final de 3,9 e acidez de 0,776%).

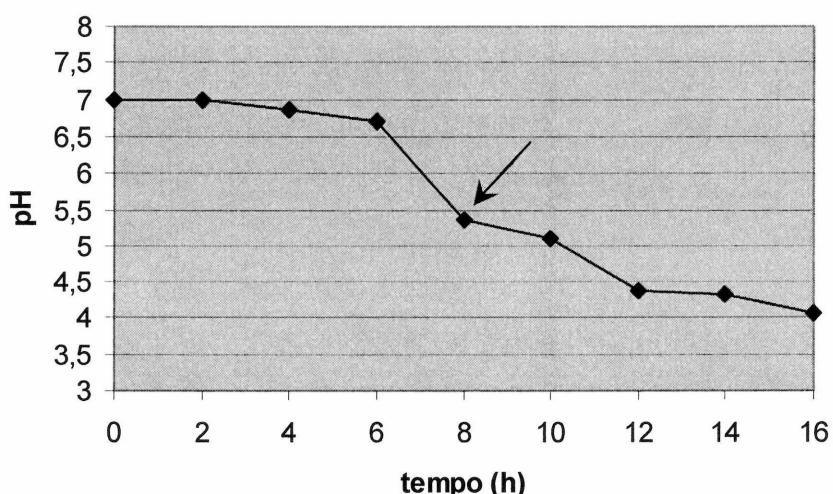


FIGURA 15 – EVOLUÇÃO DO pH NO SUBSTRATO FERMENTADO PELAS CEPAS *L. plantarum* A6 + *L. casei* Shirota + *L. acidophilus* (o tempo de incremento das células probióticas está indicado)

Na FIGURA 16, observa-se a evolução comparativa do ácido láctico titulável e analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) no decorrer das 16 horas de fermentação. Pode-se constatar que os valores de acidez

determinados por esta técnica são ligeiramente superiores ao obtidos no método titulométrico tradicional.

A análise realizada em CLAE indicou que não havia pico de glicose nos cromatógrafos de todos os tempos de fermentação analisados. Este fato confirma os dados citados por GIRAUD et al. (1991) de que a bactéria produz α -amilase e esta enzima é capaz de degradar o amido formando glicose que por sua vez é rapidamente consumida pela própria bactéria amilolítica resultando em ácido láctico como produto final. O ácido láctico apareceu em picos crescentes nos cromatógrafos até o último tempo de fermentação (FIGURA 16).

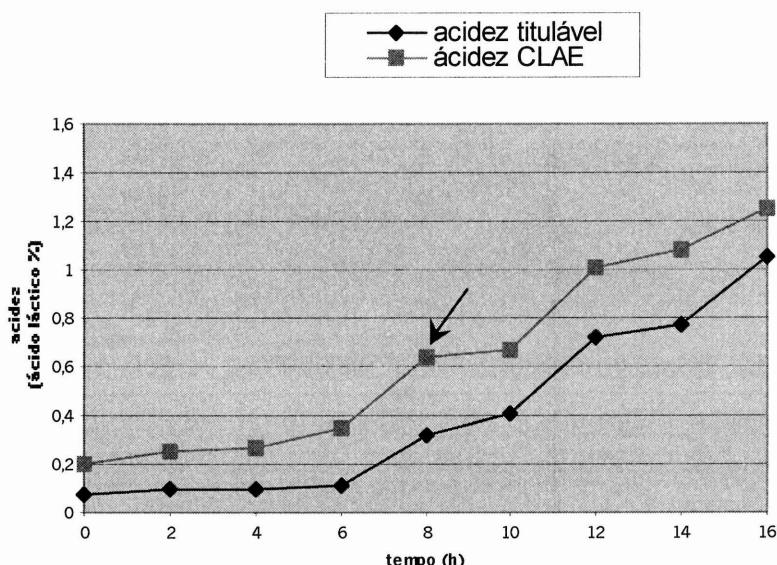


FIGURA 16 – EVOLUÇÃO DO ÁCIDO LÁCTICO DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELAS CEPAS DE *L. plantarum* A6, *L. casei* Shirota e *L. acidophilus*, COMPARANDO-SE OS MÉTODOS DE TITULAÇÃO E DOSAGEM EM CLAE. (o tempo de incremento das células probióticas está indicado)

Os açúcares redutores obtidos pelo método de Somogyi-Nelson novamente repetem os resultados da primeira fermentação (apenas com a bactéria *Lactobacillus plantarum* A6), onde provavelmente aconteceu uma hidrólise do amido e da lactose presente devido à técnica utilizada, resultando em uma

quantidade de açúcares redutores analisados maior que a real (50 g/L) (FIGURA 17). Observa-se porém que após 8 horas de fermentação há um declínio mais acentuado deste total de açúcares redutores, resultado provável do incremento celular.

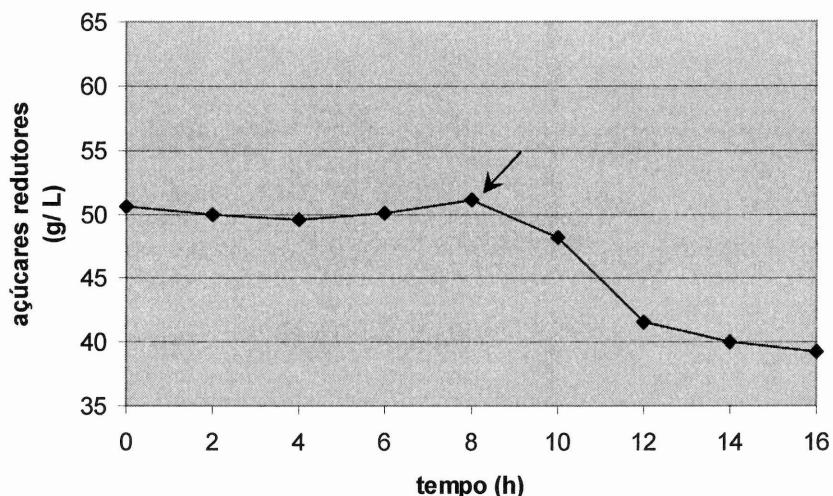


FIGURA 17 – EVOLUÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELAS CEPAS *L. plantarum* A6 + *L. casei* Shirota + *L. acidophilus* (o incremento das células probióticas está indicado)

Observa-se também que a partir de 8 horas de cultura ocorreu um aumento significativo na contagem de células amilolíticas e probióticas (chegando ao final com $2,8 \times 10^9$ UFC/mL para as células amilolíticas e $2,28 \times 10^9$ UFC/mL para as células probióticas). Foi realizada a contagem das células amilolíticas em ágar MRS modificado com adição de amido, até 6 horas de fermentação. A contagem das células probióticas foi realizada meio MRS (FIGURA 18).

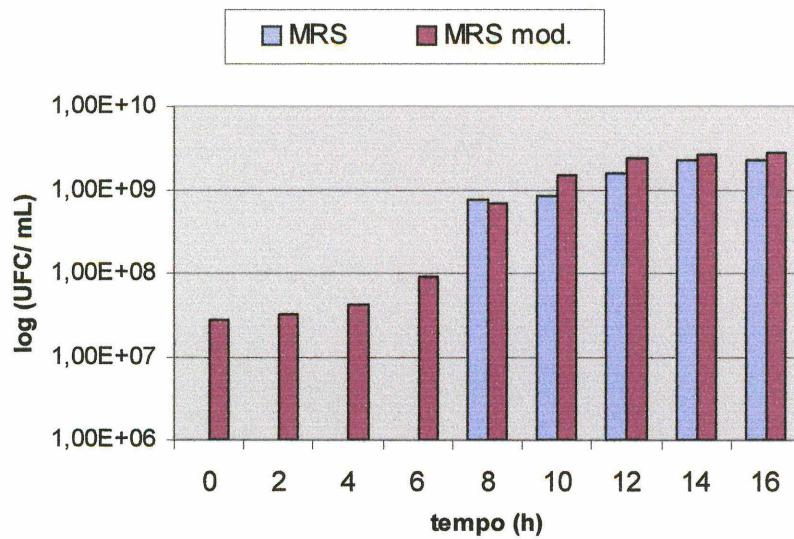


FIGURA 18 – EVOLUÇÃO DA CONTAGEM CELULAR NA FERMENTAÇÃO DO SUBSTRATO PELAS CEPAS DE *L. plantarum* A6, *L. casei* Shirota e *L. acidophilus*.

A contagem de células amilolíticas foi ligeiramente maior que a das células probióticas. Para verificar se as cepas que cresceram em ágar MRS não eram as cepas amilolíticas foi isolado determinadas colônias e observado por coloração de Gram a morfologia das células (FIGURA 18). Ao mesmo tempo inoculou-se as mesmas células em caldo MRS modificado com amido, conforme descrito no item 3.1.1.

Observou-se que a morfologia da maioria das colônias que cresceram em ágar MRS eram das cepas probióticas e que as mesmas não foram capazes de crescer em caldo MRS modificado. Este fato comprovou a existência de células probióticas viáveis no fermentado.

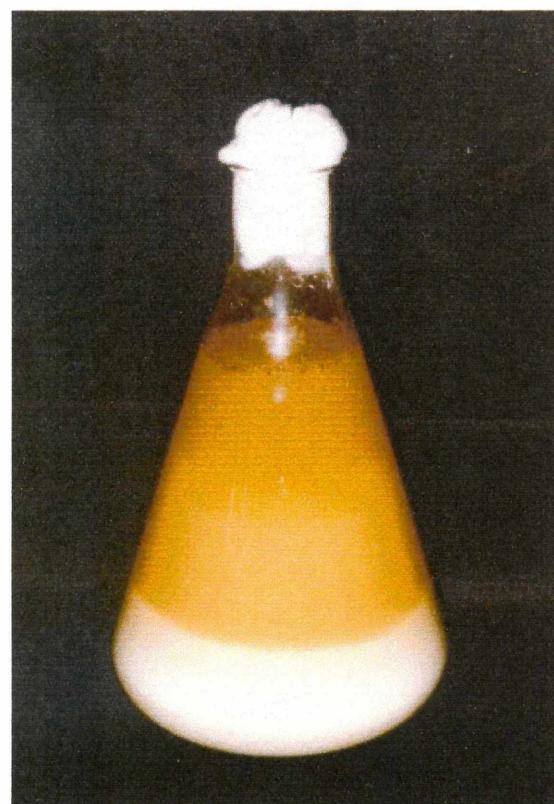


FIGURA 19 – FERMENTADO CONTENDO AS DUAS FASES (líquida – bebida láctea e sólida – farinha de mandioca biotransformada)

Foram testados os valores de pH, acidez titulável em ácido láctico e contagem de células em ágar MRS de 5 bebidas lácteas fermentadas similares (com bactérias probióticas) comercializadas na cidade de Curitiba e obteve-se os valores apresentados na TABELA 18.

TABELA 18 – VALORES DE pH E CONTAGEM DE CÉLULAS DE 5 BEBIDAS LÁCTEAS FERMENTADAS SIMILARES ENCONTRADAS NO MERCADO.

	pH	Acidez titulável em ácido láctico (%)	Contagem de células UFC/mL
Bebida 1	4,3	0,9	$2,37 \cdot 10^8$
Bebida 2	3,75	0,87	$7,8 \cdot 10^8$
Bebida 3	3,67	0,95	$1,95 \cdot 10^8$
Bebida 4	3,8	1,0	$4,8 \cdot 10^8$
Bebida 5	3,9	1,0	$8,9 \cdot 10^8$

Bebida 1: LC1 (Nestlé); Bebida 2: Vigor club (Vigor); Bebida 3: Batavito (Batavo);

Bebida 4: Yakult (Yakult); Bebida 5: Leite fermentado (Parmalat)

Analizando os dados obtidos na TABELA 18, observa-se que a fermentação deveria ser interrompida após 16 horas pois apresentou pH 4,07, acidez titulável em ácido láctico de 1,050% e contagem máxima de células da ordem de 10^9 UFC/mL para células probióticas e amilolíticas. Valores de pH abaixo de 4,0 não são interessantes pois deve-se prever que ainda ocorra fermentação na vida de prateleira da bebida, causando queda no pH, aumento da acidez e morte das células.

4.5. FORMULAÇÃO DA BEBIDA

Após a fermentação, foi separada a fração sobrenadante, através de filtração simples em malha de nylon esterilizada, da fração residual sólida (farinha de mandioca biotransformada). A fração sobrenadante foi formulada de acordo com os itens a seguir.

4.5.1. Seleção e treinamento de julgadores

Inscreveram-se e apresentaram-se na primeira etapa de seleção, 50 indivíduos voluntários para comporem uma equipe de julgadores, dos quais 44 foram selecionados. Os demais foram reprovados após responderem as fichas de recrutamento por incompatibilidade de tempo, ou por demonstrarem aversão a bebidas lácteas.

Os 44 candidatos, selecionados, receberam instruções e submeteram-se a testes triangulares onde deveriam identificar a amostra que possuía formulação diferente das demais, conforme descrito no item 3.2.8.3.

Os resultados obtidos foram avaliados através da análise seqüencial, onde 12 dos 44 julgadores selecionados na primeira fase, foram aceitos por sua habilidade discriminativa como mostra a TABELA 19.

TABELA 19 – SOMATÓRIO DE ACERTOS DE CADA JULGADOR, OBTIDOS NOS TESTES TRIANGULARES REALIZADOS DURANTE A SELEÇÃO E TREINAMENTO DOS CANDIDATOS

Prova-dor	Número de testes realizados													Resultados da seleção
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
1	1	2	2	3										I
2	1	2	3	4	5	6								A
3	1	2	3	4	5	6								A
4	0	1	1											I
5	1	2	3	3	4	5	6	6	7					A
6	0	0	1	2	2	3	4							I
7	0	1	1	2	3	3	3	4	5	5				I
8	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9				A
9	1	2	3	3	3	3	3	4	4	5	5	5	6	I
10	1	2	3	3	4	5	6	7	8					A
11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			A
12	0	1	1	2	2	2	3	4						I
13	0	0	1	2	3	3	4	5	6	7	8	9		A
14	1	1	2	3	4	5	6	7	8					A
15	1	2	3											I
16	0	1	2	3	4	5	5	5	6	7	7			I
17	1	2	3	3	3	3	4	5	6					I
18	0	1	1	1	1									I
19	1	2												I
20	0	1	2											I
21	0	1												I
22	0	0	0											I
23	1	0												I
24	0	1	2	2	3									I
25	1	1	2	2	2	3								I
26	0	1	2	2	2	3	4	5	6	7	7			I
27	0	1												I
28	1	2	2											I
29	0	0	1	2	3	4	5							I
30	1	2												I
31	1	2	3	4	5	6	7	8	9					A
32	0	0	0	1	2	3								I
33	0	1	2	2	3	4	5	6						I
34	1	1	1	2	3									I
35	0	0	1	1	2	3	3	4						I
36	0	1	2	2										I
37	0	1	2	3	4	5	6							A
38	1	2	3											I
39	1	1	2	2										I
40	0	1	1	2	3	3	4	5						I
41	0	1	2	3	4	4	5	6	7					A
42	1	2	2	2	3	3	4	4	5					I
43	1	2												I
44	1	2	3	4	5	6								A

1-10: nº de decisões corretas 0: decisão incorreta
(R): provador rejeitado (I): região de indecisão (A): provador aceito

No gráfico da FIGURA 20, foram plotados os resultados obtidos nos testes triangulares conforme descrito no item 3.2.8.3. Observa-se que na região de aceitação foram selecionados 12 julgadores após a realização de 13 testes triangulares.

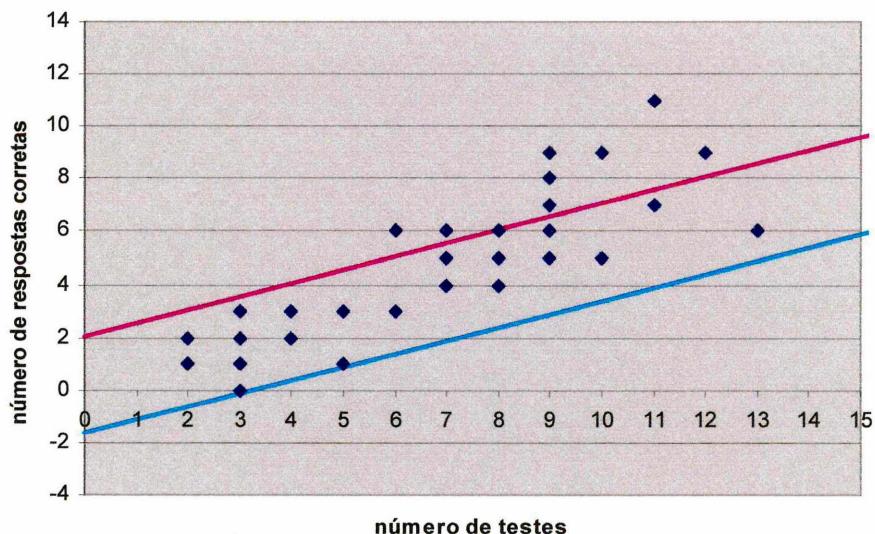


FIGURA 20 – RESULADO DO DESEMPENHO DOS CANDIDATOS DURANTE A SELEÇÃO – TESTE TRIANGULAR

Linha rosa : Linha de aceitação ($A = 2,08 + 0,50n$)
 Linha azul: Linha de rejeição ($R = -1,62 + 0,50n$)

Os 12 julgadores selecionados eram pessoas com idades variando de 19 a 45 anos, sendo três do sexo masculino e oito do sexo feminino.

Observa-se no gráfico da seleção de julgadores (FIGURA 20) que acima da linha rosa (Aceitação) estão os julgadores selecionados. No intervalo entre a linha rosa e a linha azul (rejeição) encontram-se os julgadores que necessitariam de maior treinamento para poderem ser então selecionados ou rejeitados. Como 12 julgadores mostraram-se homogêneos e sendo este um número suficiente para a realização dos testes seguintes, optou-se em dar continuidade passando para a etapa de formulação da bebida.

4.5.2. Formulação da bebida pelos julgadores selecionados

Ao sobrenadante fermentado foi adicionado sucos de tomate, goiaba e néctar de pêssego e submetidas à apreciação dos julgadores selecionados e treinados para indicar qual a formulação mais adequada através do perfil de características, analisando os atributos individualmente.

Os testes foram realizados em três etapas, conforme descrito nas TABELAS 12, 13 e 14 (MATERIAL E MÉTODOS).

Na primeira etapa, foram testados os sucos de tomate, goiaba e pêssego na proporção de 2/3 de suco e 1/3 de extrato fermentado.

Na FIGURA 21 que representa o perfil de características desta etapa, observa-se que o extrato fermentado acrescido de suco de tomate não foi bem aceita pelos julgadores. As bebidas que foram adicionadas de sucos de goiaba e pêssego foram melhor aceitas nos atributos avaliados. Numa avaliação global das formulações propostas na primeira etapa com o teste de escala hedônica onde o julgador pode exprimir numericamente o quanto gostou ou desgostou da bebida, a formulação A recebeu média 3,83, a bebida B, média 6,33 e a bebida C, média 6,22.

Na segunda etapa optou-se por eliminar o suco de tomate, devido à baixa aceitação da formulação A. A rejeição ao suco de tomate provavelmente está relacionada com a pequena associação que os julgadores fizeram do suco de tomate, que normalmente é uma bebida salgada, com bebidas lácteas, freqüentemente doces.

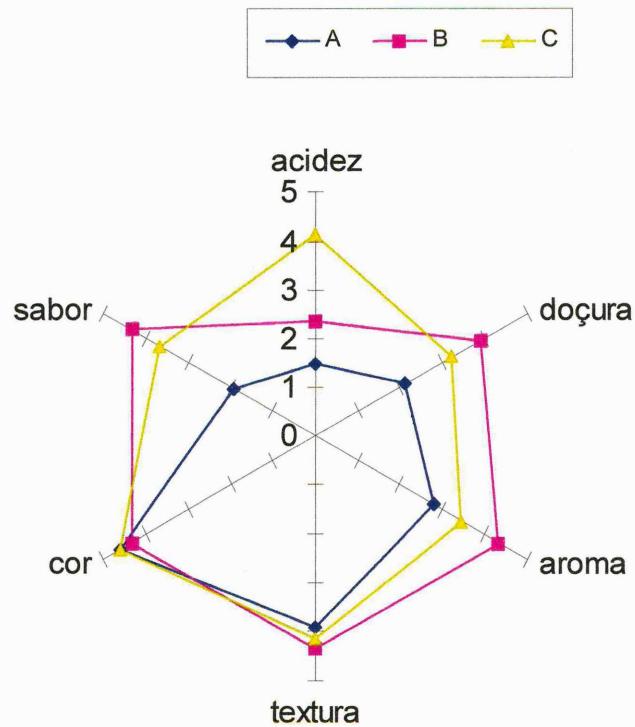


FIGURA 21 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES A, B e C

Formulação A: 66% de suco de tomate, 34% da bebida fermentada

Formulação B: 65% de suco de goiaba, 1% de açúcar e 34% de bebida fermentada

Formulação C: 66% de suco de pêssego, 34% de bebida fermentada

Em função deste resultado foi sugerido a utilização de outras proporções e testadas 5 novas formulações com os sucos de goiaba e pêssego, variando-se as concentrações de suco e bebida fermentada. Duas das formulações com o suco de goiaba foram acrescidas de 1 e 2% de açúcar (Formulações E e F), com o objetivo de aumentar a quantidade de bebida fermentada à formulação final. Em uma das bebidas formuladas com suco de pêssego também foi testado o incremento de 1% de açúcar (H). Em paralelo foram testadas as mesmas bebidas sem açúcar (D e G).

Na FIGURA 22 que representa o perfil de características da segunda etapa da análise sensorial, observa-se que todas as formulações apresentam perfil semelhantes, este fato é comprovado com o teste da escala hedônica, onde as formulações receberam as seguintes médias: D (6,0), E (6,1), F (5,5), G (5,6) e H (6,8). Porém quando analisado apenas os atributos acidez e doçura para as formulações com suco de goiaba (D, E e F) observou-se que poderia haver o acréscimo de quantidades maiores de açúcar sem diminuir a quantidade de bebida láctea fermentada.

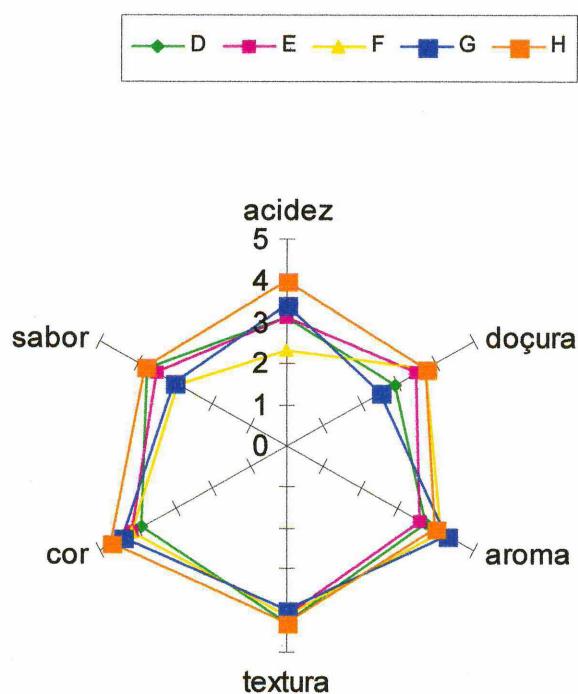


FIGURA 22 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES D, E, F, G e H

Formulação D: 66% de suco de goiaba, 34% de bebida fermentada

Formulação E: 55% de suco de goiaba, 1% de açúcar, 44% de bebida fermentada

Formulação F: 44% de suco de goiaba, 2% de açúcar, 54% de bebida fermentada

Formulação G: 66% de suco de pêssego, 1% de açúcar, 34% de bebida fermentada

Formulação H: 65% de suco de pêssego, 1% de açúcar, 34% de bebida fermentada

Optou-se então em aumentar em 10 vezes a quantidade de açúcar na formulação final acrescida com o suco de goiaba, utilizando concentrações maiores de bebida fermentada (44% para a formulação I e 54% para a formulação J). Estas novas formulações foram testadas em paralelo com a formulação H (com suco de pêssego) da etapa anterior, que havia recebido a maior média no teste de escala hedônica (6,8).

Na FIGURA 23 que representa o perfil de características da terceira etapa da análise sensorial, observa-se que a formulação J (36% de suco de goiaba, 10% de açúcar e 54%) foi a preferida pelos julgadores. Observa-se que os julgadores deram notas altas à todos os atributos avaliados como: sabor, acidez, doçura, textura e cor. Foi classificada em segundo lugar a formulação L (65% de suco de pêssego, 1% de açúcar e 34% de bebida fermentada) e em terceiro a bebida I (46% de suco de goiaba, 10% de açúcar e 44% de bebida láctea fermentada). Estes resultados foram confirmados no teste de escala hedônica onde as formulações receberam as seguintes médias: I (6,28), J (8,0) e L (6,86), interessante ressaltar aqui que a formulação L da terceira etapa é a mesma da H da segunda etapa e recebeu praticamente a mesma nota média (L, 6,86 e H, 6,8), fato este que caracteriza os julgadores como pessoas realmente aptas para a testes de análise sensorial envolvendo bebidas lácteas.

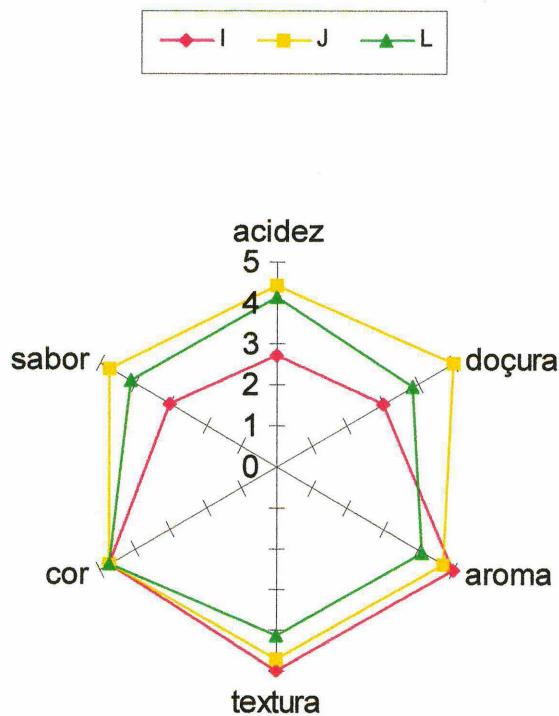


FIGURA 23 – PERFIL DE CARACTERÍSTICAS DAS FORMULAÇÕES I, J e K

Formulação I: 46% de suco de goiaba, 10% de açúcar, 44% de bebida fermentada

Formulação J: 36% de suco de goiaba, 10% de açúcar, 54% de bebida fermentada

Formulação L: 65% de suco de pêssego, 1% de açúcar, 34% de bebida fermentada

Nestas etapas os julgadores avaliaram as bebidas utilizando o teste de ordenação, perfil de características e escala hedônica. Nesta terceira etapa também foi aplicado o teste de ordenação. Neste teste a menor nota média indica a mostra que o julgador mais gostou. A formulação I recebeu nota média de 2,43, a formulação J, nota 1,57 e a formulação L, nota 2,14 (FIGURA 24).

Apesar da amostra J ter recebido a maior média nos testes acima realizados, estatisticamente não foi comprovado diferença significativa entre as amostras (ANEXO 6).

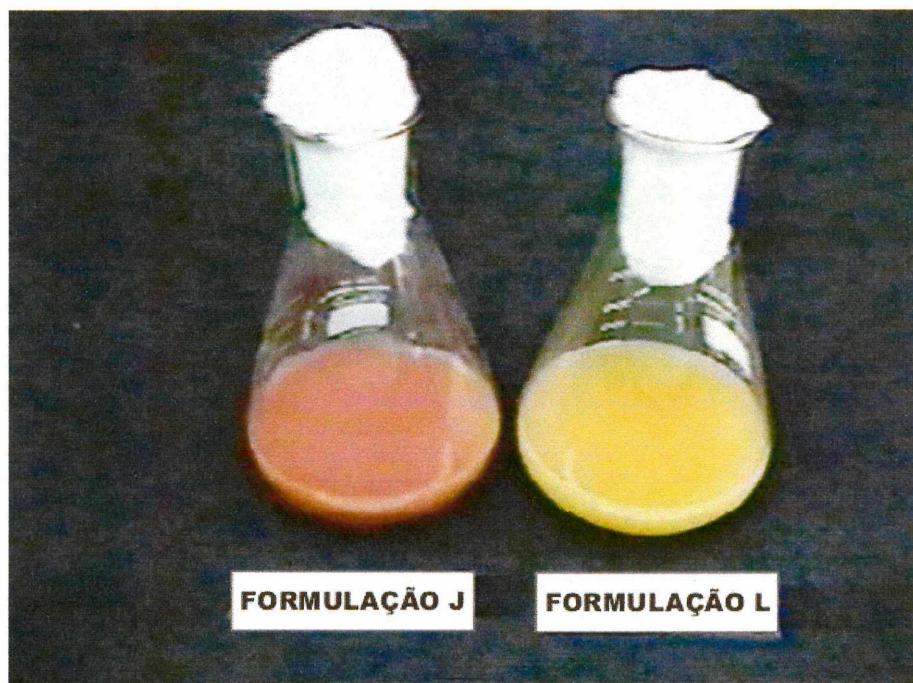


FIGURA 24 – FORMULAÇÕES J (36% de suco de goiaba, 10% de açúcar e 54% de bebida fermentada) E L (65% de suco de pêssego, 1% de açúcar e 34% de bebida fermentada).

4.6. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA BEBIDA LÁCTEA

A manutenção da estabilidade físico-química e microbiológica durante o período de estocagem constitui fator importante na qualidade de uma bebida láctea fermentada. (MACEDO, 1997).

Considerando que o período de vida de prateleira da grande parte das bebidas lácteas fermentadas é de 28 dias, a estabilidade da bebida láctea foi avaliada durante o mesmo período.

A bebida final fermentada e aromatizada foi dividida em 5 recipientes estéreis e armazenada a 4°C em geladeira. Foram retiradas amostras de 7 em 7 dias logo após a fermentação (tempo 0) até o final do 28º dia de estocagem, conforme descrito no item 3.2.9.

ABOU (2000) cita que os produtos lácteos fermentados contendo bactérias vivas devem ser conservados à frio a fim de garantir a presença dos fermentos vivos e assegurar os seus benefícios até o final do tempo de vida de prateleira do produto (shelf-life).

4.6.1. Estabilidade físico-química

A evolução do pH e acidez titulável na bebida láctea foi acompanhada durante o período de estocagem em intervalos de 7 dias.

Na FIGURA 25 pode-se observar que, durante o período de estocagem da bebida, as variações de pH e acidez mostram-se pouco significativas. O pH manteve-se praticamente constante até 14 dias de armazenamento, decrescendo para o valor final de 3,65 ao final do período de estocagem. A acidez teve aumento significativo até o 14º dia mantendo-se praticamente constante até o 28º dia de armazenagem, quando atinge o valor de 1,27% de acidez titulável em ácido láctico.

A pequena variação de pH e acidez titulável verificadas na bebida devem-se provavelmente às características de baixa pós-acidificação atribuídas às culturas utilizadas. O processo de acidificação durante o armazenamento encontra-se freqüentemente associado ao uso das culturas clássicas para fabricação de iogurtes (*L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *S. salivarius* ssp. *thermophilus*) e contribui na sinérese, inibição do crescimento das culturas específicas e acúmulo de D (-) ácido láctico no produto. Culturas de *L. casei*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp conferem ao produto

acidez suave e menor pós-acidificação, além de produzirem maior quantidade de L (+) ácido láctico (MACEDO, 1999).

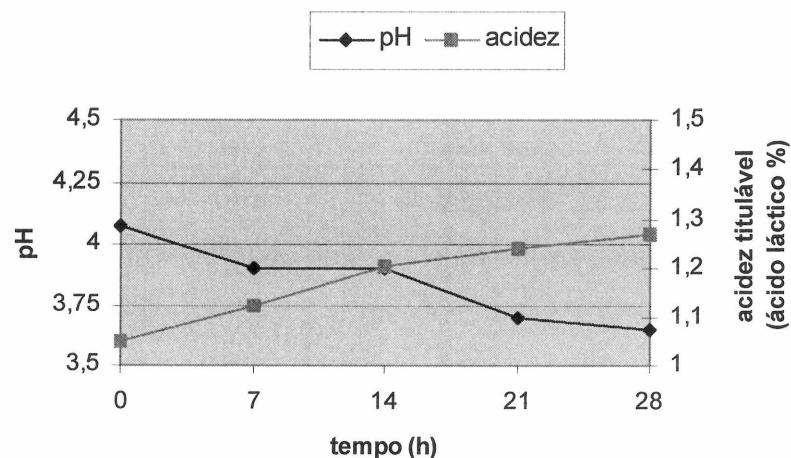


FIGURA 25 – VARIAÇÃO DO pH e ACIDEZ TITULÁVEL NA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA ARMAZENADA SOB REFRIGERAÇÃO A $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$.

ABOU (2000) demonstra em seus estudos de vida de prateleira de bebidas lácteas fermentadas com *Lactobacillus acidophilus* mantidas a 4°C , que após 5 semanas, a queda do pH é pouco significativa e que as células se mantêm viáveis e em quantidades significativas.

Os resultados obtidos mostram que a bebida láctea fermentada apresentou estabilidade físico-química durante os 28 dias de estocagem.

4.6.2. Avaliação microbiológica

4.6.2.1. Avaliação da evolução da cultura mista

As variações na contagem celular e valores de pH em bebidas lácteas fermentadas estão diretamente relacionadas ao tempo e temperatura de estocagem, tipo de cultura utilizada e número de células no início do armazenamento (MEDINA & JORDANO, 1994).

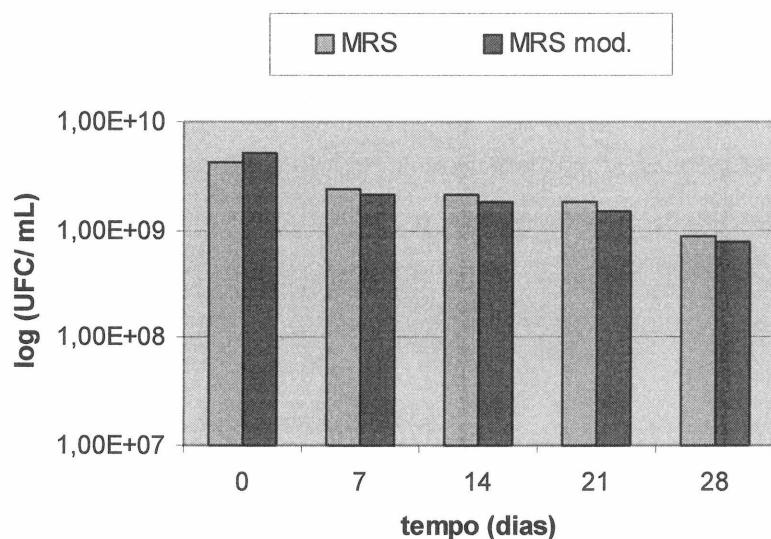


FIGURA 26 – EVOLUÇÃO NA CONTAGEM CELULAR DE *L. plantarum* A6, *L. casei* Shirota e *L. acidophilus* NA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DURANTE ESTOCAGEM A 4°C ± 1,0°C.

Na FIGURA 26, observa-se que durante as três primeiras semanas de estocagem observa-se um pequeno decréscimo, pouco significativo, na contagem de células probióticas em ágar MRS da cultura mista e na contagem da bactéria amilolítica em ágar MRS modificado com amido. Na última semana de estocagem há um decréscimo mais acentuado do número de células probióticas até atingir $8,7 \times 10^8$ UFC/mL e amilolíticas $7,7 \times 10^8$ UFC/mL no 28º dia de estocagem.

A contagem celular mínima de cultura específica recomendada para bebidas lácteas fermentadas é de 10^6 células viáveis/mL no momento do consumo (MACEDO, 1997).

Outros autores como MEDINA & JORDANO (1994) consideram que a efetividade de lactobacilos como adjunto da dieta é obtida por valores situados entre 10^6 e 10^8 UFC/mL.

SALOFF-COSTE (2000) cita que há necessidade da ingestão de 10^8 UFC/mL de *Lactobacillus acidophilus* para haver um aumento significativo das células totais de lactobacilos no íleo e 3×10^7 UFC/mL durante 30 dias para que aconteça uma diminuição considerada do colesterol sérico.

4.6.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas realizadas na bebida fermentada ao longo do período de armazenamento estão representados na TABELA 20.

TABELA 20 - AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DURANTE O PERÍODO DE ESTOCAGEM DE 28 DIAS A 4°C ± 1,0°C.

Análises microbiológicas	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
Coliformes totais (NMP/mL)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)
Coliformes fecais (NMP/mL)	< 1 (neg.)	< 1 (neg.)	< 1 (neg.)	< 1 (neg.)	< 1 (neg.)
Salmonella (em 25 mL)	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
Bolores e leveduras (UFC/mL)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)	< 10 (neg.)

Alimentos com pH inferiores a 4,0 são considerados como muito ácidos e o desenvolvimento microbiano fica restrito quase que exclusivamente a bolores, leveduras e bactérias lácticas (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A ausência de bactérias do grupo coliforme e salmonelas indica que a bebida láctea foi processada em boas condições higiênico-sanitárias. A presença de bolores e leveduras fornece informações sobre as condições higiênicas mantidas durante o processamento e estocagem de um alimento. Desta forma pode-se verificar que a bebida elaborada foi armazenada sob condições satisfatórias (SIQUEIRA, 1995).

De acordo com a portaria nº 451/97, DINAL/ MS, a bebida láctea fermentada apresentou padrões microbiológicos situados dentro dos limites estabelecidos para leites fermentados, mostrando excelente qualidade microbiológica, durante o período de estocagem.

4.7. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE MANDIOCA BIOTRANSFORMADA

Após separação da fração sobrenadante (bebida láctea), por filtração, a fração sólida foi seca em estufa com circulação forçada de ar por um período de 20 horas a 45°C. A farinha seca (FIGURA 27) apresentou um teor de umidade de 7,32% e atividade de água de 0,31 à uma temperatura de 22°C.



FIGURA 27 – FARINHA DE MANDIOCA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO.

Foi realizada contagem de células em ágar MRS e MRS modificado para saber se ainda existiam bactérias probióticas e amilolíticas na farinha seca. A TABELA 21 demonstra as contagens obtidas na farinha de mandioca fermentada. Na análise microbiológica da farinha de mandioca obtida do comércio (antes de ser autoclavada e fermentada), as colônias que cresceram em ágar padrão para contagem apresentaram-se como bactérias gram positivas e esporuladas.

Foi ainda realizada a composição centesimal da farinha de mandioca antes e depois de fermentada para observar as alterações na composição inicial desta farinha, conforme representado na TABELA 21.

Observa-se também na TABELA 21, que houve um incremento considerável na quantidade de proteínas (de 0,75% para 2,99%), lipídios (de 0,76% para 1,12%) e no teor de cinzas (de 0,70% para 2,26%). Estes valores são atribuídos ao crescimento microbiano e à adição do soro de leite, que contribui para o aumento dos teores desses três componentes.

TABELA 21 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL E CONTAGEM DE CÉLULAS DA FARINHA DE MANDIOCA ANTES E APÓS A FERMENTAÇÃO.

Componentes	Farinha de mandioca antes da fermentação (%)	Farinha de mandioca fermentada (%)
Proteínas	0,75	2,99
Lipídios	0,76	1,12
Fibras	2,92	2,67
Cinzas	0,70	2,26
Umidade	4,02	7,32
Carboidratos	90,85	83,64
Amido	80,10	64,80
Bactérias amilolíticas (UFC/g)	-	$3,6 \times 10^5$
Bactérias probióticas (UFC/g)	-	$9,8 \times 10^4$

Os resultados acima representam a média de 5 determinações.

Paralelamente à análise centesimal foi ainda realizada uma análise de amido na farinha fermentada a qual demonstra que houve um consumo real do amido pela bactéria *Lactobacillus plantarum* A6 (cepa amilolítica), conforme demonstrado na TABELA 21.

5. CONCLUSÕES

A relação temperatura e tempo de 80°C por 20 min para o tratamento térmico do soro de leite mostrou-se eficiente na destruição da flora microbiana naturalmente presente, sem haver precipitação das proteínas.

A otimização demonstrou que os melhores parâmetros fermentativos foram: tempo de fermentação de 16 horas, taxa de inóculo de 16%, temperatura de incubação de 35°C e concentração de farinha de mandioca de 20%.

Após 16 horas de fermentação a bebida láctea apresentou pH de 4,07, acidez titulável em ácido láctico de 1,050, 39,2 g/L de açúcares redutores, $2,80 \times 10^9$ UFC/mL de bactérias lácticas amilolíticas e $2,28 \times 10^9$ UFC/mL de bactérias probióticas.

A produção de ácido láctico foi acompanhada por injeção em cromatógrafo líquido (CLAE), resultando em 1,25% após 16 horas de fermentação. A análise em CLAE demonstrou que a glicose produzida pelo microrganismo foi rapidamente convertida em ácido láctico confirmando os dados publicados por GIRAUD et al. (1991).

A análise sensorial demonstrou que a formulação contendo 36% de suco de goiaba, 10% de açúcar, 54% de bebida fermentada recebeu as maiores médias entre os julgadores, porém estatisticamente não foi comprovado diferença significativa entre as amostras (Formulação I: 46% de suco de goiaba, 10% de açúcar, 44% de bebida fermentada e Formulação L: 65% de suco de pêssego, 1% de açúcar, 34% de bebida fermentada).

Constatou-se a homogeneidade do grupo de julgadores selecionados devido às respostas coincidentes da mesma formulação com codificações diferentes em períodos distintos.

A bebida láctea manteve a qualidade físico-química e microbiológica no decorrer do período de 28 dias de estocagem a 4°C, exibindo desejável contagem celular das culturas específicas utilizadas.

A farinha láctea fermentada após secagem (atividade de água de 0,31 à 22°C) apresentou 20% menos amido que a farinha não fermentada, um aumento de 75% de proteínas e contagem celular de $3,6 \times 10^5$ células amilolíticas/g e $9,8 \times 10^4$ células probióticas/g.

A elaboração de bebida láctea empregando soro de leite, farinha de mandioca e bactérias lácticas amilolíticas e probióticas constitui uma alternativa de grande interesse econômico, por se tratar de matérias-primas de baixo custo que são capazes de agregar valor nutricional e funcional ao produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Teste triangular em análise sensorial dos alimentos e bebidas.** Procedimento. NBR 12995. 5p. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT. _____. **Escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas.** Procedimento. NBR 14141. 3p. Rio de Janeiro, 1998.

ABNT. _____. **Análise sensorial dos alimentos e bebidas. Terminologia.** NBR 12806. 8p. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT. _____. **Teste de ordenação em análise sensorial.** Procedimento. NBR 13170. 7p. Rio de Janeiro, 1994.

ABOU, C. **Les traitements thermiques – leurs effets sur les laits fermentés.** Danone Word Newsletter. n.20. 2000. Disponível em: http://www.danonenewsletter.fr/eng/news_20/sum.html Acesso em 13 jan.2001

ALAIS, C. **Ciencia de la leche.** 5. ed. México: Continental, 1984.

ALMEIDA, K. E.; BONASSI, I. A.; ROÇA, R. O. Avaliação sensorial de bebida láctea preparada com diferentes teores de soro, utilizando-se dois tipos de cultura láctica. In: Congresso Nacional de Laticínios, 17., 2000, Juiz de Fora. **Anais do XVII Congresso Nacional de Laticínios.** Juiz de Fora: EPAMIG, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 2000. p.7-13.

AMIOT, J. **Ciencia y tecnologia de la leche.** Zaragoza: Acribia, 1991.

ANTOINE, J. M. et al. **Bactéries lactiques en alimentation humaine.** In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques.** Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.2. 419-435.

ANUALPEC 2000 – Anuário [da] pecuária brasileira. São Paulo: FNP, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15. ed., v.2., p. 687, 1990.

BALAGOPALAN, C.; PADMAJA, G.; NANDA, S.K.; MOORTHY, S.N. **Cassava in Food, Feed, and Industry**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1988.

BARBOSA, H. R.; TORRES, B. B. **Microbiologia básica**. São Paulo: Atheneu, 1998.

BATISH, V. K. et al. Fermented milk products. In: JOSHI, V. K.; PANDEY, A. **Biotechnology: Food fermentation, Microbiology, Biochemistry and Technology**. New Delhi, Ernakulum, Calcutta: Educational Publishers & Distributors, 1999. 781-863.

BITTENCOURT, L.; BITTENCOURT, D. Uma visão mais empresarial - Bovinocultura de leite. **A granja do ano**. Centaurus, n. 15, 2000/2001. Edição especial.

BOURLIOUX, P. Ecologie microbienne du tractus digestif humain. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.2. 369-380.

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.4

CHEFTEL, J.C.; CHEFTEL, H. **Introduction a la biochimie et a la technologie des aliments**. Paris: Technique et Documentation - Lavoisier, 1977.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**. v.23, p.130-135, 1960.

DEGÁSPARI, C. H. **Avaliação das diferenças de acuidade gustativa entre indivíduos de sexo feminino e masculino**. Curitiba, 1995. 104f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

DELLAGLIO, F. et al. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.1. 25-70.

DESMAZEAUD, M. J.; ROISSART, H. Métabolisme général des bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.1. 169-204.

FERREIRA, C. L. L. F.; TESHIMA, E. Prebióticos. **Biotecnologia**. n.16, p. 22-25.2000.

FERREIRA, V. L. P.; ALMEIDA, T. C. A.; PETTINELLI, M. L. de et al. **Análise sensorial Testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000. 127 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FULLER, R. Modulação da microflora intestinal pelos probióticos. In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Veney: Nestlé. Resumo do 42º Seminário de Nestlé Nutrition. 1998.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 66, p. 365-378, 1989.

GANDHI, D. N.; PATEL, R. S. Technology and keeping quality of fermented whey concentrate. **Cultured Dairy Products Journal**, v.29, n.1, p.25-27, 1994.

GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D. O conceito da microbiota colônica equilibrada, os probióticos e os simbióticos. In: **Probióticos, outros fatores nutricionais e a microflora intestinal**. Veney: Nestlé. Resumo do 42º Seminário de Nestlé Nutrition. 1998.

GIRAUD, E. et al. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n. 36, p.379-383. 1991.

GIRAUD, E.; CHAMPAILLER, A.; RAIMBAULT, M. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environment Microbiology**. v. 60. n. 12, p.4319-4323, 1994.

GIRAUD, E.; GOSSELIN, L.; RAIMBAULT, M. Production of a *Lactobacillus plantarum* starter with linamarase and amylase activities for cassava fermentation. **Journal of Science Food Agriculture.**, n. 62, p.77-82, 1993.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc., 1989.

HIGASKINO, C. E. K. **Isolamento de bactérias da flora intestinal, com características probióticas de ação antimicrobiana**. Curitiba, 1998. 69f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

HOLZAPFEL, W. et al. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. n.41, p. 85-101, 1998.

HONHOLTZ, J. H. Manioc cultivation in South East Asia. *Applied Geography and Development*, v.16:p.117-35, 1980.

LOONES, A. Laits fermentés par les bactéries lactiques. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. *Bactéries lactiques*. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.2. 135-152.

MACEDO, R. Desenvolvimento de bebida láctea fermentada a base de extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala por cultura mista de *Lactobacillus casei shirota* e *Bifidobacterium adolescentis*. Curitiba, 1997. 141f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MACEDO, R. F.; FREITAS, R. J. S., PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production and shelf-life studies of low cost beverage with soymilk, buffalo cheese whey and cow milk fermented by mixed cultures of *Lactobacillus casei* ssp. Shirota and *Bifidobacterium adolescentis*. *Journal of Basic Microbiology*. v. 39. n.4. p.243-251, 1999.

MACHADO, C. M. M. Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em bio-resíduos da agroindústria do café. Curitiba, 2000. 73f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

MEDINA, L. M.; JORDANO, R. Survival of constitutive microflora in commercially fermented milk containing bifidobacteria during refrigerated storage. *Journal of Food protection*, v. 56, n. 8, p. 731-733, 1994.

MONTEIRO, C. L. B. *Técnicas de avaliação sensorial*. 2 ed. Curitiba: CEPPA – Universidade Federal do Paraná, 1984.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*, v. 153, p. 375-380, 1944.

OTERO, M.; RODRIGUEZ, T.; CAMEJO, J. CARDOSO, F. Bebida láctea fermentada. *Alimentaria*. n. 260, p. 93-95, 1995.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEQ, N. R. *Microbiologia*. 2.ed. São Paulo: Makron Books, v. 2. 1996.

PONSANO, E. H. G.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Fermentação do soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para a redução de sua capacidade poluente. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 15, n. 1, p. 170-173, jul-dez. 1995.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 9, p. 3763-3766.

REQUE, E. F. Isolamento, identificação e estudos fisiológicos da bactéria de ação probiótica (*Lactobacillus fermentum* LPB) para uso em frangos de corte. Curitiba, 1999. 90f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. *Tratado de microbiologia*. São Paulo: Manole, 1988.

SALOFF-COSTE, C. J. *Lactobacillus acidophilus*. Danone Word Newsletter. n.13. 1997. Disponível em: http://www.danonenewsletter.fr/fr/news_13/sum.html Acesso em 12 abr.2001

SALOFF-COSTE, C. J. *Lactobacillus casei*. Danone Word Newsletter. n.17. 1995. Disponível em: http://www.danonenewsletter.fr/eng/news_7/sum.html Acesso em 15 abr.2001

SANTOS, C. R. *A História da alimentação no Paraná*. Curitiba: Fundação Cultural, 1995.

SÃO PAULO. Secretaria do Estado da saúde. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo, 1985, 523p.

SEIBEL, N. F.; CANSIAN, R. L. Análise de diferentes concentrações de soro na produção de bebida láctea. *Leite & Derivados*. n. 52, p.44-49. 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. *Métodos de análise microbiológica de alimentos*. Manual técnico nº 14. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), 1995.

SIQUEIRA, R. S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Rio de Janeiro: EMPRAPA, 1995.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, v. 160, p.61-69, 1945.

SOTTIEZ, P. Subproductos derivados de la elaboración de los quesos. In: LUQUET, F.M.. *Leche y productos lácteos – vaca – oveja – cabra*. Zaragoza: Acribia, 1993. P.287-319. v.2: Los productos lácteos – Transformacion y tecnologias.

SPREER, E. **Lactologia Industrial**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1991.

STERTZ, S. C. **Bioconversão da farinha de mandioca crua (*Manihot esculenta, Crantz*) por fungos do gênero *Rhizopus* em fermentação no estado sólido**. Curitiba, 1997. 109f. Dissertação (mestrado em Tecnologia Química, área de concentração em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

SWAISGOOD, H. E. **Características de los fluidos nutritivos**. In: FENNEMA, O. R. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 889-930:

THOMPSON, J.; GENTRY-WEEKS, C. R. **Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques**. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.1. 239-284.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TOURNUT, J. **Perspectives de développement des probiotiques à base de bactéries lactiques**. In: ROISSART, H.; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques**. Chemin de Saint Georges: Lorica, 1994. v.2. 471-487.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. M. S. C. **A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo**. In: Os probióticos e a saúde infantil. Nestlé. fascículo 1.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. M. S. C. **A composição e papel da microflora intestinal na saúde e proteção do organismo**. In: Os probióticos e a saúde infantil. Nestlé. fascículo 2.

UNITED STATES DAIRY EXPORT COUNCIL (USDEC). **Manual de referência para produtos de soro dos EUA**. Arlington, 1997.

VEISSEYRE, R. **Lactología técnica**. Zaragoza: Acribia, 1988.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactologica**. Zaragoza: Acribia, 1987.

WASZCZYNSKYJ, N. **Análise sensorial em alimentos e bebidas**. Apostila, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1997.

ANEXO 1



CONVITE

Você gostaria de participar de uma equipe de análise sensorial de bebida láctea?

Inscreva-se !

Requisitos: - aluno, professor ou funcionário da UFPR,
- possuir horário disponível no período da manhã ou tarde (máx. 30 min)
- se selecionado, comprometer-se a realizar os testes até o fim

Local de Inscrição: Laboratório de Processos Biotecnológicos

Período de Inscrição: 06/06/00 a 15/06/00

Realização das análises: Bloco A – Usinas Piloto – Laboratório de Análise Sensorial

Falar com: Maria Carolina ou Nádia

ANEXO 2

Ficha de Inscrição: _____

Data: ___/___/00

Dados Pessoais

Nome completo: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Idade: _____

Sexo: _____ Formação: _____

Responda as perguntas abaixo e, no caso de dúvidas, pergunte.
Todas as respostas são de caráter sigiloso.

Hábitos Alimentares

1 - Você faz alguma dieta alimentar? Qual?

2 - Você tem o hábito de consumir bebidas lácteas? Quais?

Saúde

1 - Possui rinite, sinusite, gastrite ou diabetes?

2 - Você tem algum tipo de alergia a algum alimento e/ou bebida? Se positivo, especifique.

4 - Você faz uso de algum medicamento que possa afetar ou interferir especificamente no seu olfato?

5 - Você usa prótese dentária?

Hábitos

1 - Você fuma? Com que frequência?

2 - Você usa perfume? Com qual frequência?

Possibilidade de Tempo

1 - Em qual dia da semana (manhã, tarde e horário) você tem disponibilidade para participar da análise sensorial com regularidade?

2 - Qual é o seu período de férias?

3- Comentários de seu interesse.

Assinatura

Muito obrigado!!!

ANEXO 3

TESTE DO PERFIL DE CARACTERISTICAS

Produto: bebida láctea fermentada

Nome: _____

Data: ___/___/___

Instruções: Ordene as amostras de acordo com a preferência, seguindo a escala abaixo.

1- Péssimo

3- Bom

5- Excelente

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Aparéncia			
Cor			
Aroma			
Textura			
Sabor			

Observações: _____

ANEXO 4

ESCALA HEDÔNICA

Produto: bebida láctea fermentada

Nome: _____

Data: ___/___/___

Instruções: Avalie cada amostra usando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou da amostra.

- 1- Desgostei muitíssimo
- 2- Desgostei muito
- 3- Desgostei regularmente
- 4- Desgostei ligeiramente
- 5- Indiferente
- 6- Gostei ligeiramente
- 7- Gostei regularmente
- 8- Gostei muito
- 9- Gostei muitíssimo

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			

Observações: _____

ANEXO 5

TESTE DE ORDENAÇÃO

Produto: bebida láctea fermentada

Nome: _____

Data: ___/___/___

Instruções: Ordene as amostras de acordo com a preferência, seguindo a escala abaixo.

1- Gostou mais

3- Gostou menos

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Preferência			

Observações: _____

ANEXO 6

QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS VALORES OBTIDOS PARA AS TRÊS FORMULAÇÕES (I, J e L).

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Distribuição estatística
Amostras	2	19,5	9,75	2,035 ^{ns}
Julgadores	11	38,75	3,52	0,73*
Resíduo	22	105,5	4,79	
TOTAL	35	163,75		

ns – não significativo