

RENATA ERNLUND FREITAS DE MACEDO

**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***

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre no  
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia  
Química, área de concentração em Tecno-  
logia de Alimentos da Universidade Fede-  
ral do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA  
1997

**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***

por:

RENATA ERNLUND FREITAS DE MACEDO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no  
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia Química.

Comissão examinadora:

---

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol  
Orientador

---

Prof. Dra. Marileusa Dozolina Chiarello

---

Prof. Dr. José Domingos Fontana

Curitiba, 21 de novembro de 1997.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccoll

Ao meu marido Maurício  
pelo apoio, amizade e amor  
demonstrados em todos os  
momentos.

Ao meu pai Renato, que com  
sua calma e paciência, sempre  
guiou meus passos para o  
caminho certo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccoll pela orientação acertada, incentivo constante e valorização do trabalho durante toda sua execução.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela conceção da bolsa de estudos para a realização deste trabalho.

À Central de Produção de Alimentos da Secretaria de Abastecimento da cidade de Curitiba, especialmente à Marise E. Galerani pelo atencioso tratamento dispensado e fornecimento do extrato hidrossolúvel de soja.

Ao Sr. Wilson Camargo pelo fornecimento do soro de leite de búfala e valiosa literatura sobre este assunto.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Krieger e Dr<sup>a</sup>. Marileusa D. Chiarello pela revisão e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

À Eliane Maria Stropato da Biblioteca do Setor de Tecnologia pela revisão e correção das referências bibliográficas.

A todos os colegas do Curso de Mestrado em Tecnologia Química e do Laboratório de Processos Biotecnológicos, onde descobri amigos verdadeiros, compartilhei experiências e recebi incentivo em todos os momentos da realização do trabalho.

Em especial, à minha família pelo incentivo e colaboração nesta etapa de crescimento profissional.

## SUMÁRIO

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 consumo mundiais de leite .....	4
2.2. LEITE DE BÚFALA.....	6
2.2.1. Bubalinocultura nacional e mundial .....	6
2.2.2. Produção de leite de búfala .....	9
2.2.3. Características do leite de búfala .....	9
2.3. SORO DE LEITE .....	13
2.3.1. Composição química do soro de leite .....	14
2.3.2. Subprodutos do soro de leite .....	18
2.3.3. Utilização do soro de leite.....	20
2.3.4. Produção e custos do soro de leite .....	21
2.4. SORO DE LEITE DE BÚFALA .....	21
2.5. SOJA .....	23
2.5.1. Composição química da soja .....	26
2.5.2. Extrato hidrossolúvel de soja .....	31
2.5.2.1. Composição química do extrato hidrossolúvel de soja .....	32
2.5.2.2. Principais usos do leite de soja .....	35
2.5.2.3. Fermentação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS).....	35
2.6. FERMENTAÇÃO .....	36
2.6.1. Fermentação láctica .....	37
2.6.1.1. Fermentação homoláctica.....	38
2.6.1.2. Fermentação heteroláctica .....	39
2.6.2. Bactérias lácticas .....	40
2.6.2.1. Características gerais das bactérias do ácido láctico.....	41
2.6.2.2. <i>Lactobacillus casei</i> .....	42
2.6.3. Bactérias bífidas.....	43
2.6.3.1. Características gerais das bactérias bífidas .....	43
2.6.3.2. <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....	45
2.7. USO DE CULTURAS MISTAS EM PRODUTOS FERMENTADOS .....	45
2.8. ALIMENTOS FERMENTADOS .....	46
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.1. MATERIAL .....	49
3.1.1. Microrganismos .....	49
3.1.2. Matérias-primas .....	50
3.1.3. Equipamentos .....	51
3.2. MÉTODOS .....	51
3.2.1. Métodos analíticos .....	52
3.2.1.1. Determinação do pH .....	52
3.2.1.2. Determinação de acidez titulável .....	52
3.2.1.3. Determinação de cinzas .....	52
3.2.1.4. Determinação de proteínas .....	52
3.2.1.5. Extrato seco .....	53
3.2.1.6. Lipídios .....	53
3.2.1.7. Açúcares redutores .....	53

3.2.1.8. Açúcares totais .....	54
3.2.1.9. Determinação da densidade óptica .....	54
3.2.2. Manutenção das culturas.....	54
3.2.3. Obtenção do extrato hidrossolúvel de soja .....	55
3.2.4. Obtenção do soro de leite de búfala.....	56
3.2.5. Caracterização das matérias-primas.....	57
3.2.6. Tratamento térmico dos componentes do substrato .....	57
3.2.7. Seleção de culturas simples .....	58
3.2.7.1. Preparo dos inóculos para a fermentação.....	58
3.2.7.2. Fermentação do substrato.....	59
3.2.7.3. Avaliação do fermentado .....	59
3.2.8. Seleção de culturas mistas.....	60
3.2.9. Formulações .....	61
3.2.9.1. Pré-seleção de formulações .....	63
3.2.9.2. Seleção de formulações .....	63
3.2.10. Avaliação do crescimento e proporção de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> no inóculo .....	64
3.2.10.1. Desenvolvimento das cepas selecionadas em caldo de inoculação .....	64
3.2.10.2. Proporção de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> no inóculo .....	65
3.2.11. Aromatização .....	65
3.2.12. Avaliação da estabilidade da bebida láctea .....	66
3.2.12.1. Estabilidade fisico-química.....	67
3.2.12.2. Estabilidade microbiológica .....	67
3.2.12.3. Estabilidade sensorial.....	69
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS .....	70
4.2. DEFINIÇÃO DA MELHOR CONDIÇÃO DE TRATAMENTO TÉRMICO DO SORO DE LEITE DE BÚFALA .....	72
4.3. SELEÇÃO DE CULTURAS SIMPLES .....	76
4.4. SELEÇÃO DE CULTURAS MISTAS .....	80
4.5. SELEÇÃO DE FORMULAÇÕES .....	85
4.5.1. Pré-seleção de formulações .....	85
4.5.2. Seleção de formulações .....	89
4.6. CRESCIMENTO E PROPORÇÃO DAS CULTURAS SELECIONADAS EM CALDO DE INOCULAÇÃO .....	96
4.6.1. Efeito do período de incubação no crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> no inóculo .....	96
4.6.2. Proporção de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> no inóculo .....	99
4.8. AROMATIZAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA .....	105
4.9.1. Avaliação da estabilidade fisico-química.....	106
4.9.2. Avaliação microbiológica .....	110
4.9.2.1. Avaliação da evolução da cultura mista .....	110
4.9.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica .....	112
4.9.3. Avaliação sensorial .....	113
4.10. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE BEBIDA LÁCTEA ELABORADA COM SORO DE LEITE DE BÚFALA E COM SORO DE LEITE DE VACA .....	115
5. CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ANEXOS .....	132

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Evolução da produção mundial de leite no período de 1995 a 1997 .....	5
TABELA 2. Produção de leite em relação ao número de habitantes nos países do Mercosul .....	6
TABELA 3. População mundial de búfalos nos principais países criadores em 1996 .....	7
TABELA 4. Rebanho nacional de bubalinos nos maiores estados criadores em 1996 .....	8
TABELA 5. Rebanho paranaense de bubalinos em 1994.....	8
TABELA 6. Composição química média comparativa do leite de diferentes espécies .....	10
TABELA 7. Distribuição dos compostos nitrogenados no leite de búfala e no leite de vaca .....	11
TABELA 8. Composição em vitaminas e minerais dos leites de búfala e de vaca.....	12
TABELA 9. Composição química do soro de leite.....	15
TABELA 10. Conteúdo de vitaminas e sais minerais do soro de leite.....	16
TABELA 11. Composição protéica do soro no leite integral.....	16
TABELA 12. Composição química do soro de leite de búfala.....	22
TABELA 13. Evolução da produção mundial de oleaginosas.....	24
TABELA 14. Produção mundial de soja distribuída por país.....	25
TABELA 15. Participação dos principais estados produtores de soja no panorama de produção nacional.....	26
TABELA 16. Composição química da soja.....	27
TABELA 17. Variação no conteúdo de minerais em cultivares de soja.....	28
TABELA 18. Composição química do leite de soja .....	32
TABELA 19. Composição do leite de soja em relação ao leite de vaca .....	33
TABELA 20. Conteúdo vitamínico de produtos lácteos fermentados em relação ao leite fresco integral.....	48
TABELA 21. Condições de tempo e temperatura utilizadas na pasteurização do soro de leite de búfala.....	58
TABELA 22. Culturas mistas utilizadas na fermentação do substrato composto de 40 % de leite de vaca desnatado, 35 % de soro de leite de búfala desnatado e 25 % de extrato hidrossolúvel de soja .....	60
TABELA 23. Proporções das matérias-primas utilizadas nas misturas para fermentação .....	61
TABELA 24. Composição centesimal das matérias-primas utilizadas como substrato .....	70
TABELA 25. Efeito do tempo e temperatura de pasteurização no aspecto e qualidade microbiológica do soro de leite de búfala .....	73
TABELA 26. Avaliação organoléptica das bebidas fermentadas por diferentes combinações de culturas mistas .....	81
TABELA 27. Valores de pH e acidez titulável obtido nas misturas fermentadas por diferentes associações de culturas.....	82
TABELA 28. Diferentes formulações testadas na elaboração da bebida láctea .....	85
TABELA 29. Avaliação organoléptica das formulações testadas .....	86
TABELA 30. Proporções de matérias-primas das misturas testadas para a seleção de formulações .....	89
TABELA 31. Médias obtidas para as características avaliadas das formulações com reduzido conteúdo de leite de vaca .....	90
TABELA 32. Valores de pH, acidez titulável e açúcares redutores nas formulações C, G, H e I no início e após 8 horas de fermentação .....	93
TABELA 33. Número de células viáveis de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> na bebida fermentada pelas diferentes proporções das culturas utilizadas no inóculo .....	100
TABELA 34. Escores médios obtidos na avaliação sensorial das bebidas aromatizadas com diferentes essências.....	105
TABELA 35. Avaliação microbiológica da bebida láctea fermentada durante o período de estocagem de 28 dias a 4° C ± 1,0° C .....	112

TABELA 36. Escores médios obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea fermentada durante 28 dias de estocagem a $4^{\circ}\text{ C} \pm 1,0^{\circ}\text{ C}$ .....	113
TABELA 37. Escores médios obtidos na avaliação sensorial das bebidas fermentadas elaboradas com soro de leite de vaca e com soro de leite de búfala. ....	117

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Processos de tratamento e transformação do soro de leite.....	19
FIGURA 2. Matérias-primas utilizadas na composição do substrato.....	50
FIGURA 3. Fluxograma do processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja.....	55
FIGURA 4. Fluxograma de fabricação de queijo de búfala Minas frescal e obtenção do soro de leite de búfala.....	56
FIGURA 5. Fluxograma esquemático de obtenção da bebida láctea fermentada.....	62
FIGURA 6. Características visuais do soro de leite de búfala tratado com diferentes condições de temperatura e tempo de pasteurização.....	75
FIGURA 7. Evolução do pH e acidez no substrato fermentado pelas diferentes cepas de bactérias testadas.....	78
FIGURA 8. Evolução do número de células viáveis das diferentes cepas de bactérias tetadas para a fermentação do substrato.....	79
FIGURA 9. Número total de células viáveis nas bebidas fermentadas pelas diferentes culturas mistas.....	84
FIGURA 10. Evolução do pH e acidez titulável durante a fermentação das diferentes formulações..	87
FIGURA 11. Evolução no número de células viáveis da cultura mista durante a fermentação das diferentes formulações.....	88
FIGURA 12. Perfil de características da avaliação sensorial das formulações C, G, H e I.....	92
FIGURA 13. Número de células viáveis de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> nas formulações C, G, H e I.....	94
FIGURA 14. Curva de crescimento e evolução da densidade óptica de <i>Lactobacillus casei</i> em caldo MRS e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> em caldo MRS modificado.....	97
FIGURA 15. Morfologia celular de cultura de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> em caldo MRS modificado após 60 horas de incubação a 37° C.....	98
FIGURA 16. Morfologia celular de cultura de <i>Lactobacillus casei</i> em caldo MRS após 48 horas de incubação a 37° C.....	99
FIGURA 17. Valores de pH e acidez titulável na bebida fermentada com diferentes proporções de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> no inóculo.....	101
FIGURA 18. Perfil de pH, acidez titulável e consumo de açúcares redutores durante a fermentação de bebida constituída de 35 % leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja.....	102
FIGURA 19. Evolução do crescimento de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> na bebida fermentada.....	104
FIGURA 20. Aspecto e coloração das bebidas fermentadas aromatizadas com diferentes essências.	106
FIGURA 21. Configuração das características avaliadas nas bebidas fermentadas aromatizadas com essências de morango, baunilha e pêssego.....	107
FIGURA 22. Variação do pH e acidez titulável na bebida fermentada armazenada sob refrigeração a 4° C ± 1,0° C.....	109

FIGURA 23. Evolução na contagem celular de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> na bebida láctea fermentada durante estocagem a $4^{\circ}\text{ C} \pm 1,0^{\circ}\text{ C}$ .....	111
FIGURA 24. Perfil de características da bebida láctea fermentada durante período de estocagem de 28 dias a $4^{\circ}\text{ C} \pm 1,0^{\circ}\text{ C}$ .....	114
FIGURA 25. Avaliação das bebidas fermentadas com soro de leite de búfala e com soro de leite de vaca quanto ao pH, acidez titulável e contagem celular de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium adolescentis</i> .....	116
FIGURA 26. Perfil de características das bebidas fermentadas elaboradas com soro de leite de búfala e soro de leite de vaca.....	118

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AOAC	- Association of Official Analytical Chemists
ANOVA	- Análise de variância
ATCC	- American Type Culture Collection
CCT	- Coleção de Culturas Tropical
° D	- Graus Dornic
Da	- Dalton
IAL	- Instituto Adolfo Lutz
INCQS	- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
nm	- Nanômetro
μ	- Mícron
p/v	- Peso/ volume
t.	- Tonelada
UFC	- Unidades formadoras de colônia
t.	- Tonelada

## **RESUMO**

Com o objetivo de ampliar o uso do soro de leite de búfala e do extrato hidrossolúvel de soja em bebidas, visto que agregam qualidade nutricional ao produto, foi desenvolvida uma bebida láctea fermentada constituída de 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja. A fermentação foi realizada por cultura mista de *Lactobacillus casei shirota* e *Bifidobacterium adolescentis*, que proporcionaram características sensoriais desejadas, além de possibilitarem a atribuição de alguma característica do tipo probiótica à bebida. As condições ideais para a fermentação foram verificadas em 8 horas a 37° C, com a adição de 5 % de inóculo, cuja proporção entre as cepas foi 1:5 de *L. casei* e *B. adolescentis*, previamente cultivadas em caldo de inoculação por 48 e 60 horas a 37°C, respectivamente. A bebida láctea aromatizada com essência de baunilha foi avaliada no decorrer do período de 28 dias de estocagem e demonstrou estabilidade fisico-química, microbiológica e sensorial. A bebida mostrou pequena variação de pH e acidez durante o armazenamento, mantendo sua qualidade microbiológica e sanitária, e apresentando desejável contagem celular de *L. casei* e *B. adolescentis*,  $6,8 \times 10^8$  células/ mL e  $2,3 \times 10^7$  células/ mL, respectivamente, ao final de 28 dias de armazenamento. Ao longo da estocagem, a bebida láctea exibiu bom perfil sensorial, mantendo-se apreciada pelos provadores.

**Palavras chave:** *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium adolescentis*, soro de leite, extrato hidrossolúvel de soja, bebida láctea fermentada.

## ABSTRACT

In order to increase the application of buffalo cheese whey and soymilk a fermented beverage from 35 % buffalo cheese whey, 30 % soymilk and 35 % cow milk was developed. The substrate mixture was then fermented by a mixed culture of *Lactobacillus casei shirota* and *Bifidobacterium adolescentis* since their concomitant use resulted both in a pleasant taste and flavoured product besides an expected association with health-promoting effects. The fermenter bacterial strains were previously grown in inoculation broth at 37° C for 48 and 60 h, respectively. The definitive fermentation step was then carried out at the same temperature for a shorter period of 8 h keeping a 1:5 proportion between the lactic and bifidobacteria within a 5 % inoculum amount. The fermented beverage following a light extraflavouring with vanilla essence was evaluated during a 28 days storage period at 4° C thus confirming the maintenance of its chemical, microbiological and sensorial stabilities. Albeit a slight variation in the acidity profile the desirable balance for the viable cells of the bacterial strains ( $6,8 \times 10^8$  cells/ mL for *L. casei* and  $2,3 \times 10^7$  cells/ mL for *B. adolescentis*) was found even at the end of the storage time. No negative changes were found in the sensorial characteristics of the fermented milky beverage allowing its good acceptability in all time course of the storage period.

**Key-words:** *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium adolescentis*, cheese whey, soymilk, fermented beverage.

## **1. INTRODUÇÃO**

As bebidas lácteas, por possuírem acidez mais baixa do que os iogurtes e se adaptarem melhor ao paladar do brasileiro, certamente revolucionaram o mercado de produtos lácteos desde seu lançamento a cerca de sete anos. A tendência para os próximos anos será de consumo crescente de produtos refrigerados, dentre os quais iogurtes e bebidas lácteas, cuja comercialização cresceu 162% nos últimos três anos (PARMALAT, 1997). Tal tendência em relação às bebidas lácteas deve-se principalmente à possibilidade de serem incorporados em sua formulação, subprodutos da indústria leiteira, como o soro de leite, de forma a diminuir a poluição ambiental que estes acarretam e proporcionar um produto de menor custo para o consumidor.

Assim como o soro de leite, a soja também é bastante utilizada na forma de leite de soja em substituição total ou parcial ao leite de vaca, pois além de apresentar qualidade nutricional semelhante, pode ser consumido por indivíduos intolerantes à lactose e apresenta custo três vezes menor do que o leite de vaca.

Entretanto, em virtude de seu sabor residual, os produtos à base de soja possuem aceitabilidade limitada pelos consumidores brasileiros. Uma das soluções para este problema é a fermentação, que melhora suas características organolépticas e sua qualidade nutricional devido à ação das enzimas produzidas que proporcionam maior digestibilidade. A fermentação também propicia a preservação de alimentos, pela produção de ácidos orgânicos e compostos bioativos que inibem a proliferação de microrganismos indesejáveis nos produtos à base de leite e extratos vegetais.

Aproximadamente, 25 % dos produtos lácteos fermentados comercializados no Japão e 12 % na França, utilizam culturas de bactérias intestinais selecionadas, denominados probióticos, produtos lácteos de terceira geração (VALENTIM *et al.*, 1994). O termo probiótico está fundamentado na ação exercida por alguns microrganismos sobre o trato intestinal, previnindo 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, 1993 citado por SEVERO, 1995).

## 1.2. OBJETIVOS

### 1.2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi a produção de bebida láctea fermentada com substituição parcial do leite de vaca por extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala, utilizando cultura mista de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

### 1.2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- 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 boas propriedades organolépticas e nutricionais, por culturas bacterianas que possam conferir características do tipo probióticas, contribuindo para a introdução do produto no mercado consumidor;
- a utilização de derivado da soja, em razão da grande produção desta leguminosa no Estado do Paraná, bem como de seu elevado valor nutricional e baixo custo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. LEITE**

#### **2.1.1. Produção e consumo mundiais de leite**

Mundialmente, o consumo de leite e derivados é bastante heterogêneo, variando de 36 litros ao ano por habitante, nos países em desenvolvimento, até 200 litros, nos países desenvolvidos, sendo o consumo mínimo estabelecido pelos especialistas de 150 litros ao ano (GARCIA, 1994).

A produção mundial de leite esperada para 1997 é de 386,9 bilhões de litros, com crescimento de 0,5 % superior ao de 1996 (PARANÁ, 1997a). Contudo, a disponibilidade de leite tende a um leve decréscimo, visto seu crescimento ser inferior ao da população mundial. Este decréscimo deve-se ao sistema de cotas estabelecido no Mercado Comum Europeu, onde há retirada gradativa dos subsídios e à crise no setor lácteo nos países do leste europeu. Com relação aos países em desenvolvimento, o crescimento expressivo na produção leiteira não é suficiente para atender a demanda, havendo conseqüentemente necessidade de importação de produtos lácteos (GARCIA, 1994; CHR HANSEN, 1997).

Na Tabela 1 está apresentada a produção mundial de leite distribuída por regiões.

**TABELA 1. Evolução da produção mundial de leite no período de 1995 a 1997.**

Regiões	Produção em bilhões de litros			
	1995	1996 *	1997**	96/97 (%) ***
União Europeia	121,8	121,3	120,5	-0,6
América do Norte	89,6	89,5	90,1	0,7
Leste Europeu	73,8	69,4	66,8	-1,7
América do Sul	30,8	32,8	35,2	7,4
Sul da Ásia	32,5	33,5	34,5	3,0
Oceânia	18,1	19,4	20,3	4,7
Ásia	14,1	14,8	15,4	4,1
Oeste Europeu	3,9	3,9	3,9	0
Total	384,7	384,7	386,8	0,5

\* estimativa

\*\* previsão

\*\*\* relação do aumento ou redução da produção leiteira entre 1996 e 1997

Fonte: PARANÁ (1997a).

Entre os países americanos, no que se refere aos litros de leite produzidos por habitante ao ano, somente cinco países são autosuficientes, encabeçados pelo Uruguai com 349 litros por habitante/ano, seguido pelo Canadá, Estados Unidos, Argentina e Costa Rica.

Entre os países do Mercosul, a Argentina e o Uruguai apresentam produções consideráveis de leite em relação ao número de habitantes, 201 L/ hab/ano e 349 L/ hab/ano, respectivamente, como mostra a Tabela 2.

**TABELA 2. Produção de leite em relação ao número de habitantes nos países do Mercosul.**

Países	Produção de leite (1.000 t.)	Habitantes (1.000)	L/ hab/ ano
Argentina	6.500	32.322	201
Brasil	14.228	150.368	94
Paraguai	205	4.277	47
Uruguai	1.050	3.014	349
Total	21.983	189.981	115

Fonte: GARCIA (1994).

## 2.2. LEITE DE BÚFALA

### 2.2.1. Bubalinocultura nacional e mundial

A exploração da bubalinocultura e dos produtos por ela gerados, justifica-se pela grande capacidade de adaptação destes animais a ambientes desfavoráveis, que ao contrário dos bovinos, desenvolvem-se em terrenos alagadiços ou areões e em pastos pobres, transformando forragens de baixa qualidade e restos de lavouras em carne e leite (RODACKI, 1996).

A domesticação de bubalinos data do ano de 2.500 antes de Cristo pelos povos da Ásia e antigo Egito, onde até a atualidade, estes animais servem às comunidades como força de trabalho ou alimento (PARANÁ, 1997b).

A população mundial de búfalos aumentou 1,5 % ao ano de 1982 a 1992, atingindo 148 milhões de cabeças, sendo 95 % deste total encontrado na Ásia, onde a Índia representa 53 % da população bubalina mundial, cujo número de cabeças encontrava-se em 1996 em torno de 82 milhões.

Seguidos à Índia, encontram-se a China e o Paquistão, com o segundo e o terceiro maiores rebanhos de búfalos do mundo, como pode ser observado na Tabela 3 (LIGDA, 1997).

**TABELA 3. População mundial de búfalos nos principais países criadores em 1996.**

Países	Nº de cabeças (milhares)
Índia	80.000
China, Tailândia, Filipinas	54.500
Paquistão	14.000
Brasil	2.200
Romênia	272
Itália	177
População mundial	151.338,73

Fonte: PARANÁ (1997b).

O rebanho nacional de bubalinos ocupa posição importante no panorama mundial e está estimado em 2 milhões de cabeças, esperando-se que atinga 50 milhões nos próximos 25 anos. O Estado do Pará, mais precisamente a Ilha de Marajó, possui o maior número de cabeças, visto a bubalinocultura brasileira ter iniciado nesta região, como mostrado na Tabela 4.

No Estado do Paraná, a bubalinocultura apresenta-se distribuída em todas as regiões, com rebanho estimado de 120 mil cabeças e crescimento anual de 7 %, enquanto o rebanho bovino apresenta crescimento de 1,5 % ao ano. A região litorânea representa 10 % do total do rebanho bubalino no estado (RODACKI, 1996).

**TABELA 4. Rebanho nacional de bubalinos nos maiores estados criadores em 1996.**

Estados	Nº de cabeças
Pará	745.684
Amapá	93.835
Maranhão	83.111
Paraná	80.217
Rio Grande do Sul	71.441
São Paulo	53.611
Goiás	49.092
População nacional	1.446.720

Fonte: PARANÁ (1997b).

Na Tabela 5 estão descritas as regiões do Estado do Paraná com maior população de bubalinos e seu respectivo número de cabeças.

**TABELA 5. Rebanho paranaense de bubalinos em 1994.**

Município	Nº de cabeças
Ortigueira	11.600
Tibagi	10.900
Antonina	7.200
Guaraqueçaba	6.450
Umuarama	3.375
Arapoti	2.725

Fonte: PARANÁ (1997b).

### 2.2.2. Produção de leite de búfala

Do total de leite produzido no mundo, mais de 9 % é de origem bubalina. Em 1992, a produção mundial de leite de búfala alcançou 45,3 milhões de toneladas/ano, ao passo que em 1982 era de 30,7 milhões de toneladas/ano, resultando em um aumento de 3,8 % ao ano. A Índia é o maior produtor mundial do leite com produção de 29,3 milhões de toneladas em 1992 (LIGDA, 1997), em contrapartida, não existem dados oficiais sobre a produção brasileira de leite de búfala, sendo que média de produção por animal obtida por VILLARES *et al.* (1983) variou de 1.184,9 a 1.329,5 Kg/ano, podendo ultrapassar 4.500 Kg/ano mediante tratamento adequado (FERNANDES, 1979).

No Brasil, considerando o crescimento da bubalinocultura, o leite de búfala poderá constituir, em futuro próximo, grande fonte complementar de proteína animal, a exemplo da Índia, onde há três vacas para cada búfala, cuja produção representa 60 % do total (RAMOS, 1991).

### 2.2.3. Características do leite de búfala

O leite de búfala não apresenta restrições, tanto para consumo “in natura”, como para industrialização, sendo seus subprodutos de qualidade superior aos provenientes do leite de outras espécies, haja vista seu maior teor em gordura e sólidos totais (RAMOS, 1991), como é mostrado na Tabela 6.

Apesar de seu alto teor de gordura, o leite de búfala apresenta concentração em colesterol inferior à do leite de vaca (212-275 mg/100 g e 280-380 mg/100 g, respectivamente). A gordura do leite de búfala apresenta-se sob a forma de glóbulos com diâmetro de 4,15 a 4,60 nm, maiores que os do leite bovino cujo diâmetro varia de 3,36 a 4,15 nm.

**TABELA 6. Composição química média comparativa do leite de diferentes espécies.**

Componentes (%)	Espécie				
	Búfala	Vaca	Humana	Cabra	Ovelha
Água	82,8	87,3	87,1	86,7	82,0
Gordura	7,4	3,9	4,5	4,5	7,2
Caseína	3,2	2,6	0,4	2,6	3,9
Proteínas do soro	0,6	0,6	0,5	0,6	0,7
Lactose	4,8	4,6	7,1	4,3	4,8
Cinzas	0,8	0,7	0,2	0,8	0,9

Fonte: WALSTRA & JENNESS (1984).

A composição em ácidos graxos do leite de búfala difere da do leite de vaca, sendo pobre em ácidos graxos saturados de 6 a 16 átomos de carbono e abundante em ácidos insaturados. Do total de 45 ácidos graxos encontrados na gordura do leite de búfala, o ácido palmítico (C16) representa cerca de 33,08 %, o ácido oléico 25 a 30 % e o ácido butírico juntamente com o ácido esteárico, 4,36 %, por sua vez, os ácidos caprílico, cáprico e láurico são encontrados em quantidades inferiores a dos leites de outras espécies (CITRO, 1992).

No leite de búfala, a caseína constitui cerca de 80 % do total de proteínas (Tabela 7) e apresenta-se totalmente sob a forma micelar, com dimensão de 110 a 160 nm, diferindo da caseína bovina onde cerca de 90 a 95 % está na forma micelar e o restante no soro, cuja dimensão é de 70 a 110 nm. As concentrações em nitrogênio, cálcio e fósforo protéico no leite de búfala são de 12; 3,5 e 4,5 mg % respectivamente (CITRO, 1992).

**TABELA 7. Distribuição dos compostos nitrogenados no leite de búfala e no leite de vaca.**

Frações de nitrogênio	Leite de búfala			Leite de vaca		
	N mg/100mL	N total (%)	Proteína total (%)	N mg/100mL	N total (%)	Proteína total (%)
Total	609	100	-	573	100	-
Protéico	573	94	100	542	94,6	100
Caseína	460	76	80	437	76	80,5
Lactoalbumina	48	8	8	39	6,8	7,1
Lactoglobulina	37	6	6	36	6,3	6,7
Proteose-peptona	31	5	5	29	5,1	5,4
Não protéico	35	5,7	-	31	5,4	-

Fonte: CITRO (1992).

O odor e sabor do leite de búfala são característicos, sendo este último mais doce e cremoso ao paladar do que o leite de vaca, ao passo que sua coloração branco-porcelana com reflexos verde azulados é caracterizada pela ausência do pigmento amarelo caroteno, precursor da vitamina A e por pigmento de origem biliar identificado na biliverdina, substância abundante neste leite. Contudo, o teor de vitamina A no leite de búfala é ligeiramente superior ao do leite de vaca, provavelmente devido à conversão do caroteno presente na dieta em vitamina A (CITRO, 1993; LIGDA, 1981), como pode ser observado na Tabela 8.

**TABELA 8. Composição em vitaminas e minerais dos leites de búfala e de vaca.**

Componentes (mg/ 100 mL de leite)	Leite de búfala	Leite de vaca
Vitamina A *	9,5	9,2
Tiamina **	0,50	0,45
Riboflavina **	1,07	1,49
Vitamina C	2,97	2,56
Ca	203,0	102,1
Mg	18,5	11,5
Na	50,15	50,0
K	108,5	148,0
Fosfato	129,3	95,0
Citrato	160-200	166
Cl	65-82	106

\* mg/ g de gordura

\*\* mg/ mL de leite

Fonte: FEDERACITE (1994).

Na elaboração de laticínios, o leite de búfala apresenta rendimento industrial 40 % superior ao do leite de vaca, pois para a fabricação de 1 Kg de manteiga são necessários 20 Kg de leite de vaca e apenas 14 Kg de leite de búfala e para a produção de 1 Kg queijo frescal utiliza-se 6,5 Kg de leite de vaca ou 4,5 Kg de leite de búfala (SANTOS, 1997). Apesar de apresentar rendimento industrial para a fabricação de derivados 100 % superior ao do leite bovino, o leite de búfala atinge preço apenas 15 a 20 % superior (BERNARDES & BERNARDES, 1989).

Na Itália, o leite de búfala é totalmente destinado à industrialização, essencialmente para a produção da “mozzarella”, queijo fresco de massa filada, originário da região de Caserta e Salerno.

O leite de búfala é também utilizado para a produção de vários tipos de queijo, como “cheddar”, “roquefort”, provolone (curado), “scamorza” (semi-fresco, meio curado), “mascarpone” (queijo de creme de leite) e “stracchino” (frescal) (CITRO, 1993).

Entre os diversos alimentos à base de leite de búfala, encontra-se uma mistura de “tofu”, tipo de queijo de soja e leite de búfala, que pode ser servido frito ou não, alimento muito popular na Índia (PARMAR *et al.*, 1989).

### 2.3. SORO DE LEITE

O soro de leite ou lactossoro é um líquido obtido da coagulação do leite na elaboração dos queijos, logo após a separação da coalhada (caseína) e da gordura. O soro de leite também pode ser definido como a fase aquosa separada da coalhada, no processo de elaboração do queijo e na produção de caseína (SPREER, 1991). No leite, o soro representa de 80-90 % do volume total que entra no processo industrial e contém em torno 6 a 6,4 % de extrato seco, cerca de 50 % dos nutrientes do leite original, como proteínas solúveis, lactose, vitaminas e sais minerais. Apesar do grande valor nutritivo, o soro de queijaria foi considerado durante muito tempo um subproduto sem utilidade (ALFA LAVAL FOOD, 1990). Comumente, de acordo com o método utilizado para a fabricação de queijos, existem dois tipos de soro:

#### a) Lactossoro doce

Resulta, segundo ALAIS (1984), da coagulação de leites não ácidos pela ação do coalho. Sua acidez varia de 15 a 25 graus Dornic ( $^{\circ}$  D) de acordo com os procedimentos utilizados. O soro de leite doce contém restos de coalho ativo, matéria graxa e um grande número de bactérias procedentes sobretudo do crescimento do fermento láctico, durante a fabricação do queijo. Apresenta pH próximo a 6,2 e é obtido à temperatura em torno de 38 $^{\circ}$  C (ROLLAND, 1991).

Na coagulação do leite por ação do coalho, o complexo caseína-cálcio desdobra-se em paracaseinato de cálcio e proteínas do soro, ficando o cálcio unido às proteínas coaguladas (SPREER, 1991).

#### b) Lactossoro ácido

SPREER (1991) cita que o soro ácido é obtido da fabricação de queijos frescos ou de pasta branda, ou ainda da fabricação de caseína láctica, apresentando acidez de 120° 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 lactossoro ácido assim formado contém grande quantidade de lactato de cálcio e conteúdo de extrato seco variando entre 4,5 e 5,5 %. Um outro tipo de lactossoro industrial é obtido mediante a coagulação das proteínas do leite pelo emprego de outros ácidos, como o ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido acético (ROLLAND, 1991).

#### 2.3.1. Composição química do soro de leite

A composição aproximada do soro proveniente da elaboração de queijos e do soro procedente da produção de caseína está ilustrada na Tabela 9, assim como os valores apresentados por SPREER (1991) e ALAIS (1984) para o lactossoro fresco.

O soro de leite contém apreciável quantidade de proteínas e de lactose, com especial importância para os processos fermentativos, nos quais esta é utilizada como fonte de carbono de baixo custo. Além disto, o soro apresenta considerável teor de vitaminas e sais minerais conforme apresentado na Tabela 10.

**TABELA 9. Composição química do soro de leite.**

Componentes (%)	SPREER		ALAIS	
	Soro doce	Soro Ácido	Soro doce	Soro Ácido
Água	93 – 94	94 – 95	93,5	93,5
Extrato seco	6 – 7	5 – 6	-	-
Lactose	4,5 - 5,0	3,8 - 4,2	4,5	4,0
Proteínas	0,8 - 1,0	0,8 - 1,0	0,9	1,0
Cinzas	0,5 - 0,7	0,7 - 0,8	-	-
Gorduras	-	-	0,3	0,1
Ácido láctico	Traços	até 8,0	0,2	0,6 - 1,0
pH	6,45	perto de 5	-	-
Densidade a 20°C	1,025-1,020	1,027	-	-

(-) valores não indicados.

Fonte: ALAIS (1984); SPREER (1991).

As proteínas do soro, que constituem aproximadamente 13 % dos sólidos secos do mesmo, apresentam considerável valor nutricional, o qual juntamente com o valor energético e dietético da lactose e das vitaminas do complexo B fazem do soro um produto altamente atrativo (ROLLAND, 1991).

**TABELA 10.** Conteúdo de vitaminas e sais minerais do soro de leite.

Componentes (%)	Quantidades
Minerais	0,55
Potássio	0,147
Cálcio	0,043
Fósforo	0,040
Sódio	0,060
Riboflavina (mg/ Kg)	1,20
Niacina (mg/ Kg)	0,85
Ácido pantotênico (mg/ Kg)	3,4
Tiamina (mg/ Kg)	0,4

Fonte: ROLLAND (1991).

As proteínas do soro de leite são basicamente a  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina (Tabela 11). Apresentam alto valor nutritivo, especialmente a  $\alpha$ -lactoalbumina, cuja composição em aminoácidos é muito próxima da composição considerada biologicamente ótima (ALFA LAVAL FOOD, 1990).

**TABELA 11.** Composição protéica do soro no leite integral.

Tipo de proteína	Valores ( %)
Proteínas totais	18
Soroalbuminas bovinas	1
$\beta$ -lactoglobulinas	10
$\alpha$ -lactoalbuminas	4
Imunoglobulinas	3

Fonte: SÁ & BARBOSA (1990).

A  $\alpha$ -lactoalbumina é considerada como a típica proteína do soro de leite e está presente no leite de todos os mamíferos. A  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína mais abundante no soro de leite bovino. Quando o leite é aquecido acima de 60º C, inicia-se uma série de reações, nas quais a reatividade do aminoácido sulfurado da  $\beta$ -lactoglobulina tem papel dominante. A altas temperaturas, os compostos que contêm enxofre, como o sulfeto de hidrogênio, são liberados gradualmente, sendo responsáveis pelo sabor de cozido do leite tratado termicamente (VEISSEYRE, 1988; SPREER, 1991).

As proteínas do soro de leite são desnaturadas pelo calor e não precipitam em seus pontos isoelétricos. No entanto, polieletrolitos, como a carboximetilcelulose, apresentam essa propriedade. Em processos industriais, onde as proteínas do soro são recuperadas, freqüentemente utilizam-se tais substâncias, ou uma combinação das mesmas com o calor e ajuste de pH. Quando se aquece o leite, parte das proteínas do soro formam complexos desnaturados com a caseína, diminuindo a capacidade da caseína de permitir o ataque do coalho e se ligar ao cálcio. A coalhada de queijaria, quando aquecida a altas temperaturas, não libera soro como ocorre normalmente, em virtude do menor número de enlaces da caseína entre as moléculas da proteína (SPREER, 1991).

As soroalbuminas do soro de leite apresentam peso molecular elevado e identificam-se com a soroalbumina sanguínea, sendo bastante solúveis em água. As imunoglobulinas e proteínas relacionadas são muito heterogêneas e um mínimo de seus componentes têm sido estudado de forma precisa. Acredita-se que muitas substâncias de importância serão provavelmente comercializadas à partir do soro de leite ou soro de queijaria. A lactoferrina e a lactoperoxidase são substâncias de possível utilização em medicina e na indústria alimentícia.

A lactose é o principal constituinte do soro, representando cerca de 70 % de seu extrato seco. É um dissacarídio composto pelos monossacarídios glucose e galactose. A lactose não é tão doce quanto os outros tipos de açúcares, porém sua hidrólise origina compostos de doçura consideravelmente maior. O desdobramento da lactose se realiza por hidrólise enzimática, com a eliminação de uma molécula de água. A enzima que desdobra a lactose, chamada  $\beta$ -galactosidase, pertence ao grupo das hidrolases. Indivíduos que carecem desta enzima são portanto impossibilitados de ingerir produtos lácteos e apresentam o distúrbio denominado intolerância à lactose (SÁ & BARBOSA, 1990).

### 2.3.2. Subprodutos do soro de leite

Apesar de conter nutrientes valiosos, apenas recentemente têm surgido novos processos comerciais para a fabricação de produtos de alta qualidade à partir do soro de leite. Independente do tratamento posterior, é conveniente que se efetue a separação da gordura e finos da caseína do soro de leite. Isto se faz, em parte, para aumentar o rendimento econômico e também porque estes constituintes podem interferir em tratamentos posteriores (ALFA LAVAL FOOD, 1990).

O diagrama de blocos da FIGURA 1 ilustra alguns dos diversos processos utilizados para o tratamento do soro e os produtos finais obtidos do mesmo.

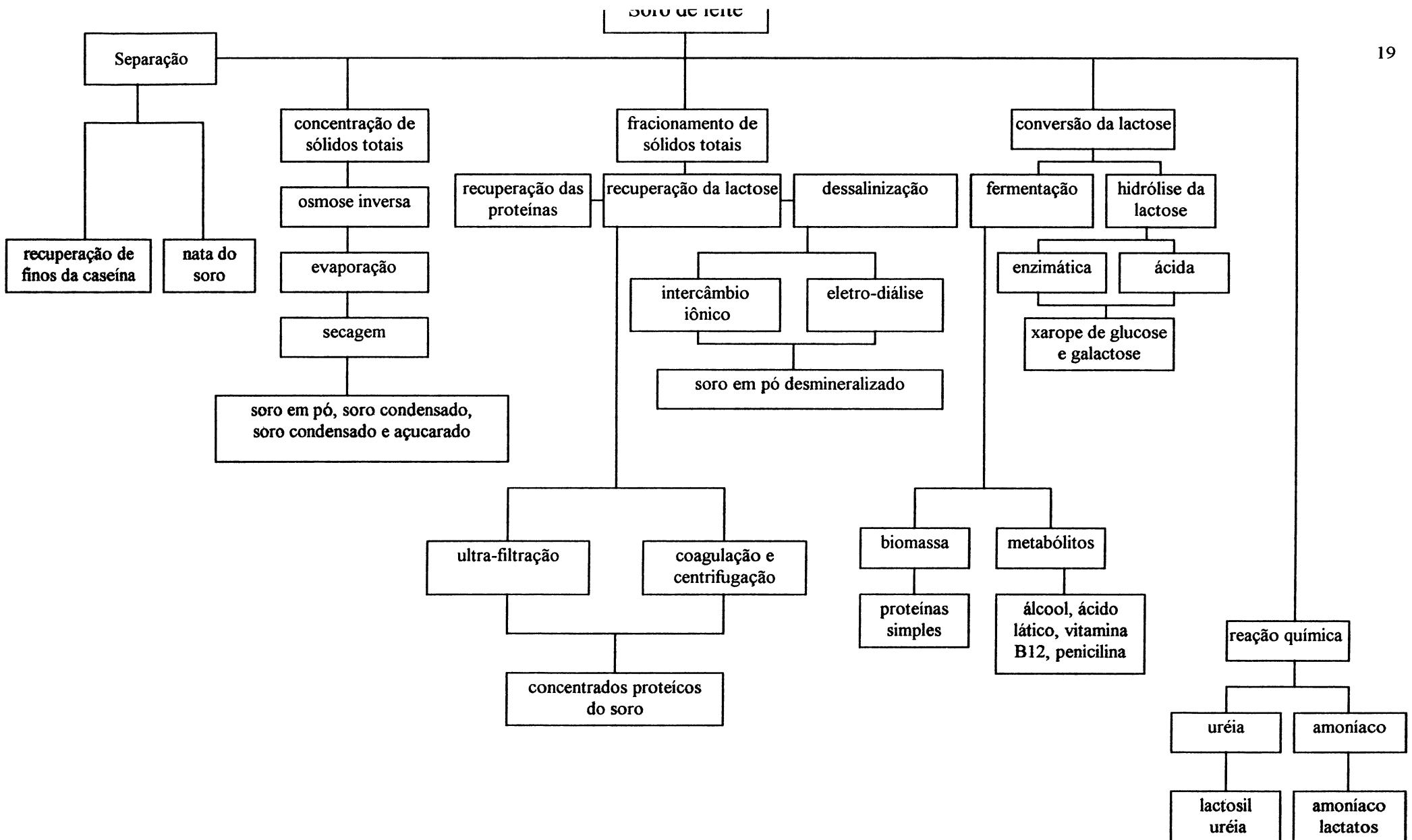


FIGURA 1. Processos de tratamento e transformação do soro de leite.

Fonte: ALFA LAVAL FOOD (1990).

Revisão Bibliográfica

### 2.3.3. Utilização do soro de leite

Na atualidade, o soro de leite ou lactossoro é utilizado nas mais variadas indústrias, porém ainda em pequena escala. O Quadro 1 apresenta as utilizações do soro de leite.

#### **QUADRO 1. Principais usos do soro de leite.**

1. Desnatado, extração do creme (manteiga de soro)
2. Lactossoro líquido
  - a. Alimentação animal (especialmente suínos)
  - b. Alimentação humana
    - bebidas fermentadas ou aromatizadas
    - preparo de biscoitos, sorvetes
3. Lactossoro concentrado ou dessecado (xarope, pasta e lactossoro 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 (“Serac”, lactoalbumina)
    - 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. Lactossoro sem uma parte de lactose
  - c. Extração de proteínas
  - d. Lactossoro 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 alcoólicas, “cerveja de soro”
  - g. Solvente industrial, indústria química
  - h. Fermentação por bactérias acéticas (vinagre de soro)
7. Lactossoro fermentado por cultivo com leveduras de padaria
  - a. Produto concentrado ou dessecado para alimentação animal
8. Obtenção de vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina), extraída de diversas águas mães

Fonte: ALAIS (1984).

### 2.3.4. Produção e custos do soro de leite

O lactossoro foi considerado por muito tempo um produto residual sem qualquer utilidade, exceto como suplemento para a ração de animais. Sendo um subproduto rico em componentes valiosos, seu aproveitamento é economicamente importante como matéria-prima; para a obtenção de componentes lácteos de alto valor para serem utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e como alimento para gado; e para a redução de suas concentrações nas águas residuais, diminuindo o DBO<sub>5</sub>, visto que este é de 30.000 a 60.000 mg de O<sub>2</sub> por litro de água residual.

No início dos anos 90, na Alemanha eram produzidos anualmente 1.600.000 t. de soro doce e ácido que continham aproximadamente 74.000 t. de lactose, 12.000 t. de proteínas séricas, 10.000 t. de sais minerais e 7.000 t. de gordura. Numerosos estudos estão sendo realizados no sentido de obter melhor aproveitamento do lactossoro, haja vista que o custo de produção da matéria-prima lactossoro é praticamente nulo, pois como um subproduto invariavelmente presente nas indústrias de laticínios, pode ser melhor explorado e valorizado economicamente. (SPREER, 1991).

O consumo bioquímico total de oxigênio expresso como DBO<sub>5</sub>, corresponde exclusivamente às necessidades para desdobrar a lactose do soro de leite. A fermentação da lactose por microrganismos possibilita uma considerável redução da DBO<sub>5</sub> (SPREER, 1991).

## 2.4. SORO DE LEITE DE BÚFALA

Apesar de seu alto valor nutritivo, no Brasil, o soro de leite de búfala não tem sido aproveitado pela indústria alimentícia e tão pouco estudado como matéria-prima para fabricação de alimentos ou bebidas. O valor nutricional do soro de leite de búfala pode ser observado na Tabela 12.

**TABELA 12.** Composição química do soro de leite de búfala.

Componentes	Valores ( %)
Água	92,5
Proteínas	1,2
Lactose	5,5
Matéria graxa	0,5
Cinzas	0,3
Acidez em ácido láctico	0,15
pH	6,3

Fonte: CABRERA *et al.* (1995).

Mundialmente, são poucos os estudos sobre a utilização deste soro como alimento para consumo humano. Na literatura consultada, algumas das utilizações estão descritas a seguir.

O soro de leite de búfala pode ser utilizado para a fabricação de ricota por meio de precipitação ácida e sob calor do soro ou da mistura de soro e leite desnatado de búfala, consistindo em produto dietético com pouca matéria graxa e sal (FURTADO em VAN DENDER, 1989). Na Itália, é produzido o soro fermentado “siero innesto” com soro de “mozzarella”, típico queijo de búfala, mantido sem refrigeração por 1 ou 2 dias até obter acidez de 65-90° D, resultante da ação de bactérias lácticas nele presentes (CITRO, 1993).

CABRERA *et al.* (1995) estudaram dois diferentes métodos para a produção de alimento à base de soro de leite de búfala. O soro de queijaria cujo pH era 6,3, contendo 1,2 % de proteína, 5,5 % de lactose e 0,5 % de gordura recebeu adição de CaCl<sub>2</sub> e aquecimento de 80-90° C por 20-30 minutos. O outro método consistiu do ajuste do pH para 4,16-5,44 pela adição de ácido cítrico, seguido de aquecimento em diferentes combinações de temperatura e tempo variando de 85°C por 10 minutos, 90°C por 20 minutos e 95°C por 30 minutos.

As amostras foram então centrifugadas e o concentrado seco e pesado, com subsequente adição de creme para resultar em produtos com conteúdo de gordura de 10, 15 e 20 % e conteúdo de sal de 2,0-2,5 %. Após avaliação sensorial, o produto de maior aceitabilidade foi aquele que continha 20 % de gordura e realizado pelo segundo método, sendo máximo o tempo de prateleira de 6 dias a 4-6° C (CABRERA *et al.*, 1995).

A manufatura de alimento infantil à base de soro e leite de búfala com teor de cinzas semelhante ao do leite humano foi desenvolvida por SINGH & MATHUR (1989). O processo envolveu a desmineralização por eletrodialise do leite desnatado concentrado, soro concentrado e mistura de soro e leite de búfala concentrados (35 % de sólidos totais) na proporção de 15:85, obtendo-se performance ótima de 50 % de desmineralização das matérias-primas estudadas, tornando possível seu uso em alimentos infantis, por apresentar alto valor nutricional e teor de minerais semelhante ao do leite humano.

As propriedades funcionais de emulsificação e formação de creme das proteínas do soro de leite de búfala foram estudadas em comparação as do soro de leite de vaca, utilizando processo de ultrafiltração e uso de carboximetilcelulose. As proteínas do soro de leite de búfala obtiveram para ambos os processos maior capacidade de emulsificação e formação de creme que as do soro de leite de vaca, sendo que com o uso de carboximetilcelulose, as proteínas do soro de búfala apresentaram-se mais estáveis e com maior capacidade de emulsificação (MAHRAN *et al.*, 1992).

## 2.5. SOJA

A soja, *Glycine max L.*, é a mais importante oleaginosa em produção sob cultivo extensivo, cuja produção de proteína por hectare supera qualquer outra planta em cultivo. Pertence à família Leguminaceae, subfamília Papilionacea e tribo Faseolacea, caracterizando-se como planta anual, raramente perene (GOMES, 1986).

Originária do leste asiático, é conhecida pelo homem há mais de 5.000 anos, embora os primeiros registros de sua existência datem de 814 a.C., fazendo parte do grupo dos cinco grãos sagrados (“Wu Ku”) juntamente com o arroz, trigo, cevada e sorgo. Introduzida na Europa pelos holandeses em meados do século XVIII, seu cultivo despertou interesse agronômico no início no século IX. No Brasil, a primeira referência sobre soja data de 1882, quando cultivada na Bahia (GOMES, 1986; PARANÁ, 1996).

Atualmente, a soja é a mais importante das oleaginosas e responsável por 50 % da produção mundial, conforme mostra a Tabela 13. Isto se deve a sua versatilidade para uso industrial principalmente em alimentos elaborados e facilidade de cultivo, inferior somente às palmas em competitividade de mercado.

**TABELA 13. Evolução da produção mundial de oleaginosas.**

Oleaginosas	Produção (milhões t.)					
	1992/1993	1993/1994	1994/1995	1995/1996	1996/1997*	Participação média (%) **
Soja	117,30	117,53	137,74	123,62	131,66	51,2
Algodão	31,60	29,48	33,02	34,35	33,59	13,2
Amendoim	23,08	24,00	26,28	25,94	26,35	10,3
Girassol	21,31	20,73	23,50	23,50	25,78	9,4
Colza	25,31	26,74	30,28	29,82	34,58	12,0
Copra	4,92	4,97	5,47	5,14	5,00	2,1
Palita	4,00	4,25	4,54	4,96	4,70	1,8
Total	227,52	227,70	260,63	253,98	254,76	100,0

\*estimativa.

\*\* participação de cada oleaginosa na produção total.

Fonte: PARANÁ (1996).

Entre os países grandes produtores de soja, os Estados Unidos participam com quase a metade de toda produção mundial, o Brasil ocupa a segunda posição, enquanto a China e a Argentina alternam-se entre a terceira e quarta posições, mostradas na Tabela 14. Entre os países citados, o Brasil possui o maior potencial de expansão na produção, cuja comercialização está direcionada aos mercados dos países desenvolvidos.

Entre os países sul americanos, os principais produtores de soja são Brasil, Argentina, Paraguai, Equador, Colômbia, Bolívia, Peru e Chile (NOGUEIRA *et al.*, 1981).

No Brasil, o Estado do Paraná é o maior produtor nacional de soja, seguido pelo Rio Grande do Sul e Mato Grosso, cujas produções estão na Tabela 15.

**TABELA 14. Produção mundial de soja distribuída por país.**

Países	Produção 1996/97 *	Participação média (%)
		**
Estados Unidos	62,59	47,5
Brasil	26,00	19,7
Argentina	13,50	10,2
China	13,30	10,1
Paraguai	2,50	1,8
União Européia	0,99	0,7
Outros	12,78	9,7
Total	131,66	100,0

\* estimativa.

\*\* participação de cada país na produção mundial de soja.

Fonte: PARANÁ (1996).

**TABELA 15. Participação dos principais estados produtores de soja no panorama de produção nacional.**

Estados	Produção 1996/97	Participação média
	(milhões t.) *	(%) **
Paraná	6,4	23,2
Rio Grande do Sul	5,9	22,5
Mato Grosso	5,3	20,4
Mato Grosso do Sul	2,3	9,2

\* estimativa.

\*\* participação de cada estado na produção nacional de soja.

Fonte: PARANÁ (1996).

#### 2.5.1. Composição química da soja

Muitos países em desenvolvimento utilizam as proteínas, carboidratos e gorduras vegetais como fonte de alimento para o ser humano. A soja é a leguminosa mais relevante da Ásia e América, sendo na Ásia uma das mais importantes fontes de proteínas e gorduras, diferenciando-se de outras leguminosas por seu alto teor protéico e baixo teor de amido (SPREER, 1991).

A escassez de alimentos de origem animal existente em muitos países principalmente aqueles em desenvolvimento e a maior rentabilidade econômica na obtenção de nutrientes vegetais são as principais causas, nos últimos anos, do aparecimento de um grande número de produtos de origem vegetal similares ao leite, os quais são fabricados visando a substituição total ou parcial do leite de vaca na alimentação humana.

Em razão do alto teor protéico e conteúdo graxo, a soja é considerada um alimento de primeira ordem do ponto de vista nutricional.

A proteína da soja apresenta teor de aminoácidos essenciais mais elevado do que várias outras proteínas vegetais e animais, sendo rica em lisina, leucina, isoleucina, arginina, ácido glutâmico e ácido aspártico, embora seja deficiente em aminoácidos sulfurados como metionina, cisteína e cistina (SPREER, 1991; HÜHN & PINHEIRO, 1980).

As globulinas da soja, embora diferenciem-se das proteínas animais quanto à sua composição química, são perfeitamente comparáveis a estas quanto à coagulação por ácidos diluídos, sendo também atacadas por fermentos lácticos (GOMES, 1986). A Tabela 16 mostra a composição química dos grãos de soja.

**TABELA 16. Composição química da soja.**

Componentes (%)	CAMPESE	MEISSL & BOCKER
Água	9,50	10,00
Globulina solúvel	30,00	30,00
Globulina insolúvel	7,50	7,50
Albumina	0,50	0,50
Óleo	18,50	18,00
Lecitina	1,50	-
Colesterina, resina, cera	0,50	2,00 (inclui lecitina)
Dextrina	10,00	10,00
Amido	4,00	5,00
Celulose	6,00	5,00
Cinzas	5,0	-

(-) valores não indicados

Fonte: GOMES (1986).

Os açúcares presentes nos grãos de soja encontram-se na forma de monossacarídeos, hemiceluloses e na sua maior parte, oligossacarídeos. Dentre estes últimos, a sacarose é o principal composto representando 5 % do total, seguida de estaquiose, 3,8 % e rafinose, 1,1 %. Os monossacarídeos são glucose, 0,006 % e arabinose, 0,0015 % e entre as hemiceluloses estão a arabana e arabinogalactana (ANGELES & MARTH, 1970).

A presença de ácido mágico nos produtos de oxidação do açúcar da soja, o aproxima da lactose e o afasta da sacarose. O açúcar da soja é talvez idêntico ao galactano que origina a galactose por hidrólise e ácido mágico por oxidação, desta forma, a origem da lactose deve relacionar-se com os galactanos existentes em muitas leguminosas. Nestas condições, o açúcar da soja apresenta grande analogia com a lactose (GOMES, 1986).

A parte lipídica da soja é rica em ácido linoléico e linolênico, ácidos graxos insaturados essenciais, que podem reduzir os níveis de colesterol no sangue humano (MOHAMED & RANGAPPA, 1992).

A composição em minerais mínima e máxima de algumas cultivares de soja produzidas no Brasil estão apresentadas na Tabela 17.

**TABELA 17. Variação no conteúdo de minerais em cultivares de soja.**

Minerais	Quantidades (mg/100 g)	
	Mínima	Máxima
Potássio	1.710	2.120
Fósforo	610	1.030
Magnésio	180	230
Cálcio	170	270
Ferro	10,2	17,8
Zinco	2,8	6,8
Manganês	2,2	4,8
Cobre	1,1	2,7

Fonte: MANDARINO *et al.* (1992).

Dos grãos de soja se extrai um grande número de subprodutos com as mais variadas finalidades conforme é mostrado no Quadro 2.

#### **QUADRO 2. Principais utilidades da soja.**

Sementes	Farinha	Adubo Sucedâneo da celulose Alimento para o homem (macarrão, pão, bolachas) Goma Caseína vegetal Tintas a água Alimento para gado
	Óleo	Glicerina Esmaltes Azeite culinário (sucedâneo da manteiga, da banha, azeite alimentício, azeite para saladas) Verniz Lacas Linóleo Artigos impermeáveis Tintas Sabão Celulóide Sucedâneo da borracha Tintas de impressão Óleo e graxa lubrificantes Óleo combustível Velas Lecitinas Azeite de iluminação Oleados Desinfetantes Óleo margarina
	Semente verde	Verdura Conserva enlatada Salada
	Semente seca	Alimento para o gado Torradas Sopas Molho de soja Sucedâneo do café Leite vegetal (em pó, coalhado, condensado, fresco) Bebidas

Fonte: GOMES (1986).

A partir da soja, é possível ainda obter produtos da mistura da sua farinha com carne e os produtos tradicionais como “shoyo”, “miso”, “tempeh” e “tofu”, conhecido como queijo de soja (COSTA, 1981).

Embora apresente inegável valor nutritivo, a soja possui alguns fatores antinutricionais, tais como a antitripsina, as hemaglutininas, as saponinas e os agentes bocigênicos (HÜHN & PINHEIRO, 1980; ANTUNES & SGARBIERI, 1981), cujas propriedades estão descritas a seguir.

a) Antitripsina:

A antitripsina, como define seu nome, é inibidora da tripsina e o fator da soja mais estudado e conhecido. Atua inibindo a ação proteolítica da tripsina, enzima digestiva presente no trato intestinal do homem e dos animais, resultando em pobre digestão e absorção dos nutrientes da dieta. Caracterizada como uma proteína termolábil, a antitripsina possui peso molecular de 24.000 Da, espectro de absorção máxima a 280 nm e ponto isoelétrico em pH 4,5. As proteínas da farinha de soja apresentam eficiência inversamente proporcional à presença do fator antitripsina. No tratamento térmico da farinha de soja a 120° C por 10 minutos, o valor biológico de suas proteínas torna-se máximo (ANTUNES & SGARBIERI, 1981).

b) Hemaglutininas:

As hemaglutininas, glicoproteínas amplamente distribuídas no reino vegetal, especialmente nas leguminosas, possuem a propriedade de aglutinar os eritrócitos sanguíneos do homem e dos animais. Essas glicoproteínas presentes na soja apresentam elevados pesos moleculares, próximos a 110.000 Da, porém são termolábeis e portanto, rapidamente inativadas pelo calor seco ou úmido.

c) Saponinas:

Ao lado da hemaglutininas, as saponinas possuem a capacidade de romper os eritrócitos, sendo também inativadas pelo tratamento térmico da soja ou por hidrólise com solução ácida (ANTUNES & SGARBIERI, 1981).

d) Agentes bocigênicos:

Embora não tenham sido isolados da soja, alguns dados revelaram que produtos de soja tratados termicamente de maneira inadequada teriam gerado hipertrofia da glândula tireóide em animais de laboratório, em razão da presença de agentes bocigênicos.

A urease, enzima presente em grandes quantidades na soja não é considerada agente antinutricional, porém produz sabor desagradável nos alimentos quando são suplementados com uréia, em virtude de seu desdobramento e transformação em NH<sub>3</sub> e CO<sub>2</sub> (ANTUNES & SGARBIERI, 1981).

A flatulência causada pelo acúmulo de gases no trato intestinal também é atribuída ao consumo da soja e derivados, em virtude da dificuldade de hidrólise e absorção de alguns carboidratos, como rafinose e estaquiose contidos no grão. Porém, a formação de gases intestinais é característica individual, não ocorrendo em indivíduos habituados ao consumo da soja e outras leguminosas (SGARBIERI, 1987).

#### 2.5.2. Extrato hidrossolúvel de soja

A elaboração de extratos aquosos protéicos à base de proteínas de oleaginosas como substitutos lácteos representa alternativa tecnológica viável devido à qualidade nutricional destas proteínas e à sua fácil disponibilidade. O extrato hidrossolúvel de soja ou leite de soja é um produto líquido, de grande valor nutritivo, obtido industrialmente dos componentes da soja, cuja composição, aspecto e sabor são similares aos do leite de vaca (COSTA, 1981; SPREER, 1991).

O extrato hidrossolúvel de soja caracteriza-se por ser um líquido homogêneo, que não forma depósitos, ferve a 101° C, apresenta cheiro de malte, pH ácido, sendo coagulado por coalhos, ácidos e sais, podendo apresentar teor de ácido láctico de até 1 % quando fermentado (GOMES, 1986).

#### *2.5.2.1. Composição química do extrato hidrossolúvel de soja*

O extrato hidrossolúvel de soja apresenta conteúdo protéico basicamente formado por albuminas e globulinas. Cerca de 80 % das vitaminas do complexo B contidas no leite de vaca são fornecidas no consumo do leite de soja (SALOMON *et al.*, 1981). A composição química do extrato hidrossolúvel de soja está apresentada na Tabela 18.

**TABELA 18. Composição química do leite de soja.**

Componentes (%)	GOMES	SPREER
Água	89,58	90,40
Proteína	5,76	3,60
Gordura	2,46	3,00
Açúcares	1,40	3,0
Cinzas	0,80	-

Fonte: GOMES (1986); SPREER (1991).

Devido ao seu alto conteúdo protéico, o extrato hidrossolúvel de soja pode ser utilizado como substituto do leite de vaca em indivíduos intolerantes a este, apresentando valores nutricionais semelhantes, como mostra a Tabela 19.

**TABELA 19. Composição do leite de soja em relação ao leite de vaca.**

Componentes (%)	Leite de soja	Leite de vaca
Água	90,00	87,04
Proteínas	3,50	3,40
Gordura	2,80	3,70
Carboidratos	3,10	4,80
Cinzas	0,50	0,70

Fonte: MORETTI & HINOJOSA (1981).

De acordo com SALOMON *et al.* (1981), o extrato hidrossolúvel da soja integral (EHS) é um produto obtido pela seleção, maceração, tratamento térmico, cocção e posterior centrifugação da semente de soja. A fração hidrossolúvel é desidratada em “spray-dryer” e formulada para uma concentração protéica de 30 % com 4,2 % de umidade.

O extrato hidrossolúvel da soja, assim como outros produtos desta derivados apresentam aceitação limitada devido principalmente ao sabor indesejável, descrito como adstringente, amargo e conhecido como “beany flavour” (HÜHN & PINHEIRO, 1980). Há dois grupos de sabores indesejáveis nos produtos à base de soja. Um, é composto pelos voláteis, responsáveis pelo sabor herbáceo ou de feijão cru, oriundos da deterioração oxidativa dos ácidos graxos insaturados presentes nos grãos de soja pela ação da enzima lipoxigenase cuja ação é desencadeada quando a estrutura dos grãos é rompida em presença de oxigênio. O outro é composto pelos compostos não voláteis, responsáveis pelo sabor amargo e adstringente, formados pela deterioração oxidativa de aminoácidos e por hidrólise enzimática (PRUDÊNCIO, 1995).

O tratamento dos grãos de soja e seu manuseio é de vital importância na obtenção do extrato hidrossolúvel visto que os grãos apresentam lipoxigenase e seus substratos, os ácidos graxos insaturados e que a reação de oxidação ocorre principalmente durante o descaque e moagem dos mesmos. Após desenvolvida a reação, é praticamente impossível remover ou mascarar completamente o sabor desagradável gerado.

O processo de fabricação do leite de soja é variável. LI-YU-YING & GRANDVOINNET, citados por GOMES (1986), afirmam que o leite de soja deve ser produzido com variedades de soja cujas sementes sejam brancas ou amarelas, as quais são maceradas por 24 horas, moídas e filtradas, obtendo-se o leite de soja no filtrado. Outro procedimento de acordo com o mesmo autor foi desenvolvido pela fábrica de Cáseo-Sojaína, na França e consiste da limpeza dos grãos com água potável e filtrada, maceração, moagem, filtração em filtro-prensa e posterior esterilização, obtendo-se desta forma um leite livre de impurezas e microrganismos.

O processo de maceração é considerado um pré-tratamento da matéria-prima para a hidratação dos grãos, que facilita a moagem e remoção de sujidades (LO *et al.*, 1968).

Em trabalho realizado por KARLESKIND *et al.* (1991), o preparo do leite de soja foi realizado sem a maceração dos grãos, os quais foram escaldados na proporção de 1/5 (p/v) em água fervente contendo 0,25 % de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) por 30 minutos e enxaguados com excesso de água. Após a drenagem, os grãos foram novamente dispersos em água para uma solução de 12 % de sólidos totais, seguido da moagem, aquecimento a 82° C, homogeneização e filtração, obtendo-se 3,5 % de sólidos totais e 1,5 % de proteína no produto final.

O uso de solução de bicarbonato de sódio durante a maceração auxilia na redução do “beany flavour” e dos inibidores da tripsina, resultando em produto final de melhor aceitação e valor nutricional. Outras substâncias também foram utilizadas por diversos autores com a mesma finalidade, entre elas, carbonato de sódio, clorofilina e sulfito de sódio (KHALEQUE *et al.*, 1970).

Existem controvérsias entre os autores com relação ao tratamento térmico ao qual o EHS deve ser submetido. SPREER (1975) sugere temperaturas de 88° C por 10 minutos ou 95° C por 5 minutos, ao passo que BABEL (1976) emprega temperatura de 82,5° C por 20 minutos e YEARGER (1975) 85° C por 30 minutos. O tratamento térmico melhora a palatabilidade e aumenta a qualidade nutritiva dos alimentos à base de soja, mediante a destruição da atividade das lipoxigenases e de fatores antinutricionais (PATEL *et al.*, 1980).

#### *2.5.2.2. Principais usos do leite de soja*

O leite de soja apresenta grande versatilidade quanto à sua utilização, que teve inicio na China, anterior à era cristã. Os principais usos do leite de soja descritos por SPREER (1991) são leite de soja similar em composição, aspecto e sabor ao leite de vaca; leite de soja aromatizado, suplementado com frutas, cacau, caramelo ou álcool, edulcorado ou não; produtos fermentados de leite de soja, iogurte, coalhada de leite de soja como intermediário para fabricação de outros produtos; alimento infantil, substituindo em parte o leite de vaca; gelados e sopas em pó; alimento para terneiros em substituição do leite de vaca.

Na China, o leite de soja é considerado alimento básico para as crianças e muito aceito pelos adultos, sendo indicado para indivíduos intolerantes à lactose (GOMES, 1986). Nos Estados Unidos da América, o leite de soja também é utilizado em pães, bolos, pastéis e chocolates (GOMES, 1986).

#### *2.5.2.3. Fermentação do extrato hidrossolúvel de soja (EHS)*

A produção de ácido orgânico depende do crescimento dos microrganismos e da sua capacidade de fermentar os carboidratos disponíveis no substrato.

Os carboidratos fermentáveis da soja são oligossacarídeos de baixo peso molecular, solúveis em água, como a sacarose, rafinose e estaquiose (KAWAMURA, 1967). De acordo com MITAL & STEINKRAUS (1974), a fermentação do EHS reduz de maneira significativa a concentração de rafinose e estaquiose nesse substrato, melhorando a aceitabilidade do produto, visto serem oligossacarídeos causadores de flatulência.

A escolha da matéria-prima é essencial para obtenção de um EHS de boa qualidade visando sua fermentação. A variedade de soja utilizada exerce fator de grande importância sobre o crescimento dos microrganismos usados na fermentação em virtude da composição própria de cada variedade (KOTHARI, 1973).

As condições e os métodos empregados para o preparo do EHS influenciam a produção de ácido pelas bactérias lácticas, nos quais o tratamento térmico e o tempo de maceração são operações importantes para a qualidade do EHS (PATEL *et al.*, 1980).

## 2.6. FERMENTAÇÃO

A fermentação é o processo pelo qual os glicídeos e substâncias similares oxidam, liberando energia na ausência de aceptores externos de elétrons ( $O_2$ ). Neste processo, as alterações químicas produzidas no substrato orgânico são ocasionadas pelas enzimas elaboradas pelos microrganismos fermentadores (JAY, 1978). A respiração aeróbica e anaeróbica oxidam substâncias orgânicas e eventualmente inorgânicas, proporcionando neste último caso, energia para a síntese de matéria celular a partir de  $CO_2$  e de outros nutrientes inorgânicos.

Em contrapartida, a fermentação é um conjunto de reações biológicas de oxirredução produtoras de energia, nas quais os compostos orgânicos atuam com receptores finais de elétrons. Na fermentação, tanto o doador como o receptor de elétrons são compostos orgânicos geralmente produzidos em base a um único substrato orgânico no decorrer do metabolismo intermediário (STAINER *et al.*, 1976; MONTES, 1977).

Desta forma, os processos de fermentação são resultantes de uma deficiência nutricional básica, nos quais os microrganismos não fazem uso do oxigênio e aperfeiçoaram seus mecanismos de sobrevivência utilizando as substâncias do metabolismo primário ou as substâncias adicionadas ao meio como receptoras de elétrons (FERREIRA, 1987).

Os compostos fermentáveis devem ser capazes de produzir intermediários oxidáveis e redutíveis. Os açúcares possuem esta característica, sendo os compostos mais fáceis e amplamente metabolizados pelos microrganismos fermentadores. Outras substâncias, como ácidos orgânicos, aminoácidos e purinas também podem ser fermentados por alguns microrganismos (MONTES, 1977).

### 2.6.1. Fermentação láctica

A fermentação láctica resulta da ação enzimática das bactérias lácticas sobre a lactose, desdobrando-a em glucose e galactose, com posterior conversão em ácido láctico (FERREIRA, 1987).

Segundo STAINER *et al.* (1976), a fermentação láctica é característica dos tecidos animais, de alguns protozoários, fungos e bactérias. Nela, os açúcares hexacarbonados simples (hexoses) são convertidos em duas moléculas de ácido láctico, conforme esquema a seguir:



A fermentação láctica pode ter como produto final juntamente com ácido láctico (fermentação homoláctica) outros metabólitos, como etanol, ácido acético e CO<sub>2</sub> em quantidades apreciáveis, caracterizando assim a fermentação heteroláctica (FERREIRA, 1987).

#### *2.6.1.1. Fermentação homoláctica*

É realizada especialmente por estreptococos e algumas espécies de lactobacilos. Nesta fermentação, o açúcar do meio é transformado quase que exclusivamente em ácido láctico com conversão superior a 80 %, visto que a conversão de açúcares em ácido láctico nunca é total. As bactérias homofermentativas apresentam em sua membrana celular um sistema fosfotransferase que fosforila a lactose C6 da molécula de galactose, na medida em que penetra na célula. A enzima  $\beta$ -D-fosfogalactosidase hidrolisa a lactose-fosfato à glucose e galactose-6-fosfato (MONTES, 1977).

A glucose é fosforilada em C-6 e metabolizada a piruvato pela via glicolítica de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (EMP). A galactose-fosfato através de um isômero da frutose passa à fase triose-fosfato da glicólise e depois à piruvato. Todos os estreptococos do grupo N (*Str. cremoris*, *lactis* e *diacetylactis*) possuem desidrogenase láctica com especificidade L e originam quatro moléculas de ácido L (+) láctico de uma molécula de lactose (MONTES, 1977; FERREIRA, 1987).

Outras bactérias homofermentativas, como *Str. thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, não fosforilam a lactose que entra na célula, mas a hidrolisam por meio de uma  $\beta$  galactosidase intracelular. A molécula de glucose seguindo a via glicolítica forma em algumas espécies ácido L (+) láctico, em outras D (-) e nas demais uma mescla de ambos. Estes microrganismos não metabolizam a galactose, originando somente duas moléculas de ácido láctico a partir de uma molécula de lactose (WALSTRA & JENNESS, 1987).

Todos os microrganismos dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus* e alguns do gênero *Lactobacillus* são homofermentadores, possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, carecem de fosfocetolase e utilizam a via glicolítica de EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS (JAY, 1978).

#### *2.6.1.2. Fermentação heteroláctica*

Os microrganismos heterofermentativos, algumas bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, transformam o açúcar do meio em ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub> e manitol. Esses microrganismos carecem de aldolase e utilizam a via hexose monofosfato para metabolizar a glucose. A partir da glucose há formação do ácido 6-fosfoglucônico que sofre descarboxilação e resulta em ribose-5-fosfato, que transforma-se em acetilfosfato e gliceraldeído-3-fosfato. O ácido acético e/ou etanol são os primeiros metabólitos formados seguidos do ácido pirúvico e ácido láctico (WALSTRA & JENNESS, 1987).

Os heterofermentativos possuem fosfocetolase e carecem de aldolase e hexose isomerase, utilizando a via hexose monofosfato ou pentose monofosfato para a degradação da glucose (JAY, 1978).

As espécies heterolácticas são capazes de fermentar pentoses como xilose, arabinose e ribose, gerando ácido láctico e ácido acético por vias metabólicas que envolvem fosfocetolase (MONTES, 1977).

KANDLER & WEISS (1986) reportam a existência de um grupo de bactérias heterolácticas facultativas, cuja fermentação de hexoses ocorre, na maioria das espécies, pela via EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS, resultando quase exclusivamente em ácido láctico, porém em algumas espécies, quando há limitação de hexoses no meio, pentoses são fermentadas a ácido láctico, acético, etanol e ácido fórmico, via enzima fosfocetolase induzida.

O ácido láctico gerado pelas diversas vias metabólicas possui um carbono assimétrico e por isso pode apresentar-se sob duas configurações com atividade óptica, L (+) ou D (-), dependendo da especificidade da enzima lactato desidrogenase presente na células bacterianas, desta forma, as espécies homofermentativas produzem ácido L (+) láctico e as espécies heterofermentativas produzem ácido D (-) láctico.

Ambas as configurações podem ser formadas quando as enzimas L- e D-lactato desidrogenase estão presentes na mesma célula, ou em alguns casos, pela ação da enzima lactato racemase combinada com L- lactato desidrogenase (KANDLER & WEISS, 1986).

#### 2.6.2. Bactérias lácticas

As bactérias acidolácticas encontram-se distribuídas na natureza e são especialmente conhecidas por sua capacidade de atuar em diferentes grupos de alimentos, especialmente no leite, carne e produtos vegetais. Estão divididas em quatro gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (VEDAMUTHU *et al.*, 1992). Estão relacionadas com a produção de alimentos de alta e média acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação de um grande número de alimentos, como leites fermentados, iogurtes, queijos, salames, presuntos, chucrute, pepinos e outros vegetais fermentados, sendo selecionadas de acordo com o carboidrato à fermentar, normalmente a glucose, sacarose ou lactose (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Este grupo de bactérias contribui na formação de aromas nos produtos fermentados pela produção de compostos voláteis como diacetil e seus derivados, H<sub>2</sub>S e aminas nos queijos (KANDLER & WEISS, 1986).

### *2.6.2.1. Características gerais das bactérias do ácido láctico*

De acordo com SÁ & BARBOSA (1990), as bactérias lácticas pertencem às famílias Streptococcaceae, na qual apresentam-se de forma arredondada, soltas ou em cadeias, e Lactobacillaceae, que encontram-se sob a forma de bastonete, em cadeia ou não.

As bactérias lácticas são microrganismos anaeróbios facultativos, podendo crescer em presença de oxigênio, porém apresentam melhor desenvolvimento em meio com baixa tensão de oxigênio; são basicamente sacarolíticas, atuando notadamente sobre hidratos de carbono, mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de crescimento variando de 30 a 37° C e 45 a 50° C, respectivamente; são produtoras de ácido láctico e ineficientes quanto à produção de energia, necessitando de grande quantidade de açúcar, vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos, em determinadas espécies, para obtenção de energia suficiente para a biossíntese e reprodução (FERREIRA, 1987).

Este grupo de microrganismos não possui catalase, com exceção de alguns pediococos, que produzem pseudocatalase, reage positivamente às colorações de Gram, azul de metileno e rezarsurina, é usualmente imóvel e obrigatoriamente fermentador (VEDAMUTHU *et al.*, 1992; SÁ & BARBOSA, 1990).

As bactérias lácticas são atribuídas propriedades nutritivas, medicinais e terapêuticas em virtude de sua ação benéfica sobre a flora intestinal, pois aderem-se a diversos epitélios do sistema digestivo. Autores citados por GOULET (1991) observaram que diversas cepas lácticas possuíam propriedades imunoestimulantes, as quais não estariam ligadas à viabilidade das células, pois também eram encontradas em cultivos inativados pelo calor.

Entre os lactobacilos, o *Lactobacillus acidophilus* produz substâncias antibacterianas, tais como proteínas inibitórias, peróxido de hidrogênio, lactocidina, acidolina, acidofilina e lactacium-B. A redução de B-glucoronidase fecal e atividade nitrorreduktase também estão associadas à ingestão de células viáveis desse microrganismo, assim como a inibição da enzima hidroximetil-glutaril-CoA-redutase, reguladora da síntese de colesterol sanguíneo (VIJAYENDRA & GUPTA, 1992).

#### 2.6.2.2. *Lactobacillus casei*

O gênero *Lactobacillus* compreende 50 espécies de bactérias homo e heterolácticas. Apresentam-se sob a forma de bastonetes longos, curtos ou cocobacilos, dependendo da idade da cultura e composição do meio onde crescem. Formam colônias pequenas de 2 a 5 mm, com bordas convexas, lisas, brilhantes ou opacas e sem pigmento (KANDLER & WEISS, 1986).

O *Lactobacillus casei* apresenta-se sob a forma de bast.ete, variando de 0,7 a 1,1  $\mu\text{m}$  de largura e 2,0 a 4,0  $\mu\text{m}$  de comprimento, imóvel, não flagelado e com tendência a formar cadeias e colônias lisas, brancas ou amareladas. Fermenta a lactose, glucose, frutose e galactose, geralmente a maltose e sacarose e usualmente sorbitol e sorbose, porém não fermenta pentoses, como xilose e arabinose. Nutricionalmente, riboflavina, ácido fólico, pantotenato de cálcio, niacina, piridoxamina são essenciais, não requerendo tiamina e vitamina B<sub>12</sub> (GUOQUIANG, 1991; KANDLER & WEISS, 1986). Este lactobacilo é muito utilizado em queijaria em virtude da produção de proteinases, peptidases, desaminases e lipases. Quando cultivado no leite, o acidifica pela produção de ácido L (+) láctico na concentração de 1,2 a 1,5 % (ALAIS, 1984).

### 2.6.3. Bactérias bífidas

As bactérias bífidas foram descobertas e descritas pela primeira vez, em 1900, por Henry Tisser nas fezes de crianças amamentadas no seio materno. Habitam o intestino grosso do homem e diversos animais, sendo também encontradas no mel de abelhas, água de esgoto, em cárries dentárias, na secreção vaginal e em outros materiais biológicos humanos, estando classificadas em 24 espécies, incluindo nove de origem humana (VIJAYENDRA & GUPTA, 1992).

#### *2.6.3.1. Características gerais das bactérias bífidas*

Este grupo de bactérias apresenta-se sob a forma de bacilos Gram-positivos, bifurcados ou em forma de Y, não esporulados e imóveis. São anaeróbicos, porém algumas espécies podem tolerar o O<sub>2</sub>, somente na presença de CO<sub>2</sub> e apresentam crescimento ótimo à temperatura de 37 a 41° C e pH de 6,5 a 7, tendo seu desenvolvimento inibido em pH 4,5 a 5 e 8,0 a 8,5. Formam colônias lisas, convexas, brilhantes, brancas ou amareladas (KANDLER & WEISS, 1986).

Nutricionalmente, as bactérias bífidas formam um grupo bastante heterogêneo, necessitando de fatores nutricionais distintos para cada espécie. Entre os fatores nutricionais requeridos estão amino açúcares, em particular, N-acetil-D-glucosamina; açúcares, como lactulose e oligossacarídeos; vitaminas, como riboflavina, ácido ascórbico, piridoxina, tiamina, biotina; e aminoácidos, como a cisteína, ácido pantotênico e ácido nicotínico (KLAVER *et al.*, 1993; KANDLER & WEISS, 1986).

Sacarolíticas, atuam basicamente sobre carboidratos, desempenhando papel significativo no controle do pH intestinal, através da liberação de ácido L (+) láctico e ácido acético na proporção 2:3, sem a liberação de CO<sub>2</sub> e por isso, não são consideradas bactérias lácticas verdadeiras, as quais produzem ácido láctico, ácido acético ou etanol e CO<sub>2</sub> na proporção de 1:1:1, nas espécies heterofermentativas.

Certas bactérias bífidas ainda produzem ácido fórmico, etanol e ácido succínico. Isto explica sua exclusão da família Lactobacilaceae, sendo atualmente pertencentes ao subgrupo dos actinomicetos (VIJAYENDRA & GUPTA, 1992; KANDLER & WEISS, 1986).

Constituem um dos grupos predominantes da microflora intestinal de indivíduos saudáveis, desempenhando importante papel na manutenção do equilíbrio microbiano intestinal, pois a acidez gerada mediante a produção de ácidos orgânicos, em especial ácidos graxos voláteis inibe ou restringe o crescimento de patógenos entéricos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e algumas espécies de *Shigella* (VALENTIM *et al.*, 1994, IWATA & MORISHITA, 1989; SCARDOVI, 1986). A inibição do crescimento de patógenos invasores também ocorre pela desconjugação de sais biliares e produção de bacteriocinas, como bifidolina e “bifilong” (ALVAREZ, 1988).

Além de manter o equilíbrio da microflora intestinal normal e estimular os movimentos peristálticos do intestino, às bactérias bífidas também são atribuídas outras propriedades importantes, tais como a redução do nível de colesterol sanguíneo, atividade anticarcinogênica pela quebra de N-nitrosaminas, estimulação do sistema imunológico, síntese de vitaminas do complexo B, absorção de cálcio e efeito positivo nos distúrbios de intolerância à lactose, pela produção de B-galactosidase, enzima necessária à digestão da lactose (COLLINS & HALL, 1984; ALVAREZ, 1988; VIJAYENDRA & GUPTA, 1992).

Entre as vitaminas produzidas pelas bactérias bífidas durante sua atividade metabólica, estão a vitamina B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, ácido fólico, biotina, ácido pantotênico e vitamina K, cuja síntese ocorre no intestino grosso (ALVAREZ, 1988).

Devido à redução do nível de amônia, fenol sérico livre e aminonitrogênio livre no sangue, as bactérias bífidas atuam no controle de distúrbios hepáticos, como a hepatite crônica e a cirrose hepática. Possuem também atividade desintoxicante, pois inibem a ação de bactérias invasoras e combatem os efeitos secundários dos antibióticos administrados por via oral (COLLINS & HALL, 1984; ALVAREZ, 1988).

### 2.6.3.2. *Bifidobacterium adolescentis*

Cerca de 60 % das bactérias bífidas isoladas de fezes de adultos saudáveis são pertencentes à espécie *Bifidobacterium adolescentis*, também encontrada no rúmen, água de esgoto e em fezes de macacos e cães (MARSHALL *et al.*, 1982; KANDLER & WEISS, 1986).

REUTER (1963), citado por KANDLER & WEISS (1986), denominou *Bifidobacterium adolescentis*, os microrganismos mais abundantes nas fezes de adultos humanos que fermentavam pentoses, como xilose, arabinose e ribose. Esta espécie também é capaz de fermentar um grande número de outros carboidratos, desde monossacarídeos até polissacarídeos. Entre estes, a lactose, sorbitol, frutose, galactose, sacarose, maltose, cellobiose, melibiose, rafinose e amido.

Alguns dos fatores nutricionais requeridos pela espécie são riboflavina, pantotenato, piridoxina e tiamina, podendo crescer na ausência de nitrogênio orgânico e excretando quantidades apreciáveis de alguns aminoácidos, como alanina, valina e ácido aspártico (KANDLER & WEISS, 1986).

## 2.7. USO DE CULTURAS MISTAS EM PRODUTOS FERMENTADOS

A utilização de culturas com duas ou mais espécies distintas de microrganismos confere ao produto características organolépticas e promotoras do bem estar, que não estariam presentes com o uso de cultura simples. Além disso, o crescimento de alguns microrganismos em determinados substratos só é possível na presença de outros, que fornecem, pelo seu metabolismo e ação de suas enzimas, nutrientes necessários aos primeiros (KLAVER *et al.*, 1993).

Desta forma, o uso concomitante de lactobacilos, em especial *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, e bactérias bífidas em bebidas lácteas oferece vantagens ao consumidor por proporcionar um produto de aroma mais suave e menor acidez que o iogurte, com as propriedades profilácticas e terapêuticas, características desses microrganismos (SAMONA & ROBINSON, 1994; KLAVER *et al.*, 1993).

Em culturas mistas, as bactérias bífidas contribuem para a formação de produto de melhor aceitabilidade, com menor sabor ácido ou amargo e pequena pós acidificação durante a estocagem (MEDINA & JORDANO, 1994).

Atualmente, as espécies mais empregadas para este fim são *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus faecium* e *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermani*, habitantes normais do trato intestinal (VALENTIM *et al.*, 1994).

## 2.8. ALIMENTOS FERMENTADOS

Os produtos fermentados apresentam grandes vantagens sobre a matéria-prima original, pois têm seu período de armazenamento prolongado, possuem melhores características organolépticas e melhor digestibilidade, visto que a hidrólise das proteínas torna seus componentes mais solúveis e assimiláveis (MENEZES, 1981).

As características mais apreciáveis e importantes dos produtos lácteos fermentados são o sabor e a textura, que estão estreitamente relacionados com a qualidade da matéria-prima, com a natureza da flora microbiana e com as condições de incubação (GOULET, 1991).

O consumo de alimentos fermentados à base de soja tem sido um hábito muito comum na dieta dos povos orientais desde a antigüidade. Atribui-se ao advento de algumas religiões, que proibiam a carne na dieta, a introdução de alimentos fermentados no Japão.

Por ser tratar de alimentos tradicionais, são de ampla aceitação tanto por seu valor nutritivo como por suas qualidades organolépticas. No Japão, o consumo desses alimentos é considerável, destacando-se o “miso”, “shoyu”, “tofu”, “kori-tofu”, “natto” e “kinako”(MENEZES, 1981)

Atualmente, os iogurtes à base de soja representam mais uma opção para os consumidores, em razão de seu menor custo e de suas propriedades físicas e funcionais semelhantes às dos iogurtes tradicionais, podendo ser formulados com reduzida concentração de lactose, gorduras saturadas e colesterol. A principal desvantagem desses produtos é a presença de sabor residual de soja e menor acidez, carecendo do aroma característico de iogurte (KARLESKIND *et al.*, 1991).

MURTI *et al.* (1992) verificaram que as bactérias lácticas podem reduzir a concentração de n-hexanal, substância que indica a presença de oxidação e desenvolvimento de aroma desagradável nos produtos à base de soja, ao produzirem iogurte com leite de soja de acidez aceitável para os consumidores e pH de 4 a 4,5 com considerável desenvolvimento de aroma.

No Egito e na Índia, vários são os produtos fermentados por bactérias lácticas, utilizando como matéria-prima o leite de búfala. Entre estes, destacam-se o “laban khad/hamid”, semelhante ao kefir e “laban zabadi”, tipo de bebida láctea, originários do Egito e o “dahi”, bebida láctea semelhante ao iogurte, “shrikhand”, tipo de “dahi” semi sólido e adocicado; e “payodhi/misti”, leite fermentado, caramelizado e escurecido, produtos tradicionais da Índia (TAMIME & ROBINSON, 1988).

A composição vitamínica dos produtos lácteos fermentados varia de acordo com a microflora presente, que pode assimilar uma parte das vitaminas e produzir outras, porém na maioria desses produtos a composição vitamínica é maior do que a de sua matéria-prima.

A composição vitamínica dos produtos lácteos fermentados é influenciada por diversos fatores, como a cepa microbiana utilizada, sua fase de crescimento, a natureza do substrato, os pré-tratamentos aos quais este é submetido e as condições de incubação. A Tabela 20 ilustra a variabilidade da composição vitamínica de alguns produtos lácteos fermentados em relação à matéria-prima utilizada (GOULET, 1991).

**TABELA 20. Conteúdo vitamínico de produtos lácteos fermentados em relação ao leite fresco integral.**

Vitaminas	Produtos (valores em 100 g)				
	Leite fresco	Cheddar	Cottage	Camembert	Iogurte
A (UI)	150	1350	170	1010	140
B <sub>1</sub> (mg)	0,03	0,03	0,03	0,04	0,03
B <sub>2</sub> (mg)	0,17	0,46	0,25	0,75	0,16
Niacina (mg)	0,1	0,1	0,1	0,8	0,1
C (mg)	1,0	0	0	0	1,0
Pantotenato (mg)	0,34	0,50	-	1,25	-
B <sub>6</sub> (mg)	0,04	0,08	-	0,22	-
B <sub>12</sub> (μg)	0,4	1,0	-	1,3	-
Folato (μg)	0,3	16	-	-	-
Biotina (μg)	4,7	3,6	-	-	-

- valores não indicados.

FONTE: GOULET (1991).

Desta forma, o desenvolvimento de produtos lácteos fermentados a base de extratos vegetais, principalmente de soja e subprodutos da indústria leiteira torna-se uma alternativa interessante, aos produtos lácteos tradicionais, tanto do ponto de vista econômico quanto nutricional.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIAL**

##### **3.1.1. Microrganismos**

Foram utilizadas seis diferentes cepas de bactérias, sendo 4 cepas de *Lactobacillus* e 2 cepas de *Bifidobacterium*, obtidas de diferentes coleções de cultura:

- *Lactobacillus acidophilus* (CCT 0329)

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

- *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014)

Procedente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Rio de Janeiro-RJ.

- *Lactobacillus casei* ssp *shirota* (IAL 0527)

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

- *Lactobacillus sp*

Isolado de produto lácteo comercial adquirido na cidade de Curitiba-PR.

- *Bifidobacterium longum* (ATCC 15707) e *Bifidobacterium adolescentis* (ATCC 15703)

Procedentes da Universidade Federal de Viçosa-MG e cedidas ao Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

As cepas de *Lactobacillus*, exceto o lactobacilo isolado de produto comercial, apresentavam-se lyophilizadas e sua ativação procedeu-se de acordo com as recomendações do fornecedor, pela dissolução da cultura em água destilada estéril, posteriormente semeada e incubada a 37° C por 48 horas em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharp – MERCK) autoclavado a 121° C por 15 min (DE MAN *et al.*, 1960). As cepas de *Bifidobacterium* apresentavam-se repicadas em ágar MRS modificado e foram ativadas segundo recomendações da coleção de culturas, em caldo MRS modificado estéril incubado a 37° C por 48 horas, composto de caldo MRS adicionado de 0,02 % de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 0,01 % de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), 0,5 % de solução de L-cisteína-HCL a 0,05 % e 0,075 % de ágar (VALENTIM *et al.*, 1994).

### 3.1.2. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas na composição do substrato para fermentação foram leite de vaca, extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala (Figura 2).



**FIGURA 2. Matérias-primas utilizadas na composição do substrato.**

*Material e Métodos*

Utilizou-se leite de vaca desnatado, procedente da Cooperativa Central de Laticínios do Paraná e adquirido em estabelecimento comercial na cidade de Curitiba. O extrato hidrossolúvel de soja foi obtido na Central de Produção de Alimentos da Secretaria de Abastecimento de Curitiba e o soro de leite de búfala, fornecido por laticínio situado na cidade de Guaraqueçaba, litoral do Estado do Paraná.

### 3.1.3. Equipamentos

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

- câmara de fluxo laminar (TROX, MDL FLV);
- estufa bacteriológica (FANEM), com termostato automático;
- microscópio ótico binocular (LEITZ WETZLAR 590505);
- balança analítica (SCIENTECH 120 x 0,0001g);
- espectrofotômetro (MILTON ROY, MDL 20D);
- autoclave vertical de laboratório (PHOENIX, MDL AV 75);
- jarra de anaerobiose (PROBAC- 2,5L);
- centrífuga refrigerada (HITACHI, MDL CR 21E);
- potenciômetro (PROCYON, MDL PH N-4).

### 3.2. MÉTODOS

Os métodos físico-químicos e os demais métodos de análise utilizados para definir a composição centesimal das matérias-primas e acompanhar a evolução das fermentações estão descritos 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 de 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 100g 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 em proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, considerando valores de nitrogênio (fatores de conversão) de 6,38 para leite de vaca e soro de leite de búfala, e 6,25 para o extrato hidrossolúvel de soja (SÃO PAULO, 1985).

### *3.2.1.5. Extrato seco*

O extrato seco foi determinado por gravimetria em estufa a 105° C, segundo metodologia descrita nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 1985).

### *3.2.1.6. Lipídios*

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

### *3.2.1.7. Açúcares redutores*

Os açúcares redutores foram determinados pelo método 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 molibídico, 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.

Previamente à determinação, as proteínas contidas nas amostras foram precipitadas, pois sua presença interfere nas leituras em espectrofotômetro, podendo gerar resultados incorretos. A precipitação das proteínas foi realizada pela adição de 2 mL de solução saturada de acetato de chumbo, 2 mL de solução de sulfato de sódio e 5 mL de 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.

### 3.2.1.8. Açúcares totais

A determinação do conteúdo de açúcares totais foi realizada pelo método AOAC 920.44 (AOAC, 1990), fundamentado na hidrólise ácida dos açúcares presentes na amostra. Os açúcares redutores gerados pela hidrólise ácida, pelo emprego de HCl, foram determinados pelo método Somogyi-Nelson e o resultado foi expresso em açúcares redutores. Para a curva padrão foi utilizada solução de lactose contendo 100 µg do açúcar/ mL de solução.

### 3.2.1.9. Determinação da densidade óptica

A densidade óptica (D.O.) foi determinada como o aumento de turbidez da amostra em absorbância, medida em espectrofotômetro e comprimento de onda de 650 nm.

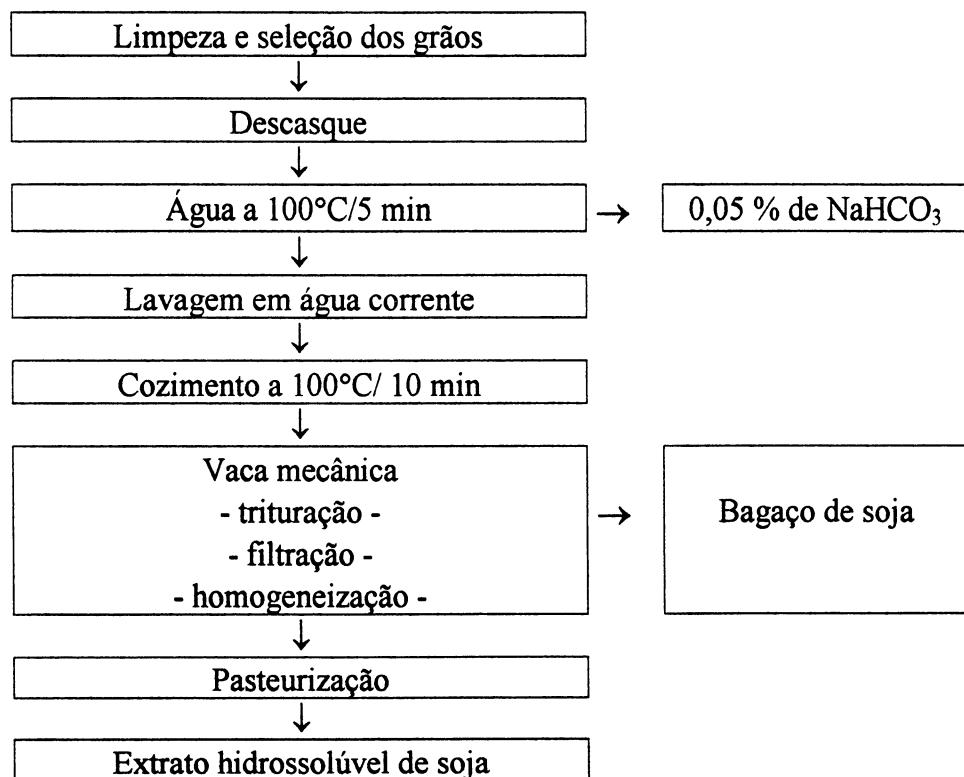
## 3.2.2. Manutenção das culturas

Após a ativação em caldo, as cepas de *Lactobacillus* foram repicadas em profundidade, em tubos com ágar MRS (MERCK), incubadas a 37° C por 48 horas e mantidas a 4° C por seis meses. As bifidobactérias foram repicadas e mantidas pelo mesmo procedimento em ágar MRS modificado.

Paralelamente à manutenção em ágar, as cepas de ambos os gêneros foram liofilizadas para estocagem no banco de cepas do LPB. As cepas ativadas em caldo foram centrifugadas a 7.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em volume de 10 % do caldo de crescimento, em leite desnatado (MOLICO), reconstituído a 12 % e esterilizado, para posterior liofilização em liofilizador (LABCONCO, MDL 4.5).

### 3.2.3. Obtenção do extrato hidrossolúvel de soja

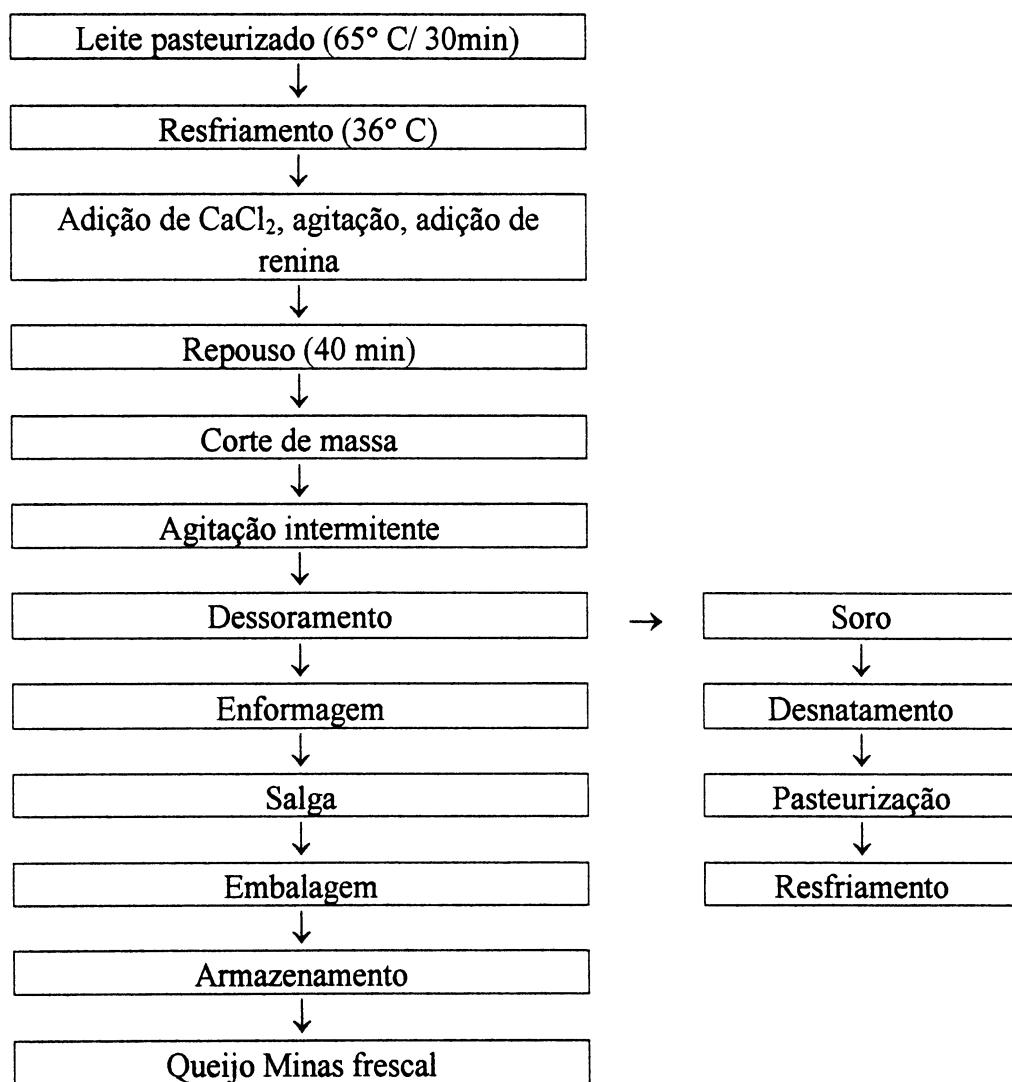
A metologia empregada na obtenção do extrato de soja foi desenvolvida na Central de Produção de Alimentos, utilizando grãos de soja da variedade BR-36, cujo processamento foi realizado em vaca mecânica (PERFECTA). Após o descasque mecânico dos grãos, estes sofreram choque térmico em água fervente a 100° C, adicionada de solução de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) a 0,05 % por 5 minutos, sem agitação, a fim de promover a inativação da enzima lipoxigenase, responsável pelo sabor indesejável de feijão cru, característico da soja. Posteriormente, os grãos foram lavados em água corrente para a remoção dos restos de casca e cozidos a 100° C por 10 minutos sob agitação, objetivando a inativação dos fatores antinutricionais da soja. Os grãos foram novamente lavados em água corrente a 30° C para serem triturados em vaca mecânica na proporção de 1 parte de soja para 7 partes de água. A Figura 3 apresenta o fluxograma de obtenção do extrato aquoso de soja.



**FIGURA 3. Fluxograma do processo de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja.**

### 3.2.4. Obtenção do soro de leite de búfala

O soro de leite utilizado foi obtido durante o processamento de queijo de búfala do tipo Minas frescal, classificado como soro doce, resultante da utilização de renina, enzima de origem animal, para a coagulação do leite, sendo seu pH de 6,2-6,4. Após a coleta, o soro foi resfriado a 5° C, desengordurado em funil de separação, e posteriormente pasteurizado. O fluxograma de obtenção está apresentado na Figura 4.



**FIGURA 4. Processo de fabricação de queijo de búfala Minas frescal e obtenção do soro de leite de búfala.**

### 3.2.5. Caracterização das matérias-primas

As matérias-primas foram caracterizadas pela análise da 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.

### 3.2.6. Tratamento térmico dos componentes do substrato

As matérias-primas foram submetidas individualmente ao tratamento térmico. Sendo o soro de leite, o componente de maior sensibilidade ao tratamento térmico, diferentes condições de tempo e temperatura de pasteurização foram testadas para este material. O tratamento térmico das demais matérias-primas baseou-se na melhor condição de tempo e temperatura obtida para o soro de leite.

Amostras de 200 mL do soro de leite de búfala em erlenmeyers de 500 mL foram pasteurizadas em banho-maria, sob agitação, em diferentes condições de tempo e temperatura (Tabela 21). Após a pasteurização, as amostras foram avaliadas visualmente para verificar a presença de floculação e microbiologicamente para atestar a eficiência do tratamento. A avaliação microbiológica foi realizada pela contagem total de microrganismos aeróbios estritos e facultativos, cuja técnica baseia-se na semeadura “pour plate” em placas com ágar padrão para contagem (PCA) de diluições sucessivas da amostra em água peptonada 0,1 %. As placas foram incubadas invertidas a 37° C por 48 horas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de amostra (BRASIL, 1992).

**TABELA 21. Condições de tempo e temperatura utilizadas na pasteurização do soro de leite de búfala.**

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

### 3.2.7. Seleção de culturas simples

Com o intuito de verificar a eficiência do substrato para o crescimento das cepas e seu comportamento fermentativo no meio, foram realizadas fermentações com cada uma das cepas de lactobacilos e bifidobactérias apresentadas no item 3.1.1.

#### 3.2.7.1. *Preparo dos inóculos para a fermentação*

O preparo dos inóculos iniciou-se com a reativação das cepas mantidas em ágar sob refrigeração. As cepas de lactobacilos foram semeadas em 20 mL de caldo MRS em tubo de ensaio lacrado com filme plástico (ROLOPACK) para evitar a entrada de ar, e as cepas de bifidobactérias em 20 mL de caldo MRS modificado, e incubadas a 37° C por 24 horas, sendo novamente inoculadas em 20 mL dos respectivos caldos por 48 horas a 37° C, obtendo-se os inóculos.

### 3.2.7.2. Fermentação do substrato

Após a pasteurização a 80° C por 20 minutos, as matérias-primas foram resfriadas à temperatura de inoculação de 37° C, em banho-maria e misturadas sob agitação vigorosa por 2 minutos na proporção de 40 % de leite de vaca desnatado, 35 % de soro de leite de búfala desnatado e 25 % de extrato hidrossolúvel de soja. Esta formulação foi obtida em trabalho realizado por VIZCARRA (1995).

A mistura foi inoculada com 5 % de inóculo (v/v) em relação ao volume total, sob agitação lenta, para incorporar o mínimo de ar, e distribuída em erlenmeyers de 250 mL, à razão de 200 mL, lacrados com filme plástico. A fermentação foi realizada, sem agitação, em estufa a 37° C por 20 horas.

### 3.2.7.3. Avaliação do fermentado

Durante a fermentação foram realizadas amostragens em intervalos de quatro horas, para verificar a evolução do pH e acidez titulável, cujas determinações seguiram metodologias descritas no item 3.2.1.

A contagem total de células viáveis expressa em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de amostra foi executada no primeiro e último tempos de fermentação. A contagem das cepas de *Lactobacillus* foi realizada pela semeadura “pour plate” de 1 mL das amostras fermentadas, previamente diluídas em 9 mL de água peptonada 0,1 %, em placas com MRS ágar e incubação em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas. Para a contagem das espécies de *Bifidobacterium*, utilizou-se MRS ágar modificado e incubação das placas invertidas em jarras de anaerobiose (PROBAC), contendo gerador de atmosfera de CO<sub>2</sub> (ANAEROGEN-OXOID) (SILVA & JUNQUEIRA, 1995; VEDAMUTHU *et al.*, 1992; SWANSON *et al.*, 1992).

As cepas foram selecionadas de acordo com o crescimento e fermentação no meio, e avaliação global de características organolépticas produzidas no fermentado.

### 3.2.8. Seleção de culturas mistas

Após a seleção das culturas simples, o substrato foi fermentado com as culturas em associação descritas na Tabela 22. A preparação do substrato e dos inóculos seguiu os mesmos procedimentos utilizados no experimento anterior. Os inóculos foram obtidos com as culturas puras de cada cepa, de acordo com metodologia descrita no item 3.2.7.1., misturadas somente no momento da inoculação.

**TABELA 22. Culturas mistas utilizadas na fermentação do substrato composto de 40 % de leite de vaca desnatado, 35 % de soro de leite de búfala desnatado e 25 % de extrato hidrossolúvel de soja.**

Culturas mistas	Microrganismos
LA-LCS	<i>Lactobacillus acidophilus</i> – <i>Lactobacillus casei shirota</i>
LA-BL	<i>Lactobacillus acidophilus</i> – <i>Bifidobacterium longum</i>
LA-BA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> – <i>Bifidobacterium adolescentis</i>
LCS-BL	<i>Lactobacillus casei shirota</i> - <i>Bifidobacterium longum</i>
LCS-BA	<i>Lactobacillus casei shirota</i> - <i>Bifidobacterium adolescentis</i>
BL-BA	<i>Bifidobacterium longum</i> - <i>Bifidobacterium adolescentis</i>

A mistura de 40 % de leite de vaca desnatado, 35 % de soro de leite de búfala desnatado e 25 % de extrato hidrossolúvel de soja foi inoculada com 5 % de inóculo, na proporção volumétrica de 1:1 de cada cultura simples, distribuída em erlenmeyer de 250 mL na razão de 200 mL e incubada em estufa bacteriológica a 37° C por 12 horas. Após a fermentação, foram realizadas determinações de pH, acidez titulável, contagem de células viáveis e avaliação de características organolépticas.

O número total de células viáveis da cultura mista, presentes na mistura após a fermentação, foi obtido pela semeadura de diluições da amostra em placas com ágar MRS, incubadas a 37° C em anaerobiose por 48 horas.

As misturas fermentadas foram avaliadas visualmente quanto ao aspecto e organolepticamente quanto à acidez e intensidade do sabor e aroma de soja.

### 3.2.9. Formulações

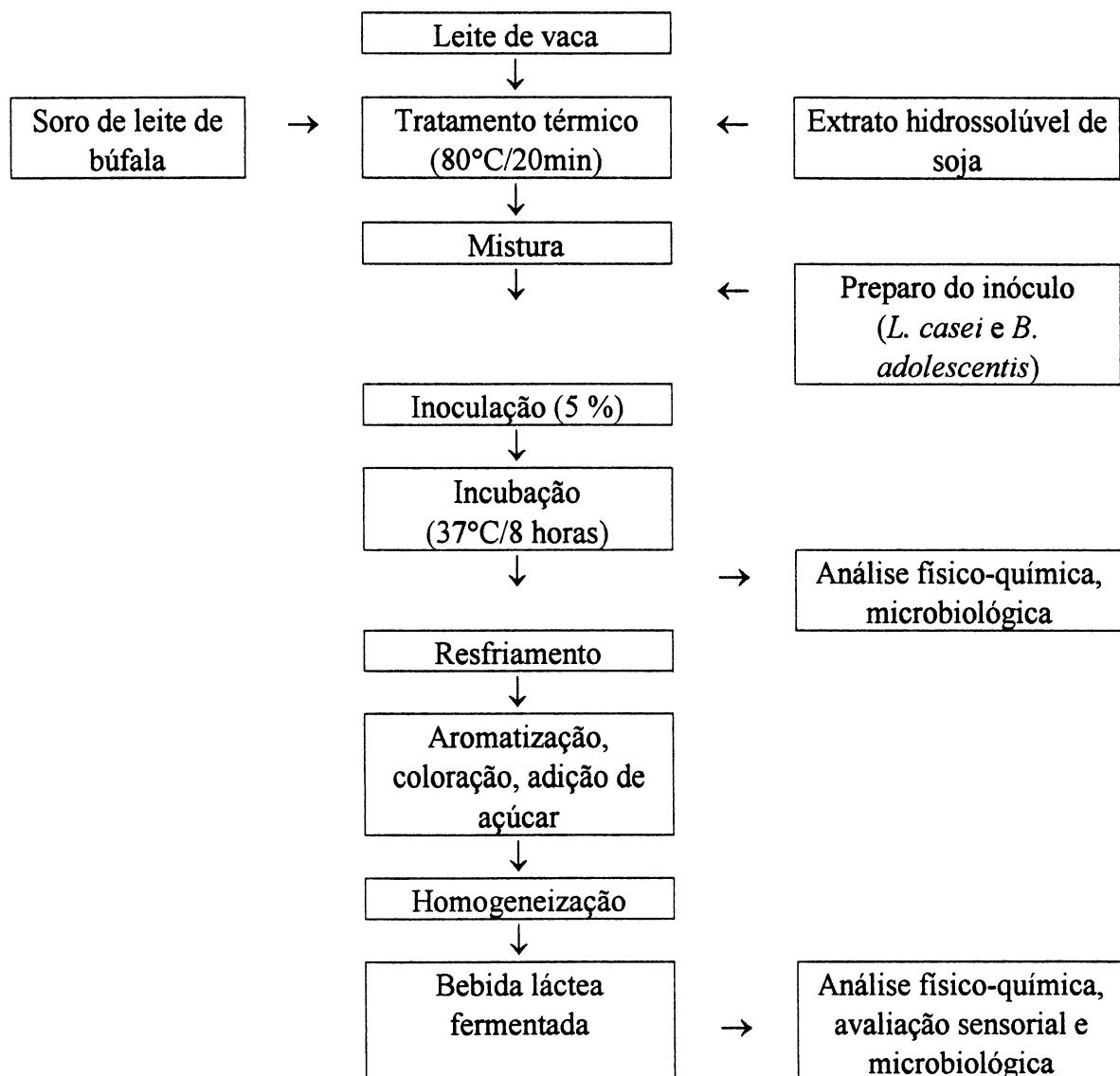
Foram elaboradas diferentes formulações, variando a proporção das matérias-primas como mostra a Tabela 23.

**TABELA 23. Proporções das matérias-primas utilizadas nas misturas para fermentação.**

Formulações	Leite de vaca (%)	Soro de leite de búfala (%)	Extrato hidrossolúvel de soja (%)
A	40	40	20
B	40	35	25
C	40	30	30
D	40	25	35
E	25	40	35
F	25	35	40
G	35	35	30
H	35	30	35
I	30	35	35

As formulações foram preparadas a partir da mistura das matérias-primas, pasteurizadas a 80° C por 20 minutos e resfriadas a 37° C. A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 2 minutos e inoculada. Os inóculos de culturas puras foram obtidos após incubação de *L. casei* e *B. adolescentis* em caldo MRS e MRS modificado a 37° C por 48 horas.

O fluxograma simplificado para a obtenção da bebida láctea fermentada está apresentado na Figura 5.



**FIGURA 5. Fluxograma esquemático do processo de obtenção da bebida láctea fermentada.**

### 3.2.9.1. Pré-seleção de formulações

As formulações A, B, C, D, E e F foram inoculadas com 5 % de inóculo (1:1 *L. casei* e *B. adolescentis*) e seu pH foi padronizado a pH 7 com solução de NaOH 3M. As misturas foram distribuídas em erlenmeyers de 125 mL à razão de 80 mL e incubadas a 37° C por 12 horas. As amostras foram coletadas a cada hora e realizadas determinações de pH e acidez titulável. A evolução no número de células viáveis foi determinada em intervalos de 4 horas e a avaliação organoléptica das misturas ao final do período de fermentação foi realizada considerando a intensidade do sabor e aroma de soja, a acidez ao paladar e o aspecto.

### 3.2.9.2. Seleção de formulações

Buscando diminuir o teor de leite de vaca nas formulações, mas mantendo a aceitabilidade do produto, foram testadas três formulações, G, H e I, comparadas entre si e com a formulação C, previamente selecionada. O preparo e inoculação das formulações foi procedido da maneira descrita anteriormente. A fermentação foi realizada em 1000 mL das misturas a 37° C por 8 horas. As formulações foram selecionadas de acordo com os resultados obtidos nas determinações de pH, acidez titulável, açúcares redutores, número de células viáveis, realizadas no início e imediatamente após a fermentação e avaliação sensorial, realizada nos fermentados mantidos sob refrigeração por 12 horas.

O número de células de *L. casei* foi determinado pela semeadura “pour plate” de diluições das formulações em placas com ágar MRS, incubadas em aerobiose, em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas, cujo resultado foi expresso em unidades formadoras de colônia/ mL de amostra. A enumeração de *B. adolescentis* baseou-se na capacidade deste microrganismo de fermentar pentoses, propriedade não apresentada pelo lactobacilo (SCARDOVI, 1986).

As placas semeadas com as formulações diluídas foram preenchidas com ágar MRS adicionado de xilose em substituição à dextrose e incubadas em jarra de anaerobiose (PROBAC) a 37° C por 48 horas.

O número de bifidobactérias foi determinado pela contagem das colônias desenvolvidas no ágar e expresso em UFC/ mL. Para a confirmação dos resultados foi realizada a contagem total em ágar MRS, sob anaerobiose e incubação a 37° C por 48 horas, cujo número de células (lactobacilos + bifidobactérias) foi subtraído do número de células obtido na contagem em aerobiose (somente lactobacilos).

As misturas refrigeradas foram adicionadas de 4 % de açúcar e homogeneizadas vigorosamente por 5 minutos para serem avaliadas quanto à intensidade do sabor e aroma de soja, sabor e aroma ácidos, sabor e aroma globais, aspecto e consistência por uma equipe de 18 provadores treinados, utilizando escala numérica não estruturada de 10 pontos, onde as extremidades expressam o mínimo e o máximo de intensidade de cada característica avaliada.

As amostras foram apresentadas aos provadores em copos de polietileno (30 mL) codificados aleatoriamente com três dígitos (ABNT 1993, 1994). Os valores obtidos foram analisados estatisticamente e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para a comparação de médias (MORAES, 1990; SPROESSER & CHAVES, 1993)

### 3.2.10. Avaliação do crescimento e proporção de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* no inóculo

#### 3.2.10.1. Desenvolvimento das cepas selecionadas em caldo de inoculação

O desenvolvimento de *L. casei shirota* e *B. adolescentis* nos caldos de inoculação foi estudado e avaliado pela contagem total de células viáveis e determinação da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro a 650 nm.

As cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* foram semeadas em caldo MRS e MRS modificado, respectivamente, na razão de 1 % do volume total de caldo e incubadas a 37° por 72 horas. A curva de crescimento foi determinada por amostragens em intervalos de 12 horas, com exceção do primeiro intervalo realizado após 24 horas de incubação. A contagem das células foi realizada em placas com ágar MRS incubadas a 37° C por 48 horas em anaerobiose.

### 3.2.10.2. Proporção de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* no inóculo

Foram estudadas as proporções, medidas em volume, de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:9 de *L. casei* e *B. adolescentis* respectivamente, no inóculo, para a obtenção de fermentado com número de células semelhante para ambas as cepas. As diferentes proporções foram avaliadas de acordo com o número de células de cada espécie obtido após a fermentação do substrato.

Os inóculos foram obtidos pela mistura de *L. casei* e *B. adolescentis*, cultivadas em caldo MRS e MRS modificado a 37° C por 48 e 60 horas, respectivamente. A mistura de 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja foi inoculada e fermentada a 37° C por 8 horas. Após a fermentação foram realizadas determinações de pH, acidez titulável e contagem das células viáveis de *L. casei* e *B. adolescentis*, segundo metodologias descritas anteriormente.

### 3.2.11. Aromatização

A formulação selecionada foi fermentada e aromatizada com diferentes essências para definir o aroma mais adequado para a bebida segundo a preferência dos provadores na avaliação sensorial.

A mistura de 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja foi fermentada em recipiente de 3.000 mL por 8 horas a 37°C, distribuída em porções de 500 mL em recipientes estéreis, aromatizada com essência natural de morango na proporção de 1 % p/v (VIRGINIA DARE), corada com carmim de cochonilha 3 % (HA-LA do Brasil) e adoçada com 4 % p/v de açúcar. Também foram utilizados os aromas de baunilha, na proporção de 0,96 % p/v (VIRGINIA DARE) e pêssego, 0,16 % p/v (CRAMER) para a aromatização da bebida adoçada com 4 % p/v de açúcar.

A evolução da fermentação foi acompanhada por amostragens em intervalos de 1 hora e determinação de pH, acidez titulável, consumo de açúcares redutores e contagem de células viáveis, cujas metodologias foram descritas anteriormente.

A avaliação sensorial foi realizada utilizando escala hedônica estruturada de 9 pontos, com 17 provadores treinados e amostras codificadas aleatoriamente com três dígitos, cujas características avaliadas foram aspecto, sabor, aroma, cor e avaliação global (ABNT 1993, 1994). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias quando diferentes entre si (MORAES, 1990; SPROESSER & CHAVES, 1993).

### 3.2.12. Avaliação da estabilidade da bebida láctea

A bebida fermentada foi estocada sob refrigeração a 4° C, em recipiente estéril de 500 mL para a avaliação de sua estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial, realizada a partir do primeiro dia, em intervalos de 7 dias, até o 28º dia de estocagem.

### *3.2.12.1. Estabilidade físico-química*

A estabilidade físico-química da bebida 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.

### *3.2.12.2. Estabilidade microbiológica*

A avaliação microbiológica da bebida láctea foi realizada paralelamente à avaliação físico-química e sensorial, em amostras tomadas ao acaso. O número de células da microflora essencial presentes na bebida, *L. casei* e *B. adolescentis* foi determinado pela contagem total de células viáveis de acordo com a metodologia desenvolvida para a cultura mista.

As demais determinações microbiológicas foram efetuadas de acordo com as técnicas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (BRASIL, 1992), cujos resultados foram interpretados segundo a Portaria nº 01 de 28 de janeiro de 1987 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (BRASIL, 1987), que estabelece padrões microbiológicos para leites fermentados, os quais consistem na pesquisa de salmonelas, número mais provável (NMP) de coliformes fecais e contagem de bolores e leveduras.

Embora não estabelecido pela legislação, o número mais provável de bactérias do grupo coliforme foi determinado, visto que estes microrganismos são indicadores das condições higiênicas mantidas durante o processamento do produto, limpeza e sanificação das instalações (SIQUEIRA, 1995).

#### a) Número mais provável de bactérias do grupo coliforme

Esta determinação foi realizada pela semeadura de três séries de tubos, contendo 9 mL de caldo lauril sulfato triptose e tubo de Durhan invertido, com 1 mL de diferentes diluições da amostra.

Os tubos foram incubados a 35° C por 24-48 horas para verificar a formação de gás e turvação do meio, indicativos da presença destes microrganismos. A partir dos tubos positivos, com formação de gás, foram semeados com alça de 5 mm, tubos com caldo bife verde brilhante 2 % lactose para a confirmação dos microrganismos. O número mais provável de coliformes totais/ mL de amostra foi calculado pelo número de tubos positivos confirmados, utilizando a tabela da Association of Official Analytical Chemists (HUNT & SPRINGER, 1978).

b) Número mais provável de coliformes fecais

O número mais provável de coliformes fecais foi determinado pela semeadura com alça dos tubos positivos de caldo lauril sulfato triptose em placas com ágar eosina azul de metíleno (EMB), as quais foram incubadas a 35° C por 24 horas e após, verificada presença de colônias no meio.

c) Contagem de bolores e leveduras

Esta contagem foi realizada pela semeadura de diferentes diluições da amostra em ágar batata dextrosado (PDA), previamente fundido e mantido a 45° C, cujo pH de 3,5 foi obtido pela adição de solução de ácido tartárico a 10 %, com a finalidade de inibir o crescimento bacteriano no meio. As placas foram invertidas e incubadas a 28° C por 48 horas e o resultado expresso em UFC/ mL. O método permite a contagem de esporos viáveis capazes de formar colônias.

d) Pesquisa de salmonelas

A pesquisa de salmonelas 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 tetratônato) e incubados a 43° C por 24 horas, cujo conteúdo foi posteriormente semeado em placas com ágar *Salmonella Shigella* e ágar eosina e azul de metileno, incubadas a 35° C por 24 a 48 horas. Os meios empregados foram testados utilizando-se cepa padrão de *Salmonella cholerae suis* (ATCC 10.708).

### 3.2.12.3. Estabilidade sensorial

A ocorrência de alterações no sabor, aroma, cor e aspecto da bebida durante o período de estocagem foi determinada pela avaliação sensorial. A bebida fermentada, aromatizada com 0,96 % p/v de essência de baunilha e adicionada de 4 % p/v de açúcar foi avaliada no 1°, 7°, 14°, 21° e 28° dias de estocagem. As amostras foram escolhidas ao acaso, homogeneizadas, distribuídas à razão de 30 mL em recipientes de polietileno, codificados aleatoriamente e apresentados a uma equipe de 17 provadores treinados. Os valores obtidos com o auxílio de escala hedônica estruturada de 9 pontos, para cada característica avaliada nos diferentes dias de amostragem, foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias (MORAES, 1990; SPROESSER & CHAVES, 1993).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MATERIAS-PRIMAS**

A obtenção de 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. Na elaboração de bebidas fermentadas, o extrato hidrossolúvel de soja (EHS) é utilizado como fonte de proteínas e o soro de leite, como fonte de carboidratos para o crescimento e fermentação das culturas específicas (SHIRAI *et al.*, 1992).

A composição fisico-química das matérias-primas utilizadas no substrato para fermentação está apresentada na Tabela 24.

**TABELA 24. Composição centesimal das matérias-primas utilizadas como substrato.**

Componentes	Leite de vaca (%)	Soro de leite de búfala (%)	Extrato hidrossolúvel de soja (%)
Água	91,07	93,52	95,19
Carboidratos	4,80	4,90	1,06
Proteínas	3,27	0,73	2,23
Lipídios	0,50	0,50	1,31
Cinzas	0,36	0,35	0,21
Extrato seco	8,93	6,48	4,81

A composição do leite de vaca varia de acordo com a espécie, raça, período de lactação, alimentação e características individuais da fêmea lactante (ALAIS, 1984).

Os valores obtidos para os componentes do leite utilizado apresentaram pequena variação dos valores obtidos por WALSTRA & JENNESS (1987), quanto aos teores em cinzas, 0,7 % e carboidratos, 4,6 %. O teor em proteínas apresentou-se similar ao encontrado pelos referidos autores, 3,2 %, porém, ligeiramente inferior ao obtido por BEHMER (1984), 3,6 %. No leite, o teor de água (91,07 %), superior aos teores de 87,5 e 87,3 % encontrados pelos autores, é decorrente do processo de desnaturamento promovido.

A composição química do extrato hidrossolúvel de soja (EHS) depende de vários fatores, como a variedade da soja e o processamento dos grãos, no qual influem o tempo e a temperatura empregados e a proporção soja: água (LO, 1968).

Os resultados obtidos para o extrato hidrossolúvel de soja diferem dos encontrados por GOMES (1986), apresentando-se inferiores para todos os componentes sólidos. O conteúdo em água apresentado pelo autor para o extrato de soja foi de 89,58 %, inferior ao valor de 95,19 % obtido para o extrato utilizado. Os teores em carboidratos, 1,40 %, proteínas, 5,76 %, lipídios, 2,46 % e cinzas, 0,80 % encontrados pelo autor, superaram significativamente os apresentados pelo extrato utilizado. No entanto, o extrato de soja obtido por PRUDÊNCIO (1995) foi caracterizado por valores de carboidratos, 1,12 %, proteínas 2,83 %, lipídios, 1,48 % e cinzas, 0,25 %, próximos aos encontrados neste estudo.

No processamento do EHS, a solubilidade das proteínas da soja em meio líquido, diminui em altas temperaturas, dificultando sua extração e resultando em produto de menor conteúdo protéico. Entretanto, extratos produzidos com altas temperaturas apresentam sabor mais agradável e melhor aceitação (LO, 1968).

O EHS utilizado apresentou teor protéico inferior aos encontrados pelos referidos autores, devido à temperatura empregada durante o processo de obtenção, o qual foi desenvolvido visando a produção de extrato de soja com melhor sabor e aroma, isento de sabores indesejáveis.

Assim como o extrato de soja, o soro de leite também apresenta composição variável com o processo empregado para sua obtenção. O soro de queijo do tipo Minas frescal é um produto de melhores características para fermentação, pois não contém corante ou sal.

O soro de leite de búfala possui alto teor de lactose e composição química bastante semelhante à do soro de leite de vaca descrita por ROLLAND (1991), cujos teores foram de 5,0 % de lactose, 0,80 % de proteínas, 0,30 % de lipídios e 0,55 % de cinzas. Apresenta coloração levemente esverdeada, devido à presença do pigmento biliverdina e maior teor em lipídios, identificados pela presença de glóbulos de gordura no soro (CITRO, 1993)

O baixo conteúdo em lipídios do soro usado resulta do desnatamento ao qual foi submetido, pois em sua origem apresentava 7 % de conteúdo lipídico. Ao contrário do soro de queijo de vaca que apresenta baixo teor de lipídios, visto que até 92 % dos lipídios do leite ficam retidos no queijo, o soro de queijo de búfala apresenta grande parte do total dos lipídios presentes no leite (ALAIS, 1984; LIGDA, 1997).

CABRERA *et al.* (1995) obtiveram para o soro de queijo branco de búfala valores de 5,5 % de lactose, 1,2 % de proteínas, superiores aos encontrados neste estudo, e valores de 0,5 % de lipídios e 0,3 % de cinzas, semelhantes aos apresentados para soro de leite de búfala utilizado.

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

A pasteurização do soro de leite é uma das mais importantes etapas do processamento de produtos lácteos, pois suas proteínas são sensíveis a altas temperaturas e apresentam a propriedade de coagular e formar complexos com outras quando aquecidas (MARSHALL *et al.*, 1982; GREIG & VAN KAN, 1984).

Tal propriedade justifica a incompatibilidade do soro de leite e do extrato de soja quando pasteurizados em um mesmo recipiente. A pasteurização conjunta resulta em produto final não homogêneo, com camadas distintas, a superior composta principalmente de proteínas do soro e a inferior, de proteínas da soja precipitadas (KARLESKIND *et al.*, 1991).

O tratamento térmico do soro de leite am temperaturas elevadas por período prolongado pode causar a desnaturação e floculação de suas proteínas, fenômenos que afetam significativamente a qualidade e aspecto do produto final. A desnaturação térmica de proteínas globulares é um processo irreversível em que as moléculas agregadas formadoras de matriz perdem a capacidade de serem facilmente dissociadas (ZIEGLER & FOEGEDING, 1990).

A floculação das proteínas do soro é decorrente do processo de desestabilização, resultante da perda da caseína na fabricação do queijo. O conteúdo reduzido de caseína aumenta a sensibilidade térmica das proteínas do soro (GREIG & VAN KAN, 1984).

Os resultados obtidos para as diferentes condições de tempo e temperatura empregadas no tratamento térmico do soro de leite de búfala estão apresentados na Tabela 25.

**TABELA 25. Efeito do tempo e temperatura de pasteurização no aspecto e qualidade microbiológica do soro de leite de búfala.**

Tempo (min)	Temperatura (°C)	Avaliação visual	Contagem padrão em placa (UFC/ml)
5	95	presença de floculação, pequenas partículas suspensas	ausência de crescimento microbiano
10	90	grande floculação, ligeira separação de fases	ausência de crescimento microbiano
15	85	intensa floculação separação de fases,	ausência de crescimento microbiano
20	80	ausência de floculação	ausência de crescimento microbiano
30	75	ausência de floculação	ausência de crescimento microbiano

Pode-se observar que o emprego de temperaturas superiores a 85° C resultou em soro cujas proteínas sofreram floculação, prejudicando seu aspecto e utilização em bebidas lácteas. Por sua vez, as amostras de soro submetidas à temperatura de 80° C e 75° C mostraram-se isentas de floculação, mantendo a estrutura protéica original.

De acordo com GREIG & VAN KAN (1984), a temperatura crítica para floculação das proteínas do soro é de 82° C, por isso, temperaturas superiores modificam a estrutura de suas moléculas, descaracterizando-as visualmente.

O tempo de pasteurização mostrou ser uma variável importante no tratamento térmico do soro de leite, visto que nas relações temperatura e tempo empregadas de 95° C por 5 min, 90° C por 10 min e 85° C por 15 min, o soro tratado nesta última condição mostrou floculação mais intensa que nas demais condições (Figura 6).

As proteínas floculadas do soro submetido à condição de 85°C por 15 min, precipitaram logo após o tratamento, formando depósito no fundo do frasco onde foi realizada a pasteurização e mostraram nítida separação da porção líquida. O soro de leite, tratado na condição de 95° C por 5 min, apresentou menor floculação e ausência de precipitado protéico.

A relação temperatura e tempo de 90° C por 10 min gerou maior floculação de proteínas do soro que a condição de 95° C por 5 min, porém não causou sua precipitação ou separação da porção líquida do soro.

Em temperaturas acima de 85° C, o tempo de tratamento mostrou ser um fator mais importante na intensidade de floculação e precipitação das proteínas do que a temperatura. Estas características apresentaram-se diretamente relacionadas e mais intensas nos tempos de pasteurização mais longos.



**FIGURA 6.** Características visuais do soro de leite de búfala tratado em diferentes condições de temperatura e tempo de pasteurização.

O objetivo fundamental do processo de pasteurização na elaboração da bebida láctea é a destruição ou redução do número de microrganismos indesejáveis, contaminantes e/ou patogênicos que possam comprometer a produção, estabilidade e conservação do produto ou a saúde dos consumidores (JAY, 1978). A pasteurização também proporciona a formação de gel e sua estabilidade pelas alterações nas proteínas do soro, minimiza a sinérese no produto final, aumenta o tamanho do micélio de proteínas e contribui no desenvolvimento de aroma desejável no produto (GREIG & VAN KAN, 1984).

A eficiência do tratamento térmico foi avaliada pela contagem do número de microrganismos presentes no material após o tratamento.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 25, todas as condições testadas de temperatura e tempo para o tratamento térmico do soro de leite de búfala mostraram-se eficientes na destruição microbiana. Entre as condições testadas, as relações 80° C por 20 min e 75° C por 30 min foram as mais adequadas para o tratamento térmico do soro de leite de búfala, pois não causaram a floculação das proteínas, mantendo seu aspecto original e proporcionaram boa qualidade microbiológica ao soro. A condição de 80° C por 20 min foi considerada ideal para o tratamento do soro por fornecer as características desejadas em um tempo de tratamento térmico mais curto.

Os demais componentes do substrato, o extrato hidrossolúvel de soja e o leite de vaca, foram submetidos à mesma condição de tratamento térmico, a qual também mostrou-se eficiente na destruição microbiana destas matérias-primas.

#### 4.3. SELEÇÃO DE CULTURAS SIMPLES

Seis diferentes cepas de bactérias lácticas e bífidas foram testadas quanto à habilidade de crescer e fermentar o substrato, composto de 40 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 25 % de extrato hidrossolúvel de soja.

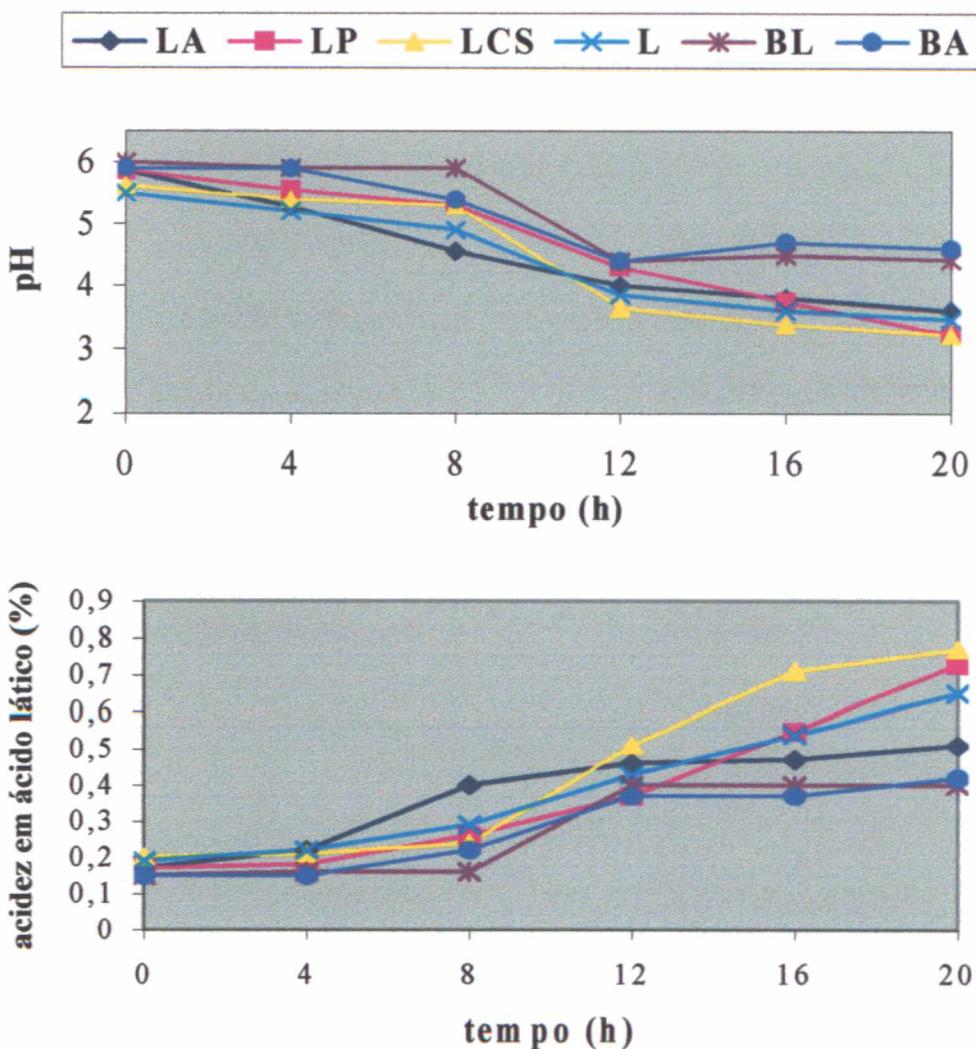
As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* utilizadas foram escolhidas por serem de origem intestinal, conhecidas pelas propriedades probióticas e por apresentarem a capacidade de fermentar pelo menos um dos açúcares presentes nas matérias-primas do substrato.

Todas as espécies testadas foram capazes de se desenvolver no substrato e apresentaram atividade fermentativa, verificada pelo abaixamento do pH e produção de ácido láctico (Figura 7). Pode-se observar estreita relação entre a queda do pH e o incremento de acidez no substrato fermentado. Pequenos desvios podem ser causados pelo tipo de ácido produzido e proporção de ácidos fricamente dissociados encontrados no material fermentado (ANGELES & MARTH, 1970).

As espécies de lactobacilos promoveram maior queda de pH e produção de ácido láctico que as bactérias bífidas. Estas últimas são caracterizadas pela produção de ácido acético na proporção de 3:2 em relação ao ácido láctico, ao passo que os lactobacilos apresentam como produto de sua atividade fermentativa quase que exclusivamente ácido láctico (VALENTIM *et al.*, 1994).

A queda de pH e a produção de ácido por *B. longum* e *B. adolescentis* apresentaram perfis bastante semelhantes. O pH manteve-se quase constante até 8 horas de fermentação, havendo queda mais acentuada com 12 horas. Após este período, permaneceu inalterado até o final de 20 horas, alcançando valores de 4,6 e 4,4 para *B. longum* e *B. adolescentis*, respectivamente. A acidez também manteve-se constante até 8 horas, com significativo aumento em 12 horas de fermentação e estabilização após este período.

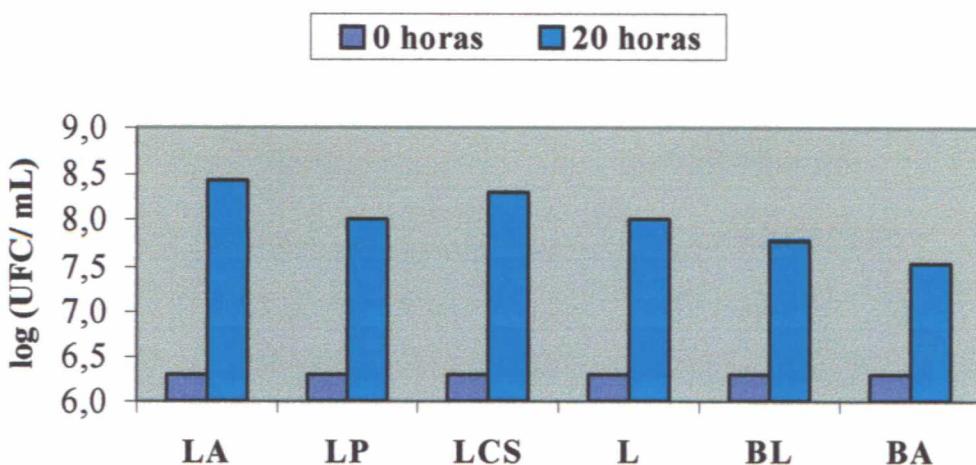
Entre os lactobacilos, o *Lactobacillus casei* ssp *shirota* e o *Lactobacillus acidophilus* propiciaram maior redução do pH no substrato que os demais. Enquanto o *Lactobacillus acidophilus* promoveu rápida queda inicial de pH, nas primeiras horas de fermentação e logo após 12 horas de fermentação o pH pouco diminuiu, o *Lactobacillus casei* proporcionou queda lenta e contínua do pH do substrato, atingindo níveis de acidez superiores aos gerados pelo *L. acidophilus* ao final da fermentação.



**FIGURA 7. Evolução do pH e acidez no substrato fermentado pelas diferentes cepas de bactérias testadas.**

LA - *Lactobacillus acidophilus*, LP - *Lactobacillus plantarum*, LCS - *Lactobacillus casei* ssp *shirota*, L - *Lactobacillus sp*, BL - *Bifidobacterium longum*, BA - *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 20 horas.

O crescimento das bactérias no substrato foi verificado pelo aumento do número de células viáveis das espécies após a fermentação (Figura 8). As cepas *L. casei* e *L. acidophilus* apresentaram maior número de células,  $2 \times 10^8$  e  $2,7 \times 10^8$ , ao final de 20 horas de fermentação quando comparadas às demais espécies.



**FIGURA 8.** Evolução do número de células viáveis das diferentes cepas de bactérias testadas para a fermentação do substrato.

LA - *Lactobacillus acidophilus*, LP - *Lactobacillus plantarum*, LCS - *Lactobacillus casei* ssp *shirota*, L - *Lactobacillus* sp, BL - *Bifidobacterium longum*, BA - *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 20 horas.

Apesar dos altos níveis de acidez e baixos valores de pH encontrados nas misturas fermentadas, as células bacterianas permaneceram viáveis ao final das 20 horas de fermentação.

A avaliação organoléptica compreende a avaliação de atributos perceptíveis em um produto, principalmente pelos sentidos químicos e outros sentidos na cavidade oral (ABNT, 1993), sendo realizada de maneira mais simplificada e podendo apresentar-se como uma etapa prévia à avaliação sensorial. Na avaliação organoléptica após a fermentação, o sabor e aroma característicos de soja nas misturas fermentadas por bactérias bífidas apresentaram-se menos intensos quando comparados às misturas não fermentadas. Logo após as primeiras horas de fermentação, verificou-se ligeira alteração no sabor e aroma das misturas fermentadas por este gênero de bactérias, provavelmente devido à produção de compostos voláteis, como acetaldeído, diacetil e etanol.

MURTI *et al.* (1992) verificaram que em iogurtes de soja fermentados por *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus* e *Bifidobacterium sp*, a concentração de acetaldeído mostrou-se três vezes maior em relação ao produto não fermentado, juntamente com um decréscimo na concentração de n-hexanal, composto resultante da quebra de ácidos polinsaturados existentes na soja, catalisada por uma lipoxigenase, resultando no aroma e sabor desagradável neste tipo de produto.

As misturas fermentadas por lactobacilos apresentaram-se mais ácidas ao paladar do que as fermentadas pelas bactérias bífidas, cuja acidez tornou-se perceptível somente após 8 horas de fermentação. O produto fermentado por *Lactobacilos acidophilus* mostrou a maior acidez ao paladar.

O período de fermentação de 20 horas mostrou-se inadequado para a produção da bebida láctea, visto que a partir de 12 horas de fermentação verificou-se a perda de homogeneidade do substrato e precipitação protéica, provavelmente resultantes da acentuada acidificação do meio, atingindo baixos valores de pH (inferiores a 4,6). Desta forma, as fermentações posteriores foram conduzidas por um período de 12 horas.

As espécies *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium adolescentis* foram selecionadas para os experimentos posteriores. A escolha das primeiras resultou do rápido abaixamento de pH e produção de ácido láctico promovidos e a escolha das últimas baseou-se no desenvolvimento de sabor e aroma agradáveis na bebida fermentada verificados pela avaliação organoléptica.

#### 4.4. SELEÇÃO DE CULTURAS MISTAS

O uso de culturas mistas proporciona ao produto, as características individuais desejáveis de cada microrganismo, que podem encontrar-se em sinergismo e que não estariam presentes com o uso de culturas simples (KLAVER *et al.*, 1993).

Buscando aproveitar as características desejáveis conferidas ao produto pelas cepas individualmente e verificar os efeitos de seu uso em associação, as cepas de lactobacilos e bifidobactérias selecionadas foram utilizadas em culturas mistas para a fermentação do substrato.

As características organolépticas dos produtos fermentados pelas culturas mistas após 12 horas de fermentação estão descritas na Tabela 26.

**TABELA 26. Avaliação organoléptica das bebidas fermentadas por diferentes combinações de culturas mistas.**

Culturas mistas	Aspecto geral	Aroma e sabor de soja	Acidez	Avaliação global
LA-LCS	leve separação do soro, coagulação	++	++	pouco agradável
LA-BL	acentuada separação do soro, formação de camadas distintas	+	++	pouco agradável
LA-BA	ausência de coagulação, bom aspecto	+	+	agradável
LCS-BL	ausência de coagulação, bom aspecto	+	+	agradável
LCS-BA	ausência de coagulação, bom aspecto	+	+	agradável, mais apreciada
BA-BL	ausência de coagulação, bom aspecto	+	+	agradável, sabor inexpressivo

LA - *Lactobacillus acidophilus*

LCS - *Lactobacillus casei* ssp *shirota*

BL - *Bifidobacterium longum*

BA - *Bifidobacterium adolescentis*

+ - baixa intensidade

++ - média intensidade

As bebidas fermentadas pelas culturas mistas *L. acidophilus* - *L. casei* e *L. acidophilus* - *B. longum* foram consideradas pouco agradáveis na avaliação global, apresentaram coagulação protética e separação das fases sólida e líquida que prejudicaram seu aspecto final.

Estes efeitos estão associados aos baixos valores de pH, 3,6 e 3,9 e níveis de acidez, 0,48 % e 0,38 % obtidos (Tabela 27), que causam a desestabilização da estrutura protéica e sua coagulação, visto que as proteínas do leite apresentam ponto isoelétrico em pH próximo a 4,6 (ALAIS, 1984) e as proteínas da soja, pH 5,2 (ANGELES & MARTH, 1970).

**TABELA 27. Valores de pH e acidez titulável obtidos nas misturas fermentadas por diferentes associações de culturas.**

Culturas mistas	pH		Acidez em ácido láctico (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
LA-LCS	6,00	3,60	0,17	0,48
LA-BL	6,20	3,90	0,15	0,38
LA-BA	6,10	4,60	0,16	0,25
LCS-BL	6,10	5,00	0,17	0,18
LCS-BA	6,30	5,10	0,17	0,17
BA-BL	6,30	5,20	0,14	0,15

Culturas mistas: LA - *Lactobacillus acidophilus*, LCS - *Lactobacillus casei* ssp *shirota*, BL - *Bifidobacterium longum*, BA - *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 12 horas.

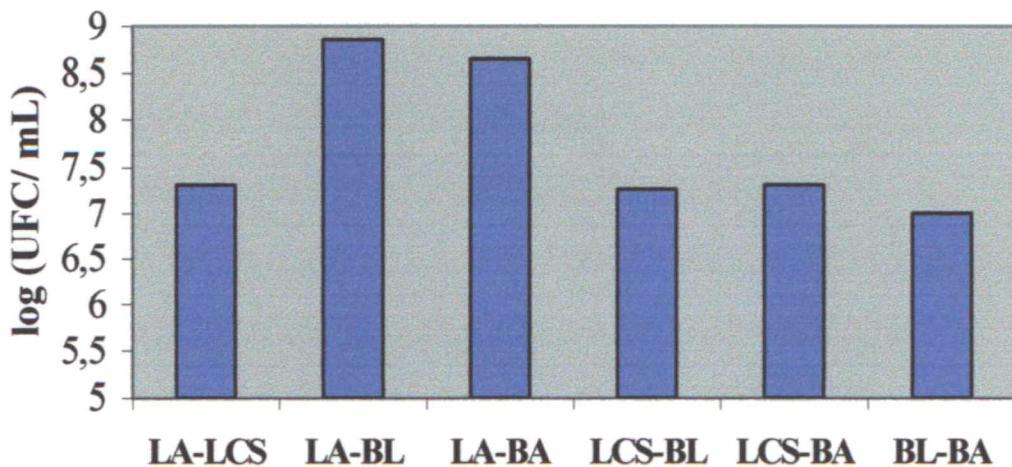
A elevada acidez e o baixo pH produzidos pelas culturas *L. acidophilus* - *L. casei* e *L. acidophilus* - *B. longum* resultaram da ação do *Lactobacillus acidophilus*, microrganismo conhecido pela grande capacidade de produção de ácido no meio de fermentação. Devido à sua característica de alta acidez, os produtos acidófilos são apreciados por um grupo restrito de consumidores (TAMIME & ROBINSON, 1988).

A presença das espécies de *Bifidobacterium* nas culturas mistas resultou em produtos agradáveis, de menor acidez e maiores valores de pH (Tabela 27). Isto deve-se ao fato de que, em sua grande maioria, as bactérias bífidas carecem da habilidade de gerar grandes quantidades de ácido, produzindo-o lentamente e resultando em produto final de sabor e aroma suaves (SAMONA & ROBINSON, 1994). Esta característica mostrou-se presente na mistura fermentada pela cultura *B. longum* - *B. adolescentis*, que apesar de apresentar bom aspecto, obteve baixa acidez e pouco sabor. A baixa intensidade de sabor e aroma de soja nas misturas fermentadas pelas culturas mistas de bactérias bífidas reforça a possibilidade de produção de compostos voláteis que mascaram o sabor e aroma característicos da soja (MURTI *et al.*, 1992).

O uso de bifidobactérias em culturas mistas, principalmente com lactobacilos, além de conferir limitada acidificação do produto, proporciona também a formação de ácido L (+) láctico e as propriedades benéficas associadas a estas bactérias intestinais (MEDINA & JORDANO, 1994).

As cepas em cultivo misto, *L. acidophilus* - *B. longum* e *L. acidophilus* - *B. adolescentis*, que produziram maior acidez e abaixamento de pH, também apresentaram maior número de células viáveis nas misturas após a fermentação (Figura 9). A menor contagem celular final obtida para a combinação *L. acidophilus* - *L. casei* deve-se provavelmente aos níveis de pH e acidez terem atingido o limite crítico para a sobrevivência dos microrganismos no meio de fermentação. O número de células viáveis das demais culturas após 12 horas de fermentação mostrou-se semelhante, assim como os valores de pH e acidez (Figura 9).

A combinação *L. casei shirota* e *B. adolescentis* resultou em produto com sabor e aroma agradáveis, aspecto homogêneo, isento de coagulação ou sabor predominante de soja e foi selecionada para os estudos posteriores.



**FIGURA 9.** Número total de células viáveis nas bebidas fermentadas pelas diferentes culturas mistas.

Culturas mistas: LA - *Lactobacillus acidophilus*, LCS - *Lactobacillus casei* ssp *shirota*, BL - *Bifidobacterium longum*, BA - *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 12 horas.

Devido à suscetibilidade das bifidobactérias a baixos valores de pH (4,0 a 4,5) e à necessidade de baixa tensão de oxigênio inicial no meio para seu crescimento, o cultivo concomitante de *Lactobacillus casei* é vantajoso, visto que este lactobacilo promove lenta acidificação e permite a redução do nível de oxigênio do meio, antes que este torne-se excessivamente ácido para a sobrevivência das bactérias bífidas. KLAVER *et al.* (1993) verificaram que a presença de bactérias proteolíticas, como o *L. casei* em cultivo misto com bactérias bífidas no leite, oferece os compostos nitrogenados necessários ao seu crescimento e que não estariam disponíveis sem a ação proteolítica do lactobacilo.

Os produtos fermentados por *Lactobacillus casei* em cultura simples tendem a apresentar intenso sabor ácido, principalmente quando atingem número de células viáveis superiores a  $1 \times 10^8$  células por mL. A combinação com bifidobactérias sugere a redução desta característica indesejável, devido às propriedades organolépticas e baixa acidificação conferidas ao produto (HONSHA *et al.* 1993, SAMONA & ROBINSON, 1994).

## 4.5. SELEÇÃO DE FORMULAÇÕES

Na elaboração de bebidas lácteas, a incorporação de grandes quantidades de soro de leite e extrato de soja reduz o custo do produto final. Entretanto, sua aceitabilidade torna-se restrita devido às características organolépticas peculiares destas matérias-primas.

Com o intuito de aumentar o conteúdo de soro de leite e extrato hidrossolúvel de soja no substrato, mas sem prejudicar a qualidade sensorial do produto, foram testadas diferentes formulações para a bebida láctea.

### 4.5.1. Pré-seleção de formulações

As formulações testadas neste estudo e suas respectivas composições estão apresentadas na Tabela 28.

**TABELA 28. Diferentes formulações testadas na elaboração da bebida láctea.**

Formulações	Leite de vaca (%)	Soro de leite de búfala (%)	Extrato hidrossolúvel de soja (%)
A	40	40	20
B	40	35	25
C	40	30	30
D	40	25	35
E	25	40	35
F	25	35	40

Na Tabela 29 estão descritas as características organolépticas das formulações fermentadas pela cultura mista *L. casei* e *B. adolescentis*.

**TABELA 29.** Avaliação organoléptica das formulações testadas.

Formulações	Aroma e sabor de soja	Acidez	Avaliação global
A	+	++	pouco agradável, sabor ligeiramente salgado
B	+	+	agradável
C	+	+	agradável, mais apreciada
D	+	+	agradável
E	+++	+++	pouco agradável, sabor ácido predominante, ligeiramente salgado
F	+++	++	pouco agradável, sabor de soja predominante

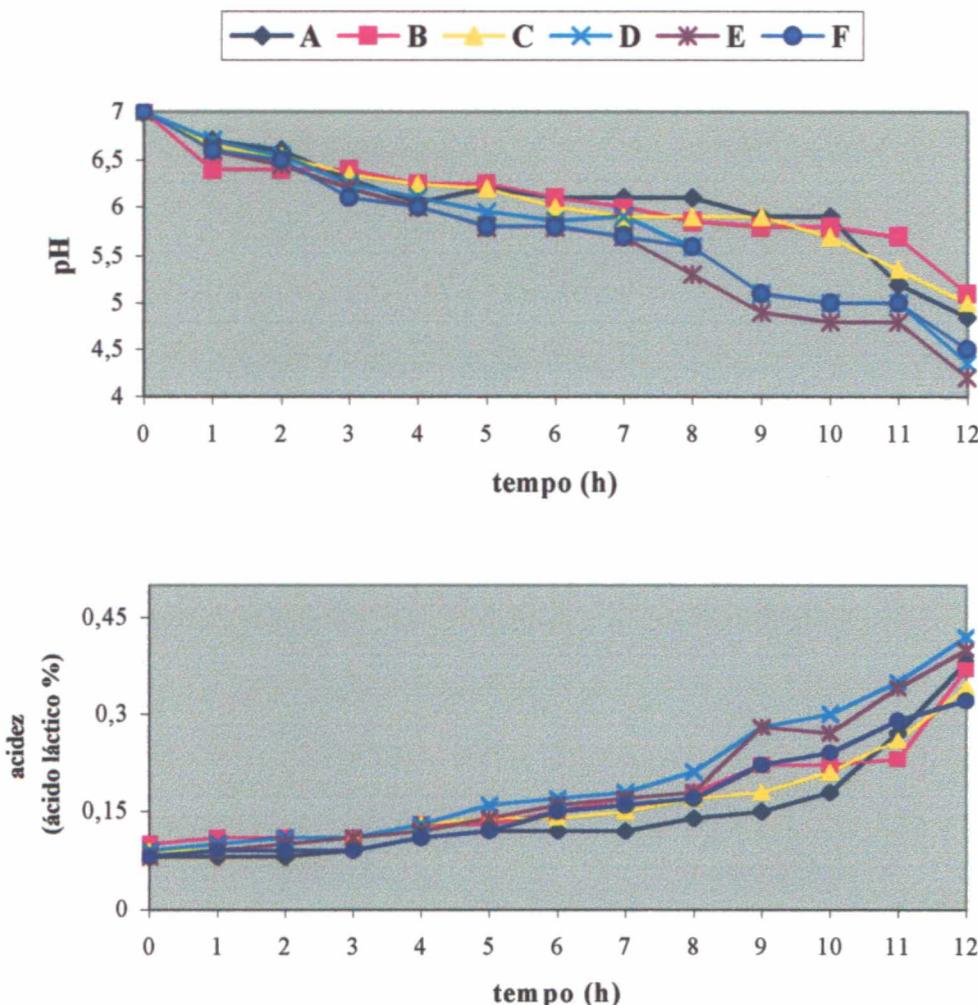
+ - baixa intensidade

++ - média intensidade

+++ - alta intensidade

As formulações B, C e D apresentaram-se agradáveis sensorialmente, nas quais o aroma e sabor de soja estavam quase inexistentes. Verifica-se que nestas formulações, o leite de vaca é o maior constituinte (40 %), o qual provavelmente mascara o sabor e aroma peculiares da leguminosa, assim como as características sensoriais do soro de leite de búfala. Apesar de também apresentar 40 % de leite de vaca em sua composição, a formulação A mostrou menor aceitação devido à grande quantidade de soro de leite de búfala, tornando-a ligeiramente salgada, ácida e pouco agradável.

A formulação E apresentou perfil sensorial semelhante ao da formulação A e intenso sabor e aroma de soja, pois apresentava 35 % de extrato hidrossolúvel de soja em sua composição. Sua alta acidez ao paladar está relacionada ao valores de pH, 4,2 e acidez titulável, 0,43 %, obtidos após a fermentação, superiores aos das demais formulações (Figura 10).



**FIGURA 10.** Evolução do pH e acidez titulável durante a fermentação das diferentes formulações.

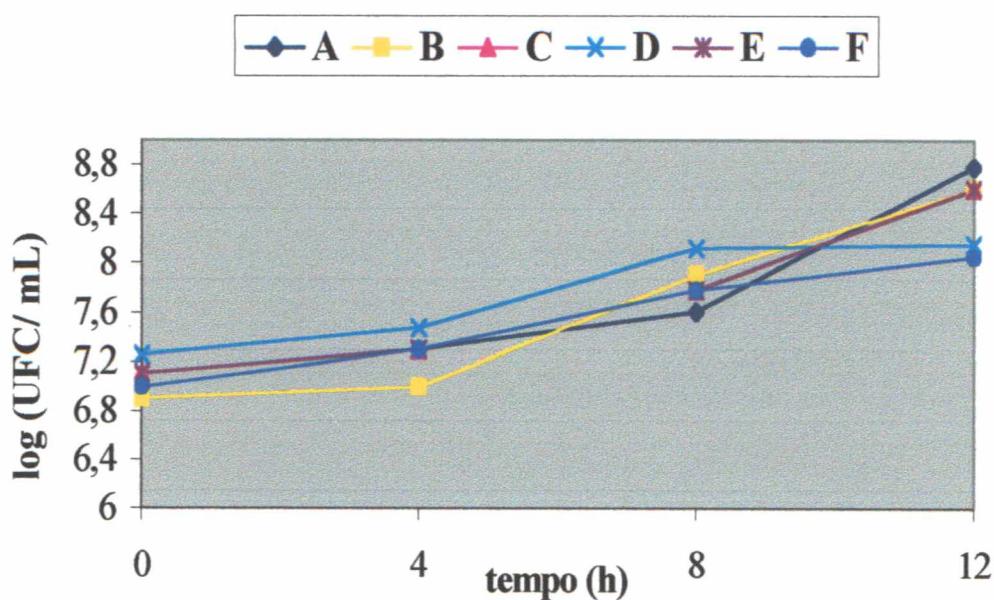
Cultura mista: *Lactobacillus casei* ssp *shirota* e *Bifidobacterium adolescentis*.

Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 12 horas.

As características organolépticas indesejáveis da soja também estavam presentes na formulação F, cujo maior constituinte era o extrato hidrossolúvel de soja (40 %). Estas formulações apresentavam a menor composição em leite de vaca e suas características organolépticas reforçam a possibilidade de que a presença do leite de vaca em maiores quantidades no substrato torna menos intensos os sabores indesejáveis da soja e do soro de leite de búfala.

As formulações apresentaram evolução de pH e acidez titulável semelhantes até 8 horas de fermentação, após este período, as formulações D e E mostraram maior decréscimo de pH e incremento de acidez. Verifica-se que as formulações A, B e C proporcionaram menor decréscimo de pH e incremento de acidez, comportando-se de maneira similar após 8 horas de fermentação. Por sua vez, a formulação F apresentou valores intermediários para as determinações de pH e acidez, cujos valores foram de 4,45 e 0,40 %, respectivamente.

Todas as formulações mostraram pouco crescimento celular no intervalo de 0 a 4 horas de fermentação, caracterizando a fase de adaptação da cultura ao meio (Figura 11). Após este período até 8 horas, a formulação D apresentou a maior contagem celular,  $1,3 \times 10^8$  células viáveis/ mL, enquanto que as demais formulações proporcionaram crescimento celular semelhante. Ao final de 12 horas de fermentação, as formulações D, E e F mostraram valores de contagem celular menores que os obtidos para as formulações A, B e C, devido à inibição do crescimento da cultura mista pela grande acidificação gerada no meio.



**FIGURA 11.** Evolução no número de células da cultura mista durante a fermentação das diferentes formulações.

Todas as formulações testadas possibilitaram o desenvolvimento da cultura mista e a produção de ácido láctico no meio. Estando a aceitação de um produto diretamente relacionada aos seus atributos sensoriais, a seleção da formulação mais adequada à elaboração da bebida láctea baseou-se nas características organolépticas apresentadas pelas formulações. A formulação C foi selecionada para experimentos posteriores, pois apresentou características de sabor e aroma desejáveis à bebida láctea.

Após a fermentação, as formulações foram mantidas sob refrigeração e ao final de 12 horas, todas as formulações apresentaram perda de estabilidade, precipitação protéica e separação de fases, prejudicando seu aspecto. Tal fenômeno pareceu estar associado aos baixos valores de pH atingidos em 12 horas de fermentação. Desta forma, definiu-se o tempo de fermentação de 8 horas como ideal para a obtenção da bebida láctea.

#### 4.5.2. Seleção de formulações

A formulação selecionada no estudo anterior, apesar de mostrar características sensoriais desejáveis, apresentava como maior constituinte o leite de vaca. Buscando diminuir este conteúdo, porém mantendo o perfil sensorial, foram testadas três formulações em comparação com a formulação previamente selecionada. O conteúdo de leite de vaca, extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala nas formulações está descrito na Tabela 30.

**TABELA 30. Proporções de matérias-primas das misturas testadas para a seleção de formulações.**

Formulações	Leite de vaca (%)	Soro de leite de búfala (%)	Extrato hidrossolúvel de soja (%)
C	40	30	30
G	35	35	30
H	35	30	35
I	30	35	35

As formulações fermentadas foram avaliadas quanto à intensidade e presença de características que influenciam a qualidade da bebida láctea pelo uso de escala não estruturada. Este método permite criar a impressão de continuidade na faixa de variação dos atributos específicos, contribuindo para a qualidade sensorial do produto (CHAVES & SPROESSER, 1993). Os resultados obtidos na avaliação de cada atributo estão apresentados na Tabela 31.

**TABELA 31. Médias obtidas para as características avaliadas das formulações com reduzido conteúdo de leite de vaca.**

Características	Formulações			
	C	G	H	I
Homogeneidade	8,7 <sup>ab</sup>	8,8 <sup>a</sup>	8,5 <sup>ab</sup>	7,7 <sup>b</sup>
Aspecto	8,7 <sup>a</sup>	8,5 <sup>a</sup>	8,7 <sup>a</sup>	7,2 <sup>b</sup>
Aroma global	7,2	7,2	6,9	6,2
Aroma de soja	2,4	1,5	1,9	2,3
Aroma ácido	2	2,1	2,7	2,9
Sabor global	6,3	7,2	6	5,8
Sabor de soja	3,3	2	2,7	3
Sabor ácido	1,7	1,7	2,5	2,7
Consistência	5,8	4,4	4,4	3,7

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

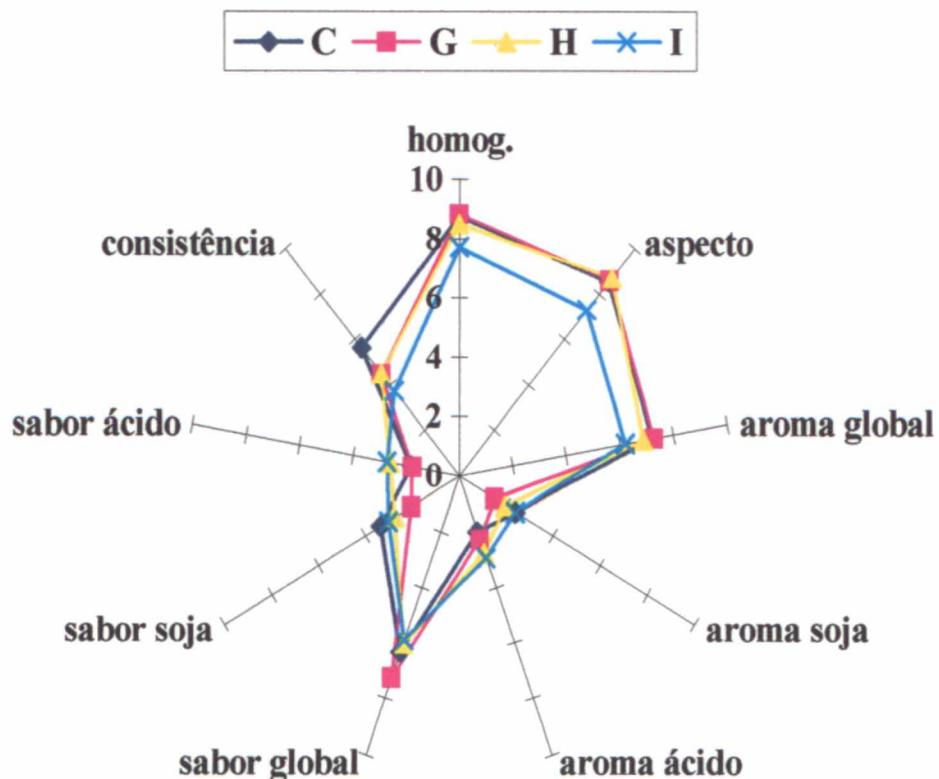
As características sensoriais consideradas desejáveis na bebida láctea foram sabor e aroma global agradáveis, ausência de sabor e aroma de soja, baixa acidez, consistência líquida e aspecto homogêneo, sem precipitação ou separação de fases.

As características de homogeneidade e aspecto receberam os maiores escores na avaliação pelos provadores em relação aos demais atributos. Em contrapartida, somente para estas características as formulações testadas apresentaram-se significativamente diferentes, sendo a formulação I inferior às formulações C, G e H. Para os demais atributos avaliados, as formulações não apresentaram diferença estatística significativa.

Verifica-se que a formulação G obteve melhor pontuação para a maioria das características avaliadas. As formulações C e I apresentaram maior sabor e aroma de soja, entretanto os escores obtidos mostraram que estas características estavam presentes em baixa intensidade. Os valores atribuídos às características avaliadas em cada formulação podem ser mais facilmente visualizados na Figura 12.

Os escores medianos atribuídos ao sabor e aroma global resultaram da avaliação das formulações não aromatizadas, apenas adoçadas. A adição de essências aromatizantes, além de melhorar a aceitação do produto, mascara os sabores objetáveis da soja (SHIRAI *et al.*, 1992).

As formulações testadas apresentaram consistência líquida e escores inferiores a 5,8, visto que o escore 10, sugeria consistência viscosa. O sabor e aroma ácidos também mostraram-se presentes em baixa intensidade nas formulações, os quais estão relacionados à baixa acidez titulável e valores de pH obtidos (Tabela 32).



**FIGURA 12. Perfil de características da avaliação sensorial das formulações C, G, H e I.**

Formulação C - 40 % leite de vaca, 30 % soro de leite de búfala, 30% extrato hidrossolúvel de soja; G - 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja, H - 35 % leite de vaca, 30 % soro de leite de búfala, 35 % extrato hidrossolúvel de soja; I - 30 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 35 % extrato hidrossolúvel de soja.

Nas determinações de pH, acidez titulável, açúcares redutores e contagem celular (Figura 13), que mostram a evolução da fermentação, as formulações obtiveram resultados semelhantes e desta forma, apresentaram-se similares quanto ao perfil fermentativo.

**TABELA 32. Valores de pH, acidez titulável e açúcares redutores nas formulações C, G, H e I no início e após 8 horas de fermentação.**

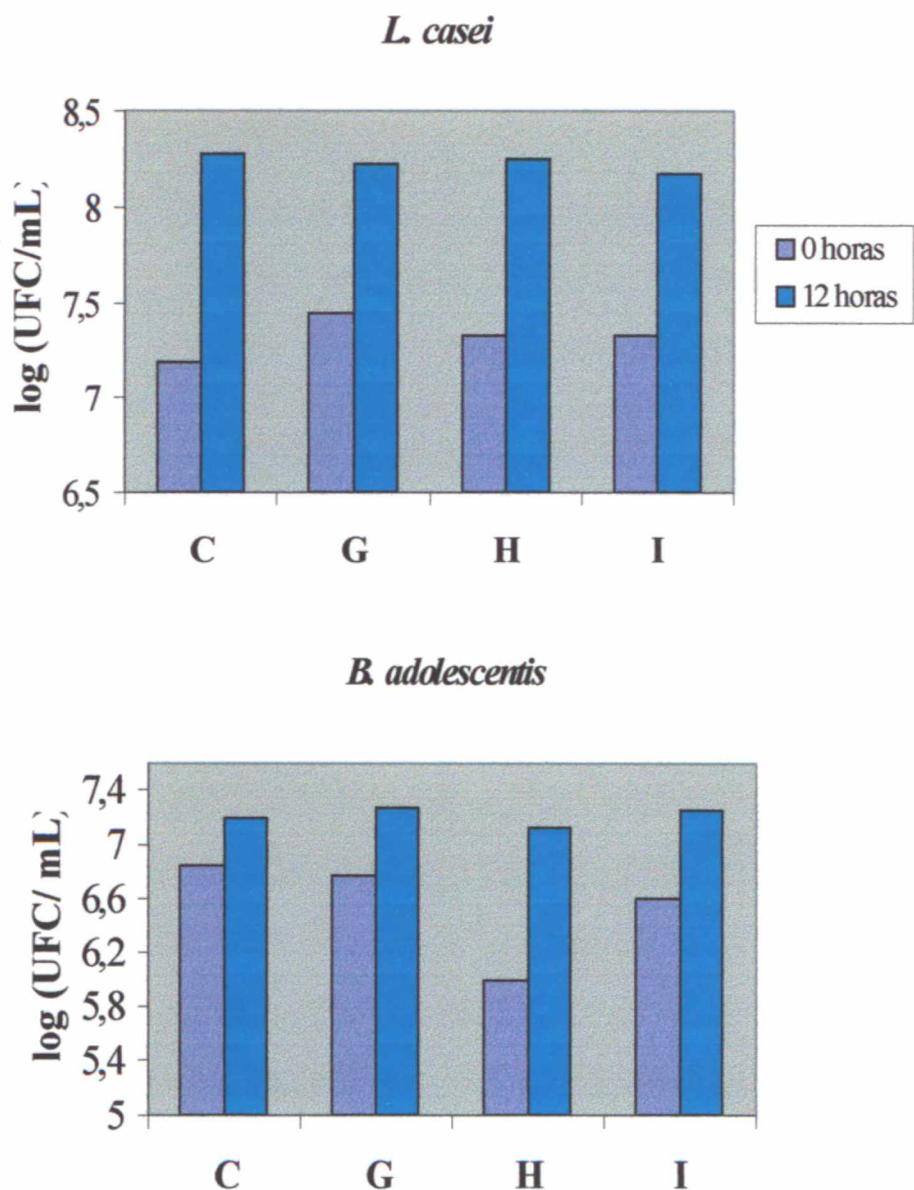
Formulações	pH		Acidez em ácido láctico (%)		Açúcares redutores (g/ 100 mL)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
C	7,00	5,90	0,06	0,15	3,00	1,72
G	7,00	5,80	0,06	0,16	2,90	1,96
H	7,00	5,70	0,06	0,15	3,00	1,69
I	7,00	5,70	0,06	0,17	2,87	1,72

Formulação C - 40 % leite de vaca, 30 % soro de leite de búfala, 30% extrato hidrossolúvel de soja; G - 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja, H - 35 % leite de vaca, 30 % soro de leite de búfala, 35 % extrato hidrossolúvel de soja; I - 30 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 35 % extrato hidrossolúvel de soja.

A baixa acidez verificada nas formulações resultou do menor tempo de fermentação definido, pois fermentações conduzidas por períodos maiores que 8 horas, acarretaram na perda de estabilidade do substrato devido aos baixos valores de pH atingidos.

O conteúdo final de açúcares redutores nas formulações representou aproximadamente 50 % do conteúdo inicial. A redução do conteúdo de açúcares redutores, juntamente com o incremento na contagem celular da cultura mista, permite afirmar que as formulações forneceram os nutrientes necessários ao desenvolvimento das cepas selecionadas.

A contagem celular de *L. casei* e *B. adolescentis* nas formulações testadas está apresentada na Figura 13.



**FIGURA 13.** Número de células viáveis de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* nas formulações C, G, H e I.

Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas.

A contagem de lactobacilos e bifidobactérias em culturas mistas requer o uso de meios seletivos que permitam o desenvolvimento da espécie desejada, inibindo o crescimento da outra (CHEVALIER *et al.*, 1991). Os resultados apresentados para a contagem celular foram obtidos pela semeadura das cepas em meio seletivo.

Foram testados diferentes métodos seletivos, incluindo o uso de antibióticos e substâncias conhecidas para a seleção de bifidobactérias, como sais biliares e cloreto de lítio (CHEVALIER *et al.*, 1991; KLAVER *et al.*, 1993; MEDINA & JORDANO, 1994). Entretanto, estes métodos não se mostraram eficientes ao objetivo proposto.

Devido à capacidade atribuída a *B. adolescentis* de fermentar diversos açúcares, entre estes pentoses, foram desenvolvidos meios de cultura seletivos a partir do meio MRS, nos quais a dextrose era substituída por xilose, arabinose e rafinose (SCARDOVI, 1986). Ambas as cepas, *L. casei* e *B. adolescentis*, foram semeadas em ágar MRS padrão e ágar MRS contendo os referidos açúcares, para verificar seu crescimento após incubação em anaerobiose por 48 horas a 37° C.

Em todos os meios testados, o lactobacilo não apresentou crescimento, devido à incapacidade de metabolizar os açúcares fornecidos, conforme descrito anteriormente por KANDLER & WEISS (1986). Os meios permitiram adequado crescimento de *B. adolescentis*, que apresentou contagem celular semelhante à obtida em meio MRS padrão. Para a contagem da bifidobactéria isoladamente, selecionou-se o meio contendo xilose em virtude de sua maior disponibilidade. Por sua vez, a contagem do lactobacilo isoladamente foi realizada em ágar MRS em aerobiose, visto que a presença de O<sub>2</sub> atua como agente inibidor do crescimento de bifidobactérias.

A formulação G cuja composição era 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja foi considerada ideal como substrato para fermentação e para a obtenção de bebida láctea sensorialmente agradável, tornando possível a redução do conteúdo de leite de vaca na composição do substrato.

## 4.6. CRESCIMENTO E PROPORÇÃO DAS CULTURAS SELECIONADAS EM CALDO DE INOCULAÇÃO

### 4.6.1. Efeito do período de incubação no crescimento de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* no inóculo

Para a obtenção de inóculo com maior número de células viáveis foi estudado o efeito do tempo de incubação sobre a curva de crescimento de *L. casei* e *B. adolescentis* em caldo de inoculação.

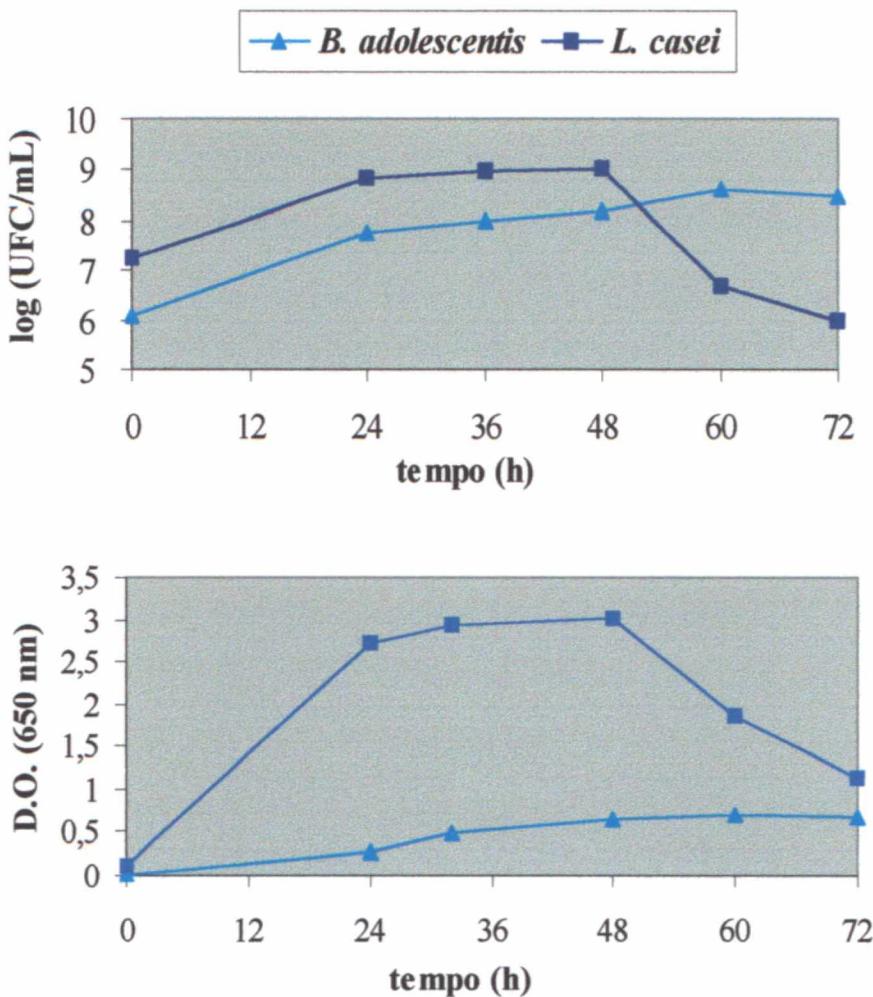
A curva de crescimento foi definida pela evolução na contagem total de células viáveis e densidade óptica (D.O.) durante a incubação, cujos resultados estão apresentados na Figura 14.

A cepa de *L. casei* apresentou maior velocidade de crescimento inicial, atingindo  $1,1 \times 10^9$  células/ mL em 48 horas de incubação. No período de 60 horas, mostrou acentuado descrédito no número de células,  $5,0 \times 10^6$  que permaneceu diminuindo lentamente até 72 horas de incubação.

Por outro lado, *B. adolescentis* mostrou crescimento lento e contínuo até 60 horas de incubação, aumentando seu número inicial de células de  $1,2 \times 10^6$  para  $3,9 \times 10^8$  e exibindo pequena redução ao final de 72 horas.

VALENTIM *et al.* (1994) obtiveram contagem celular de  $3,6 \times 10^9$  células/ mL de *B. adolescentis* em caldo MRS após 48 horas de incubação, porém a cultura inicial apresentava  $1,7 \times 10^9$  células/ mL.

As células de *B. adolescentis* foram enumeradas em ágar MRS e em ágar MRS modificado. Os resultados apresentados foram obtidos em ágar MRS devido à sua composição mais simplificada e de menor custo, visto que ambos os meios de cultura mostraram-se igualmente eficientes para a enumeração da cepa.



**FIGURA 14. Curva de crescimento e evolução da densidade óptica de *Lactobacillus casei* em caldo MRS e *Bifidobacterium adolescentis* em caldo MRS modificado.**

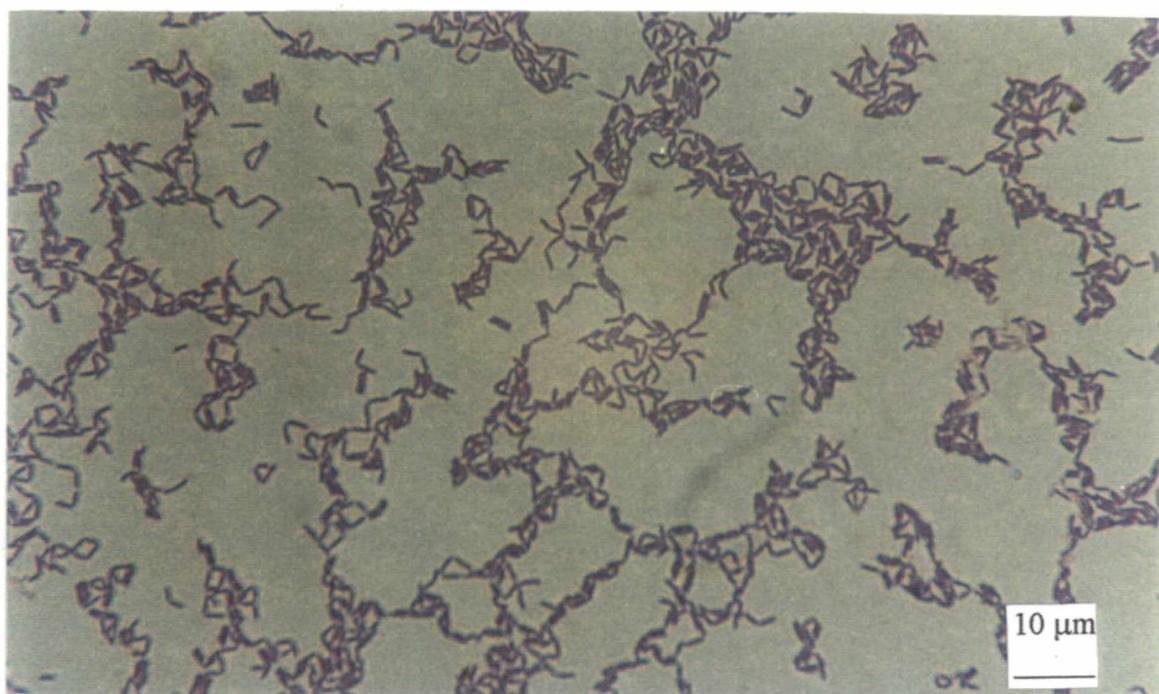
LCS: *Lactobacillus casei* ssp *shirota* BA: *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, período de incubação: 72 horas.

O aumento da densidade óptica em cultivos celulares está associado ao incremento do número de unidades formadoras de colônias, podendo desta forma ser utilizada para avaliar o crescimento celular em determinado meio de cultura (GOUQUIANG *et al.*, 1991). Acompanhando a evolução do número de células, os valores de densidade óptica (D. O.) do cultivo de *L. casei* foram superiores aos obtidos para *B. adolescentis*. Os valores de D.O. obtidos no inóculo de *L. casei* (2,72) foram semelhantes aos encontrados por VISCARRA (1995) em cultivos com 24 horas de incubação, cujo valor obtido foi 2,60.

VALENTIM *et al.* (1994) encontraram valores de D.O. em cultivos de *B. adolescentis* superiores aos obtidos neste estudo (0,90), entretanto o número de células viáveis neste inóculo também mostrou-se superior. Os baixos valores de D.O. verificados no inóculo de *B. adolescentis* em comparação aos do inóculo de *L. casei* devem-se provavelmente ao pequeno tamanho de suas células que geram menor turbidez no meio de cultura e desta forma apresentam densidade óptica inferior.

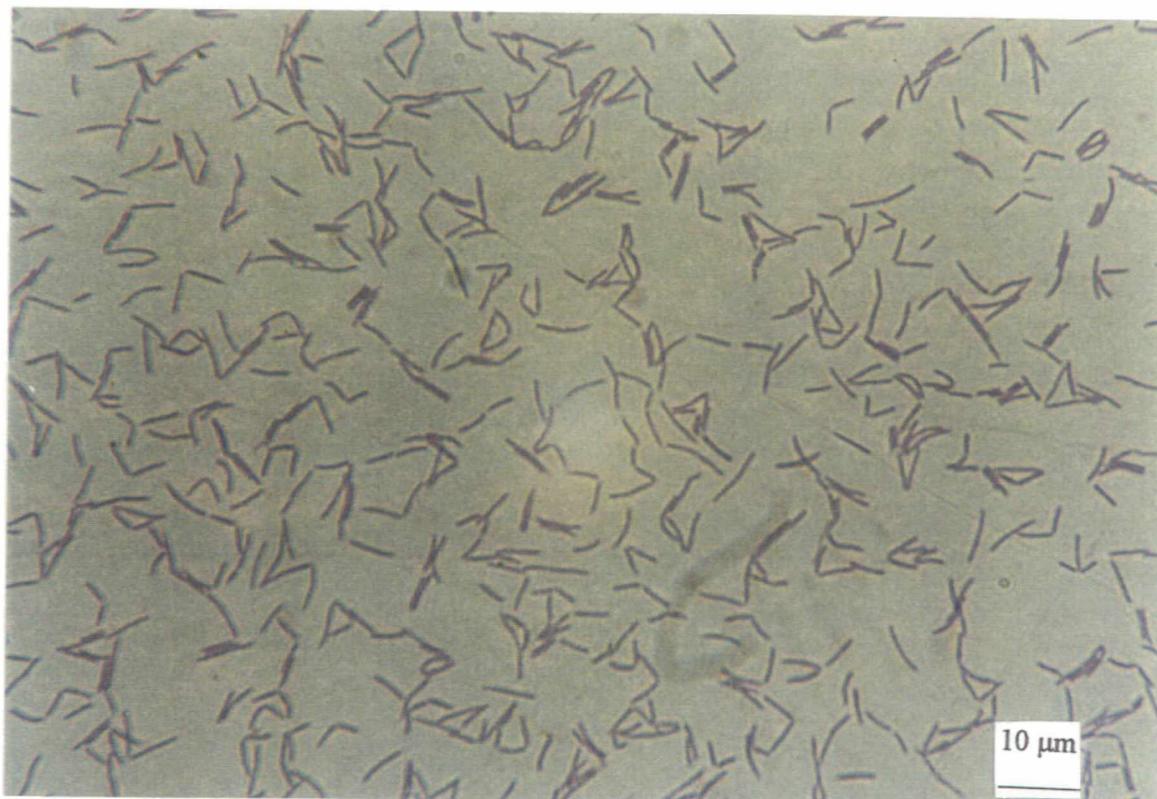
A maior contagem celular de *L. casei* em caldo MRS foi obtida em 48 horas de incubação a 37° C e o crescimento de *B. adolescentis* atingiu seu máximo em 60 horas de incubação a 37° C em caldo MRS modificado. O tempo de incubação para a produção dos inóculos foi estabelecido em 48 horas para o lactobacilo e 60 horas para a bifidobactéria.

As células das bactérias bífidas caracterizam-se pela forma curta, irregular e ramificada, enquanto as células de lactobacilos apresentam-se mais estreitas e longas, cujo comprimento representa de três a quatro vezes o comprimento das bifidobactérias (MURTI *et al.*, 1992). Tais características podem ser visualizadas nas Figuras 15 e 16.



**FIGURA 15.** Morfologia celular de cultura de *B. adolescentis* em caldo MRS modificado após 60 horas de incubação a 37° C (x 1.000).

Microfotografia de transmissão de luz.



**FIGURA 16.** Morfologia celular de cultura de *L. casei* em caldo MRS após 48 horas de incubação a 37° C (x 1.000).  
Microfotografia de transmissão de luz.

Observou-se que ambas as cepas reagem positivamente à coloração de Gram e tendem a formar cadeias de células, organizando-se em grupos compactos e originando colônias. As colônias de lactobacilos apresentam coloração branca, textura lisa, aspecto brilhante e diâmetro de 2 a 5 mm. As colônias de bifidobactérias são semelhantes às de lactobacilos, medindo 0,5 a 3 mm de diâmetro (KANDLER & WEISS, 1986; MEDINA & JORDANO, 1993).

#### 4.6.2. Proporção de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* no inóculo

Buscando definir a melhor proporção de *L. casei* e *B. adolescentis* no inóculo para a fermentação da bebida, diferentes relações foram testadas e avaliadas de acordo com o crescimento celular de cada cultura, pH e acidez obtidos na bebida fermentada.

Devido à impossibilidade de obter o número de células viáveis de cada cultura, em caldo, no momento do preparo das proporções dos inóculos, pois as contagens em placa requerem 48 horas de incubação, as diferentes proporções de *L. casei* e *B. adolescentis* foram elaboradas considerando como parâmetro o volume dos caldos contendo as células de cada cepa. A contagem celular final da cultura mista obtida para as diferentes proporções testadas na fermentação da bebida está apresentada na Tabela 33.

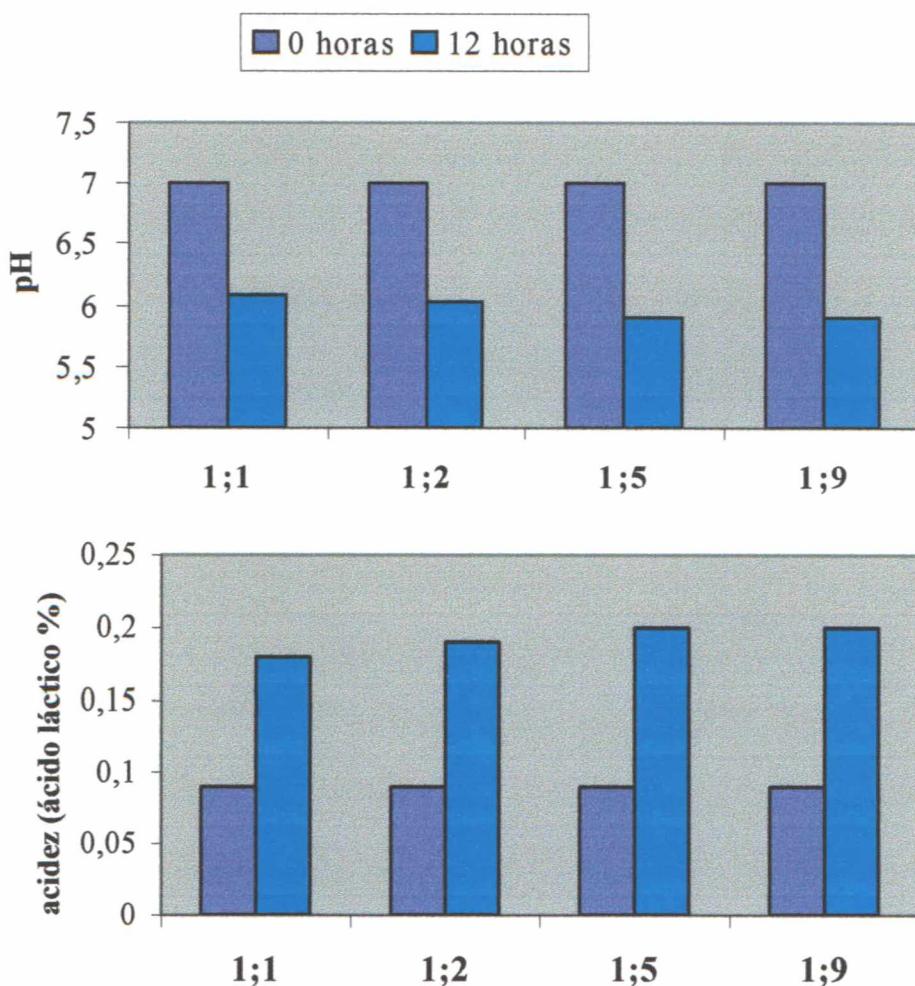
**TABELA 33. Número de células viáveis de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* na bebida fermentada pelas diferentes proporções das culturas utilizadas no inóculo.**

Proporções volumétricas LCS:BA	Número de células de <i>L. casei</i> (UFC/mL)		Número de células de <i>B. adolescentis</i> (UFC/mL)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1:1	$2,3 \times 10^8$	$1 \times 10^9$	$8 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
1:2	$1,0 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$7 \times 10^7$
1:5	$7 \times 10^7$	$4 \times 10^8$	$1,9 \times 10^7$	$3 \times 10^8$
1:9	$5,9 \times 10^7$	$5,8 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$	$1 \times 10^8$

Tempo de fermentação: 12 horas, taxa de inoculação: 5 %; LCS:  $1 \times 10^9$  células/ mL; BA:  $5,2 \times 10^8$  células/ mL.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se verificar que o número de células viáveis das culturas após a fermentação mostrou-se mais equilibrado na proporção 1:5 de *L. casei* e *B. adolescentis*, cuja contagem celular final foi  $4 \times 10^8$  e  $3 \times 10^8$  células viáveis/ mL, respectivamente.

Na proporção de 1:1 e 1:2 das culturas no inóculo, o número de células do lactobacilo apresentou-se notadamente superior ao da bifidobactéria na bebida fermentada, enquanto que o crescimento celular de *L. casei* superou ligeiramente o de *B. adolescentis* quando o substrato foi inoculado na relação de 1:9 das culturas. Apesar da variação no número de células obtido nas proporções utilizadas, os valores de pH e acidez titulável na bebida fermentada mostraram-se semelhantes para todas as proporções (Figura 17).



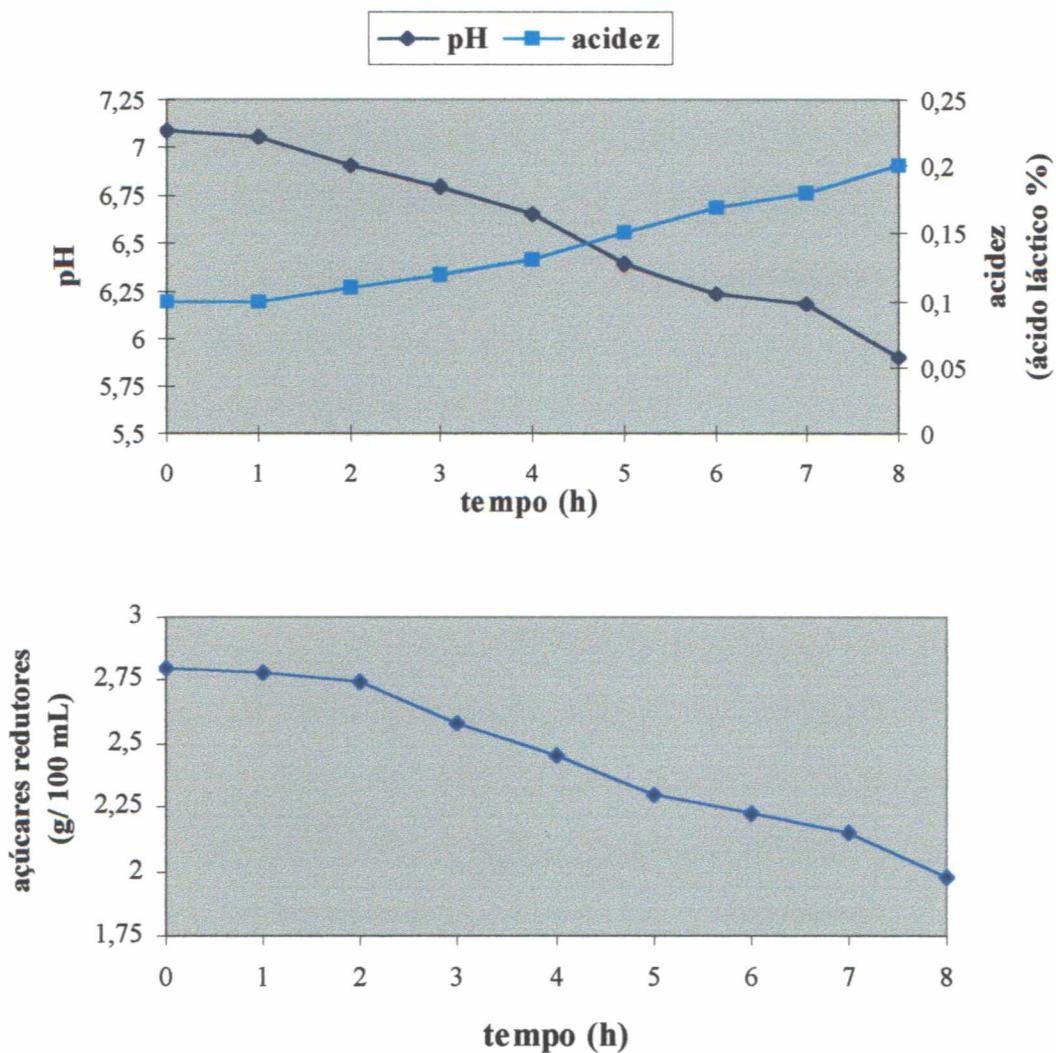
**FIGURA 17.** Valores de pH e acidez titulável na bebida fermentada com diferentes proporções de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* no inóculo.

Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas, composição do substrato: 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja.

Observou-se que a variação na proporção das culturas no inóculo não afetou a evolução da fermentação, mantendo-se os mesmos parâmetros de pH e acidez na bebida fermentada. Portanto, definiu-se a proporção de 1:5 *L. casei*: *B. adolescentis* no inóculo para a fermentação da bebida láctea.

#### 4.7. ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO

Após definidas as condições ideais de inoculação e formulação da bebida láctea, o processo fermentativo foi acompanhado pela evolução do pH, acidificação, consumo de açúcares redutores (Figura 18) e crescimento celular (Figura 19).



**FIGURA 18. Perfil de pH, acidez titulável e consumo de açúcares redutores durante a fermentação de bebida constituída de 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja.**

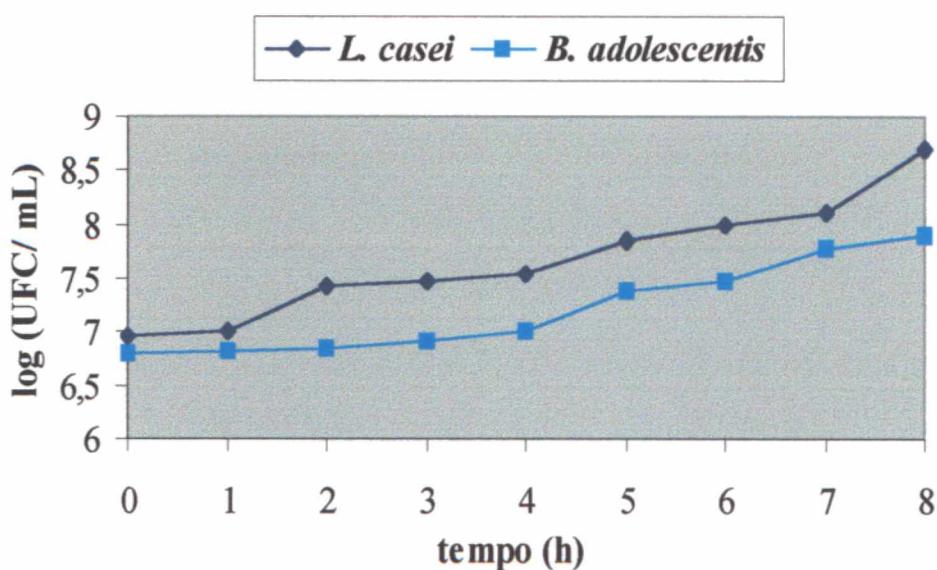
Cultura mista: *Lactobacillus casei* ssp *shirota* e *Bifidobacterium adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas.

Verificou-se pequena variação de pH, acidez titulável e consumo de açúcares redutores até a primeira hora de fermentação, coincidindo com um crescimento pouco expressivo de *L. casei* e *B. adolescentis* no mesmo período.

A partir de 2 horas de fermentação, ocorreu queda lenta e contínua de pH, que se refletiu na produção constante e crescente de ácido, permitindo a obtenção de bebida fermentada homogênea e isenta de partículas precipitadas. O desenvolvimento de acidez mostrou-se mais acentuado após 4 horas de fermentação, mantendo aumento contínuo e quase linear até o final da fermentação. Este aumento na produção de ácido foi acompanhado pelo aumento da contagem celular de *L. casei* e *B. adolescentis*. O consumo dos açúcares redutores mostrou-se lento nas primeiras 2 horas de fermentação, apresentando evolução semelhante ao incremento de acidez até 8 horas de fermentação, atingindo conteúdo final de 1,98 g em 100 mL de material fermentado.

Ambas as cepas de *L. casei* e *B. adolescentis* mantiveram sua contagem celular constante na primeira hora de fermentação, correspondendo à fase de latência e adaptação ao meio (Figura 19).

O número de células de *L. casei* mostrou ligeiro aumento entre a primeira e a quarta hora de fermentação ( $3,6 \times 10^7$  células/ mL), apresentando maior crescimento no período de 5 horas. Entre 6 e 7 horas de fermentação, o crescimento manteve-se constante, tornando-se mais expressivo ao final de 8 horas, quando atingiu contagem celular de  $9 \times 10^8$  células/ mL de produto fermentado. A curva de crescimento de *L. casei*, em extrato hidrossolúvel de soja, descrita por ANGELES & MARTH (1970) mostrou evolução celular semelhante à obtida neste experimento, atingindo contagem celular de  $7 \times 10^7$  UFC/ mL após 8 horas de fermentação, sendo o número inicial de  $3 \times 10^6$  UFC/ mL.



**FIGURA 19. Evolução do crescimento de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* na bebida fermentada.**

LCS: *L. casei*; BA: *B. adolescentis*. Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas. Taxa de inoculação: LCS:  $8,7 \times 10^8$  células/ mL; BA:  $1,4 \times 10^8$  células/ mL. Proporção LCS-BA no inóculo: 1:5.

A cepa de *B. adolescentis* apresentou crescimento lento entre 1 e 4 horas de fermentação ( $1 \times 10^7$  células/ mL). A partir deste período, verificou-se crescimento mais intenso, atingindo número final de células de  $8 \times 10^7$  células/ mL. Resultados similares foram encontrados por SAMONA & ROBINSON (1994) para *B. adolescentis* associada a culturas de iogurte em leite desnatado, cujo número inicial de células foi de  $7 \times 10^6$  células/ mL, alcançando contagens de  $3 \times 10^7$  e  $8 \times 10^7$  células/ mL em 4 e 8 horas de fermentação, respectivamente. Apesar do crescimento de *B. adolescentis* apresentar-se mais lento e inferior ao de *L. casei*, a presença deste microrganismo pareceu não influenciar o desenvolvimento da bifidobactéria no substrato.

#### 4.8. AROMATIZAÇÃO DA BEBIDA FERMENTADA

A bebida fermentada foi aromatizada com essências de morango, baunilha e pêssego e submetida à avaliação sensorial para verificar a essência mais adequada e de melhor aceitação pelos provadores. As pontuações obtidas para os atributos avaliados nas bebidas aromatizadas estão apresentadas na Tabela 34.

As bebidas aromatizadas não apresentaram diferença significativa para o sabor, aspecto e avaliação global, enquanto que nas avaliações de aroma e cor, as bebidas mostraram-se estatisticamente diferentes.

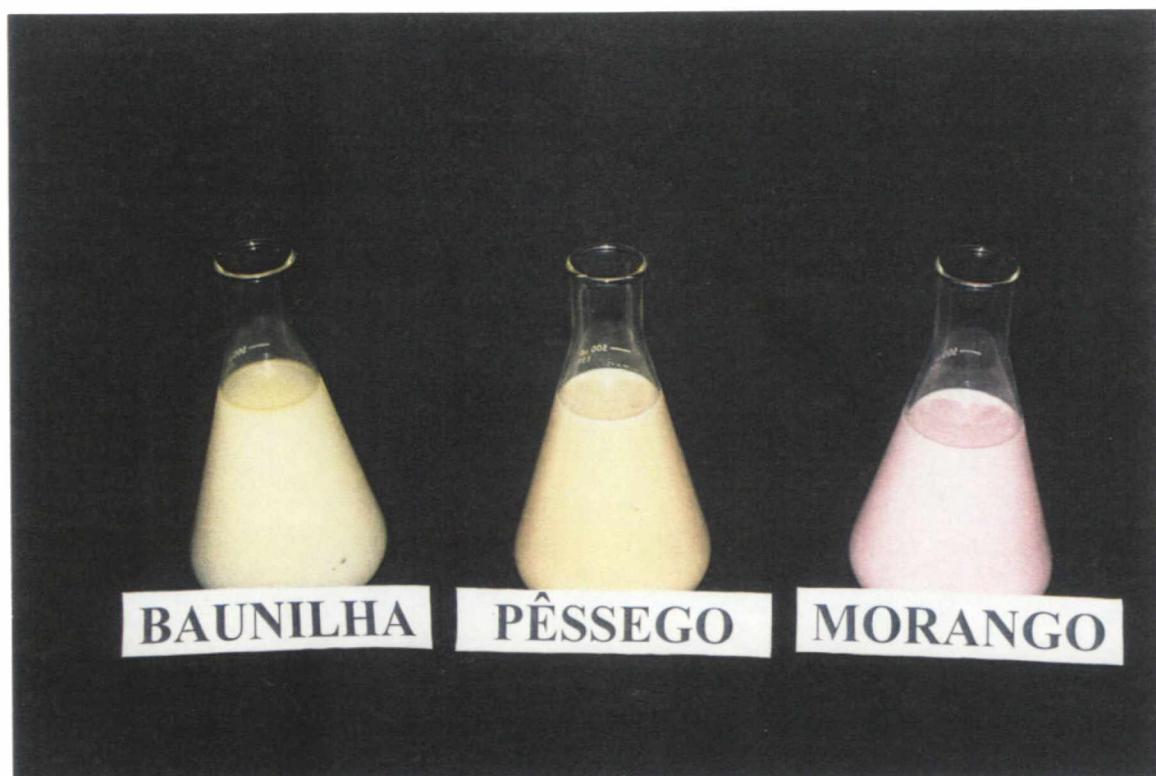
**TABELA 34. Escores médios obtidos na avaliação sensorial das bebidas aromatizadas com diferentes essências.**

Características	Essências		
	Morango	Pêssego	Baunilha
Sabor	7,82	7,11	7,88
Aroma	8,35 <sup>a</sup>	8,23 <sup>a</sup>	7,47 <sup>b</sup>
Cor	8,23 <sup>a</sup>	6,94 <sup>b</sup>	8,00 <sup>a</sup>
Aspecto	7,88	7,35	7,94
Avaliação global	7,52	7,17	7,64

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

A bebida aromatizada com essência de baunilha exibiu aroma menos intenso que as demais, ao passo que as essências de morango e pêssego foram apreciadas pelos provadores e obtiveram escores elevados. A essência de pêssego utilizada, apesar de proporcionar sabor e aroma agradáveis à bebida láctea, gerou coloração mais escura que a tradicionalmente conhecida para os produtos aromatizados de pêssego, obtendo portanto, escores significativamente inferiores aos atribuídos às essências de morango e baunilha (Figura 20 e 21).

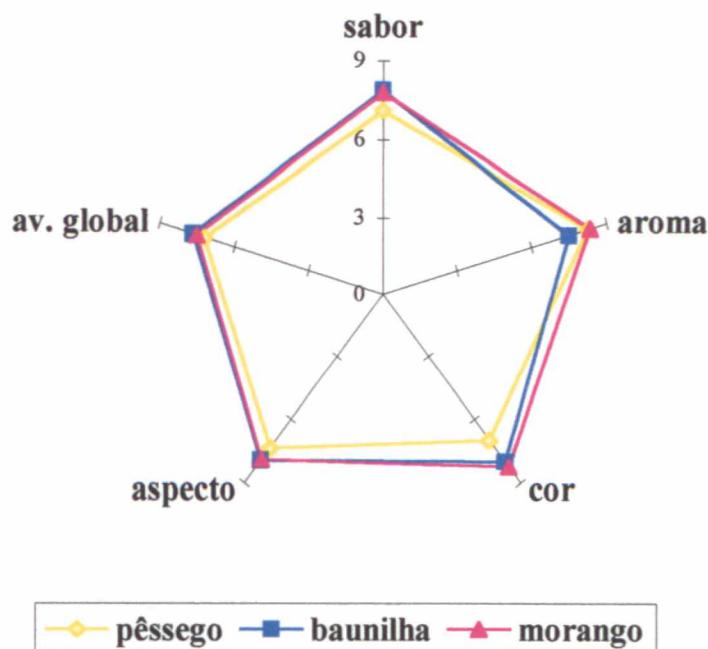
A avaliação global representa o conjunto de todas as demais características avaliadas reunidas num único atributo. As bebidas aromatizadas com as diferentes essências mostraram-se igualmente agradáveis na avaliação global pelos provadores e obtiveram escores elevados para as características avaliadas, considerando que a escala utilizada apresentava escore máximo de 9 pontos.



**FIGURA 20.** Aspecto e coloração das bebidas fermentadas aromatizadas com diferentes essências.

Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas, composição do substrato: 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja.

A bebida com essência de baunilha recebeu as maiores pontuações para a maioria dos atributos avaliados, provavelmente devido ao fato de que as tradicionais bebidas fermentadas apresentam-se aromatizadas com esta essência. Selecionou-se desta forma, a essência de baunilha para a aromatização da bebida láctea.



**FIGURA 21.** Configuração das características avaliadas nas bebidas fermentadas aromatizadas com essências de morango, baunilha e pêssego.

Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas, composição do substrato: 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja.

#### 4.9. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA BEBIDA LÁCTEA

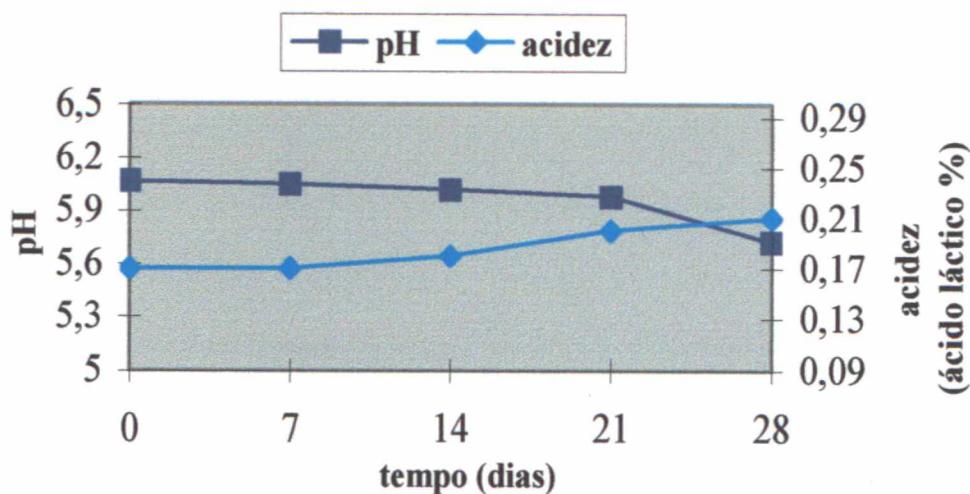
A manutenção da estabilidade físico-química, microbiológica e sensorial durante o período de estocagem constitui fator importante na qualidade de uma bebida láctea fermentada. Considerando que o período de vida de prateleira da grande maioria das bebidas lácteas fermentadas é de 28 dias, a estabilidade da bebida elaborada foi avaliada durante o mesmo período.

#### 4.9.1. Avaliação da estabilidade físico-química

A evolução do pH e acidez titulável na bebida láctea durante o período de estocagem foi acompanhada em intervalos de 7 dias (Figura 22). A análise dos dados permite observar que durante o período de estocagem da bebida, as variações de pH e acidez mostraram-se pouco significativas. O pH manteve-se constante até 21 dias de armazenamento, decrescendo para o valor de 5,72 ao final do período de estocagem. A partir do 14º dia de estocagem verificou-se ligeira acidificação do produto, evoluindo contínua e lentamente até o 28º dia.

A pequena variação de pH e acidez verificadas na bebida devem-se provavelmente às características de baixa pós-acidificação atribuídas às culturas utilizadas. O processo de pós-acidificação dos produtos lácteos (a acidificação durante o armazenamento) encontra-se freqüentemente associado ao uso das culturas clássicas para a 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 (KNEIFEL *et al.*, 1993).

Embora os baixos níveis de pH e maior acidez determinem a segurança microbiológica dos produtos lácteos fermentados, influem também na evolução da microbiota essencial. Em virtude da suscetibilidade das bactérias bífidas a baixos níveis de pH, sua viabilidade é assegurada em pH superiores a 5,5 (KLAVER *et al.*, 1993). BIAVATI *et al.* (1992), citados pelos autores referidos anteriormente, verificaram rápida perda de viabilidade para 88 % das cepas de *Bifidobacterium* cultivadas em leite acidificado a pH 4,0. Desta forma, os valores de pH obtidos na bebida láctea poderiam permitir o crescimento e a manutenção de células viáveis de *Bifidobacterium* durante o período de estocagem.



**FIGURA 22.** Variação do pH e acidez titulável na bebida láctea fermentada armazenada sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ .

Composição do substrato: 35 % leite de vaca, 35 % soro de leite de búfala, 30 % extrato hidrossolúvel de soja; tempo de estocagem: 28 dias.

A manutenção do pH e acidez da bebida até o 28º dia de armazenamento também poderia estar relacionada à presença de agentes com propriedades tamponantes no meio, pois a partir de 30 dias de estocagem observou-se que o pH da bebida láctea reduziu notadamente para 4,7, indicando a perda da capacidade tamponante destas substâncias. Resultados semelhantes foram obtidos por VARGAS *et al.* (1989) para iogurte composto de extrato de soja e soro de leite analisado durante 35 dias, cujo efeito tamponante foi atribuído aos compostos sólidos do produto, como proteínas da soja, proteínas do leite, açúcar e aromatizantes.

Estes resultados mostraram que a bebida láctea fermentada apresentou estabilidade físico-química durante 28 dias de estocagem.

#### 4.9.2. Avaliação microbiológica

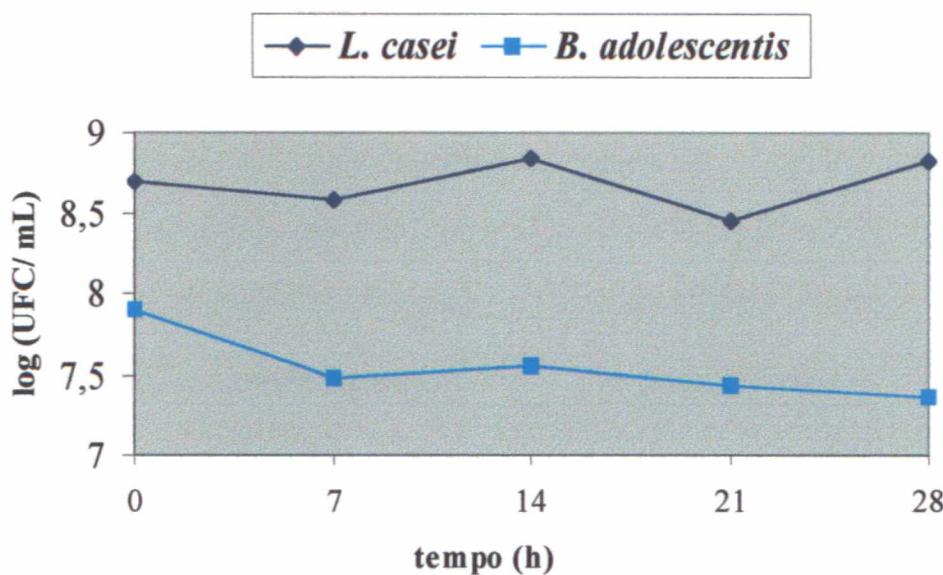
##### 4.9.2.1. Avaliação da evolução da cultura mista

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).

Durante a primeira semana de estocagem, verificou-se redução no número de células de *L. casei* e *B. adolescentis* (Figura 23). A cepa de *B. adolescentis* apresentou maior redução no número de células viáveis em comparação a *L. casei* após 7 dias de refrigeração. A perda de viabilidade celular das bactérias bífidas durante a estocagem tem sido descrita por diversos autores. KLAVER *et al.* (1993) verificaram que ao final de 12 dias de estocagem sob refrigeração a 5° C, a grande maioria das cepas de *Bifidobacterium* estudadas mostraram elevada redução na viabilidade celular.

Após 14 dias de estocagem, observou-se ligeiro aumento na contagem celular de *B. adolescentis* e novamente redução até atingir  $2,3 \times 10^7$  células ao final do período de armazenamento. MEDINA & JORDANO (1994) mostraram que em leite fermentado por *Bifidobacterium sp*, o número de células viáveis decresceu 40 % em 28 dias de estocagem. A viabilidade de *B. adolescentis* em leite fermentado por MARSHALL *et al.* (1982), apresentou-se inferior à verificada neste experimento, decrescendo de  $5,0 \times 10^9$  células no início da estocagem para  $3,4 \times 10^8$  células após 21 dias, mostrando redução de 93 % das células viáveis.

O crescimento de *L. casei* entre 7 e 14 dias de estocagem mostrou-se intenso, apresentando número de células 142 % superior à contagem observada após a elaboração do produto. Diversos autores observaram que a contagem celular de culturas lácticas em iogurte, apresentaram aumento após a manufatura do produto e redução durante prolongada estocagem (KNEIFEL *et al.*, 1993; MEDINA & JORDANO, 1994).



**FIGURA 23.** Evolução na contagem celular de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis* na bebida láctea fermentada durante estocagem a  $4^{\circ}\text{ C} \pm 1,0^{\circ}\text{ C}$ .

A partir de 14 dias, a população de *L. casei* decresceu para  $2,8 \times 10^8$  células/mL, elevando este número para  $6,6 \times 10^8$  células/mL em 28 dias de estocagem. Este aumento na contagem celular ocorreu concomitantemente à redução de pH e acidificação observadas no mesmo período.

A contagem celular mínima de cultura específica recomendada para bebidas lácteas fermentadas é de  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL no momento do consumo (HONSHA, 1993).

Alguns autores indicam que a maioria dos produtos lácteos fermentados apresentam entre  $1 \times 10^7$  e  $1 \times 10^9$  UFC/ mL e que estes valores poderiam ser aceitos como um possível limite mínimo para a contagem celular (KNEIFEL *et al.*, 1993). Outros autores consideram que a efetividade da ação de lactobacilos e bifidobactérias como adjunto na dieta é obtida por valores situados entre  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^8$  UFC/ mL (MEDINA & JORDANO, 1994).

As ações e influências de produtos lácteos fermentados sobre seus consumidores têm sido investigadas mais intensamente nas últimas décadas e muitas são as evidências de que a ingestão de lactobacilos e bifidobactérias acarreta efeitos benéficos à saúde (VALENTIM *et al.*, 1994; VIJAYENDRA & GUPTA, 1992; IWATA & MORISHITA, 1989; ALVAREZ, 1988; COLLINS & HALL, 1984). A contagem celular final, após 28 dias de estocagem, de *L. casei* e *B. adolescentis* na bebida fermentada mostrou-se dentro dos limites recomendados para este produto, tornando-o atrativo como adjunto na dieta humana.

#### *4.9.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica*

Os resultados das análises microbiológicas realizadas na bebida fermentada ao longo do período de armazenamento estão apresentados na Tabela 35.

**TABELA 35. Avaliação microbiológica da bebida láctea fermentada durante o período de estocagem de 28 dias a  $4^\circ\text{C} \pm 1,0^\circ\text{C}$ .**

Análises microbiológicas	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
Coliformes totais (NMP/ mL)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)
Coliformes fecais (NMP/ mL)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)	< 3 (neg)
<i>Salmonella</i> (em 25 mL)	aus.	aus.	aus.	aus.	aus.
Bolores e leveduras (UFC/ mL)	< 10 (neg)	< 10 (neg)	< 10 (neg)	< 10 (neg)	< 10 (neg)

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 nº1/ 87, DINAL/ MS, a bebida láctea fermentada apresentou padrões microbiológicos situados dentro dos limites estabelecidos para leites fermentados (BRASIL, 1987), mostrando excelente qualidade microbiológica, mantida durante o período de estocagem.

#### 4.9.3. Avaliação sensorial

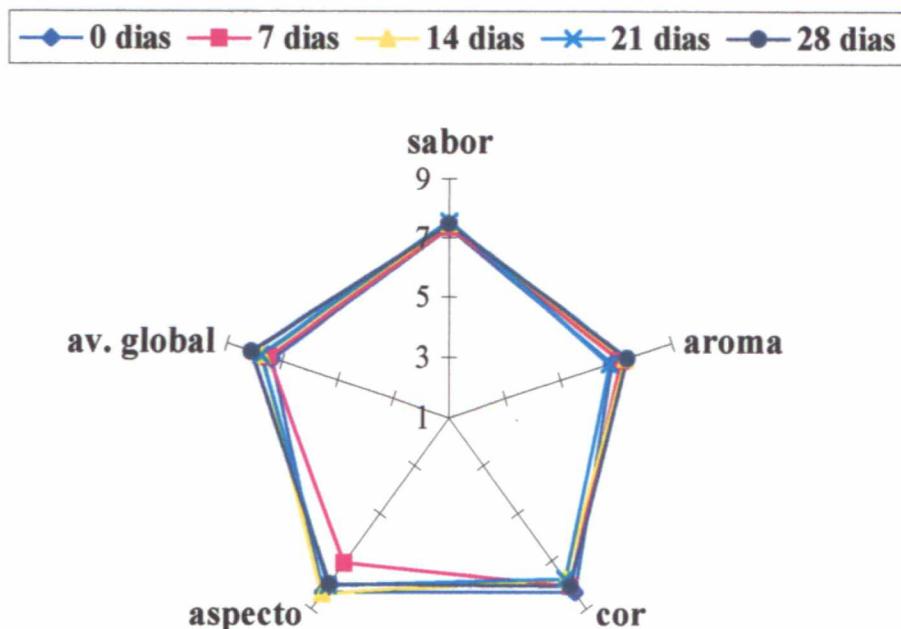
A estabilidade das características sensoriais da bebida láctea durante a estocagem foi investigada em intervalos de 7 dias. Os atributos avaliados na bebida aromatizada com essência de baunilha foram sabor, aroma, cor, aspecto e avaliação global, cujas pontuações obtidas estão apresentadas na Tabela 36.

**TABELA 36. Escores médios obtidos na avaliação sensorial da bebida láctea fermentada durante 28 dias de estocagem a 4° C ± 1,0° C.**

Características	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
Sabor	7,35	7,35	7,47	7,58	7,47
Aroma	6,82	7,17	7,29	6,76	7,41
Cor	8,29	8,05	7,76	7,76	8,05
Aspecto	8,29 <sup>a</sup>	7,11 <sup>b</sup>	8,35 <sup>a</sup>	8,00 <sup>ab</sup>	7,74 <sup>ab</sup>
Avaliação global	7,35 <sup>b</sup>	7,47 <sup>ab</sup>	7,70 <sup>ab</sup>	7,76 <sup>ab</sup>	8,11 <sup>a</sup>

Médias seguidas da mesma letra, na mesma linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

O período de estocagem mostrou pouca influência sobre o sabor, aroma e cor da bebida, os quais não apresentaram diferença estatística significativa para os diferentes tempos avaliados (Figura 24).



**FIGURA 24.** Perfil de características da bebida láctea fermentada durante período de estocagem de 28 dias a  $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O aspecto foi o atributo avaliado que exibiu as maiores variações entre os períodos de estocagem, para o qual a bebida com 7 dias mostrou-se significativamente inferior, devido à presença de partículas sobrenadantes oriundas do extrato hidrossolúvel de soja utilizado, não apresentadas pelas demais bebidas analisadas. Observa-se que o sabor, aroma e avaliação global obtiveram pontuações crescentes no decorrer da estocagem, mostrando escores mais elevados em 28 dias de armazenamento. Estes resultados indicam que a bebida láctea manteve sua qualidade sensorial ao longo da estocagem, mostrando-se ainda mais apreciada ao final deste período.

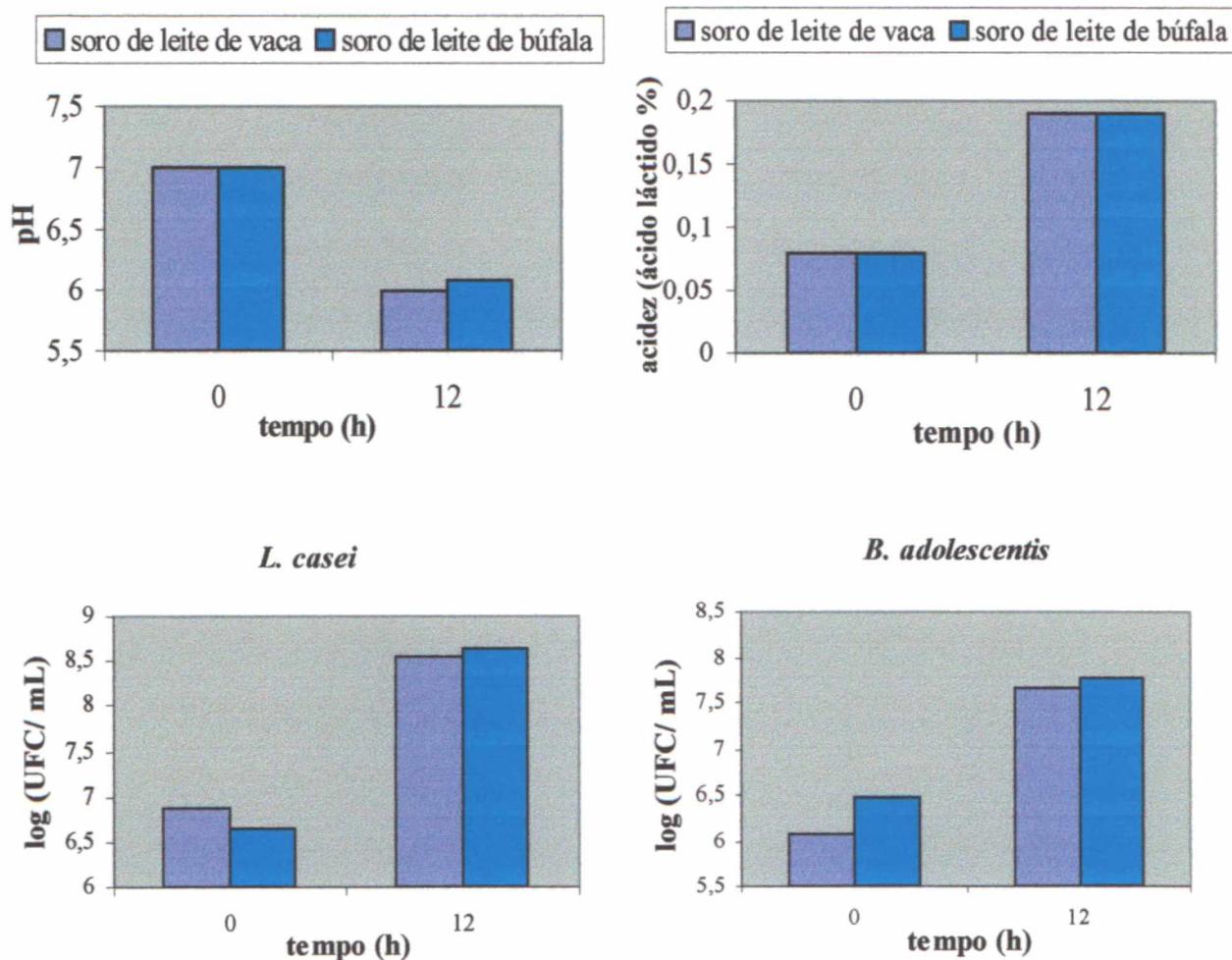
#### 4.10. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DE BEBIDA LÁCTEA ELABORADA COM SORO DE LEITE DE BÚFALA E COM SORO DE LEITE DE VACA

O soro de leite de vaca é o principal tipo de soro de leite de interesse industrial, pois a grande produção diária torna seu destino um fator preocupante e objeto de inúmeros estudos que buscam minizar a poluição ambiental e reaproveitá-lo como matéria-prima para incorporação em alimentos. Desta forma, a bebida láctea desenvolvida foi elaborada com soro de leite de vaca e comparada à bebida com soro de leite de búfala.

As bebidas foram elaboradas de acordo com as condições estabelecidas para a bebida láctea com soro de leite de búfala, cuja composição era 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja e avaliadas quanto a evolução da fermentação, pelas análises de pH, acidez titulável e contagem celular e quanto ao perfil sensorial.

A análise dos resultados obtidos nas determinações de pH, acidez titulável e número de células viáveis nas bebidas fermentadas (Figura 25) permite afirmar que a substituição do soro de leite de búfala pelo soro de leite de vaca não afeta os parâmetros de fermentação, pois as bebidas fermentadas apresentaram valores muito próximos nas determinações realizadas.

As características sensoriais avaliadas nas bebidas fermentadas e aromatizadas com essência de baunilha foram sabor, aroma, cor, aspecto e avaliação global, com o auxílio de escala estruturada de nove pontos. A Tabela 37 apresenta as médias obtidas para cada atributo avaliado nas bebidas.



**FIGURA 25.** Avaliação das bebidas fermentadas com soro de leite de búfala e com soro de leite de vaca quanto ao pH, acidez titulável e contagem celular de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium adolescentis*.

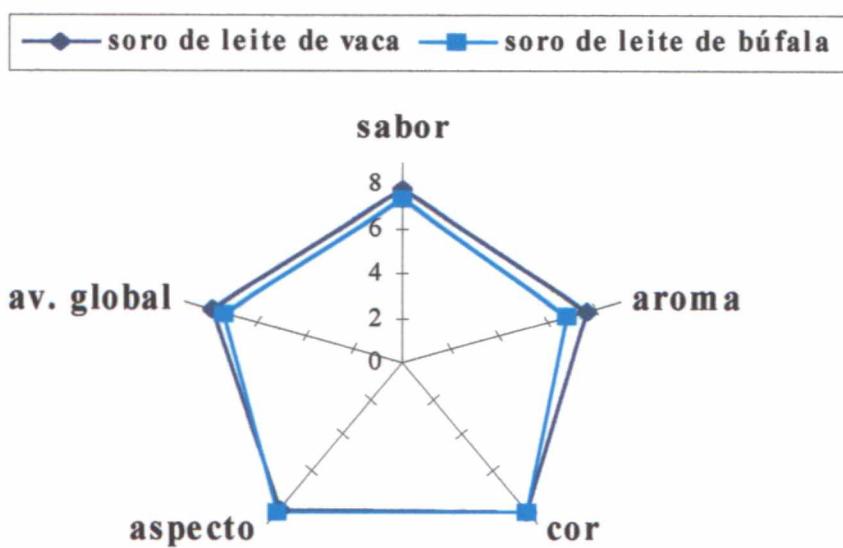
Condições experimentais: temperatura: 37° C, tempo de fermentação: 8 horas, LCS: *L. casei*; BA: *B. adolescentis*; proporção LCS-BA no inóculo: 1:5. LCS

**TABELA 37.** Escores médios obtidos na avaliação sensorial das bebidas fermentadas elaboradas com soro de leite de vaca e com soro de leite de búfala.

Características	Soro de leite de búfala	Soro de leite de vaca
Sabor	7,35	7,76
Aroma	6,82	7,58
Cor	8,29	8,29
Aspecto	8,29	8,23
Avaliação global	7,35	7,76

As características não seguidas de letras, não apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

As bebidas não apresentaram diferença significativa para as características avaliadas, podendo-se observar que as médias atribuídas mostraram-se semelhantes. As médias mais distantes foram obtidas para o aroma que apresentou-se menos intenso na bebida elaborada com soro de leite de búfala (Figura 26).



**FIGURA 26.** Perfil de características das bebidas fermentadas elaboradas com soro de leite de búfala e soro de leite de vaca.

De acordo com os resultados obtidos, a bebida láctea fermentada pode ser elaborada com soro de leite de vaca em substituição ao soro de leite de búfala, mantendo os mesmos parâmetros fermentativos e perfil sensorial.

## **5. CONCLUSÕES**

A relação temperatura e tempo de 80° C por 20 min para o tratamento térmico das matérias-primas mostrou-se eficiente na destruição microbiana, mantendo a estrutura original das proteínas do soro de leite de búfala.

O crescimento de *L. casei* em caldo de inoculação atingiu seu máximo em 48 horas de incubação a 37° C, enquanto que o maior crescimento de *B. adolescentis* no inóculo foi obtido em 60 horas de incubação.

A proporção das culturas no inóculo definida para a fermentação do substrato foi de 1:5 *L. casei* e *B. adolescentis*, pois mostrou equilíbrio na contagem celular das culturas após a fermentação da bebida láctea.

A formulação 35 % de leite de vaca, 35 % de soro de leite de búfala e 30 % de extrato hidrossolúvel de soja demonstrou ser ideal na composição do substrato, proporcionando condições ao desenvolvimento da cultura e perfil sensorial desejado ao produto.

A combinação das culturas *L. casei shirota* e *B. adolescentis* apresentou-se a mais adequada para a fermentação do substrato, pois conferiram ao produto características de sabor, aroma, acidez e homogeneidade desejadas.

O período ideal para a fermentação do substrato foi de 8 horas a 37° C, obtendo-se assim bebida láctea estável, isenta de coagulação e precipitação de proteínas.

A aromatização da bebida láctea com essência de baunilha recebeu as maiores pontuações na avaliação sensorial do produto em comparação às demais essências utilizadas.

A bebida láctea manteve a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial no decorrer do período de 28 dias de estocagem a 4° C, exibindo desejável contagem celular da cultura específica e características sensoriais ainda mais apreciadas ao final do armazenamento.

A substituição do soro de leite de búfala pelo soro de leite de vaca na formulação da bebida não alterou seu perfil fermentativo e sensorial, tornando possível a elaboração de bebida láctea igualmente apreciada com soro de leite de vaca.

Demonstrou-se a viabilidade da produção de bebida láctea fermentada de menor custo que as bebidas produzidas essencialmente com leite de vaca. A elaboração de bebida láctea empregando extrato hidrossolúvel de soja e soro de leite de búfala constitui uma alternativa de grande interesse econômico tanto privado quanto institucional.

## PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A criação de um novo produto compreende diversos estudos como testes de formulação, estabelecimento de condições experimentais ideais, avaliação de aceitação, vida de prateleira e tantos outros.

Desta forma, em trabalhos futuros poderão ser abordados os seguintes aspectos de produção da bebida láctea:

- estudos de escalonamento (scale-up) em fermentadores de 10 e 100 litros para otimizar o processo em escala semi-industrial;
- estudos de aromatização com outras essências e sucos naturais de frutas, como maçã, laranja e pêssego, possibilitando à bebida uma variedade de sabores que satisfaçam o mercado consumidor.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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

ALFA LAVAL FOOD. **Manual de indústrias lácteas.** 2. ed. Madrid: Iragra, 1990.

ALVAREZ, A. M. Bio: La nueva generación de productos lácteos. **Alimentaria**, Madrid, n. 192, p. 103-105, mai., 1988.

ANGELES, A. G.; MARTH, E. H. Growth and activity of lactic-acid bacteria in soymilk. Growth and acid prouction. **Journal Milk Food Technology**, v. 34, p. 30-36, 1971.

ANTUNES, P. L.; SGARBIERI, V. C. Propriedades físicas, químicas e nutricionais das proteínas da soja. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil.** Campinas: ITAL, 1981. p. 850-853.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise sensorial.** PN 13:014.01-015, São Paulo, 1994.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Terminologia.** NBR 12994/ 1993, Rio de Janeiro, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15. ed. Washington, 1990, 2.200p.

BABEL, F. J. Technology of dairy products manufactures with selected microrganisms. In: HARPER, W. J.; HALL, C. W. **Dairy Technology and Engineering.** Westport: Avi Publishing, 1976.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 322 p.

BERNARDES, W.; BERNARDES, O. **Exploração leiteira da búfala**. [s.l.]:[s.n.], 1989.  
(Relatório interno - Fazenda Paineiras de Ingá - Sarapuí).

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 01 de 28 de fevereiro de 1987. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p. 2197-2200, 12 de fevereiro de 1987.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **Manual de Análise Microbiológica de Alimentos**. [s.1.]:[s.n.], 1992.

CABRERA, M. C. *et al.* Obtencion de requeson a partir de suero de queso de bufala. **Alimentaria**, Madrid, n. 260, p.75-78, 1995.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1993.

CHEVALIER, P.; ROY, D.; SAVOIE, L. X- $\alpha$ -Gal-based medium for simultaneous enumeration of bifidobacteria and lactic acid bacteria in milk. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, p. 75-83, 1991.

CHR HANSEN. O mundo lácteo além do ano 2000. **Informativo Há-la Biotec**, Valinhos, n. 38, mar., 1997.

CITRO, A.; CORREALE, E. Il'latte di bufala. **Il'Latte**, Batiplagia, p. 224-230, mar., 1992.

CITRO, A. Mozzarella. **Curso de fabricação de queijos de leite de búfala**. Curitiba: ABUPAR, mai., 1993.

COLLINS, E. B.; HALL, B. J. Growth of bifidobacteria in milk and preparation of *Bifidobacterium infantis* for a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, n. 67, p. 1376-1380, 1984.

COSTA, S. I. Alimentos derivados da soja. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 857-865.

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.

DEMETER, K. J. **Elementos de microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1971. 140 p.

FEDERACITE, A. **O búfalo e sua rentabilidade**. [s.l.] :Guaíba, 1994.

FERNANDES, A. G.; MARTINS, J. F. P.; BALDINI, V. L. S. Desenvolvimento de parâmetros tecnológicos para o processamento de requeijão cremoso com leite de búfala *Bubalus bubalis* da raça Murrah. In: ENCONTRO SOBRE BUBALINOS (1979: Araçatuba). **Anais**. Araçatuba: FMVZ, UNESP, 1979, p. 114-143.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados**. Aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 1987.

GARCIA, A. A. I. Comércio internacional de produtos lácteos e a “Federacion Panamericana de Lecheria”. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS (12.: 1994: Juiz de Fora). **Anais**. Juiz de Fora: [s.n.], 1994. p. 156-165.

GOMES, P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1986.

GOULET, J. Propiedades de los productos lácteos fermentados. In: AMIOJ, J. **Ciencia y tecnología de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 361-364.

GOUQUIANG, D.; KAUL, R.; MATTIASSON, B. Evaluation of alginate immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, 1991.

GREIG, R. I. W.; VAN KAN, J. Effect of whey protein concentrate on fermentation of yogurt. **Dairy Industries International**, v. 49, n. 10, p. 28-29, 1984.

HONSHA, K. K. Y. YOSHIHARU, K. Fermented milk drinks and production process thereof. Int. A23C9/12. EP. n. 0529414A1. 12 Aug. 1992, 03 March 1993.

HÜHN, S.; PINHEIRO, A. J. R. Efeito do íon cúprico no sabor do leite de soja. **Revista Ceres**, v. 27, n. 150, p. 145-154, 1980.

HUNT, D. A.; SPRINGER, J. Comparison of two rapid test procedures with the standard EC test for recovery of fecal coliform bacteria from shellfish-growing waters. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v. 61, n. 6, p. 1317-1323, nov., 1978.

IGLÉCIO, C. Iogurtes e bebidas lácteas. **Alimentos & Tecnologia**, n. 57, p.20-25. 1995.

IWATA, M.; MORISHITA, T. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. **Applied Microbiology**, v. 9, p. 165-168, 1989.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1978.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: SNEATH, P. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986. v. 2.

KARLESKIND, D. et al. Improving acid production in soy-based yogurt by adding cheese whey proteins and mineral salts. **Journal of Food Science**, Chicago. v. 56, n. 4, p. 999-1001, 1991.

KAWAMURA, S. Review of 480 work on soybean carbohydrates. In: **Internacional Conference on Soybean Protein in Food**. Washington: [s.n.], 1967. p. 249-254.

KHALEQUE, A.; BANNATYNE, W. R.; WALLACE, G. M. Studies on the processing and properties of soymilk. Effect of preprocessing conditions on the flavour and composition of soymilks. **J. Science Food Agriculture**, v. 21, novembro, 1970.

KLAVER, F. A. M.; KINGMA, F.; WEERKAMP, A. H. Growth and survival of bifidobacteria in milk. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 27, p. 151-164, 1993.

KNEIFEL, W.; DORIS, J.; ERHARD, F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 18, p. 179-189, 1993.

KOTHARI, S. L. Studies on fermented soymilk products. Effect of soymilk processing factors on the acid production by lactic acid bacteria in soymilk. **Indian Journal of Microbiology**, n. 13, p.109-117, 1973.

LIGDA, D. J. ([djligda@netnitco.net](mailto:djligda@netnitco.net)) **Water Buffalo**. 23 de abril de 1997. E-mail para: David J. Ligda ([djligda@netnitco.net](mailto:djligda@netnitco.net)).

LO, W. Y. Soaking soybeans before extraction as it affects chemical compositions and yield of soymilk. **Food Technology**, v. 22, n. 9, 1968.

MAHRAN, G. A. *et al.* Functional properties of buffalo whey proteins. Whipping and emulsification properties. **Asian Journal of Dairy Research**, v. 11, n. 1, p. 37-42, 1992.

MANDARINO, J. M. G.; PANIZZI, M. C. C. OLIVEIRA, M. C. N. Chemical composition of soybean seeds different production areas of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 4, p. 647-653, 1992.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; MABBIT, L. A. Fermentation of specially formulated milk with single strains of bifidobacteria. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.35, n. 4, p. 143-144, Oct., 1982.

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.

MENEZES, T. J. B. Alimentos tradicionais do oriente à base de soja. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 900-908.

MITAL, B. K.; STEINKRAUS, K. H.; MAYLOR, H. B. Growth of lactic acid bacteria in soy milks. **Jounal of Food Science**, Chicago, n. 39, v. 5, p.1018-1022, 1974.

MOHAMED, A. I.; RANGAPPA, M. Nutrient composition and anti-nutritional factors in vegetable soybean. Oil, fatty acids, sterols and lipoxygenase activity. **Food Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 277-282, 1992.

MONTES, A. L. **Microbiología de los alimentos**. Curso teórico e práctico. São Paulo: Resenha Universitária, v. 2, 1977.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1990.

MORETTI, R. H.; HINOJOSA, G. R. Produção de leite de soja em escala semi-industrial. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 979-984.

MURTI, T. W. *et al.* Bacterial growth and volatile compounds in yogurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp. **Jounal of Food Science**, Chicago, v. 0, n.0, p. 153-156, 1992.

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

NOGUEIRA, S.; ARAÚJO, P. F. C.; YAMAGUISHI, C. T. A soja no mundo. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 1019-1025.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. **Acompanhamento da Situação Agropecuária no Paraná**. Curitiba, v. 22, n. 9, p. 43-52, set./out., 1996.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. **Acompanhamento da Situação Agropecuária no Paraná**. Curitiba, v. 23, n. 5, p. 12-18, mai., 1997a.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. **Acompanhamento da Situação Agropecuária no Paraná**. Curitiba, v. 23, n. 6, p. 40-45, jun., 1997b.

PARMALAT. Consumo de leite. **Produtor Parmalat**. n. 3, p. 32-34, mai., 1997.

PARMAR, S. S.; SUKHMINDER, S.; SHARMA, R. S. Compositional and quality characteristics of paneer made from soya beans and buffalo milk under different heat treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 47, n. 4, p. 463-473, 1989.

PATEL, A. A.; WAGHMARE, W. H.; GUPTA, S. K. Lactic fermentation of soymilk. **Process Biochem**. Walford, v. 17, n. 15, p. 9-13, 1980.

PRUDÊNCIO, E. S. **Aproveitamento do soro de queijo na obtenção do extrato hidrossolúvel de soja**. Florianópolis, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina.

RAMOS, A. **O potencial leiteiro do búfalo**. Ponta Grossa: [s.n.], 1991. Apresentado - ENCONTRO ESTADUAL DE BUBALINOCULTURA (1: 1991: Ponta Grossa).

RODACKI, U. **Búfalo, um animal especial**. ABUPAR, Curitiba, 1996.

ROLLAND, J. El lactosuero y sus derivados. In: AMIOJ, J. **Ciencia y tecnologia de la leche**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 376-392.

SÁ, F. V.; BARBOSA, M. **O leite e seus produtos**. 5. ed. Lisboa: Clássica, 1990. 520 p.

SALOMON, J. B.; DOREA, J. G.; GARRONE, D. Jr. O extrato hidrossolúvel de soja integral na alimentação infantil. In: MIYASAKA, S.; MEDINA., J. C. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p. 890-899.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 47, n. 2, p. 58-60, 1994.

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

SÃO PAULO. Instituto de Economia Agrícola. **Informações Econômicas**. v. 25, n. 9, p. 64-75, set., 1995.

SCARDOVI, V. Genus *Bifidobacterium*. In: SNEATH, P. et al. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986. v. 2.

SEVERO, L. M. B. **Desenvolvimento de uma bebida láctea a base de soro de leite fermentado**. Londrina, 1995. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos), Universidade Estadual de Londrina.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição – fator de saúde e desenvolvimento**. Campinas: Almed, 1987. p. 217-335.

SHIRAI, K. et al. Production of a yogurt-like product from plant foodstuffs and whey. Substrate preparation and fermentation. **Journal of Food and Agriculture**, v. 59, p. 199-204, 1992.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos. Manual Técnico, ITAL**, n. 14, 1995.

SINGH, M. N.; MATHUR, B. N. Mineral modification of buffalo milk for infant formula manufacture employing electrodialysis. Demineralization pattern of nutritionally important ionic species. **Indian Journal of Dairy Science**, v. 43, n. 1, p. 95-98, 1990.

SIQUEIRA, R. S. DE. **Manual de microbiologia de alimentos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1995, 159 p.

SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p.61-68, 1945.

SPREER, E. **Lactologia industrial**. 6. ed. Zaragoza: Acribia, 1991. 617 p.

STAINER, R. Y.; DEUDUROF, M.; ADELBERG, E. A. **Mundo dos micróbios**. São Paulo: Edgard Blucher, 1976.

SWANSON, K. M. J. *et al.* Colony count methods. In: VANDERZANT, C; SPLITSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

TAMIME, A. J.; ROBINSON, R.K. Technology of manufature of thermophilic fermented milks. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n. 227, p. 82-95, 1988.

VALENTIM, C.; TESHIMA, E.; FERREIRA, C. L. L. F. Crescimento de bactérias bífidas em leite e em caldo MRS modificado com pH ajustado para diversos valores. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, (12: 1994, Juiz de Fora). **Anais**. Juiz de Fora: [s.n.], 1994. p. 49-53.

VAN DENDER, A. G. F. *et al.* Utilização artesanal do leite de búfala. **Manual Técnico**, Campinas, ITAL, n. 3, 1989. 60 p.

VARGAS, L. H. M.; RTEDDY, K. V.; SILVA, R. S. F. Shelf-life studies on soy-whey yogurt: a combined sensory, chemycal and microbiological approach. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 22, p. 133-137, 1989.

VEDAMUTHU, E. R. *et al.* Acid-producing microorganisms. In: VANDERZANT, C; SPLITSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1988.

VIJAYENDRA, S. V. N.; GUPTA, R. C. Therapeutic importance of bifidobacteria and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **Indian Dairyman**, v. 44, n. 12, p. 595-599, 1992.

VILLARES, J. B. *et al.* Controle leiteiro de búfalas Murrah, Jafarabadi, Mediterrâneo e outras. In: CONGRESSO DE ZOOTECNIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, (1983: Botucatu). **Anais**. Botucatu: FMVZ, UNESP, 1983. p. 224-237.

VIZCARRA, R. V. **Biofermentação láctica de extrato aquoso de soja e soro de leite por *Lactobacillus casei*.** Curitiba, 1995. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química), Universidade Federal do Paraná.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Quimica y fisica lactológica.** Zaragoza; Acribia, 1987, p. 128-131.

YEARGER, C. Yogurt processing methods. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 2, n. 10, 1975.

ZIEGLER, G. R.; FOEGEDING, E. A. The gelation of proteins. In: KINSELLA, J. E. **Advances in Food and Nutrition Research.** New York: Academic Press, 1990, v. 34, p. 203-298.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Ficha de respostas apresentada aos provadores na avaliação sensorial das amostras para a seleção de formulações.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Em cada amostra, avalie os atributos listados abaixo utilizando a escala correspondente.

Amostra: \_\_\_\_\_

### **1. APARÊNCIA**

a) Homogeneidade	<p>0 I _____ I _____ I _____ I _____ I pouca</p> <p>10 muita</p>
b) Aspecto	<p>I _____ I _____ I ruim bom</p>

### **2. AROMA**

a) Aroma global	<p>I _____ I _____ I ruim bom</p>
b) Aroma de soja	<p>I _____ I _____ I nenhum bastante</p>
c) Aroma ácido	<p>I _____ I _____ I fraco forte</p>

### **3. SABOR**

a) Sabor global	<p>I _____ I _____ I ruim bom</p>
b) Sabor de soja	<p>I _____ I _____ I nenhum bastante</p>
c) Sabor ácido	<p>I _____ I _____ I fraco forte</p>

### **4. TEXTURA**

a) Consistência	<p>I _____ I _____ I pouca bastante</p>
-----------------	---

Anexo 2. Ficha de respostas apresentada aos provadores para a avaliação sensorial das bebidas fermentadas aromatizadas, para avaliação da estabilidade durante a estocagem e avaliação sensorial comparativa entre as bebidas elaboradas com soro de leite de búfala e com soro de leite de vaca.

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Avalie cada amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto agradou ou desagradou o produto.

1. Extremamente desagradável
2. Muito desagradável
3. Desagradável
4. Levemente desagradável
5. Nem agradável nem desagradável
6. Levemente agradável
7. Agradável
8. Muito agradável
9. Extremamente agradável

#### **Características avaliadas**

##### **1. Sabor**

Amostra nº219	Amostra nº378	Amostra nº521

##### **2. Aroma**

Amostra nº219	Amostra nº378	Amostra nº521

##### **3. Cor**

Amostra nº219	Amostra nº378	Amostra nº521

##### **4. Aspecto**

Amostra nº219	Amostra nº378	Amostra nº521

##### **5. Avaliação global**

Amostra nº219	Amostra nº378	Amostra nº521

Anexo 3. Análise de variância dos valores obtidos para os atributos avaliados na seleção de formulações.

Atributo: homogeneidade

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	26,76	17	0,41 ns
Tratamento	14,42	3	0,02 *
Resíduo	75,49	51	
Total	116,67	71	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: aspecto

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	31,64	17	0,18 ns
Tratamento	24,47	3	0,00 *
Resíduo	68,81	51	
Total	124,93	71	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: aroma global

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	38,00	17	0,45 ns
Tratamento	12,79	3	0,13 ns
Resíduo	111,91	51	
Total	162,70	71	

ns - não significativo.

Atributo: aroma de soja

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	138,35	17	0,00 *
Tratamento	9,80	3	0,38 ns
Resíduo	161,02	51	
Total	309,18	71	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: aroma ácido

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	167,99	17	0,00 *
Tratamento	9,58	3	0,39 ns
Resíduo	161,96	51	
Total	339,53	71	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: sabor global

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	69,56	17	0,15 ns
Tratamento	20,13	3	0,08 ns
Resíduo	145,49	51	
Total	235,19	71	

ns - não significativo.

Atributo: sabor de soja

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	160,14	17	0,00 *
Tratamento	16,89	3	0,17 ns
Resíduo	166,60	51	
Total	343,64	71	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: sabor ácido

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	78,72	17	0,06 ns
Tratamento	14,09	3	0,16 ns
Resíduo	134,20	51	
Total	227,02	71	

ns - não significativo.

Atributo: consistência

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	178,87	17	0,08 ns
Tratamento	33,39	3	0,16 ns
Resíduo	323,36	51	
Total	535,62	71	

ns - não significativo.

Anexo 4. Análise de variância dos valores obtidos nos atributos avaliados das formulações aromatizadas com essências de pêssego, baunilha e morango.

Atributo: sabor

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	20,82	16	0,23 ns
Tratamento	6,15	2	0,05 ns
Resíduo	31,17	32	
Total	58,15	50	

ns - não significativo.

Atributo: aroma

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	14,31	16	0,28 ns
Tratamento	7,80	2	0,00 *
Resíduo	22,86	32	
Total	44,98	50	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

Atributo: cor

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	8,82	16	0,90 ns
Tratamento	16,15	2	0,00 *
Resíduo	33,17	32	
Total	58,15	50	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

## Atributo: aspecto

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	13,49	16	0,70 ns
Tratamento	3,56	2	0,21 ns
Resíduo	35,09	32	
Total	52,15	50	

ns - não significativo.

## Atributo: avaliação global

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	22,62	16	0,15 ns
Tratamento	2,03	2	0,34 ns
Resíduo	29,96	32	
Total	54,62	50	

ns - não significativo.

Anexo 5. Análise de variância dos valores obtidos na avaliação da estabilidade da bebida láctea fermentada no decorrer de 28 dias de estocagem.

## Atributo: sabor

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	20,21	16	0,55 ns
Tratamento	0,65	4	0,97 ns
Resíduo	88,14	64	
Total	109,01	84	

ns - não significativo.

Atributo: aroma

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	20,84	16	0,83 ns
Tratamento	5,60	4	0,59 ns
Resíduo	128,80	64	
Total	155,24	84	

ns - não significativo.

Atributo: cor

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	14,58	16	0,54 ns
Tratamento	3,45	4	0,48 ns
Resíduo	62,94	64	
Total	80,98	84	

ns - não significativo.

Atributo: aspecto

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	16,30	16	0,50 ns
Tratamento	16,58	4	0,00 *
Resíduo	67,81	64	
Total	100,70	84	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

**Atributo: avaliação global**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	6,82	16	0,79 ns
Tratamento	5,95	4	0,05 ns
Resíduo	39,64	64	
Total	52,42	84	

ns - não significativo.

**Anexo 6. Análise de variância dos valores obtidos na avaliação comparativa das formulações com soro de leite de vaca e soro de leite de búfala.**

**Atributo: sabor**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	22,88	16	0,32 ns
Tratamento	1,44	1	0,27 ns
Resíduo	18,05	16	
Total	42,38	33	

ns - não significativo.

**Atributo: aroma**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	30,05	16	0,72 ns
Tratamento	4,97	1	0,18 ns
Resíduo	40,52	16	
Total	75,55	33	

ns - não significativo.

**Atributo: cor**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	11,05	16	0,67 ns
Tratamento	0,00	1	1,00 ns
Resíduo	14,00	16	
Total	25,05	33	

ns - não significativo.

**Atributo: aspecto**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	13,11	16	0,04 *
Tratamento	0,02	1	0,27 ns
Resíduo	5,47	16	
Total	18,61	33	

ns - não significativo.

\* - significativo a 5 % de probabilidade.

**Atributo: avaliação global**

Fontes de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Nível de significância
Blocos	11,88	16	0,29 ns
Tratamento	1,44	1	0,13 ns
Resíduo	9,05	16	
Total	22,38	33	

ns - não significativo.