



MIGUEL MEIRELLES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO PREPARADO
COM LEITE SUBMETIDO À ALTA PRESSÃO DINÂMICA**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MIGUEL MEIRELLES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO PREPARADO
COM LEITE SUBMETIDO À ALTA PRESSÃO DINÂMICA**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cristianini

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO MIGUEL MEIRELLES DE OLIVEIRA, E ORIENTADO PELO PROF. DR. MARCELO CRISTIANINI.

Prof. Dr. Marcelo Cristianini

**CAMPINAS
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

OL4a Oliveira, Miguel Meirelles de, 1989-
Avaliação de leite fermentado probiótico preparado com leite submetido à alta pressão dinâmica / Miguel Meirelles de Oliveira. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Marcelo Cristianini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Homogeneização por alta pressão. 2. Processo não térmico. 3. *Lactobacillus acidophilus*. 4. *Streptococcus thermophilus*. 5. Alimentos funcionais. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of probiotic fermented milk made from dynamic high pressure-treated milk

Palavras-chave em Inglês:

High pressure homogenization

Non-thermal process

Lactobacillus acidophilus

Streptococcus thermophilus

Functional foods

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Cristianini [Orientador]

Adriano Gomes da Cruz

Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá

Data da defesa: 19-04-2013

Programa de Pós Graduação: Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador
Universidade Estadual de Campinas - FEA

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas - FEA

Dr^a. Patricia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
Membro Titular
Instituto de Tecnologia de Alimentos - TECNOLAT

Prof. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira
Membro Suplente
Universidade de São Paulo - FCM

Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig
Membro Suplente
Universidade Estadual de Campinas - FEA

“Não tenha medo de pensar diferente dos outros, tenha medo de pensar igual e descobrir que todos estão errados.”

Eça de Queiroz

Aos meus pais Ivon Martins de Oliveira e Maria das Graças M. de Oliveira,
ao meu avô José Luiz Nepomuceno Meirelles (*in memoriam*),

Dedico.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio de algumas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, profissionalmente ou pessoalmente, e que sem elas não seria possível conquistar este sonho. Sinto-me grato a todos e gostaria de aproveitar o espaço para nomeá-las, e pedir perdão por eventual esquecimento. Sendo assim, gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Marcelo Cristianini (Unicamp/FEA/DTA) pela orientação, dedicação, companheirismo, amizade, confiança em meu trabalho e pelo apoio nas decisões profissionais e pessoais.

Ao Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (Unicamp/FEA/DTA) pela confiança no meu trabalho, dedicação e incentivo.

Aos membros da banca Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (Unicamp/FEA), Dr^a. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá (ITAL/TECNOLAT), Prof. Dr^a. Maricê Nogueira de Oliveira (USP/FCM), e Prof. Dr. Salvador Massaguer Roig (Unicamp/FEA), pelas valiosas contribuições e sugestões.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do projeto e ao CNPq pela bolsa concedida.

À Profa. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves (UNICAMP/FEA) e à Profa. Dra. Marise Aparecida Rodrigues Pollonio (UNICAMP/FEA), por todo apoio e incentivo.

Aos secretários da SPG/FEA, Sr. Cosme Perota e Sr. Marcos Sampaio Silveira, pela paciência e auxílios diversos.

Aos funcionários do DTA/FEA, Téc. José Roberto dos Santos, Dra. Renata M. S. Celeghini, Téc. Fernanda Cristina de Souza e Msc. Maria Elizabete Dias pela disposição e auxílios diversos.

Aos amigos de laboratório (Alline, Pedro, Bruna, Mírian, Bruno, Thiago e Letícia) pelo apoio pessoal, risadas, amizade e pela ajuda durante a realização das análises. Essa galerinha *High pressure* tem o poder de transformar o laboratório em

um local muito agradável, o que certamente contribui para a excelência na condução dos projetos.

Aos amigos da república Chora Rita que compartilharam comigo momentos felizes e desesperadores ao longo desta estrada, e sempre acreditaram no meu sonho e potencial (Lucas, Alex, Daniel, Rafael, Sthefani, Freddie e Welliton).

Aos meus pais (Ivon Martins de Oliveira e Maria das Graças Meirelles de Oliveira) que sempre me apoiaram todas as minhas escolhas e acreditaram no meu potencial.

Aos meus primos, tios, avós e demais familiares por estarem sempre presentes e disponíveis em minha vida, incentivando e me acolhendo em momentos difíceis.

Ao CEFET, IF e à UNICAMP, e a seus professores e funcionários, pelo conhecimento sólido e base segura para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos amigos da FEA, cujos auxílios diversos, incentivo e apoio foram essenciais: Diana, Karina, Guilherme, Cecília, Aninha, Leandro, Laís, Talita, Adriana, Edilma, Eliene, Vanessa e Mária.

A Deus, acima de todos e de todas as coisas, por tornar a minha existência possível.

Resumo Geral

Leites fermentados probióticos são considerados alimentos funcionais, devendo conferir proteção às culturas. A alta pressão dinâmica (APD) vem sendo investigada como alternativa na produção de leite fermentado, pois altera a funcionalidade de alguns constituintes. Este trabalho objetivou avaliar o uso de leite submetido à APD na cinética de fermentação de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, bem como a viabilidade das culturas, as características físico-químicas e reológicas durante a estocagem refrigerada do leite fermentado probiótico.

Leite (3% de gordura) foi submetido ao processo de APD (100MPa e 200MPa) e comparados com controle (15/5MPa), e avaliada a cinética de fermentação (pH), atividade proteolítica e a viabilidade durante a fermentação do *L. acidophilus* (Cap.2). Outro experimento foi realizado com leite (2% de gordura) submetido à APD (50/5MPa, 100/5MPa, 150/5MPa e 180/5MPa) e comparado com o controle (15/5MPa), no qual foi avaliada a cinética de fermentação de *S. thermophilus* em co-cultura com *L. acidophilus* (Cap.3), bem como o comportamento reológico (Cap.3) e as características físico-químicas (Cap.4) do leite fermentado probiótico durante a estocagem refrigerada.

A cinética de fermentação de *Lactobacillus acidophilus* foi alterada pela APD (100MPa e 200MPa) em comparação com o controle (15/5MPa), aumentando consideravelmente o tempo de fermentação com o aumento da pressão, sendo que após 24 horas de fermentação as amostras apresentaram valores de pH 4,49 (15/5MPa), pH 4,72 (100MPa) e 4,93 (200MPa). A atividade proteolítica foi alterada, sendo que pressões elevadas reduziram a atividade, atingindo no final da fermentação uma redução de 21,39% (100MPa) e 35,89% (200MPa), quando comparadas com o controle. Além disso, as amostras submetidas à APD apresentaram menor número de células viáveis de *L. acidophilus* no fim da fermentação em relação ao controle (0,28 ciclos log) ($p < 0,05$).

A cinética de fermentação do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* não foi alterada pela APD. O comportamento reológico durante a fermentação de leite processado à 100/5MPa e 180/5MPa apresentou correlação positiva entre a pressão usada com a consistência do leite fermentado, gerando um produto com maior consistência. Além disso, o processo de APD aumentou a capacidade de retenção de água (CRA) em 9,15% e reduziu a sinérese espontânea do produto em 31%, entre o controle e a amostras processada a 180/5MPa.

A viabilidade do *S. thermophilus* não foi ($p < 0,05$) influenciada pela APD (50/5MPa, 100/5MPa, 50/5MPa e 180/5MPa) em comparação com a homogeneização convencional (15/5MPa) durante a estocagem refrigerada, reduzindo a contagem em aproximadamente 0,2 ciclos log em todos os tratamentos estudados. A viabilidade do *L. acidophilus* foi maior na amostra processada a 180/5MPa a partir do 14º dia, em comparação ao controle (15/5MPa). O pH apresentou uma pequena redução ($p < 0,05$) somente na amostra processada a 180/5MPa no último dia. A atividade proteolítica das culturas não foi influenciada pela ADP.

Os resultados demonstraram que a APD pode melhorar a textura de leite fermentado, aumentar a capacidade de retenção de água, reduzir a sinérese e alterar a cinética de fermentação, dependendo da cultura utilizada. No entanto, a viabilidade das culturas, a redução do pH e a atividade proteolítica não sofreram alterações expressivas pela APD, apesar de apresentar diferenças significativas.

Palavras-chave: *Homogeneização por alta pressão • processo não térmico • Lactobacillus acidophilus • Streptococcus thermophilus • alimentos funcionais • iogurte.*

Summary

Probiotics fermented milk are considered functional food, should provide protection to cultures. Dynamic high pressure (DHP) is being investigated as an alternative in the production of fermented milk, because changing the functionality of some constituents. This study evaluated the use of milk submitted to DHP in fermentation kinetics of *S. thermophilus* and *L. acidophilus*, as well as the viability of the cultures, the physico-chemical and rheological during refrigerated storage of fermented milk probiotic.

Milk (3% fat) was subjected to the process of DHP (100MPa and 200MPa) and compared with control (15/5MPa), and evaluated the kinetics of fermentation (pH), proteolytic activity and viability during fermentation of *L. acidophilus* (Cap.2). Another experiment was performed with milk (2% fat) subject to DHP (50/5MPa, 100/5MPa, and 150/5MPa 180/5MPa) and compared with the control (15/5MPa), in which was evaluated the kinetics fermentation of *S. thermophilus* in co-cultured with *L. acidophilus* (Cap.3), and rheological behavior (Cap.3) and the physico-chemical (Cap.4) of probiotic fermented milk during refrigerated storage.

The fermentation kinetics of *Lactobacillus acidophilus* was modified by DHP (100MPa and 200MPa), compared to control (15/5 MPa) considerably increasing the fermentation time the higher the pressure used, and that after 24 hours of fermentation samples showed pH 4.49 (15/5MPa), pH 4.72 (100MPa) 4.93 (200MPa). The proteolytic activity was changed, with elevated pressures reducing proteolytic activity at the end of the fermentation, reaching a reduction of 21.39% (100MPa) and 35.89% (200MPa) compared with the control. In addition, the samples submitted to APD had lower number of viable probiotics in the end of fermentation compared to control (0,28 log cycles) ($p < 0.05$).

The fermentation kinetics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophilus* was not altered by DHP. The rheological behavior during fermentation in milk processed by DHP (100/5 MPa and 180/5 MPa) demonstrated a positive

correlation between the pressure and consistency of the fermented milk. Moreover, the process of DHP favored water-holding capacity (WHC) in 10.13% and reduced syneresis spontaneous in 31% between the control and 180/5 MPa.

The viability of *S. thermophilus* was not influenced by DHP (50/5MPa, 100/5MPa, 150/5MPa and 180/5MPa), compared to conventional homogenization (15/5 MPa) during refrigerated storage, reducing the count in approximately 0.2 log cycles in all treatments. The viability of *L. acidophilus* was higher in the processed sample 180/5MPa from day 14, compared to the control (15/5 MPa). The pH showed a small reduction in sample subject to 180/5 MPa at the final day of storage. The proteolytic activity of the culture was not influenced by DHP.

The results showed that the DHP may improve the texture of fermented milk, increase water-holding capacity, reduce syneresis and alter the kinetics of the fermentation. However, viability of cultures, the decrease in pH and proteolytic activity did not change by DHP, despite showing significant differences.

Keywords:

High pressure homogenization • non-thermal process • *Lactobacillus acidophilus* • *Streptococcus thermophilus* • functional foods • yogurt.

Sumário

Resumo Geral	xiii
Summary	xv
Sumário	xvii
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Figuras	xxiii
Capítulo 1. Revisão Bibliográfica e Objetivos	25
1.1 Leite fermentado.....	26
1.1.1 Mercado	26
1.1.2 Processo de fabricação de leite fermentado firme	27
1.1.3 Padronização do leite	28
1.1.4 Homogeneização	29
1.1.5 Tratamento térmico.....	30
1.1.6 Fermentação.....	32
1.1.7 Resfriamento do gel.....	33
1.2 Metabolismo das culturas	33
1.2.1 <i>Streptococcus thermophilus</i>	33
1.2.2 Cultura probiótica (<i>Lactobacillus acidophilus</i>).....	34
1.3 Alta pressão dinâmica (APD)	36
1.4 Alta pressão dinâmica (APD) na elaboração de leite fermentado	38
1.5 Objetivos	42
1.6 Referências Bibliográficas	43
Capítulo 2. Efeito da alta pressão dinâmica em leite fermentado por <i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
Resumo	55
Abstract	56
2.1 Introdução	57

2.2	Material e Métodos	58
2.2.1	Preparo da cultura	58
2.2.2	Tratamento do leite e produção do leite fermentado.....	59
2.2.3	Cinética de fermentação (pH)	60
2.2.4	Atividade proteolítica.....	60
2.2.5	Enumeração da cultura probiótica	61
2.2.6	Análise estatística	61
2.3	Resultados e Discussão	61
2.3.1	Cinética de fermentação (pH)	61
2.3.2	Atividade proteolítica.....	63
2.3.3	Enumeração da cultura probiótica	65
2.4	Conclusões.....	67
2.5	Referências Bibliográficas	67
Capítulo 3. Efeito da alta pressão dinâmica na cinética de fermentação e propriedades reológicas de leite fermentado probiótico		73
Resumo		75
Abstract		76
3.1	Introdução	77
3.2	Material e Métodos	78
3.2.1	Preparo da cultura	78
3.2.2	Tratamento do leite e produção do leite fermentado.....	79
3.2.3	Cinética de fermentação (pH)	80
3.2.4	Análise reológica.....	80
3.2.5	Análise estatística	81
3.3	Resultados e Discussão	81
3.3.1	Cinética de fermentação (pH)	81
3.3.2	Análise reológica.....	83
3.4	Conclusão	89
3.5	Referências Bibliográficas	89

Capítulo 4. Avaliação de leite fermentado probiótico preparado com leite submetido à alta pressão dinâmica	93
Resumo	95
Abstract	96
4.1 Introdução	97
4.2 Material e Métodos	98
4.2.1 Preparo da cultura	98
4.2.2 Tratamento do leite e produção do leite fermentado.....	99
4.2.3 Enumeração das culturas	100
4.2.4 Potencial hidrogeniônico (pH).....	100
4.2.5 Atividade proteolítica.....	100
4.2.6 Sinérese espontânea e capacidade de retenção de água (CRA)	101
4.2.7 Análise estatística	102
4.3 Resultados e Discussão	102
4.3.1 Enumeração das culturas	102
4.3.2 Potencial hidrogeniônico (pH).....	106
4.3.3 Atividade proteolítica.....	108
4.3.4 Sinérese espontânea e capacidade de retenção de água (CRA)	109
4.4 Conclusão	112
4.5 Referências Bibliográficas	112
Conclusões Gerais	121
Sugestões para trabalhos futuros.....	123

Lista de Tabelas

Tabela 4.1. Média \pm desvio padrão (n=3) do pH de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5°C..... 107

Tabela 4.2. Média \pm desvio padrão (n=3) da atividade proteolítica, expressa em absorbância a 340 nm, de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5 °C. 109

Lista de Figuras

Figura 1.1. Fluxograma do processamento de leite fermentado firme. (Adaptado de Tamine e Robinson, 1999).	28
Figura 1.2. Efeito do tratamento térmico na agregação de micelas de caseína durante a coagulação ácida. FCC = Fosfato de Cálcio Coloidal. (Adaptado de Harte et al., 2002).....	31
Figura 2.1 Cinética de redução do pH durante a fermentação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> em leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, n=3).	62
Figura 2.2 Atividade proteolítica de <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante a fermentação de leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, n=3).	64
Figura 2.3 Contagem de <i>Lactobacillus acidophilus</i> durante a fermentação de leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, n=3).	66
Figura 3.1 Cinética de fermentação com acompanhamento do pH e módulo de armazenamento (G'), sendo o pH expresso como a média de todos os tratamentos (valores médios, n=3 para o pH e n=2 para a análise reológica).	82
Figura 3.2. Média \pm desvio padrão (N=3) dos valores dos ensaios oscilatórios do leite fermentado probiótico feito com leite submetido à APD (180/5 MPa).....	84
Figura 3.3 Imagem ilustrativa de leite fermentado probiótico feito com leite processado por alta pressão dinâmica, no qual os géis (1° dia) foram batidos com auxílio de uma espátula com 20 voltas no sentido horário e 20 anti-horário e colocados para escorrer em uma superfície lisa com inclinação de 45° por 10 segundos.....	86
Figura 3.4 Média \pm desvio padrão (n=3) das componentes elásticas (K') e viscosa (K'') (a) e índice de comportamento (n' e n'') (b) das amostras controle	

(15/5 MPa) e submetidas à APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa). Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p > 0,05$)..... 88

Figura 4.1. Contagem de *Streptococcus thermophilus* durante a estocagem (5 °C) em leite fermentado elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) (valores médios, n=3). 104

Figura 4.2. Contagem de *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem (5 °C) em leite fermentado elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) (valores médios, n=3). 106

Figura 4.3. Porcentagem de soro removido por sinérese espontânea (a) e capacidade de retenção de água, expressa em porcentagem (% p/p) (b), do gel de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5 °C. Médias com letras iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) (valores médios, n=3)..... 111

Capítulo 1. Revisão Bibliográfica e Objetivos

1.1 Leite fermentado

1.1.1 Mercado

As bebidas a base de leite fermentado englobam uma ampla variedade de produtos que são regulamentados pelo Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Entende-se por leite fermentado os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas, que por sua atividade contribuem para as características do produto final. Além disso, estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007).

Os produtos derivados do leite fermentado são amplamente consumidos e relacionados com alimentos funcionais e promoção a saúde, gerando um aumento considerável no consumo destes alimentos, principalmente quando adicionados de micro-organismos probióticos (MOHAMMADI, 2012; SLOAN, 2012). O mercado de alimentos contendo probióticos é mais ativo nos países desenvolvidos como em alguns países europeus, Estados Unidos, Japão e Austrália. Contudo, o setor lácteo é o segmento mais desenvolvido no mercado de produtos probióticos, com iogurtes e leites fermentados disponíveis em embalagens com formato de "dose diária" (FARNWORTH, 2008).

O mercado de leite fermentando probiótico representa uma parcela importante da economia, favorecido pela crescente popularidade do produto como um alimento funcional. Além disso, outros fatores que favoreceram a venda do iogurte foi a redução de gordura e a classificação do produto como "iogurte natural", o que representou nos últimos anos um aumento nas vendas de 8,1% e 16,8%, respectivamente (DAIRYCO, 2013). Segundo a Nutraceutical World (2010) o mercado mundial de iogurte atingirá em 2015 o valor de US\$ 67 bilhões, prevendo um aumento anual de 6% nas vendas, o que representa 49,6 milhões de toneladas. Os alimentos probiótico atingiram US\$ 27,9 bilhões em 2011, com projeção de alcançar

US\$ 44,9 bilhões em 2018, sendo que somente os produtos lácteos probióticos deverão alcançar US\$ 32,2 bilhões, com taxa composta de crescimento anual de 6,8% entre 2013 e 2018 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013).

Na América Latina o mercado de alimentos funcionais obteve uma taxa de crescimento de 32% entre 2005 e 2007, sendo que o Brasil e o México possuem um potencial emergente no consumo destes produtos por apresentarem uma economia em desenvolvimento e aumento no interesse por estes alimentos, impulsionado principalmente pela publicidade que divulga a promoção a saúde inerente aos produtos probióticos. No Brasil as vendas de alimentos funcionais atingiram US\$ 500 mil o que corresponde a 1% dos alimentos vendidos em 2007. Sendo que, 65 % dos alimentos funcionais comercializados no país são produtos probióticos. Outro fator de destaque é que de todos os probióticos apenas o gênero *Lactobacillus* representou 61,9% das vendas no mundo em 2007 (GRANATO et al., 2010a; GRANATO et al., 2010b).

1.1.2 Processo de fabricação de leite fermentado firme

O processamento do leite fermentado é amplamente conhecido, sendo este produto comercializado como leite fermentado firme ou leite fermentado batido. Contudo, a principal diferença entre esses dois tipos de produto é a etapa de rompimento do gel, que no leite fermentado batido ocorre após a fermentação e no leite fermentado firme é inexistente, sendo a etapa de fermentação executada dentro da embalagem em que será comercializado (TAMINE e ROBINSON, 1999). O fluxograma de produção do leite fermentado firme está representado a seguir (Figura 1.1), e as principais etapas detalhadas nos tópicos seguintes.

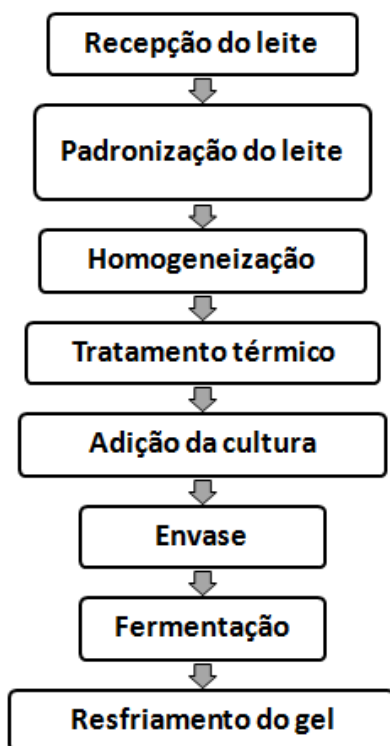


Figura 1.1. Fluxograma do processamento de leite fermentado firme. (Adaptado de Tamine e Robinson, 1999).

1.1.3 Padronização do leite

O leite é basicamente composto de água, proteínas, carboidratos, gordura, minerais e vitaminas, sendo que o teor de cada componente varia de acordo com a estação do ano, idade do animal, fase gestacional, raça, tipo de alimentação, entre outros (WALSTRA, WOUTERS, GEURTS, 2006). Contudo é de fundamental importância padronizar o leite para a fabricação de leite fermentado, uma vez que diferenças no conteúdo de extrato seco podem interferir na qualidade final do produto, afetando a consistência e atributos sensoriais como o gosto e aroma (ÖZER, 2010).

A gordura presente no leite contribui para a sensação de cremosidade, tornando o produto mais agradável na boca, além de contribuir com a textura pela capacidade de interagir com a rede proteica (LUCEY, MUNRO, SINGH, 1998).

Geralmente utiliza-se leite padronizado ou integral (3,0 a 4,2%), semi-desnatado (1,5%) ou, desnatado (<0,5%). A padronização da gordura pode ser feita (a) pelo desnate do leite utilizando centrífuga, (b) misturando leite integral com leite desnatado, ou (c) adição de creme ao leite desnatado (TAMINE e ROBINSON, 1999).

O conteúdo de sólidos não gordurosos contribui especialmente para a textura do leite fermentado, sendo que quanto maior a concentração de sólidos maior a viscosidade do produto final. A padronização pode ser feita adicionando preferencialmente leite em pó, soro em pó, concentrado proteico de soro e/ou caseína em pó. Porém a adição destes constituintes é limitada, uma vez que a concentração excessiva de sólidos torna o processo inviável (TAMINE, 2006). Dessa forma, o conteúdo de sólidos totais (incluindo a gordura) pode variar de baixos teores de sólidos 9% a altos teores 30%. Contudo para o melhor custo/benefício recomenda-se de 15 a 16% de sólidos, pois valores abaixo formam um gel de estrutura fraca e acima pouco impactam no aumento da textura (entre 16 e 20%) e concentrações ainda mais elevadas (> 25%) podem reduzir a mobilidade molecular e dificultar a atividade metabólica de algumas culturas (TAMINE e ROBINSON, 1999).

1.1.4 Homogeneização

O leite é uma típica emulsão de óleo em água no qual os glóbulos de gordura (com tamanhos entre 0,1 a 15 μm , com predominância a 3,5 μm) estão envoltos por uma fina membrana composta basicamente de proteínas, fosfolipídios e lipídeos (FOX e McSWEENEY, 1998). Contudo, durante a etapa de fermentação o leite permanece em repouso por um longo período, promovendo a suspensão dos glóbulos de gordura, demasiadamente grandes, na superfície do leite. Portanto é necessário aplicar o processo de homogeneização com o objetivo de reduzir o tamanho dos glóbulos (0,1 a 2,0 μm) e evitar a separação e aglutinação (AFONSO e MAIA, 1999, ZAMORA et al., 2012).

A redução no tamanho dos glóbulos de gordura aumenta a superfície total dos glóbulos ocasionando quantidade insuficiente de membrana para recobrir toda sua superfície e manter a emulsão estável. Por esse motivo as proteínas do leite, principalmente caseína, aderem-se a superfície da gordura atuando como emulsificante, e conseqüentemente promovendo a textura de leite fermentado, uma vez que a gordura adsorvida sobre as proteínas atua favoravelmente na estrutura do gel durante a fermentação (LUCEY, MUNRO, SINGH, 1998; TAMINE e ROBINSON, 1999).

O processo de homogeneização, convencionalmente aplicado nas indústrias, fundamenta-se na passagem forçada do leite por uma passagem estreita. Portanto observa-se maior eficiência do processo quando são utilizadas condições favoráveis à tecnologia, tais como: (a) temperatura adequada; (b) pressão correta de homogeneização; e (c) níveis de gordura. A temperatura do leite durante a passagem deve ser superior a 60 °C, isso garante que toda a gordura estará na forma líquida, ou seja, há ausência de cristais de gordura. As pressões utilizadas, geralmente não ultrapassam 20 MPa, podendo ser em um único estágio ou combinadas em dois estágios (ex.: 15 MPa no primeiro estágio e 5 MPa no segundo estágio). Entretanto, a homogeneização em dois estágios somente se faz necessário quando o conteúdo de gordura é alto (creme), onde os glóbulos facilmente coalescem (TAMINE e ROBINSON, 1999).

Alguns estudos apontam que a utilização da homogeneização por alta pressão (50 a 300 MPa), promove efeitos em diversos constituintes do leite, porém este tema será melhor abordado no **item 1.5**.

1.1.5 Tratamento térmico

O tratamento térmico aplicado ao leite para a fabricação de leite fermentado pode utilizar diversas combinações de tempo x temperatura, sendo denominado tratamento HTSH (*high temperature/short holding*), variando de 90 a 95 °C por 5 a 10 minutos ou LTH (*low temperature holding*) 80 a 85 °C por 30 minutos. Essas temperaturas são altas o suficiente para destruir patógenos, micro-organismos

competidores e algumas enzimas endógenas, porém o principal fator associado ao tratamento térmico é a precipitação de proteínas do soro, principalmente β -lactoglobulina (β -lg) sobre a κ -caseína. No tratamento LTH, mais de 80 % da β -lg são desnaturadas, gerando aumento da micela devido à interligação da β -lg/ κ -caseína que impede a proximidade excessiva destas moléculas no ponto isoelétrico (pH 4,6), aumentando a capacidade de retenção de água entre as moléculas e contribuindo para a firmeza do gel (ver **Figura 1.2**) (TAMINE, 2006).

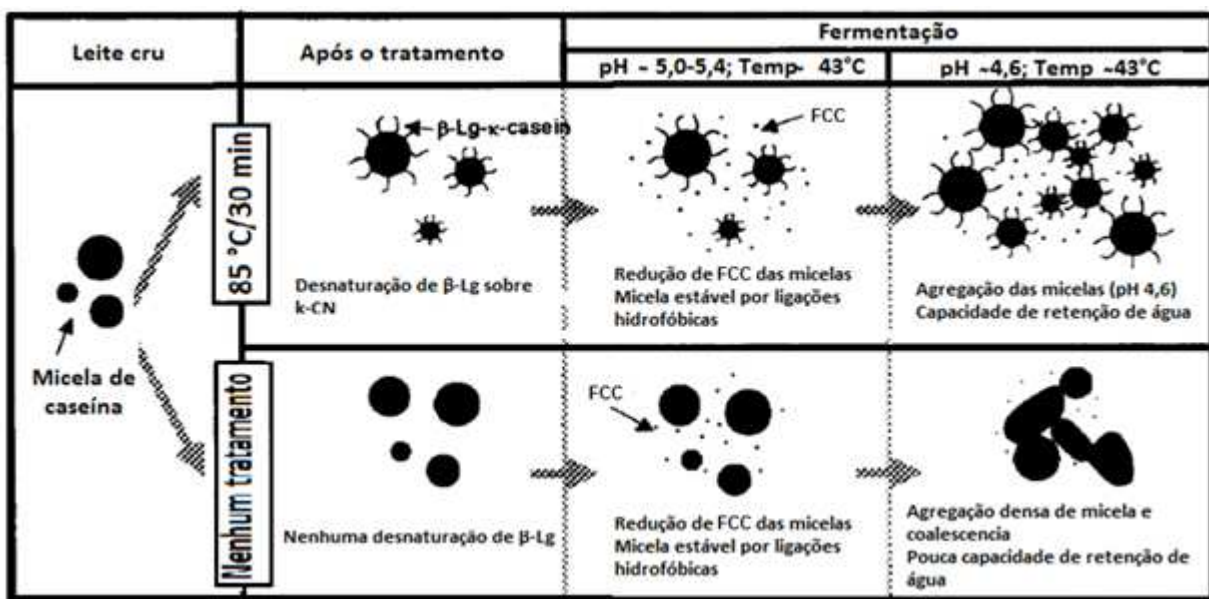


Figura 1.2. Efeito do tratamento térmico na agregação de micelas de caseína durante a coagulação ácida. FCC = Fosfato de Cálcio Coloidal. (Adaptado de Harte et al., 2002).

Outros fatores associados ao tratamento térmico são: (a) quebra parcial de proteínas do soro para peptídeos de menor peso molecular que estimulam a atividade microbiana, principalmente de culturas com baixa atividade proteolítica, como os probióticos (MORTAZAVIAN et al., 2006a,b); (b) expulsão do oxigênio, promovendo a viabilidade de culturas probióticas anaeróbias (SHAH, 1997); e (c)

redução da microbiota competidora, que poderia inibir o desenvolvimento da cultura fermentadora (TAMINE, 2006).

1.1.6 Fermentação

Após o tratamento térmico o leite é resfriado para posterior inoculação e a temperatura deve ser escolhida de acordo com o metabolismo da cultura (LEE e LUCEY, 2010). Em leite fermentado por *Streptococcus thermophilus*, a temperatura ótima de fermentação varia de 40 a 45 °C (TAMINE, 2006). Além disso, resultados obtidos por Lee e Lucey (2004), demonstraram que variações na quantidade de inóculo (0,5 a 4%) e temperatura (40 a 46 °C) modificam o tempo de fermentação e o comportamento reológico do gel. Temperaturas menores de incubação aumentam o tempo de fermentação, porém geram um gel mais firme. Por outro lado, a fermentação lenta prejudica a produção de compostos de aroma (LEE e LUCEY, 2003; TAMINE, 2006; BEAL et al, 1999).

As culturas ácido-lácticas, em especial *S. thermophilus*, tem a capacidade de metabolizar rapidamente a lactose em L(+) ácido láctico (ROBINSON, 2002). O resultado deste metabolismo gera redução do pH, e como consequência precipitação da caseína ao atingir o ponto isoelétrico (pH 4,6).

As caseínas presentes no leite (pH 6,7) são estabilizadas por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e fosfato de cálcio coloidal, e se mantêm na forma dispersa devido a sua superfície negativamente carregada, causando repulsão eletrostática (FOX e McSWEENEY, 1998). Durante a fermentação a precipitação da caseína ocorre pela (a) solubilização do fosfato de cálcio coloidal (FCC), (b) aumento de atrações eletrostáticas, devido à neutralização da carga negativa superficial da micela, e (c) aumento das interações hidrofóbicas entre micelas. Contudo, estes fenômenos ocorrem em 3 etapas durante a fermentação (redução do pH de 6,7 para 4,6). A primeira etapa (pH 6,7 a 6,0) é caracterizada pela parcial neutralização da carga negativa da micela de caseína e pouca solubilização do FCC. Na faixa entre pH 6,0 a 5,0 a carga negativa da caseína decresce, reduzindo a repulsão

eletrostática da κ -caseína e o FCC é totalmente solubilizado (\sim pH 5,0), enfraquecendo a estrutura interna. Quando o leite atinge pH 4,6 (ponto isoelétrico) a carga negativa da caseína é neutralizada, reduzindo a repulsão eletrostática entre as caseínas gerando aproximação das micelas. Dessa forma, a rede tridimensional do gel é formada pelo aumento de interações caseína-caseína, hidrofobicidade e interações eletrostáticas (positiva-negativa) (LEE e LUCEY, 2010).

1.1.7 Resfriamento do gel

A etapa de resfriamento é um importante método de controle da atividade metabólica das culturas, sendo que temperaturas inferiores a 10 °C reduzem drasticamente o metabolismo de bactérias do ácido láctico. Na produção de leite fermentado firme o produto é resfriado após a fermentação (pH 4,6), e o gel pode adquirir estrutura mais rígida após o 1° ou 2° dia de estocagem (TAMINE e ROBINSON, 1999).

1.2 Metabolismo das culturas

1.2.1 *Streptococcus thermophilus*

As culturas *starter* são frequentemente utilizadas na produção de leite fermentado devido a sua rápida atividade metabólica, sendo capaz de reduzir rapidamente o pH do leite, evitando o desenvolvimento de micro-organismos competidores (TAMINE, 2006). Dentre as bactérias lácticas o *Streptococcus thermophilus* é tradicionalmente utilizado, porém algumas cepas apresentam baixa atividade proteolítica e redução na produção de ácido láctico em valores de pH inferiores a 5,2, por isso são utilizados, geralmente, em associação com uma ou várias espécies de *Lactobacillus* (SHAHBAL et al., 1991; PEARCE e FLINT, 2002).

Streptococcus thermophilus possui diâmetro de 0,7 a 0,9 μm , ocorrendo em pares ou correntes, alguns dos quais podem ser bem longos. Possui crescimento ótimo entre 40 e 45 °C e capacidade de fermentar um número limitado de açúcares, entre eles lactose, frutose, sacarose e glicose. Por isso é altamente adaptada à

utilização em produtos lácteos, fermentando rapidamente lactose homofermentativamente para L(+) lactato como produto principal (TAMINE, 2006), via Embden-Meyerhof (EMP). A lactose é transportada para dentro da célula e é hidrolisada pela β -galactosidase em glicose e galactose, mas apenas a glicose é metabolizada através da via EMP para L(+) lactato, uma vez que estirpes *S. thermophilus* não fermentam galactose durante o metabolismo. Porém algumas estirpes possuem a capacidade de metabolizar a galactose quando a disponibilização de glicose é escassa (PEARCE e FLINT, 2002).

Outra característica importante na utilização de *S. thermophilus* em produtos lácteos é a produção de exopolissacarídeo (EPS), que contribui para a textura final na maioria dos leites fermentados. Alguns processos utilizam cepas produtoras de ESP para substituição de gordura em produtos desnatados, mantendo a viscosidade mais próxima ao leite fermentado integral. Contudo a produção de ESP em leite é dependente da temperatura de incubação e da cepa utilizada (VUYST et al., 2003; PURWANDARI et al., 2007).

1.2.2 Cultura probiótica (*Lactobacillus acidophilus*)

Os probióticos são definidos segundo a Food and Agriculture Organization (FAO) como “micro-organismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO, 2001). Dessa forma, para o micro-organismo ser denominado probiótico deve apresentar: (a) tolerância à acidez, ao suco gástrico e bile, sendo capazes de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal; (b) aderir à mucosa intestinal humana; (c) produzir substâncias antimicrobianas, com concomitante inibição de patógenos, ou seja, efeito imunomodulador; (d) propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (GOMES e MALCATA, 1999; SAARELA et al., 2000; DEL PIANO et al., 2006).

No Brasil, a legislação vigente afirma ainda que para o produto se enquadrar como alimento funcional a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve estar

entre 10^8 e 10^9 UFC por dose diária de produto consumido e a concentração do probiótico deve ser indicada no rótulo do produto (BRASIL, 2008).

O gênero *Lactobacillus* contém grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, são caracterizados geralmente como gram-positivos, não formadores de esporos e podem ser aerotolerantes ou anaeróbios restritos. São capazes de crescer em temperaturas que variam de 2 a 53 °C, com valores ótimos, geralmente, de 30 a 40 °C, e pH ótimo entre 5,5 e 6,2. Fermentam glicose para ácido láctico em cepas homofermentativas e as cepas heterofermentativas produzem ácido láctico, etanol e CO₂ (e/ou ácido acético). Aproximadamente 56 espécies do gênero *Lactobacillus* são conhecidas, entre estes o *Lactobacillus acidophilus* é o mais utilizado e estudado (O'SULLIVAN, 2006).

O *L. acidophilus* é microaerófilo, possui a capacidade de fermentar celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, salicina, sacarose, trealose e esculina. O leite possui em sua maioria lactose, porém o gênero *L. acidophilus* tem maior predominância em metabolizar sacarose. Além disso, a galactose produto da hidrólise de lactose não possui um grau de metabolização favorável, diferentemente da glicose e frutose oriundas da hidrólise da sacarose, sendo que a fermentação da glicose possui como único aceptor final o ácido láctico (GOMES e MALCATA, 1999), composto desejável na produção de leite fermentado (FARNWORTH, 2008). Além disso, esta espécie tem alta capacidade tamponante citoplasmática, o que permite maior resistência às mudanças no pH do citoplasma conferindo a bactéria maior estabilidade em condições ácidas (RIUS et al., 1994).

Algumas linhagens de *L. acidophilus* são comprovadamente probióticas podendo melhorar a funcionalidade dos produtos aos quais forem adicionados, por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K. Além disso, podem modular a microbiota intestinal, reforçar o sistema imune, auxiliar no tratamento contra infecções intestinais (SAZAWAL et al., 2006; SAARELA et al., 2000) e diminuir o risco de carcinogenicidade por serem capazes de reduzir os níveis de enzimas responsáveis por ativar os pró-carcinógenos (RAFTER, 2002).

Os benefícios nutricionais dos probióticos têm sido estudados em sua maioria nos produtos à base de leite fermentado contendo *Lactobacillus* e/ou bifidobacteria. Entretanto, a produção de leite fermentado de alta qualidade contendo probióticos é um grande desafio para fábricas de laticínios devido ao caráter sensível dos microorganismos nesses bioprodutos. Porém quando comparado a outras espécies probióticas a capacidade do *L. acidophilus* em tolerar baixas concentrações de oxigênio e resistir ao pH de leite fermentado (pH 4,6) contribuem para sua utilização na produção de leite fermentado (GOMES e MALCATA, 1999).

1.3 Alta pressão dinâmica (APD)

Nos últimos anos, vários processos não térmicos têm sido desenvolvidos e aplicados na produção de uma larga variedade de alimentos contribuindo para sua qualidade e segurança. Os alimentos processados por alta pressão representaram em 2008, segundo estimativas de algumas indústrias, um faturamento de US\$ 2 bilhões e uma produção de 200 mil toneladas/ano. Deste total os produtos de origem vegetal representaram 36 %, de origem animal (carnes e frutos do mar) 47 % e as bebidas com 11% (BALASUBRAMANIAM, 2008). Contudo, o processo de alta pressão estabelece duas classes de tecnologia, com base em princípios distintos (HAYDES et al., 2005; HUPPERTZ et al., 2002), denominados alta pressão isostática e alta pressão dinâmica (CRUZ et al., 2010).

A alta pressão isostática também conhecida como alta pressão hidrostática ou apenas alta pressão, consiste em submeter o produto à alta pressão dentro de uma câmara (100 MPa a 900 MPa), utilizando um meio que transfere a pressão ao produto (geralmente água potável). Este processo utiliza tempos prolongados (minutos ou horas) e temperaturas que podem variar de acordo com o objetivo desejado (CHAWLA et al., 2011).

Por sua vez o processo de alta pressão dinâmica (APD) ou homogeneização por alta pressão baseia-se no mesmo princípio dos homogeneizadores tradicionais, mas operam em níveis de pressão muito mais altos (PAREDA et al., 2009; BOUAOUINA et al., 2006; FLOURY et al., 2004). Na APD o fluido é forçado a passar

sob alta pressão por um estreito orifício, regulado por uma válvula, e posterior descompressão para a pressão atmosférica. Desta forma, fenômenos físicos gerados durante o processo, tais como: cavitação, turbulência, forças de impacto e cisalhamento contribuem para alterar estruturalmente as partículas dos alimentos (LANCIOTTI et al., 1996; BOUAOUINA et al., 2006).

Diversos estudos apontam a utilização de APD na destruição microbiana, sendo capaz de inativar bactérias vegetativas (CAMPOS e CRISTIANINI, 2007; TAHIRI et al., 2006; BRIÑEZ et al., 2007; TRIBST, FRANCHI, CRISTIANINI, 2008; FRANCHI, TRIBST, CRISTIANINI, 2011; FRANCHI, TRIBST, CRISTIANINI, 2012), leveduras (FANTIN et al., 1996; TAHIRI et al., 2006; FRANCHI, TRIBST, CRISTIANINI, 2011) e bolores (TAHIRI et al., 2006; TRIBST et al., 2009; TRIBST et al., 2011). Entretanto, alguns estudos mostram ineficiência do tratamento de APD para a inativação de algumas espécies microbianas, tais como *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarium* e *Leuconostoc dextranicum* (WUYTACK et al., 2002), devendo ser combinada com outras tecnologias (TRIBST et al., 2009; CHAVES-LÓPEZ et al., 2009).

Contudo, para a melhor utilização da tecnologia de APD objetivando a destruição microbiana deve-se levar em consideração a composição do alimento, temperatura de entrada do líquido no equipamento, nível de pressão e número de passagens pela válvula (WUYTACK et al., 2002; DIELS et al., 2003; BRIÑEZ et al., 2007; TRIBST et al., 2009; FRANCHI et al., 2011b; PEDRAS et al., 2012). Para o leite, por exemplo, observa-se maior efetividade do tratamento quando se utiliza maior temperatura de entrada, pressões elevadas e maior conteúdo de gordura (PEDRAS et al., 2012).

Além disso, a APD vem sendo investigada na alteração de macromoléculas, sendo capaz de alterar sua funcionalidade. A ação sobre proteínas pode alterar sua conformação (LUO et al., 2010), propiciando maior susceptibilidade a proteólise (GARCÍA-RISCO et al., 2002), aumento do nível de interações hidrofóbicas (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008), e o nível de fragmentos proteicos (SANDRA e DALGLEISH, 2005; SERRA et al., 2008), com consequente redução do peso

molecular (DONG et al., 2011). Em polissacarídeos a APD causa redução do peso molecular e mudanças conformacionais, contribuindo para redução da viscosidade em produtos com alta concentração de polissacarídeos (FLOURY, DESRUMAUX, LEGRAND, 2002; MODIG et al., 2006; VILLAY et al., 2012; AUGUSTO, IBARZ, CRISTIANNINI, 2012). Em óleos e gorduras pode interferir na estabilização de emulsões (FLOURY, DESRUMAUX, LEGRAND, 2002; MARCO-MOLÉS et al., 2012), e consequente redução dos tamanhos das gotículas formadas (FLOURY, DESRUMAUX, LARDIÈRES, 2000).

Contudo, estes efeitos geram um novo campo de estudo, uma vez que as alterações moleculares causadas por APD podem alterar estruturalmente os alimentos (SERRA et al., 2007; ESCOBAR et al., 2011; AUGUSTO, IBARZ, CRISTIANNINI, 2012) e modificar a cinética de reações bioquímicas (LANCIOTTI et al., 2006; PATRIGNANI et al., 2007; TRIBST e CRISTIANINI, 2012).

1.4 Alta pressão dinâmica (APD) na elaboração de leite fermentado

A APD tem sido frequentemente estudada na alteração dos constituintes dos alimentos. Diversos estudos sobre seu efeito em leite têm demonstrado que APD reduz o tamanho dos glóbulos de gordura (HAYES, FOX, KELLY, 2005; THIEBAUD et al., 2003), altera a funcionalidade das proteínas, aumenta o nível de desnaturação e agregação, bem como causa a inativação de enzimas (HAYES e KELLY, 2003). Entretanto estes efeitos possuem intensidades diferenciadas em detrimento à pressão utilizada, sendo que quanto maior a pressão e/ou a temperatura do produto durante o processo de APD maior o efeito (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; PAREDA et al., 2009).

Com base nessas alterações a APD tem sido amplamente estudada na modificação da textura de iogurte e leites fermentados, extensão da vida de prateleira e melhoria de diversas outras características, tais como, retenção de água, viscosidade, densidade do gel, redução de pós-acidificação e desenvolvimento de culturas lácteas (PATRIGNANI et al., 2009; SERRA et al., 2009b; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; PATRIGNANI et al., 2007; HAYES, FOX, KELLY, 2005). Esses fatores

contribuem para o interesse das indústrias em eliminar o uso de amido, pectina, gelatina e/ou misturas desses estabilizadores (MASSON et al., 2011; TAMIME e ROBINSON, 2007), reduzindo de custos e seguindo a tendência dos alimentos funcionais de alta qualidade.

A promoção de tais características evidenciadas na produção de leite fermentado ocorre devido ao processo de APD desintegrar as micelas de caseína, com conseqüente aumento do número de fragmentos e maior solubilização do fosfato de cálcio coloidal, o que desestabiliza a micela e eleva o número de interações entre caseína-caseína por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (SERRA et al., 2009a; GUERZONI et al., 1999). Além disso, quando a APD é aplicada em leite cru favorece a desnaturação da β -lactoglobulina sobre a k-caseína (GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; SERRA et al., 2008; GARCÍA-RISCO et al., 2002). Porém alguns autores apontam que leite desnatado submetido a pressões acima de 200 MPa desfavorecem a estrutura do gel, devido à desintegração demasiadamente alta das micelas de caseína, aumentando a proximidade das moléculas e favorecendo fortes interações entre proteínas, o que acarretaria em expulsão de soro e redução da viscosidade (MASSON et al., 2011; SERRA et al., 2009a).

Além disso, outro fator que interfere na promoção das características do leite fermentado é teor de gordura presente no leite processado por APD (SERRA et al., 2007; SERRA et al., 2008). Em experimento realizado por Ciron et al. (2010), a redução na quantidade de gordura do leite reduziu a firmeza do gel. Esse comportamento é justificado, pois quando os glóbulos de gordura são submetidos à APD contribuem para a estrutura do gel, pois a redução do tamanho dos glóbulos com o conseqüente aumento da superfície propiciam interações favoráveis com as proteínas durante a formação do gel ácido. Outra função da gordura é atuar como enchimento inerte quando não interagem com as partículas de proteínas. Há formação de *clusters* de glóbulo de gordura cruzados por proteínas de soro de leite desnaturadas, que associados com a rede base de caseína, aumentam a extensão do *cross-linking* e área de contato, aumentando a firmeza (LUCEY, MUNRO, SINGH, 1998).

Outro fator a ser observado é que no processo convencional de aquecimento para a produção de leite fermentado o complexo formado entre proteína do soro e caseína pode impedir ou retardar a acessibilidade de proteases às caseínas via repulsão ou impedimento estérico (SANDRA e DALGLEISH, 2005). Neste caso, a APD poderia atuar modificando a conformação da proteína, expondo novos sítios de substrato e aumentando sua suscetibilidade à ação proteolítica, facilitando a etapa de fermentação, principalmente por micro-organismos fastidiosos, que podem ser favorecidos pela presença de peptídeos (HAYES e KELLY, 2003; BOUAOUINA et al., 2006; GARCÍA-RISCO et al., 2002; GOMES e MALCATA, 1999; SANDRA e DALGLEISH, 2005). Porém a intensidade de proteólise está relacionada com o teor de gordura, uma vez que quando o leite com gordura é submetido à APD a intensidade de proteólise é reduzida, o que está relacionado com a adsorção de proteínas sobre a superfície da gordura, restringindo a acessibilidade da enzima ao sítio de ligação (PAREDA et al., 2009).

Alguns trabalhos apontam a utilização da APD no favorecimento da viabilidade de culturas *starters* e probióticas. Patrignani et al. (2009), observaram que a APD (60 MPa) contribuiu para a manutenção da viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, porém a cultura co-adjunta de *L. acidophilus* não foi influenciada. Por outro lado, em queijo feito com leite processado por APD (100 MPa) a contagem de *L. acidophilus* se manteve a mesma durante 12 dias de estocagem (10^7 UFC.mL⁻¹), enquanto o controle apresentou redução de $1,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ para 1×10^6 UFC.g⁻¹ (BURNS et al., 2008). Além disso, segundo Patrignani et al. (2007), a presença de gordura no leite processado por APD pode prejudicar a etapa de fermentação por *Lactobacillus paracasei*, aumentando o tempo necessário para atingir o pH desejado. Neste estudo, porém, durante a vida de prateleira a presença da gordura favoreceu a viabilidade da cultura probiótica.

Desta forma, a tecnologia de APD se mostra promissora na fabricação de leite fermentado, bem como na viabilidade das culturas utilizadas, porém são necessários maiores estudos para elucidar a influência de cada variável nas características do produto final, tais como pressões aplicadas, teor de gordura do leite, culturas

utilizadas e a atividade metabólica da cultura durante a fermentação, bem como sua viabilidade durante a estocagem.

1.5 Objetivos

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a influência da alta pressão dinâmica aplicada em leite na fabricação de leite fermentado probiótico. Para uma avaliação global deste objetivo, o mesmo foi subdividido em alguns objetivos específicos:

1. Avaliar a cinética de fermentação *L. acidophilus* (Capítulo 2), e *S. thermophilus* e *L. acidophilus* (Capítulo 3) em leite submetido à APD;
2. Avaliar a influência da APD sob as características físico-químicas do leite fermentado probiótico: reologia (Capítulo 3), proteólise, pH, capacidade de retenção de água e sinérese durante o armazenamento refrigerado (Capítulo 4);
3. Verificar a viabilidade da cultura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus* durante o armazenamento refrigerado do leite fermentado (Capítulo 4).

1.6 Referências Bibliográficas

- AFONSO, I. M.; MAIA, J. M. Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 183-190, 1999.
- AUGUSTO, P.E.D.; IBARZ, A.; CRISTIANINI, M. Effect of High Pressure Homogenization (HPH) on the Rheological Properties of a Fruit Juice Serum Model. **Journal of Food Engineering**, 2012, in press.
- BALASUBRAMANIAM, V. M., FARKAS, D., & TUREY, E. J. Preserving foods through high pressure processing. **Food Technology**, v. 11, p. 33-38, 2008.
- BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on Acidification and Viscosity of Stirred Yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 673–681, 1998.
- BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em julho, 2008**. Disponível em <[http:// www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 21 de Outubro de 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46 de 23/10/2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Disponível em: <[http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em 21 de Outubro de 2012.
- BRÍÑEZ, W. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; HERRERO, M.M.H.; LÓPEZ, B.G. Inactivation of *staphylococcus* ssp. Strains in whole milk and orange juice using ultra high pressure homogenization at inlet temperatures of 6 and 20°C. **Food Control**, v. 18, p. 1282-1288, 2007.
- BURNS, P.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D; VINDEROLA, G.C.; REINHEIMER, J.A. LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. Probiotic Crescenza Cheese Containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Manufactured with High-

Pressure Homogenized Milk. **American Dairy Science Association**, v. 91, p. 500–512, 2008.

CAMPOS, F.P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 226-229, 2007.

CHAVES-LÓPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; GUERZONI, M.E.; SUZZI, G. Effect of high pressure homogenization applied individually or in combination with other mild physical or chemical stresses on *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* spore viability. **Food Control**, v. 20, p. 9691-695, 2009.

CHAWLA, R.; PATIL, G. R.; SINGH, A. K. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. **Jounal Food Scienc and Technology**. v. 48, n. 3, p.260–268, 2011.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, A.L. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 314–320, 2010.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I.; BOLINI, H.M.A.; SANT'ANA, A.S.; CRISTIANINI, M. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, p. 483-493, 2010.

DAIRYCO. **Yogurt Market**. 2013. Disponível em: < <http://www.dairyco.org.uk/market-information/dairy-sales-consumption/yogurt-market/yogurt-market/>>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2013.

DEL PIANO, M., MORELLI, L., STROZZI, G.P., ALLESINA, S., BARBA, M., DEIDDA, F., LORENZINI, P., BALLARE, M., MONTINO, F., ORSELLO, M., SARTORI, M., GARELLO, E., CARMAGNOLA, S., PAGLIARULO, M., AND CAPURSO, L., Probiotics: from research to consumer, **Digestive and Liver Disease**. v. 38, p. 248–255, 2006.

DIELS, A.M.J.; TAEYE, J.D.; MICHIELS, C.W. Sensitization of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 165-175, 2005.

DONG, X.; ZHAO, M.; SHI, J.; YANG, B.; LI, J.; LUO, D.; JIANG, G.; JIANG, Y. Effects of combined high-pressure homogenization and enzymatic treatment on extraction yield, hydrolysis and function properties of peanut proteins. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v. 12, p. 478-483, 2011.

ESCOBAR , D.; CLARK, S.; GANESAN, V.; REPISO, L.; WALLER, J.; HARTE, F. High-pressure homogenization of raw and pasteurized milk modifies the yield, composition, and texture of queso fresco cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 1201–1210, 2011.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; MEDICI, A.; PEDRINI, P.; ROSSI, D. Effects of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 7(10), p. 2879-2887, 1996.

FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods**. 2ª Edição. Estados Unidos da América: Editora CRC Press. p. 581, 2008.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LARDIÈRES, J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 1, p. 127–134, 2000.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; LEGRAND, J. Effect of Ultra-high-pressure Homogenization on Structure and on Rheological Properties of Soy Protein-stabilized Emulsions. **Journal of Food Science**. V. 67, p. 3388–3395, 2002.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. Dairy Chemistry and Biochemistry. 1° ed. London: Blackie Academic and Professional, 1998, p. 463.

FLOURY, J.; LEGRAND, J.; DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogenizer. Part B. Study of droplet break-up and recoalescence. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 1285-1294, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization

Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acessado em 17 jun. 2011.

FRANCHI, M.A.; TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Lactobacillus brevis* in beer by high pressure homogenization associated with lysozyme. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117 (4), p. 634-638, 2011.

FRANCHI, M.A.; TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Short Communication: The effect of antimicrobials and bacteriocins on beer spoilage microorganisms. **International Food Research Journal**, v. 19 (2), 783-786, 2012.

GALIA, W.; PERRIN, C.; GENAY, M.; DARY, A. Variability and molecular typing of *Streptococcus thermophilus* strains displaying different proteolytic and acidifying properties. **International Dairy Journal**. V. 19, p. 89–95, 2009.

GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Modifications in Milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. **International Dairy Journal**, v.12, p. 679-688, 2002.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GRÁCIA-JULIÁ, A.; RENÉ, M.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; PICART, L.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1014-1032, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SHAH, N.P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010a.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010b.

GUERZONI, M.E.; VANNINI, L.; CHAVES-LÓPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 851–862, 1999.

HARTE, F.; LUEDECKE, L.; SWANSON, B.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Yield Stress and Microstructure of Set Yogurt Made from High Hydrostatic Pressure-Treated Full Fat Milk. **Journal of Food Science**. V. 67, N. 6, p.2245-2250, 2002.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 25–33, 2005.

HAYES, M.G. KELLY, A.L. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) Effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 297–305, 2003.

HUPPERTZ, T.; KELLY, A L.; FOX, P. F. Effects of high pressure on some constituents and properties of milk. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 561-572, 2002.

LANCIOTTI, R.; GARDINI, F.; SINIGAGLIA, M.; GUERZONI, M. E. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters of Applied Microbiology**, v. 22, p. 165-168, 1996.

LANCIOTTI, R.; VANNINI, L.; PATRIGNANI, F.; IUCCI, L.; VALLICELLI, M.; NDAGIJIMANA, M.; GUERZONI, M.E. Effect of high pressure homogenization of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 73 (2), p. 216-226, 2006.

LEE, W; LUCEY, J.A. Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. **Journal of Texture Studies**, v. 34, p. 515-536, 2003.

LEE, W; LUCEY, J.A. Formation and Physical Properties of Yogurt. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 23, N. 9, p. 1127–1136, 2010.

LEE, W.; LUCEY, J. A. Structure and Physical Properties of Yogurt Gels: Effect of Inoculation Rate and Incubation Temperature. **Journal of Dairy Science**. v.87, p.3153–3164, 2004

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 660-664, 1998.

LUO, D. H., ZHAO, Q. Z., ZHAO, M. M., YANG, B., LONG, X. T., REN, J. Y., & ZHAO, H. Effects of limited proteolysis and high-pressure homogenization on structural and functional characteristics of glycinin. **Food Chemistry**, v. 122, p. 25-30, 2010.

MARCO-MOLÉS, R.; HERNANDO, I.; LLORCA, E.; PÉREZ-MUNUERA, I. Influence of high pressure homogenization (HPH) on the structural stability of an egg/dairy emulsion. **Journal of Food Engineering**. v. 109, p. 652–658, 2012.

MASSON, L.M.P.; ROSENTHAL, A.; CALADO, V.M.A.; DELIZA, R.; TASHIMA, L. Effect of ultra-high pressure homogenization on viscosity and shear stress of fermented dairy beverage. **Food Science and Technology**. V.44, p. 495-501, 2011.

MODIG, G.; NILSSONA, L.; BERGENSTAHL, B.; WAHLUND, K-G. Homogenization-induced degradation of hydrophobically modified starch determined by asymmetrical flow field-flow fractionation and multi-angle light scattering. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1087–1095, 2006.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MOHAMMAD, A.; MORTAZAVIAN. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Engineering Life Science**. v. 12, n 4, p. 399–409, 2012.

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

MORTAZAVIAN, A.M.; EHSANI, M.R.; MOUSAVI, S.,M.; REINHEIMER, J.A.; EMAMDJOMEH, Z.; SOHRABVANDI, S.; REZAEI, K. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of

probiotic microorganism in freshly made yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, p.8-11, 2006b.

NUTRACEUTICALS WORLD . **Yogurt Consumption to Reach \$67 Billion by 2015**. 2010. Disponível em: <http://www.nutraceuticalsworld.com/contents/view_breaking-news/2010-02-08/yogurt-consumption-to-reach-67-billion-by-2015/>. Acesso em: 13 de fevereiro de 2013.

O'SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. In: Ahmedna, M.; Goktepe, I.; Juneja, V.K. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: CRC Press, 2006, Cap. 4, p. 91-108, ISBN: 978-1-4200-2757-0.

ÖZER, B. Strategies for Yogurt Manufacturing. In: **Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products**. Ed. Boca Ranton: CRC Press, Yıldız, p. 47-96, 2010.

PEDRAS, M. M.; PINHO, C.R.G. ; TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. . The Effect of High Pressure Homogenization on microorganisms in milk. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 1-5, 2012.

PAREDA, J.; FERRAGUT, V.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized Milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1974–1979, 2009.

PATRIGNANI, F.; BURNS, P.; SERRAZANETTI, D.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, E. Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Research**, n. 76, p. 74–82, 2009.

PATRIGNANI, F.; LUCCI, L.; LANCIOTTI, R.; VALLICELLI, M.; MATHARA, J.M.; HOLZAPFEL, W.H. GUERZONI, M.E. Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. **American Dairy Science Association**, v.90, p.4513–4523, 2007.

PEARCE, L.; FLINT, S. **Streptococcus thermophilus**. ELSEVIER LTD. v. 4, p. 2577–2582, 2002.

PURWANDARI, U.; SHAH, N.P.; VASILJEVIC, T. Effects of Exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological and rheological properties of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1344–1352, 2007.

RAFTER, J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. **British Journal of Nutrition**, v.88, p. 89-94, 2002.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J. G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology letters**, v. 120, p. 291-296, 1994.

ROBINSON, R.K. **Yoghurt**. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. ROBINSON P.K.; BATTA, C.A.; PATEL, P.D. v. 3, London,UK: academic press, p. 784-791, 2002.

SAARELA, M., MOGENSEN, G., FONDEN, R., MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, 197-215, 2000.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1095-1104, 2005.

SAZAWAL, S.; HIREMATH, G.; DHINGA, U.; MALIK, P.; DEB, S.; BLACK, R. E. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhea: a meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 374-382, 2006.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 782–790, 2007.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yoghurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 82–91, 2009a.

SERRA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., FERRAGUT, V. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 100-106, 2009b.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; JARAMILLO, P.D.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra-High Pressure Homogenization-Induced Changes in Skim Milk: Impact on Acid Coagulation Properties. **Journal of Dairy Research**, v.75, p. 69–75, 2008.

SLOAN, A. E. Top 10 global food trends. **Food Technology**, v. 66, n. 4, p.4-12, 2012.

SHAH, N. P. Bifidobacteria: Characteristics and potential for application in fermented dairy products. **Milchwissenschaft**. v. 52, p. 16–20, 1997

SHAHBAL, S.; HEMME, D.; DESMAZEAUD, M. High cell wall-associated proteinase activity of some *Streptococcus thermophilus* strains (H-strains) correlated with a high acidification rate in milk. **Lait**. v. 71, p. 351–357, 1991.

TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**, v.39, p. 98-105, 2006.

TAMINE, A. Y. **Fermented Milks**. 1^a ed. Inglaterra: Blackwell Publishing. 2006, 262p.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 2^a ed. Inglaterra: Woodhead Publishing Ltda. 1999, 619p.

THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTEL, J. C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 427–439, 2003.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH (TMR). **Probiotics Market - Global Industry Size, Market Share, Trends, Analysis, and Forecasts 2012 – 2018**. New York, p. 120, 2013.

TRIBST, A.A.L.; CRISTIANINI, M. Increasing fungi amyloglucosidase activity by high pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, 2012, in press.

TRIBST, A.A.L.; FRANCHI, M.A.; CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v 9 (3), p. 265-271, 2008.

TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. MASSAGUER, P. R. Inactivation of *Aspergillus niger* in mango nectar by high-pressure homogenization combined with heat shock. **Journal of Food Science**, v.74 (9), p.M509-M514, 2009.

TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. MASSAGUER, P. R. Quality of mango nectar processed by high-pressure homogenization with optimized heat treatment. **Journal of Food Science**, v.76 (2), p.M106-M110, 2011.

VILLAY, A., DE FILIPPIS, F.L., PICTON, L., LE CERF, D., VIAL, C., & MICHAUD, P. Comparison of polysaccharide degradations by dynamic high-pressure homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 278-286, 2012.

VUYST, L. DE; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; MARSHALL, V.; DEGEEST, B.; VANINGELGEM, F. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 13, p.707–717, 2003.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Ed. 2.CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 744, 2006.

WUYTACK, E. Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIEL, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenization and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. v. 77, n. 3, p. 205-212, 2002.

ZAMORA, A.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenization and conventional treatments of milk. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p.135-143, 2012.

**Capítulo 2. Efeito da alta pressão dinâmica em leite fermentado
por *Lactobacillus acidophilus***

Resumo

Alta pressão dinâmica (APD) tem sido proposta na promoção das características de leite fermentado, mas poucas informações sobre o efeito no desenvolvimento das culturas têm sido avaliadas. Este trabalho objetivou avaliar a cinética de fermentação de *Lactobacillus acidophilus* em leite processado por APD. Leite em pó reconstituído (12% p/v sólidos totais com 3% v/v de gordura) foi processado a 110°C/15 minutos e submetido à homogeneização convencional (15/5 MPa, tratamento controle) e a APD (100 MPa e 200 MPa). A cultura foi adicionada (10^7 UFC.mL⁻¹) e incubada a 37 °C. A cinética de fermentação (pH), atividade proteolítica e viabilidade da cultura foram avaliadas durante 24 horas de fermentação. A cinética de fermentação mostrou que após 12 horas, as amostras processadas por APD apresentaram menores taxas de fermentação comparadas com o controle, atingindo no final da fermentação (24 horas): pH 4,49 (controle), 4,72 (100 MPa) e 4,93 (200 MPa) ($p < 0,05$). A atividade proteolítica demonstrou que após 12 horas os processamentos a APD apresentaram valores inferiores ($p < 0,05$), atingindo no final da fermentação uma redução de 21,39 % (100 MPa) e 35,89% (200 MPa), quando comparadas com o tratamento controle. A viabilidade da cultura foi mais alta no controle ($4,78 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) que as amostras de leite tratadas por APD ($2,95 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para 100 MPa e $2,54 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para 200 MPa) ($p < 0,05$). Conclui-se que a APD alterou a cinética de fermentação e a proteólise, sendo que a viabilidade de *L. acidophilus* após 24 horas de fermentação foi pouco alterada.

Palavras-Chave: *Probiótico • tecnologias emergentes • fermentação • homogeneização por alta pressão*

Abstract

Dynamic high pressure (DHP) has been proposed to improve the characteristics of fermented milk, but few information about the effect on culture development are available. This work aimed to evaluate the fermentation kinetic by *Lactobacillus acidophilus* in milk processed by DHP. Milk powder reconstituted (12% w/v total solids containing 3%v/v milkfat) was processed at 110 ° C / 15 minutes and subjected to conventional homogenization (15/5 MPa, control) and DHP (100 MPa and 200 MPa). The culture was added (10^7 CFU.mL⁻¹) and incubated at 37° C. Kinetics of fermentation (pH), proteolytic activity and viability of the culture were evaluated during 24 hours of fermentation. The fermentation kinetics after 12 hours showed that the samples processed by DHP showed lower fermentation rates compared to the control, reaching at the end of fermentation (24 hours): pH 4.49 (control) 4.72 (100 MPa) and 4.93 (200 MPa) (p <0.05). The proteolytic activity after 12 hours showed lower values to milk processed by DHP (p <0.05), reaching at the end of the fermentation a reduction of 21.39% (100 MPa) and 35.89% (200 MPa), compared with the control. The culture viability was highest in the control (4.78×10^8 CFU.mL⁻¹) than in the milk samples processed by DHP (2.95×10^8 CFU.mL⁻¹ to 100 MPa and 2.54×10^8 CFU.mL⁻¹ to 200 MPa) (p <0.05). It was concluded that DHP altered fermentation kinetics and proteolysis, whereas the viability of *L. acidophilus* fermentation after 24 hours was slightly altered.

Keywords: Probiotic • emerging technologies • fermentation • high pressure homogenization

2.1 Introdução

Alta pressão dinâmica (APD) é uma tecnologia emergente promissora, que utiliza princípio semelhante à homogeneização convencional, porém permite atingir pressões de até 400 MPa, onde o fluido é exposto à elevada turbulência, cisalhamento e forças de cavitação, que podem ser parcialmente transformadas em energia térmica (16 °C a 19 °C/100 MPa) (FLOURY et al., 2002; HAYES e KELLY, 2003; SERRA et al., 2007).

A tecnologia de APD vem sendo amplamente estudada na preservação de alimentos (TRIBST, SANT'ANA, MASSAGUER, 2009a) por inativar células de bactérias vegetativas (CAMPOS e CRISTIANINI, 2007; TRIBST, FRANCHI, CRISTIANINI, 2008), fungos filamentosos e leveduras (TAHIRI et al., 2006, TRIBST et al., 2009b, TRIBST et al., 2011). Entretanto, vários estudos relatam a utilização da APD na alteração de alguns constituintes do leite, entre eles: redução do tamanho dos glóbulos de gordura (THIEBAUD et al., 2003; HAYES, FOX, KELLY, 2005; SERRA et al., 2008) e alteração da funcionalidade das proteínas, aumentando o nível de desnaturação e agregação (HAYES e KELLY, 2003; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008). Essas modificações são responsáveis por alterar as características de iogurtes e leites fermentados, aumentando a capacidade de retenção de água, viscosidade e densidade do gel. Além disso, contribui para o desenvolvimento da cultura durante a fermentação e reduz a pós-acidificação (SERRA et al., 2009a; SERRA et al., 2009b; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; PATRIGNANI et al., 2007; HAYES, FOX, KELLY, 2005).

A etapa de fermentação é muito importante na fabricação de iogurtes e leites fermentados, uma vez que determinará a sobrevivência da cultura láctica, a formação de compostos de sabor e algumas propriedades físicas dos géis obtidos (TAMIME e ROBINSON, 1999). Contudo, para que algumas culturas possam se desenvolver é necessária uma fonte de aminoácidos, fornecida pela proteólise da caseína no início da fermentação (COURTIN et al., 2002). Portanto, quando culturas probióticas são utilizadas para a fabricação de leite fermentado, seu metabolismo lento pode dificultar a proteólise inicial (GOMES e MALCATA, 1999), tornando a etapa de

fermentação mais lenta. Contudo, há um grande interesse em reduzir o tempo de fermentação e aumentar a viabilidade de culturas de *Lactobacillus acidophilus*, pois quando viáveis e em quantidades adequadas nos alimentos podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001). Desta forma, alimentos contendo probióticos são relacionados a produtos funcionais e a expectativa de que o alimento se torne uma fonte de bem-estar, estimulando o consumo destes alimentos e incentivando pesquisas capazes de aprimorar seus benefícios (RANADHEERA et al., 2012).

Neste contexto a APD pode influenciar a etapa de fermentação e viabilidade da cultura, pois atua modificando a conformação das proteínas, expondo novos sítios do substrato podendo aumentar sua suscetibilidade à ação proteolítica (BOUAOUINA et al., 2006; GARCÍA-RISCO et al., 2002; GOMES e MALCATA, 1999).

Poucos estudos avaliaram detalhadamente a cinética de fermentação de leite processado por APD. Demonstraram apenas que esta tecnologia altera o tempo total de fermentação de leite fermentado por *Lactobacillus paracasei* (PATRIGNANI et al., 2007) e de culturas mistas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (SERRA et al., 2007). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética de fermentação, a proteólise e a viabilidade da cultura de *Lactobacillus acidophilus* durante a fermentação em leite processado por APD.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preparo da cultura

Para a elaboração do inóculo de *Lactobacillus acidophilus* NFCM[®] (Danisco, São Paulo, Brasil), 4% (p/v) da cultura liofilizada DVS (*Direct Vat Set*) foi diluída em leite desnatado reconstituído (10% p/v) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) previamente esterilizado a 115 °C/10 minutos e mantido por 2 horas a 10 °C para reidratação da cultura. Posteriormente o inóculo (10^{10} UFC.mL⁻¹) foi fracionado em tubos de *ependorff* (1 mL), e congelado a -20 °C até o momento do uso. Desta

forma, cada 1 mL de inóculo adicionado em 1 L de leite apresentou contagem de aproximadamente 10^7 UFC.mL⁻¹. Este procedimento foi realizado a fim de obter inóculos com a mesma concentração de micro-organismos.

Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar seguindo procedimentos assépticos.

2.2.2 Tratamento do leite e produção do leite fermentado

Para a realização do experimento foi utilizado leite em pó reconstituído 12% p/v (3% de gordura; e 3,5% de proteína) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) tratado termicamente a 110 °C/15 minutos em autoclave AV-30 (Phenix, São Paulo, Brasil), e então resfriado a 10 °C e submetido ao processo de alta pressão dinâmica utilizando Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália). Para o controle foram utilizados dois estágios de homogeneização 15/5 MPa (tratamento convencionalmente aplicado na indústria de laticínios), e os demais tratamentos submetidos à APD em apenas um estágio 100 MPa e 200 MPa. Na saída do equipamento de APD foi acoplada uma serpentina de inox (305 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro), imersa em banho de gelo (5 °C), que reduziu a temperatura do leite para aproximadamente 10 °C e foram coletados 1 L de leite para cada tratamento. No momento da adição do inóculo previamente preparado (1 mL), segundo **item 2.2.1**, as amostras foram aquecidas em banho-maria (FANEM[®] MOD.116, São Paulo, Brasil) até 37 °C e a cultura de *L. acidophilus* foi adicionada ao leite obtendo contagem de aproximadamente 10^7 UCF.mL⁻¹. Em seguida cada tratamento foi fracionado (10 mL) em seus respectivos tubos de ensaio estéreis. A etapa de fermentação das amostras foi realizada em B.O.D. a 37 °C e as análises conduzidas durante a fermentação por 24 horas.

2.2.3 Cinética de fermentação (pH)

A cinética de fermentação foi realizada utilizando um potenciômetro (BEL Engineering W3B, Itália), para medir o pH a cada 3 horas durante 24 horas de fermentação (MARSHALL, 1993).

2.2.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada por meio da mensuração dos aminoácidos e peptídeos liberados pela cultura determinada por o-fitaldialdeído (OPA) em espectrofotômetro conforme proposto por Church et al., (1983) adaptado por Muramalla e Aryana (2011). A solução OPA foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL adicionando 0,9 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (tetraborato de sódio) (Nuclear[®], São Paulo, Brasil), 0,5 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma[®], EUA) e aproximadamente 35 mL de água deionizada e submetida à solubilização em banho de ultrassom (UNIQUE[®] T740, São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Em paralelo foi pesado em um béquer 40 mg de ortofitaldialdeído (Sigma-Aldrich[®], EUA) e posteriormente diluído em 1 mL de metanol (Synth[®], São Paulo, Brasil), homogeneizado e transferido para um balão contendo o SDS e $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Por último foi adicionado 100 μL de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich[®], EUA) e o volume completado para 50 mL com água destilada.

Uma porção de 2,5 g do leite fermentado foi misturado a 1 mL de água destilada e posteriormente a 5 mL de ácido tricloroacético 0,75 N (Synth[®], São Paulo, Brasil). A mistura foi mantida em repouso por 10 minutos e filtrada em filtro de papel Whatman n° 2. Em seguida, 150 μL do filtrado foi misturado com 3 mL de reagente OPA, mantido em repouso por 2 minutos e submetido à leitura em estrofotômetro a 340 nm (Beckman Coulter[®] DU 800, EUA). As análises foram realizadas durante a fermentação nos tempos 0, 12 e 24 horas, sendo cada filtrado analisado em triplicata. Para a calibração (branco) foi preparada uma solução com 3 mL de reagente OPA adicionado de 150 μL de ácido tricloroacético 0,75 N. Os resultados foram expressos como absorvância a 340 nm.

2.2.5 Enumeração da cultura probiótica

A contagem do *L. acidophilus* durante a fermentação foi acompanhada diluindo 25 mL da amostra em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% p/v (Merk, Darmstadt, Alemanha) (diluição 10^{-1}) e as posteriores dissoluções foram feitas transferindo 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% p/v. As contagens foram realizadas em duplicata, por plaqueamento em profundidade com sobre camada, utilizando meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) (HIMEDIA, Mumbai, Índia) incubado em aerobiose a 37°C por 72 horas (LIMA et al., 2009).

2.2.6 Análise estatística

Os processos de produção dos leites fermentados foram realizados em 3 repetições e as análises de cada repetição foram realizadas em triplicata, exceto a análise de enumeração da cultura que foi realizada em duplicata. As similaridades e diferenças entre os dados obtidos dos diferentes tratamentos foram observados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de médias de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Statistica[®] 7.0 (Statsoft, EUA).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Cinética de fermentação (pH)

Durante a fermentação as bactérias ácido lácticas convertem lactose em ácido láctico, o que reduz o pH do leite. Durante a acidificação do leite, o pH diminui de 6,7 para $\leq 4,6$ (LEE e LUCEY, 2010). Portanto, o monitoramento do pH durante a fermentação é um importante parâmetro para avaliar o desenvolvimento da cultura.

Os resultados da cinética de fermentação (Figura 2.1) demonstraram que o tratamento do leite por APD não alterou o tempo de fermentação até 9 horas ($p > 0,05$), porém a partir deste tempo a amostra processada a 200 MPa apresentou menor redução do pH e, após 12 horas de fermentação todas as amostras diferiram

Efeito da APD em leite fermentado por *L. acidophilus*

entre si ($p < 0,05$), sendo que o tratamento controle apresentou maior redução do pH, seguido da amostra processada a 100 MPa e 200 MPa. Pode-se notar que a amostra controle atingiu o pH 5 após 18 horas de fermentação, enquanto que o leite submetido a 100 MPa atingiu o mesmo pH em aproximadamente 21 horas e o leite processado a 200 MPa em aproximadamente 24 horas. Dessa forma, é possível observar um aumento considerável no tempo de fermentação quando o leite é processado por APD. Do ponto de vista industrial o aumento no tempo de fermentação poderia causar maiores custos de processamento e reduzir a produtividade, porém este problema pode ser solucionado adicionando culturas com atividade metabólica mais alta, como é o caso do *Streptococcus thermophilus* (dados mostrados no capítulo 3).

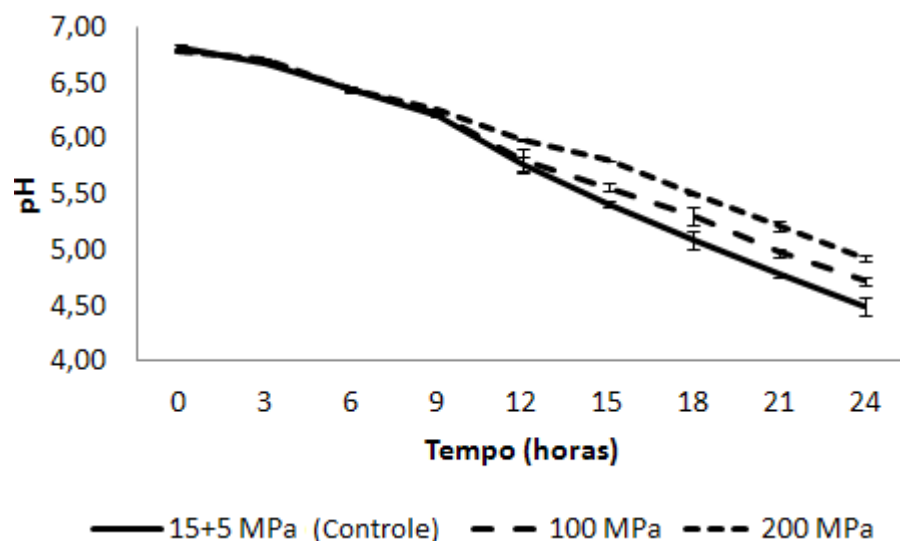


Figura 2.1 Cinética de redução do pH durante a fermentação de *Lactobacillus acidophilus* em leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, $n=3$).

Existem poucos estudos que avaliaram a etapa de fermentação de leite processado por APD. Contudo, Patrignani et al. (2007), demonstraram que leite contendo altos teores de gordura e submetidos a altas pressões (100 MPa) aumentam o tempo de fermentação de *Lactobacillus paracasei*, quando comparado com o leite submetido a baixas pressões (20 MPa).

Outro fator que parece influenciar o tempo de fermentação é o tipo da cultura utilizada. Quando a cultura possui maior atividade metabólica, sendo capaz de reduzir rapidamente o pH para 4,6, a APD não altera o tempo de fermentação final. Este fenômeno foi observado no Capítulo 3, quando foi utilizado *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*, com tempo total de fermentação de 6 horas (Figura 3.1).

Portanto, variações no teor de gordura do leite e a atividade metabólica da cultura utilizada podem influenciar a cinética de fermentação dependendo da pressão aplicada.

2.3.2 Atividade proteolítica

A proteólise é um fenômeno importante durante a fermentação, pois influencia a sobrevivência da cultura durante a estocagem, a formação de alguns compostos de sabor e algumas das propriedades físicas dos géis obtidos (TAMIME e ROBINSON, 1999). O ensaio espectrofotométrico baseado no método OPA detecta grupos α -amino livres, liberados das proteínas lácteas após atividade enzimática, expressando a atividade proteolítica das culturas (CHURCH et al., 1983).

Observa-se na Figura 2.2 que a atividade proteolítica do controle foi superior ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos submetidos à APD após 12 horas de fermentação, e esta tendência se manteve até 24 horas de fermentação. Considerando a atividade proteolítica durante a fermentação, destaca-se que a amostra processada a 200 MPa apresentou 35,89% menos atividade proteolítica e a amostra 100 MPa apresentou 21,39%, em relação ao controle. A atividade proteolítica dos leites fermentados produzidos com leite submetidos à APD não diferiram entre si durante o período de fermentação ($p > 0,05$).

A APD modifica a estrutura da micela de caseína, principalmente na região periférica próxima a κ -caseína, ocasionando redução parcial do tamanho da micela (SANDRA e DALGLEISH, 2005; ROACH e HARTE, 2008; SERRA et al., 2009a), e conseqüentemente, aumentando o nível de fragmentos caseicos na fração solúvel

Efeito da APD em leite fermentado por *L. acidophilus*

(SANDRA e DALGLEISH, 2005; SERRA et al., 2008), gerando maior susceptibilidade da micela de caseína a degradação proteolítica por exposição de novos sítios de ligação enzimática, principalmente em leite desnatado (GARCÍA-RISCO et al., 2002). Entretanto, quando o leite possui gordura, a APD reduz os glóbulos a tamanhos menores que adsorvem sobre a superfície da micela reduzindo a susceptibilidade da proteína à ação enzimática (GARCÍA-RISCO et al., 2002; CÍRON et al., 2010; PAREDA et al., 2009). Este fato pode justificar a redução da atividade proteolítica nos tratamentos submetidos à APD observados neste estudo.

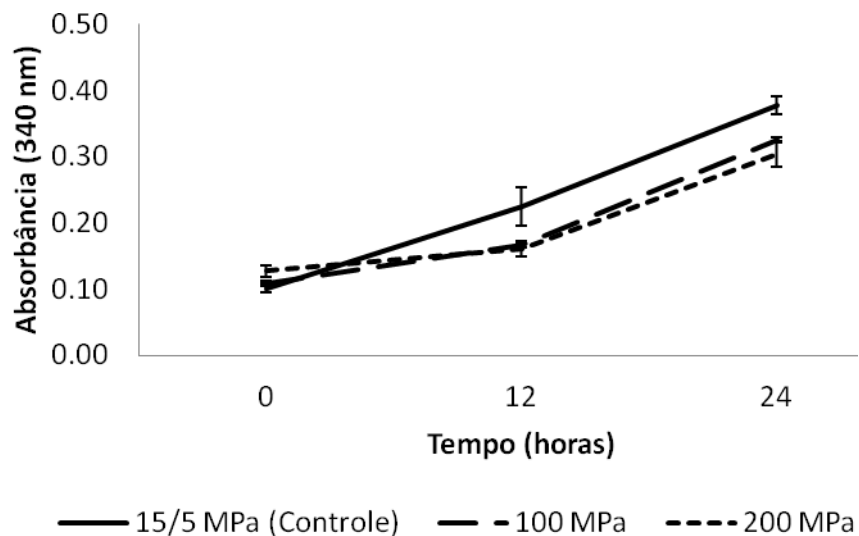


Figura 2.2 Atividade proteolítica de Lactobacillus acidophilus durante a fermentação de leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, n=3).

Segundo Tamine e Robinson (1999), a baixa atividade proteolítica, e conseqüentemente a menor liberação de peptídeos e amino ácidos durante a fermentação pode prejudicar o desenvolvimento da cultura. Desta forma, a baixa atividade proteolítica observada nas amostras submetidas à APD, pode ter influenciado a cinética de fermentação mais lenta ($p < 0,05$) (Figura 2.1), e

consequentemente a baixa contagem de *L. acidophilus* no final da fermentação ($p < 0,05$) (Figura 2.3).

2.3.3 Enumeração da cultura probiótica

A Figura 2.3 apresenta a contagem da cultura probiótica durante a fermentação, no qual se observa o mesmo comportamento em todos os tratamentos, sendo que somente no final da fermentação o controle apresentou uma contagem ligeiramente maior em relação as amostras submetidas à APD ($p < 0,05$). Entretanto, esta pequena diferença no desenvolvimento da cultura de *L. acidophilus* durante a fermentação (0,28 ciclos log) pode influenciar sua viabilidade ao longo da estocagem, conforme reportado por Dave e Shah (1998) em iogurte probiótico suplementado com 500 mg.L^{-1} de cisteína, no qual a diferença de 0,24 ciclos log na contagem de *L. acidophilus* no final da fermentação (24 horas) aumentou para 0,72 ciclos log após 35 dias de armazenamento. Desta forma, a influência da APD sobre a viabilidade da cultura durante a estocagem deverá ser investigada em estudos futuros, pois é um fator de grande importância para que o produto seja considerado um alimento probiótico, devendo apresentar contagem superior a 10^7 UFC.mL^{-1} durante toda a vida de prateleira (BRASIL, 2007).

Patrignani et al. (2007), demonstraram que o tempo de fermentação de *Lactobacillus paracasei* aumentou quando foi utilizado leite processado por APD (20 a 100 MPa) contendo 3% de gordura. Este efeito está relacionado com o teor de gordura e a pressão aplicada, sendo que quanto maior os valores dessas variáveis, maior o tempo de fermentação. Conforme verificado neste estudo, o aumento da pressão elevou o tempo de fermentação em leite com 3% de gordura.

O efeito da APD na viabilidade das culturas durante a estocagem foi investigado por outros autores. Patrignani et al. (2007) verificaram maior tempo de fermentação nas amostras processadas por APD, porém a viabilidade da cultura probiótica (*Lactobacillus paracasei*) após 30 dias foi favorecida pelas altas pressões aplicadas e teores elevados de gordura. Em queijo Crescenza Burns et al. (2008)

Efeito da APD em leite fermentado por *L. acidophilus*

não constatarem perda na viabilidade de *L. acidophilus* após 12 dias de estocagem quando o leite (4,2% de gordura) foi processado por APD (100 MPa), enquanto o controle apresentou redução de $1,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ para 1×10^6 UFC.g⁻¹. Segundo Stanton et al. (1998), altas quantidades de gordura exercem efeito protetivo da cultura probiótica, principalmente em queijo durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Desta forma, a APD aplicada no leite contendo gordura pode favorecer a viabilidade de culturas probióticas durante a estocagem refrigerada.

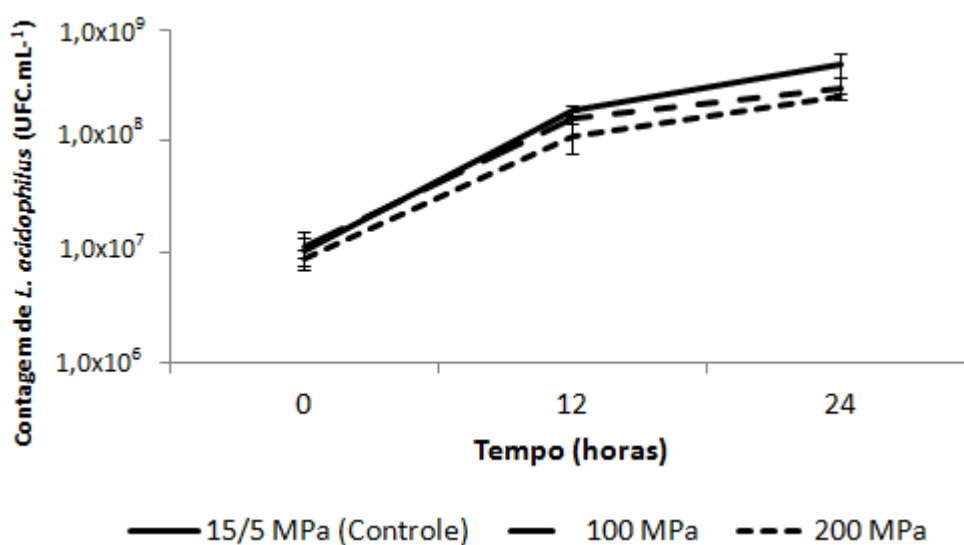


Figura 2.3 Contagem de *Lactobacillus acidophilus* durante a fermentação de leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (100 MPa e 200 MPa) (valores médios, $n=3$).

Avaliando os trabalhos encontrados na literatura, corroborando com os resultados do presente estudo, pode-se sugerir que altas pressões dinâmicas e altas concentrações de gordura prejudicam a etapa de fermentação, porém, segundo Patrignani et al. (2007) podem favorecer a viabilidade da cultura durante a estocagem, devendo esta hipótese ser avaliada em estudos futuros.

2.4 Conclusões

Concluiu-se que o processo de APD em leite com 3% de gordura aumentou o tempo de fermentação, proporcionalmente a pressão utilizada até 200 Mpa, além de reduziu a atividade proteolítica. As contagens de *L. acidophilus* foram menores após 24 horas de fermentação nas amostras feitas com leite submetido à APD. Contudo, para maiores esclarecimentos sobre a etapa de fermentação em leite submetido à APD, se faz necessário avaliar diferentes concentrações de gordura no leite e diferentes culturas fermentadoras.

2.5 Referências Bibliográficas

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on Acidification and Viscosity of Stirred Yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 673–681, 1998.

BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46 de 23/10/2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 21 de Outubro de 2012.

BURNS, P.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D; VINDEROLA, G.C.; REINHEIMER, J.A. LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. Probiotic Crescenza Cheese Containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Manufactured with High-Pressure Homogenized Milk. **American Dairy Science Association**, v. 91, p. 500–512, 2008.

CAMPOS, F.P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 226-229, 2007.

CHURCH, F.C, H. E.; SWAISGOOD, D. H.; PORTER, CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal Dairy of Scienc** . v. 66, p. 1219-1227, 1983.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, A.L. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 314–320, 2010.

COURTIN, P.; MONNET, V.; RUL, F. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus* / *Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. **Microbiology** v. 148, p. 3413–3421. 2002.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal Dairy Science**, v. 11, p. 2804-2816, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf. Acessado em 17 jun. 2011.

FLOURY, J.; DESRUMAUX, A.; AXELOS, M. A. V.; LEGRAND, J. Degradation of methylcellulose during ultra-high pressure homogenization. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p. 47–53, 2002.

GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Modifications in Milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. **International Dairy Journal**, v.12, p. 679-688, 2002.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GRÁCIA-JULIÁ, A.; RENÉ, M.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; PICART, L.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on

whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1014-1032, 2008.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 25–33, 2005.

HAYES, M.G. KELLY, A.L. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) Effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 297–305, 2003.

LANCIOTTI, R.; VANNINI, L.; PITTIA, P.; GUERZONI, M.E. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. **Food Microbiology**, v.21, p. 753-760, 2004.

LEE, W; LUCEY, J.A. Formation and Physical Properties of Yogurt. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 23, N. 9, p. 1127–1136, 2010.

LIMA, K.G.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp bulgaricus and *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Technology**, v.42, p. 491–495, 2009.

MARSHALL, R.T. Standard Methods for Examination of Dairy Products. Washington: American Public Health Association. 1993.

MURAMALLA, T.; ARYANA, K.J. Some low homogenization pressures improve certain probiotic characteristics of yogurt culture bacteria and *Lactobacillus acidophilus* LA-K. **Journal Dairy Science**, v. 94, p.3725–3738, 2011.

PAREDA, J.; FERRAGUT, V.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized Milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1974–1979, 2009.

PATRIGNANI, F.; LUCCI, L.; LANCIOTTI, R.; VALLICELLI, M.; MATHARA, J.M.; HOLZAPFEL, W.H. GUERZONI, M.E. Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional

Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. **American Dairy Science Association**, v.90, p.4513–4523, 2007.

ROACH, A.; HARTE, F. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.9, p. 1-8, 2008.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1095-1104, 2005.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yoghurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 82–91, 2009a.

SERRA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., FERRAGUT, V. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 100-106, 2009b.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; JARAMILLO, P.D.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra-High Pressure Homogenization-Induced Changes in Skim Milk: Impact on Acid Coagulation Properties. **Journal of Dairy Research**, v.75, p. 69–75, 2008.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 782–790, 2007.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p. 491-496, 1998.

TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**, v.39, p. 98-105, 2006.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 2^a ed. Inglaterra: Woodhead Publishing Ltda. 1999, 619p.

THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTEL, J. C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 427–439, 2003.

TRIBST, A.A.L.; FRANCHI, M.A.; CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v 9 (3), p. 265-271, 2008.

TRIBST, A.A.L., SANT'ANA, A.S., & DE MASSAGUER, P.R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices – past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 310-339, 2009a.

TRIBST, A.A.L., FRANCHI, M.A., CRISTIANINI, M., & DE MASSAGUER, P.R. Inactivation of *Aspergillus niger* in mango nectar by high-pressure homogenization combined with heat shock. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 509-514, 2009b.

TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. MASSAGUER, P. R. Quality of mango nectar processed by high-pressure homogenization with optimized heat treatment. **Journal of Food Science**, v.76 (2), p.M 106-M110, 2011.

Capítulo 3. Efeito da alta pressão dinâmica na cinética de fermentação e propriedades reológicas de leite fermentado probiótico

Resumo

Alta pressão dinâmica (APD) é um processo não térmico, que comprovadamente altera os constituintes lácteos. Este trabalho objetivou avaliar a cinética de fermentação, o comportamento reológico do gel durante a fermentação e durante a estocagem refrigerada de leite (2% gordura) submetido à homogeneização convencional (15/5 MPa, tratamento controle) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) fermentado por *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*. Os resultados demonstraram que a APD não altera a cinética de fermentação ($p > 0,05$), levando o mesmo tempo para atingir pH 4,6 em todos os tratamentos. No entanto, o comportamento reológico durante a fermentação demonstrou que o início da formação do gel ocorreu em pH 5,0 em todas as amostras, sendo que valores inferiores de pH apresentam correlação positiva entre a maior consistência do gel (valor de G') e maiores pressões utilizadas na APD. Durante a estocagem as amostras mantiveram este comportamento, apresentando aumento no parâmetro K' da amostra 150/5 MPa de 12,77% e na amostra 180/5 MPa aumento de 15% em relação ao controle ($124,67 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$) e, após o 14º dia essas diferenças aumentaram para 22,5% e 26,88%, respectivamente. Os parâmetros n' e n'' não foram influenciados pela APD, indicando que as forças intermoleculares não são alteradas. Conclui-se desta forma, que a APD promove a melhora da textura em leite fermentado probiótico sem alterar o tempo de fermentação do produto.

Palavras-Chave: *Cinética de fermentação • homogeneização por alta pressão • reologia • iogurte*

Abstract

Dynamic high pressure (DHP) is a non-thermal process, which demonstrably alter milk constituents. However, this study evaluated the kinetics of fermentation, the rheological behavior of the gel during fermentation and during refrigerated storage of milk (2% milkfat) subject to conventional homogenization (15/5 MPa, control treatment) and DHP (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa and 180/5 MPa) fermented by *Streptococcus thermophilus* in co-cultured with *Lactobacillus acidophilus*. The results showed that DHP does not alter the kinetics of fermentation ($p > 0.05$) leading the same time to reach pH 4.6 in all treatments. However, the rheological behavior during the fermentation showed that the onset of gel formation occurred at pH 5.0 in all samples, while lower pH exhibit a positive correlation between higher gel consistency (value of G') and higher pressures used in DHP. During storage the samples maintained this behavior, an increase in the parameter K' to sample 150/5 MPa 12.77% and the sample 180/5 MPa 15%, when compared to control (124.67 Pa.s⁻¹) and, after 14 days these differences increased to 22.5% and 26.88%, respectively. The parameters n' and n'' were not affected by DHP, indicating that the intermolecular forces are not changed. The conclusion is thus that DHP promotes texture in fermented milk probiotic without altering the fermentation time of the product.

Keywords: Kinetics of fermentation • high pressure homogenization • rheology • yogurt

3.1 Introdução

Alta pressão dinâmica (APD) é uma tecnologia emergente utilizada na preservação de alimentos (TRIBST, SANT'ANA, MASSAGUER, 2009a), sendo amplamente estudada na inativação de células de bactérias vegetativas (CAMPOS e CRISTIANINI, 2007; TRIBST, FRANCHI, CRISTIANINI, 2008) fungos filamentosos e leveduras (TAHIRI et al., 2006, TRIBST, et al., 2009b, TRIBST, et al., 2011).

Entretanto, alguns estudos relatam a utilização da APD na alteração de alguns constituintes do leite, entre eles: o tamanho dos glóbulos de gordura (THIEBAUD et al., 2003; HAYES, FOX, KELLY, 2005; SERRA et al., 2008), funcionalidade das proteínas, aumentando o nível de desnaturação e agregação, bem como a inativação de enzimas (HAYES e KELLY, 2003; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008).

Contudo, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de investigar a influência das modificações dos constituintes lácteos na fabricação de iogurte e leites fermentados, com enfoque na extensão da vida de prateleira e melhoria da capacidade de retenção de água, viscosidade, densidade do gel, redução de pós-acidificação e desenvolvimento das culturas lácteas (SERRA et al., 2009b; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; PATRIGNANI et al., 2007; HAYES, FOX, KELLY, 2005). A intensidade da melhoria de alguns atributos está diretamente relacionada com a pressão utilizada (CIRON et al., 2011; SERRA et al., 2008), a composição do leite, principalmente quantidade de gordura (CIRON et al., 2010; PATRIGNANI et al., 2007) e a cinética de formação do gel (HERNÁNDEZ et al., 2008; SERRA et al., 2008). Portanto, mais estudos são necessários para entender melhor a influência de cada uma dessas variáveis no processo de fermentação e na estrutura do produto. Neste sentido, os ensaios reológicos de baixa deformação são uma importante ferramenta na avaliação de géis lácteos.

Os ensaios reológicos de viscoelasticidade, que utilizam baixas taxas de deformação ou tensão (ex.: $\leq 1\%$ ou $\leq 1\text{ Pa}$, respectivamente), sempre realizados na região linear, não destroem a estrutura do gel, sendo possível avaliar a formação da rede tridimensional durante a fermentação, bem como as interações entre as partículas de proteína e gordura no gel pós-fermentação (LEE e LUCEY, 2010). Os

resultados são expressos como módulo de armazenamento (G') e módulo de dissipação (G''), onde G' indica o comportamento sólido do material, sendo que quanto maior o número de ligações fortes entre os constituintes do leite maior o valor de G' e os valores de G'' indicam comportamento líquido/viscoso do produto (LUCEY et al., 2000; LUCEY et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influencia da alta pressão dinâmica em leite (2 % de gordura) na cinética de fermentação por *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*, e no comportamento reológico do gel durante a fermentação e estocagem refrigerada.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Preparo da cultura

Foram utilizadas culturas liofilizadas comerciais de *Streptococcus thermophilus* TA-40 (Danisco, São Paulo, Brasil) e *Lactobacillus acidophilus* NFCM[®] (Danisco, São Paulo, Brasil). As culturas DVS (*Direct Vat Set*) foram diluídas separadamente em leite desnatado reconstituído (10 % p/v) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) esterilizado (115 °C/10 minutos). Posteriormente, o inóculo de *S. thermophilus* (10^{11} UFC.mL⁻¹) e de *L. acidophilus* (10^{10} UFC.mL⁻¹) foram fracionados separadamente em tubos de *ependorff* (1 mL), e congelado a -20 °C até o momento do uso. Desta forma, cada 1 mL de inóculo adicionado em 1 L de leite apresentou contagem de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ de *S. thermophilus* e 10^7 UFC.mL⁻¹ de *L. acidophilus*. Este procedimento foi realizado a fim de obter inóculos com a mesma concentração de micro-organismos.

No momento da utilização da cultura de *L. acidophilus* para a fermentação do leite a mesma foi descongelada e pré-ativada na proporção de 5% (v/v) em 20 mL leite desnatado reconstituído (10% p/v) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) previamente esterilizado a 115 °C/10 minutos e suplementado com 2% p/v de glicose (GOMES e MALCATA, 1999), e então incubado a 37 °C por 16 horas para aumentar

sua concentração. O inóculo de *S. thermophilus* não foi submetido ao procedimento de pré-ativação.

Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar seguindo procedimentos assépticos.

3.2.2 Tratamento do leite e produção do leite fermentado

Para a realização do experimento utilizou-se leite UHT (2,0% de gordura; 3,0% de proteína; e 10,2% de sólidos totais) (Shefa, São Paulo, Brasil), tratado termicamente a 90°C/5 minutos em banho-maria (autoclave modelo AV-30 Phenix, São Paulo, Brasil), e então resfriado a 60 °C e submetido ao processo de alta pressão dinâmica utilizando Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália). Para todos os tratamentos foram utilizados dois estágios, sendo o tratamento controle processado à 15/5 MPa (homogeneização convencionalmente aplicada na indústria de laticínios), e os demais tratamentos submetidos à alta pressão dinâmica a 50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa. Na saída do equipamento de APD foi acoplada uma serpentina de inox (305 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro), imersa em banho de gelo (5 °C), que reduziu a temperatura do leite para aproximadamente 10 °C e foram coletados 2 L de leite para cada tratamento. Após 20 minutos as amostras foram aquecidas em banho-maria (FANEM[®] MOD.116, São Paulo, Brasil) até 43 °C e adicionadas as culturas de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, previamente preparadas segundo **item 3.2.1**, a fim de obter concentrações de aproximadamente 10⁸ UFC.mL⁻¹ e 7,5x10⁷ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Cada tratamento foi fracionado em seus respectivos potes de vidro estéreis (121 °C/15 minutos) com capacidade para 150 mL (50 mm de diâmetro e 85 mm de altura). A etapa de fermentação das amostras foi realizada em B.O.D. a 43 °C e monitorada utilizando um potenciômetro (BEL Engineering W3B, Itália) até atingir pH 4,6, e então resfriadas para 5 °C e armazenadas a esta temperatura até o momento das análises.

3.2.3 Cinética de fermentação (pH)

O leite previamente processado por APD e adicionado das culturas (conforme **item 3.2.2.**) foi incubado em B.O.D. a 43 °C e pH foi monitorado com o eletrodo inserido na amostra durante todo o período de fermentação. Os dados de pH foram coletados a cada segundo utilizando um potenciômetro (BEL Engineering W3B, Itália) acoplado ao computador.

3.2.4 Análise reológica

Foram realizadas duas análises oscilatórias de baixa deformação, capaz de conservar a integridade do gel e avaliar estruturalmente as interações entre as proteínas e gorduras. Utilizou-se um reômetro de tensão controlada (AR2000ex, TA Instruments, USA) equipado com geometria *Vaned Quarter* (28 mm de diâmetro e 42 mm de comprimento).

A primeira análise consistiu em avaliar a cinética de formação do gel, baseada em estudo realizado por Lee e Lucey (2003). Para isto o leite previamente processado por APD, aquecido a 43 °C e adicionado das culturas (conforme **item 3.2.2.**), foi transferido para o *Cup* do reômetro (30 mm de diâmetro e 80 mm de altura) e a geometria foi abaixada até o *gap* de 4 mm. A tensão foi fixada em 0,1 Pa, frequência em 0,1 Hz e a leitura do parâmetro G' realizada em intervalos de 20 minutos durante 6 horas de fermentação a 43 °C.

A segunda análise consistiu em avaliar os géis durante a estocagem a 5 °C usando o mesmo reômetro e geometria, porém o *Cup* foi substituído pelo próprio frasco em que o leite fermentado foi armazenado, a fim de manter a estrutura do gel inalterada. Como esta análise conserva a estrutura original do gel (LEE e LUCEY, 2010) é necessário escolher uma tensão para ser fixada dentro da zona de viscoelasticidade linear. Para isto foi realizado uma varredura de tensão (0,01-10 Pa) sob frequência fixa de 1,0 Hz e determinou-se então a tensão dentro da viscoelasticidade linear em 1 Pa. Finalmente, realizou-se uma varredura de frequência (0,01-100 Hz) sob tensão controlada de 1 Pa, os parâmetros

viscoelásticos obtidos foram G' e G'' (CIRON et al., 2011). Para a avaliação dos resultados utilizou-se apenas os valores obtidos antes da quebra do gel e estabeleceram-se os valores segundo as Equações 3.1 e 3.2. Esta análise foi realizada nos dias 1, 14 e 28 sob armazenamento a 5 °C.

$$G' = k' \cdot \omega^{n'} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

$$G'' = k'' \cdot \omega^{n''} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Onde, G' é o módulo de armazenamento (Pa), G'' módulo de dissipação (Pa), K' e K'' índice de consistência ($\text{Pa.s}^{n'}$ e $\text{Pa.s}^{n''}$, respectivamente), ω frequência (Hz), e n' e n'' o índice de comportamento.

3.2.5 Análise estatística

Os processos de produção dos leites fermentados foram realizados em 3 repetições e as análises de cada repetição foram realizadas em triplicata, exceto para a análise reológica durante a fermentação que foi realizada em duplicata. As similaridades e diferenças entre os dados obtidos dos diferentes tratamentos foram observados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de médias de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Statistica[®] 7.0 (Statsoft, EUA).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Cinética de fermentação (pH)

Os resultados de pH durante a fermentação de leite submetido à APD fermentado por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. acidophilus* demonstraram que a cinética de fermentação (Figura 3.1) não é influenciada pela APD ($p > 0,05$), não alterando o tempo final de fermentação. Por esse motivo os resultados foram expressos como a média de todos os tratamentos estudados, bem como seus respectivos desvios padrões, no qual é possível verificar que houveram poucas

Efeito da APD na cinética de fermentação e reologia de leite fermentado

variações entre os tratamentos. O comportamento semelhante em todos os tratamentos pode ser favorável ao produto, pois mudanças drásticas na cinética de fermentação podem alterar o metabolismo da cultura e a produção de compostos de aroma desejáveis (TAMINE, 2006), descaracterizando sensorialmente o produto.

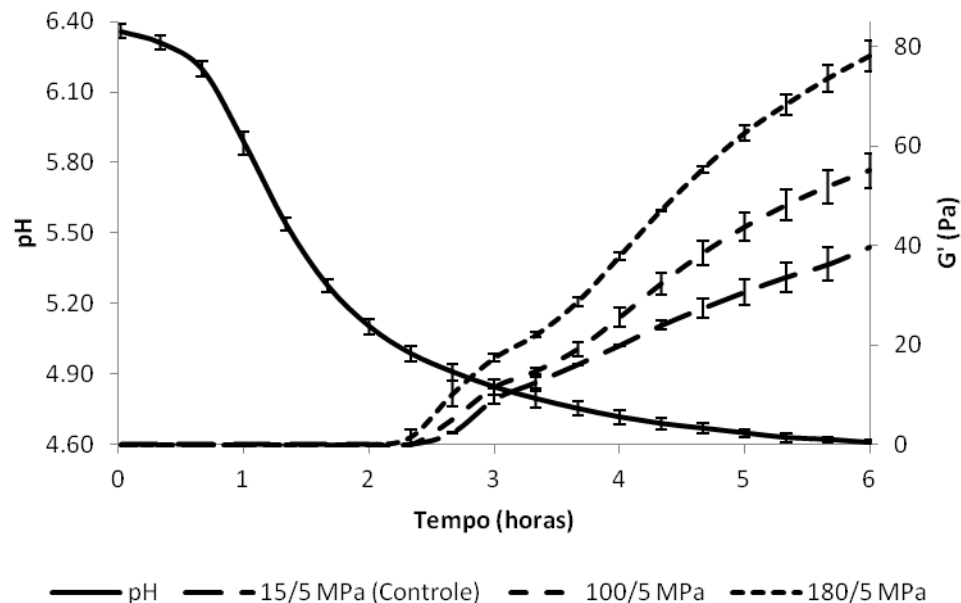


Figura 3.1 Cinética de fermentação com acompanhamento do pH e módulo de armazenamento (G'), sendo o pH expresso como a média de todos os tratamentos (valores médios, $n=3$ para o pH e $n=2$ para a análise reológica).

Durante a fermentação, a redução do pH entre 6,6 e 6,0 leva a redução da carga negativa das micelas de caseína, resultando em diminuição da repulsão eletrostática, iniciando a desestabilização das micelas. A contínua redução do pH de 6,0 para 5,0, reduz ainda mais a carga negativa da caseína ocasionando maior aproximação das micelas para a formação do gel. Além disso, inicia-se a solubilização do fosfato de cálcio coloidal (FCC), o que enfraquece a estrutura interna das micelas. Quando atinge o pH 5,0 ocorre completa solubilização do FCC, desestabilizando a micela e contribuindo para o início da formação do gel (ver Figura 3.1 início do aumento de G') (LUCEY, 2004). Em valores de pH inferiores a 5,0

ocorre maior aproximação das micelas de caseína. No final da fermentação (pH 4,6 ponto isoelétrico) a rede tridimensional é estabilizada pelas interações entre caseína-caseína, hidrofobicidade e forças eletrostáticas (LUCEY e LEE, 2010).

Observa-se ainda, que a cultura possui uma adaptação inicial de aproximadamente 1 hora, e que após essa etapa atinge a velocidade máxima de acidificação (pH entre 6,15 e 5,2). No entanto, quando o leite atingiu pH 5,2, com aproximadamente 2 horas de fermentação, ocorreu uma redução na velocidade de acidificação do leite, que pode ser justificado pela redução na atividade metabólica do *S. thermophilus* quando o leite atinge pH inferior a 5,2 (PEARCE e FLINT, 2002).

Em estudo realizado por Serra et al. (2007), houve diferença na cinética de fermentação de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), feito com leite (3,5 % de gordura), submetido ao tratamento térmico (90 °C/20s) e comparado com amostras processadas por APD (100 MPa, 200 MPa e 300 MPa). Entretanto, não foi possível observar um comportamento claro na redução do pH entre os tratamentos, pois foi utilizado leite cru para as amostras processadas à APD e comparados com leite tratado termicamente (90 °C/20s). Dessa forma, segundo o autor, o processo de APD não inativou de forma eficiente os micro-organismos presentes no leite cru, interferindo nos resultados obtidos durante a etapa de fermentação das culturas de iogurte.

3.3.2 Análise reológica

Os ensaios reológicos de viscoelasticidade sob-baixas deformações priorizam a avaliação estrutural da amostra, por isso não destroem o gel, permitindo avaliar as interações que ocorrem entre as proteínas e gordura durante a formação do gel ou no gel pós-fermentação (LEE e LUCEY, 2010).

Os resultados do comportamento reológico durante a fermentação (Figura 3.1) estão expressos como valores de G' (Pa), e indicam o comportamento sólido do material, ou seja, quanto maior os valores de G' maior a consistência do produto (LUCEY et al., 2000; LUCEY et al., 2001). Desta forma, evidencia-se que quando o leite atinge pH 5,0 o equipamento começa a detectar os valores de G' , indicando

início da formação do gel. Além disso, pode-se observar que o valor máximo de G' atingido pelo controle (40 Pa) demorou aproximadamente 6 horas, enquanto que a amostra 100/5 MPa atingiu o mesmo valor em aproximadamente 4 horas e 30 minutos e a amostra 180/5 MPa em apenas 4 horas, demonstrando correlação positiva entre o aumento nos valores de G' quanto maior a pressão aplicada no leite.

Os resultados gerados durante a análise de viscoelasticidade do gel pós-fermentação estão exemplificados na Figura 3.2 e demonstram que a zona linear encontra-se anterior as oscilações de 10 Hz, acima desse valor ocorre quebra da estrutura inicial do gel, e conseqüentemente aumento do desvio padrão. Por esse motivo, são utilizados nos cálculos apenas os valores referentes à zona linear.

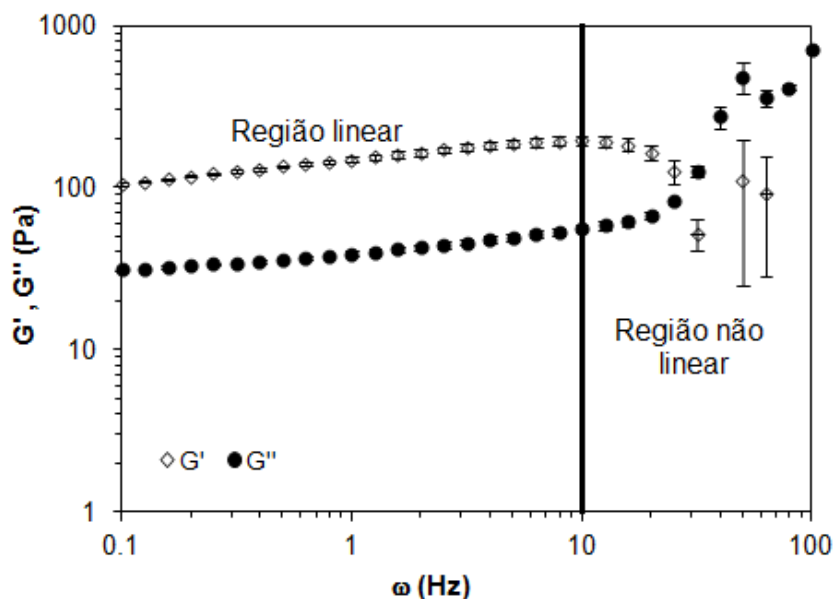


Figura 3.2. Média \pm desvio padrão ($N=3$) dos valores dos ensaios oscilatórios do leite fermentado probiótico feito com leite submetido à APD (180/5 MPa).

Os resultados dos ensaios reológicos de viscoelasticidade do gel pós-fermentação estão dispostos na Figura 3.4a e 3.4b, onde o parâmetro K' representa a componente elástica, e correlaciona os valores com as interações entre proteína-

proteína ou proteína-gordura, no qual o maior número de interações oferecem maior resistência mecânica. A componente viscosa é representada pelo parâmetro K'' e correlaciona os dados a movimentação do soro pela estrutura proteica, ou seja, quando mais densa a rede tridimensional maior a dificuldade de difusão do soro, isto é, maior a força de arraste durante o fluxo e, conseqüentemente, maiores valores de K'' . Dessa forma, pode-se observar que todas as amostras apresentaram os parâmetros de K' maiores em relação ao K'' , demonstrando comportamento mais elástico (sólido), característico do gel de leite fermentado.

No primeiro dia de estocagem as amostras submetidas a 180/5 MPa e 150/5 MPa apresentaram aumento significativo no parâmetro K' em relação ao controle (15/5 MPa), com aumento médio de 15% para a amostra 180/5 MPa e 12,77 % para a amostra 150/5 MPa em relação ao controle. A componente viscosa (K'') (Figura 3.4b) também apresentou correlação positiva com o aumento da pressão, porém com menor intensidade, uma vez que as alterações estruturais causadas no gel de leite fermentado são melhores representadas pelo parâmetro K' . A relação entre o aumento da pressão e o aumento da consistência do leite fermentado é visível, e estão demonstradas na Figura 3.3.

Para os demais dias (14° e 28° dia) as amostras mantiveram correlação positiva dos parâmetros K' e K'' com o aumento da pressão. Além disso, as amostras apresentaram um aumento nos valores de K' e K'' em relação ao primeiro dia, justificado pela acomodação da estrutura proteica (SERRA et al., 2009a), e pelo abaixamento do pH de 4,6 para 4,3 (dados mostrados no capítulo 4). Desta forma, pode-se verificar que a maior interação entre as proteínas conferida pela APD favorece a maior acomodação estrutural do gel, uma vez que os valores de K' do 1° até 28° dia aumentaram 22,5 % para o controle e 26,88% para a amostra 180/5 MPa.

Os parâmetros n' e n'' indicam o índice de comportamento do produto (Equação 3.1 e 3.2), ou seja, alterações nesses valores indicam modificações no tipo das forças intermoleculares envolvidas na estabilização do gel de leite fermentado, sendo que se o n' e n'' apresentarem valores maiores indicam que a modificação estrutural causou ligações mais fortes entre as partículas e menores valores

interações mais fracas. Desta forma, observa-se que à APD aplicada no leite (Figura 3.4b) não influenciou os valores de n' e n'' ($p > 0,05$), indicando que apesar das alterações causadas no gel e consequente aumento nos valores de K' e K'' , essas mudanças não foram drásticas o suficiente para modificar as forças envolvidas na estabilização da estrutura proteica.



Figura 3.3 Imagem ilustrativa de leite fermentado probiótico feito com leite processado por alta pressão dinâmica, no qual os géis (1º dia) foram batidos com auxílio de uma espátula com 20 voltas no sentido horário e 20 anti-horário e colocados para escorrer em uma superfície lisa com inclinação de 45° por 10 segundos.

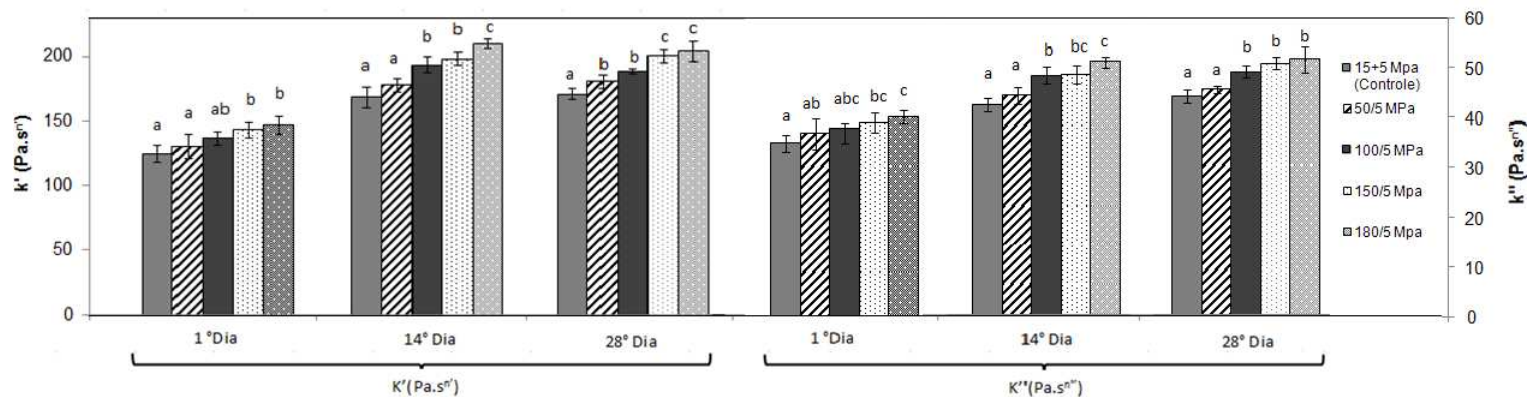
O aumento na consistência do leite fermentado quando utilizado leite processado por APD, é relatado por outros autores (CIRON et al., 2011; SERRA et al., 2009a; SERRA et al., 2007) e está relacionado principalmente com o tipo de interações entre as partículas responsáveis pela formação do gel. Durante o tratamento térmico do leite ocorre a precipitação de β -lactoglobulina (β -lg) sobre a κ -

caseína por ligações dissulfeto, impedindo a proximidade excessiva destas moléculas no ponto isoelétrico (pH 4,6), contribuindo para o aumento do K' e K'' (TAMINE, 2006). Entretanto, a APD aplicada após o tratamento térmico causa: (a) parcial dissociação da interação entre β -lg e κ -caseína, o que reduziria a consistência do produto (SANDRA e DALGLEISH, 2005), porém esta redução não é observada pois, concomitantemente, ocorre (b) fragmentação da micela e aumento da superfície total, propiciando maior número de interações entre proteínas e (c) solubilização do fosfato de cálcio coloidal. Esses fatores associados (b e c) favorecem a desestabilização das micelas e conseqüentemente maiores associações entre caseína-caseína por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (ROACH e HARTE, 2008; SERRA et al., 2009a; CIRON et al., 2010). Dessa forma, o comportamento mais consistente das amostras não depende somente da magnitude das forças, mas também da quantidade de interações entre as proteínas (SERRA et al., 2009a).

Outro fator de fundamental importância que promove a consistência do leite fermentado é a redução dos glóbulos de gordura submetidos à APD, que aumenta a superfície total das partículas favorecendo interações com as proteínas (proteína-gordura), que participam de forma mais efetiva da estrutura do gel (CIRON et al., 2010; ZAMORA et al., 2012). Os glóbulos de gordura atuam também como enchimentos inertes quando não interagem com as partículas de proteínas, ou seja, ocorre formação de *clusters* de glóbulo de gordura cruzados por proteínas de soro de leite desnaturadas, que associados com a rede base de caseína, aumentam a extensão do *cross-linking* e área de contato, aumentando a firmeza (LUCEY, MUNRO, SINGH, 1998). Contudo, essas modificações causadas dependem fundamentalmente da pressão aplicada, temperatura de entrada do fluido no equipamento de APD, composição físico-química do leite e dos constituintes presentes no leite processado (SERRA et al., 2009a; SERRA et al., 2008; SERRA et al., 2007; PATRIGNANI et al., 2007)

Efeito da APD na cinética de fermentação e reologia de leite fermentado

(a)



(b)

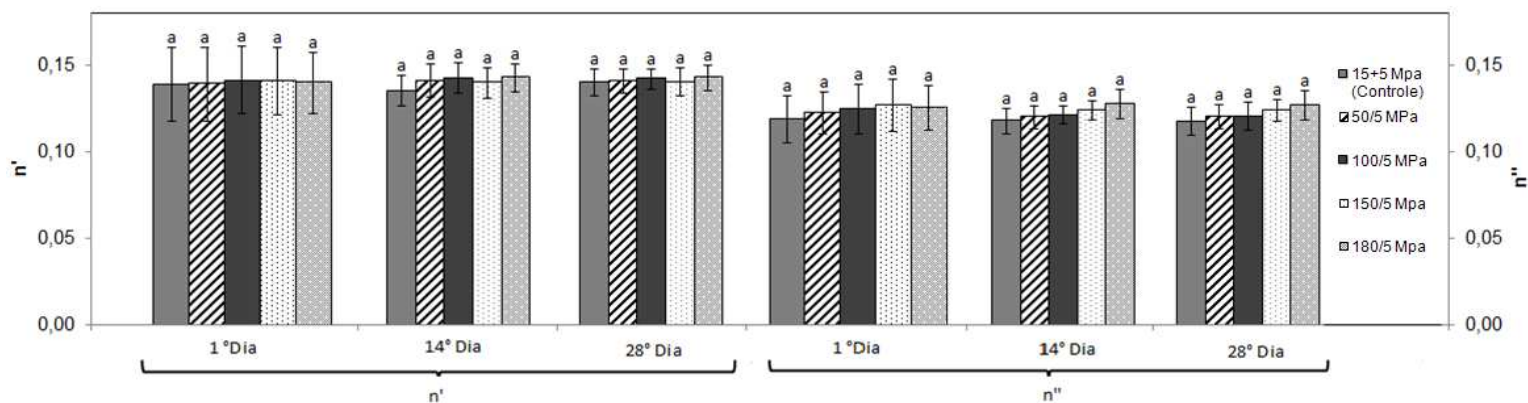


Figura 3.4 Média \pm desvio padrão ($n=3$) das componentes elásticas (K') e viscosa (K'') (a) e índice de comportamento (n' e n'') (b) das amostras controle (15/5 MPa) e submetidas à APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa). Médias com letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p > 0,05$).

Diversas alternativas são utilizadas na indústria e são alvos de pesquisas na promoção da textura de leite fermentado, como adição de leite em pó, caseína em pó, soro em pó, proteínas não lácteas, gomas, estabilizantes e/ou geleificantes, entre outros (TAMINE e ROBINSON, 1999). Contudo os resultados apresentados neste estudo apontam a alta pressão dinâmica como uma potencial tecnologia a ser utilizada em substituição a esses aditivos.

3.4 Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram que a alta pressão dinâmica não altera a cinética de fermentação do leite por *S. thermophilus* em co-cultura com *L. acidophilus*. O processamento do leite por APD contribuiu positivamente para o aumento da consistência do leite fermentado durante a fermentação.

Os testes oscilatórios realizados durante a estocagem demonstraram correlação positiva entre os índices de consistência (K' e K'') dos leites fermentados e a pressão utilizada, sendo que as diferenças entre o controle e as amostras processadas por APD aumentaram durante a estocagem, devido a maior acomodação da estrutura do gel nas amostras processadas por APD. Dessa forma, este trabalho comprova a utilização promissora da tecnologia de APD na promoção da consistência do leite fermentado.

3.5 Referências Bibliográficas

CAMPOS, F.P.; CRISTIANINI, M. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* in orange juice using ultra high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 226-229, 2007.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, A.L. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 314–320, 2010.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, M.A.E. Effect of microfluidization of heat-treated milk on rheology and sensory properties of reduced fat yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1470e1476, 2011.

GRÁCIA-JULIÁ, A.; RENÉ, M.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; PICART, L.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1014-1032, 2008.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 25–33, 2005.

HAYES, M.G. KELLY, A.L. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) Effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 297–305, 2003.

HERNÁNDEZ, A.; HARTE, F.M. Manufacture of Acid Gels from Skim Milk Using High-Pressure Homogenization. **Journal of Dairy Science**. v. 91, p. 3761–3767, 2008.

LEE, W; LUCEY, J.A. Rheological properties, whey separation, and microstructure in set-style yogurt: effects of heating temperature and incubation temperature. **Journal of Texture Studies**, v. 34, p. 515-536, 2003.

LEE, W; LUCEY, J.A. Formation and Physical Properties of Yogurt. **Asian-Australian Journal of Animal Science**. v. 23, N. 9, p. 1127–1136, 2010.

LUCEY, J. A. Formation, structural properties and rheology of acid-coagulated milk gels. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUINEE, T. P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 3 ed. Lodon: Elsevier Academic Press, 2004, p. 105-122.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 660-664, 1998.

LUCEY, J.A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P.A. Effect of heat treatment on the physical properties of milk gels made with both rennet and acid **International Dairy Journal**, v. 11, p. 559–565, 2001.

LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. Rheological properties of milk gels formed by a combination of rennet and glucono-d-lactone. **Journal of Dairy Research**, v. 67, p. 415–427, 2000.

PATRIGNANI, F.; LUCCI, L.; LANCIOTTI, R.; VALLICELLI, M.; MATHARA, J.M.; HOLZAPFEL, W.H. GUERZONI, M.E. Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. **American Dairy Science Association**, v.90, p.4513–4523, 2007.

ROACH, A.; HARTE, F. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.9, p. 1-8, 2008.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1095-1104, 2005.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yoghurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 82–91, 2009a.

SERRA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., FERRAGUT, V. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 100-106, 2009b.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; JARAMILLO, P.D.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Ultra-High Pressure Homogenization-Induced Changes in Skim Milk: Impact on Acid Coagulation Properties. **Journal of Dairy Research**, v.75, p. 69–75, 2008.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 782–790, 2007.

- TAHIRI, I.; MAKHLOUF, J.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International**, v.39, p. 98-105, 2006.
- TAMINE, A. Y. **Fermented Milks**. 1^a ed. Inglaterra: Blackwell Publishing. 2006, 262p.
- TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. 2^a ed. Inglaterra: Woodhead Publishing Ltda. 1999, 619p.
- THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J. P.; CHEFTEL, J. C. High-pressure homogenization of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 427-439, 2003.
- TRIBST, A.A.L.; FRANCHI, M.A.; CRISTIANINI, M. Ultra-high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling *Lactobacillus brevis* contamination in model system. **Innovative Food Science and Emerging Technology**, v 9 (3), p. 265-271, 2008.
- TRIBST, A.A.L., SANT'ANA, A.S., & DE MASSAGUER, P.R. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices – past, present and future perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 310-339, 2009a.
- TRIBST, A.A.L., FRANCHI, M.A., CRISTIANINI, M., & DE MASSAGUER, P.R. Inactivation of *Aspergillus niger* in mango nectar by high-pressure homogenization combined with heat shock. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 9, p. 509-514, 2009b.
- TRIBST, A. A. L.; FRANCHI, M. A.; CRISTIANINI, M. MASSAGUER, P. R. Quality of mango nectar processed by high-pressure homogenization with optimized heat treatment. **Journal of Food Science**, v.76 (2), p.M106-M110, 2011.
- ZAMORA, A.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenization and conventional treatments of milk. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p.135-143, 2012.

**Capítulo 4. Avaliação de leite fermentado probiótico preparado
com leite submetido à alta pressão dinâmica**

Resumo

Alta pressão dinâmica (APD) é um processo não térmico, que comprovadamente altera os constituintes lácteos e influencia na viabilidade de bactérias do ácido láctico. Este trabalho objetivou avaliar a viabilidade do *Streptococcus thermophilus* em co-cultura com *Lactobacillus acidophilus*, pH, atividade proteolítica, sinérese e capacidade de retenção de água (CRA) em leite fermentado, elaborado com leite (2% gordura) submetido à homogeneização convencional (15/5 MPa, tratamento controle) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa). Os resultados demonstraram que a APD não altera a viabilidade do *S. thermophilus* durante 28 dias de estocagem a 5 °C. A cultura probiótica foi pouco afetada pela APD, sendo que a amostra processada a 180/5 MPa apresentou viabilidade ligeiramente mais alta a partir do 14° dia (diferença de 0,26 ciclos log entre o controle e a amostra 180/5 MPa). Do mesmo modo, a redução do pH durante a estocagem foi pouco alterada pela APD, com apenas uma ligeira redução na amostra 180/5 MPa ($p < 0,05$). A atividade proteolítica não foi influenciada pela APD. Os valores de sinérese e CRA foram favorecidos pela APD, sendo que quanto maior a pressão utilizada menor a sinérese do produto (controle apresentou 19,63% e a amostra 180/5 MPa 13,5% de soro removido no 1° dia) e maior a capacidade de retenção de água (CRA) (controle 55,6% e 180/5 MPa 64,75%). Conclui-se que as modificações estruturais causadas no gel pela APD (sinérese e CRA), não modificaram a manutenção das culturas e o pH de forma expressiva, não alterando a atividade proteolítica após 28 dias de estocagem a 5 °C.

Palavras-chave: Homogeneização por alta pressão • sinérese • *Lactobacillus acidophilus* • iogurte.

Abstract

Dynamic high pressure (DHP) is a non-thermal process, which demonstrably alter milk constituents and influences the viability of lactic acid bacteria. However, this study aimed to evaluate the viability of *Streptococcus thermophilus* in co-cultured with *Lactobacillus acidophilus*, pH, proteolytic activity, syneresis and water holding capacity (WHC) in milk fermented, made with milk (2% milkfat) undergone conventional homogenization (15/5 MPa, control) and DHP (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa and 180/5 MPa). The results showed that DHP does not affect the viability of *S. thermophilus* during 28 days of storage at 5 ° C. The probiotic was little affected by DHP, and the sample processed at 180/5 MPa showed viability slightly higher from day 14 (difference of 0.26 cycles log between control and sample 180/5). Likewise, pH was little altered by DHP, with only a slight reduction in the sample 180/5 MPa. The proteolytic activity was not influenced by DHP. The values of syneresis and water-holding capacity (WHC) were favored by DHP and the higher the processing pressure the smaller the syneresis (control 19.63% and 180/5 MPa 13.5% of serum removed on first day) and the higher the WHC (control 55.6% and 180/5 MPa 64.75%). The results highlighted that the structural changes caused in the gel by DHP (syneresis and WHC), do not alter significantly the maintenance of culture viability, nor the pH and proteolytic activity.

Key words: High pressure homogenization • syneresis • *Lactobacillus acidophilus* • yogurt.

4.1 Introdução

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como um promotor de bem estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (PLESSAS et al., 2012). Para o produto se enquadrar como alimento funcional a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve estar entre 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹, devendo ser consumido 10^8 e 10^9 UFC por dose diária de produto (BRASIL, 2008). Dessa forma, a estabilidade da cultura durante o armazenamento dever ser verificada (DAMIN et al., 2008).

As indústrias lácteas são as maiores representantes do mercado de probióticos, que possui como principais produtos o iogurte e o leite fermentado (GRANATO et al., 2010a; GRANATO et al., 2010b). Entretanto, a produção de alimentos de alta qualidade contendo cultura probiótica é um grande desafio para a indústria, devido ao caráter sensível dos micro-organismos nesses bioprodutos (GOMES e MALCATA, 1999). Contudo, a matriz dos alimentos pode alterar significativamente sua viabilidade durante a estocagem, bem como favorecer sua passagem pelo trato gastrointestinal (RANADHEERA et al., 2012), promovendo proteção às culturas probióticas e/ou reduzindo sua exposição a compostos deletérios as células (STANTON et al., 1998; VALERIO et al., 2006).

A alta pressão dinâmica (APD) vem sendo investigada como alternativa promissora na produção de leite fermentado (CRUZ et al., 2010), pois possui a capacidade de alterar a funcionalidade dos constituintes presentes no leite, modificando a matriz estrutural dos géis e favorecendo as características físicas do produto, tais como: consistência do iogurte batido, capacidade de retenção de água, firmeza do gel, redução de sinérese, entre outros fatores (CIRON et al., 2011; PATRIGNANI et al., 2009; GRÁCIA-JULIÁ et al., 2008; PATRIGNANI et al., 2007; SERRA et al., 2007; LANCIOTTI et al., 2004). Além disso, pode alterar a viabilidade das culturas, como por exemplo, a maior contagem de *Streptococcus thermophilus* em detrimento ao *Lactobacillus bulgaricus*, causando redução da pós-acidificação em iogurte (SERRA, et al., 2009b; PATRIGNANI et al., 2009; LANCIOTTI et al., 2004),

ou favorecimento da viabilidade da cultura de *Lactobacillus paracasei* em leite fermentado, quando aplicada a APD em leite com gordura (PATRIGNANI, et al., 2007).

Com base no exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a manutenção da viabilidade de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus acidophilus*, redução do pH, atividade proteolítica, sinérese espontânea e capacidade de retenção de água durante a estocagem refrigerada de leite fermentado probiótico feito com leite submetido à alta pressão dinâmica.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Preparo da cultura

Foram utilizadas culturas liofilizadas comerciais de *Streptococcus thermophilus* TA-40 (Danisco, São Paulo, Brasil) e *Lactobacillus acidophilus* NFCM[®] (Danisco, São Paulo, Brasil). As culturas DVS (*Direct Vat Set*) foram diluídas separadamente em leite desnatado reconstituído (10 % p/v) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) esterilizado (115 °C/10 minutos). Posteriormente, os inóculos de *S. thermophilus* (10^{11} UFC.mL⁻¹) e de *L. acidophilus* (10^{10} UFC.mL⁻¹) foram fracionados separadamente em tubos de *ependorff* (1 mL), e congelados a -20 °C até o momento do uso. Desta forma, cada 1 mL de inóculo adicionado em 1 L de leite apresentou contagem de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ de *S. thermophilus* e 10^7 UFC.mL⁻¹ de *L. acidophilus*. Este procedimento foi realizado a fim de obter inóculos com a mesma concentração de micro-organismos.

No momento da utilização da cultura de *L. acidophilus* para a fermentação do leite a mesma foi descongelada e pré-ativada na proporção de 5% (v/v) em 20 mL leite desnatado reconstituído (10% p/v) (Tangará Foods, Espírito Santo, Brasil) previamente esterilizado a 115 °C/10 minutos e suplementado com 2% p/v de glicose (GOMES e MALCATA, 1999), e então incubado a 37 °C por 16 horas, a fim de

aumentar sua concentração. O inóculo de *S. thermophilus* não foi submetido ao procedimento de pré-ativação.

Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar seguindo procedimentos assépticos.

4.2.2 Tratamento do leite e produção do leite fermentado

Para a realização do experimento utilizou-se leite UHT (2,0% de gordura; 3,0% de proteína; e 10,2% de sólidos totais) (Shefa, São Paulo, Brasil), tratado termicamente a 90°C/5 minutos em banho-maria (autoclave modelo AV-30 Phenix, São Paulo, Brasil), e então resfriado para 60 °C e submetido ao processo de alta pressão dinâmica utilizando Panda Plus (GEA-Niro-Soavi, Parma, Itália). Para todos os tratamentos foram utilizado dois estágios, sendo o tratamento controle processado à 15/5 MPa (homogeneização convencionalmente aplicada na indústria de laticínios), e os demais tratamentos submetidos à alta pressão dinâmica utilizando 50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa. Na saída do equipamento de APD foi acoplada uma serpentina de inox (305 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro), imersa em banho de gelo (5 °C), que reduziu a temperatura do leite para aproximadamente 10 °C e foram coletados 2 L de leite para cada tratamento. Após 20 minutos as amostras foram aquecidas em banho-maria (FANEM[®] MOD.116, São Paulo, Brasil) até 43 °C e adicionadas as culturas de *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, previamente preparadas segundo **item 4.2.1**, a fim de obter concentrações de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ e $7,5 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, respectivamente. Cada tratamento foi fracionado em seus respectivos potes de vidro estéreis (121 °C/15 minutos) com capacidade para 150 mL. A etapa de fermentação das amostras foi realizada em B.O.D. a 43 °C e monitorada utilizando um potenciômetro (BEL Engineering W3B, Itália) até atingir pH 4,6, e então resfriadas para 5 °C e armazenadas a esta temperatura até o momento das análises.

4.2.3 Enumeração das culturas

As contagens das culturas foram verificadas diluindo 25 mL do leite fermentado em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% p/v (diluição 10^{-1}) e as posteriores dissoluções foram realizadas transferindo 1 mL da diluição anterior para tubos contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% p/v. As contagens foram realizadas em profundidade utilizando meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS) (HIMEDIA, Mumbai, Índia) para cultura de *Lactobacillus acidophilus* e incubado em aerobiose a 37°C por 72 horas (LIMA et al., 2009), e meio de cultura M17 Agar (OXOID, Basingstoke, Inglaterra) para cultura de *Streptococcus thermophilus* e incubado em aerobiose a 37 °C por 48 horas (RYBKA e KAILASAPATHY, 1996).

As análises foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28.

4.2.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH do leite fermentado foi determinado utilizando potenciômetro (BEL Engineering W3B, Itália), com duas casas de precisão (MARSHALL, 1993). As amostras foram analisadas durante a vida de prateleira nos tempos 1, 14 e 28 dias.

4.2.5 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada através da mensuração dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas determinada por o-fitaldialdeído (OPA) por leitura em espectrofotômetro conforme proposto por Church et al. (1983) adaptado por Muramalla e Aryana (2011). A solução OPA foi preparada em um balão volumétrico de 50 mL adicionando 0,9 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (tetraborato de sódio) (Nuclear[®], São Paulo, Brasil), 0,5 g de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma[®], EUA) e aproximadamente 35 mL de água deionizada e submetida à solubilização em banho de ultrassom (UNIQUE[®] T740, São Paulo, Brasil) por 30 minutos. Em paralelo foi pesado em um béquer 40 mg de ortofitaldialdeído (Sigma-Aldrich[®], EUA) e posteriormente diluído em 1 mL de metanol (Synth[®], São Paulo, Brasil),

homogeneizado e transferido para o balão contendo o SDS e o $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$. Foi adicionado em seguida 100 μL de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich[®], EUA) e o volume completado para 50 mL com água destilada.

Uma porção de 2,5 g do leite fermentado foi misturada a 1 mL de água destilada e posteriormente a 5 mL de ácido tricloroacético 0,75 N (Synth[®], São Paulo, Brasil). A mistura foi mantida em repouso por 10 minutos e filtrada através de um filtro de papel Whatman n° 2. Em seguida, 150 μL do filtrado foi misturado com 3 mL de reagente OPA, mantido em repouso por 2 minutos e submetido à leitura em estrofotômetro a 340 nm (Beckman Coulter[®] DU 800, EUA). Para a calibração (branco) foi preparada uma solução com 3 mL de reagente OPA adicionado de 150 μL de ácido tricloroacético 0,75 N. Os resultados foram expressos como absorvância a 340 nm. As análises foram realizadas durante o armazenamento a 5 °C nos dias 1, 14 e 28.

4.2.6 Sinérese espontânea e capacidade de retenção de água (CRA)

O nível espontâneo de separação do soro foi realizado conforme Amatayakul et al. (2006). Após a fermentação a embalagem com o leite fermentado firme foi pesada e posteriormente mantida em repouso sob ângulo de 45° durante 2 horas a temperatura de 5 °C. Em seguida pesou-se o soro excedido vertendo-o em um Becker (50 mL). A sinérese foi expressa como a porcentagem de soro removido da embalagem, conforme a Equação 4.1.

$$\% \text{ de sinérese} = \frac{S_o}{P_{ae} - P_e} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

Onde, S_o é o peso de soro separado da amostra, P_{ae} peso da amostra na embalagem (antes da remoção do soro) e P_e peso da embalagem vazia. A análise foi realizada em triplicata nos dias 1, 14 e 28.

A capacidade de retenção de água foi avaliada baseada na metodologia utilizada por Serra et al. (2009a) com algumas modificações. Tubos de centrífuga com capacidade de 50 mL foram preenchidos com aproximadamente 40 g de leite inoculado e incubados a 43°C até atingir pH de 4,6. As amostras foram resfriadas até 5 °C e mantidos nesta temperatura por 24 horas. Posteriormente, os tubos foram pesados e centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 5 °C (Centrífuga Excelsa II 206 BL, Fanem). Em seguida pesou-se o soro excedido vertendo-o em um Becker (50 mL). A capacidade de retenção de água foi expressa segundo a equação 4.2.

$$\% \text{ de CRA} = \frac{(P_{at} - P_t) - S_o}{(P_{at} - P_t)} \times 100 \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Onde, P_{at} é o peso da amostra no tubo (antes da centrifugação), P_t peso do tubo de centrífuga vazio e S_o peso de soro separado da amostra. A análise foi realizada nas amostras estocadas a 5 °C após 24 horas de fermentação.

4.2.7 Análise estatística

Os processos de produção dos leites fermentados foram realizados em 3 repetições e as análises de cada repetição foram realizadas em triplicata, exceto a análise de enumeração da cultura que foi realizada em duplicata. As similaridades e diferenças entre os dados obtidos dos diferentes tratamentos foram observados por Análise de Variância (ANOVA) e o teste de médias de Tukey a 5% de significância, utilizando o programa Statistica[®] 7.0 (Statsoft, EUA).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Enumeração das culturas

A legislação brasileira estipula que para o produto ser denominado leite fermentado este deve conter uma contagem mínima de 10^6 UFC.mL⁻¹ da cultura utilizada (BRASIL, 2007). Além disso, leites fermentados contendo cultura probiótica são benéficos à saúde humana (MOHAMMADI et al., 2012), contudo para exercer

sua funcionalidade a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC por dose diária de produto consumido. Dessa forma, a viabilidade da cultura durante o armazenamento deve ser verificada (DAMIN et al., 2008).

As contagens das culturas estão demonstradas nas Figuras 4.1 e 4.2, confirmando que todos os tratamentos se enquadram dentro dos padrões estipulados pela legislação brasileira, podendo ser designados como leite fermentado probiótico.

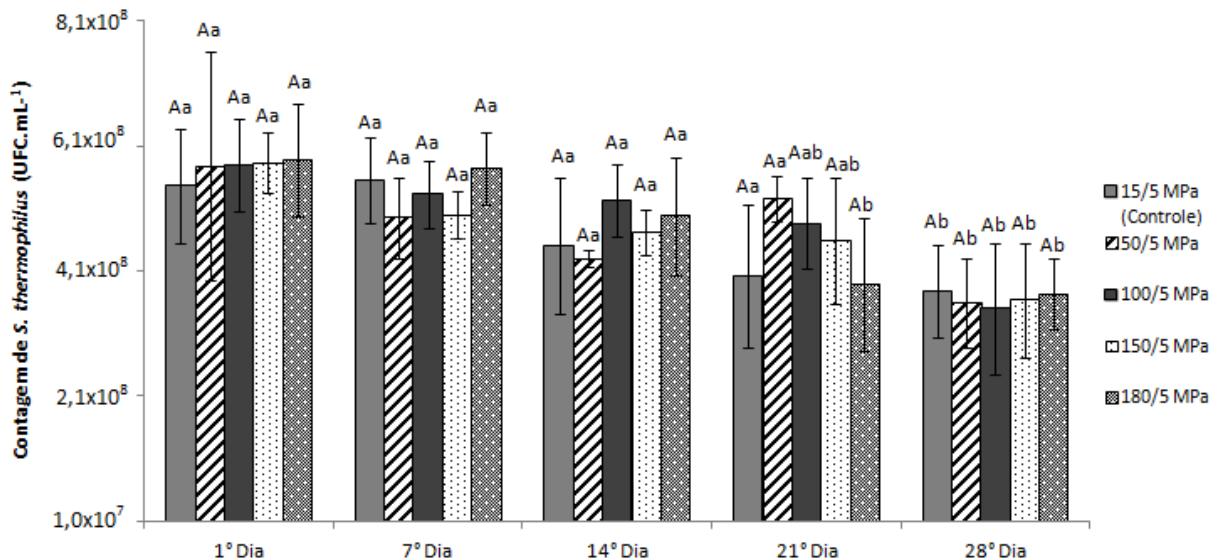
Na Figura 4.1 pode-se observar que o tratamento do leite por APD não influenciou a viabilidade do *S. thermophilus* entre os tratamentos para cada dia analisado ($p>0,05$). Durante a estocagem a 5°C verificou-se uma ligeira redução na contagem da cultura do primeiro para o último dia (28° dia), com valores de redução de 0,16; 0,21; 0,22; 0,21 e 0,20 ciclos log para os tratamentos controle (15/5 MPa), e submetidos a 50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa, respectivamente.

Serra et al. (2009b), relataram o mesmo comportamento da cultura de *S. thermophilus*, no qual o tratamento do leite (3,5% de gordura) por APD (200 MPa e 300 MPa) na elaboração de iogurte não afetou a viabilidade da cultura. Patrignani et al., (2009) verificaram que leite desnatado submetido à APD (60 MPa) reduziu 0,7 ciclos log de *S. thermophilus* em iogurte probiótico armazenado por 35 dias a 5°C , enquanto que a amostra elaborada com leite tratado termicamente ($90^{\circ}\text{C}/20$ minutos) reduziu 2 ciclos log. Entretanto, outros estudos demonstram que *S. thermophilus* possui boa estabilidade durante a estocagem refrigerada em leite fermentado feito a partir de leite tratado termicamente contendo *L. acidophilus* (DAMIN et al., 2007; MARAFON et al., 2011; ZACARCHENCO e MASSAGUER-ROIG, 2006).

A viabilidade da cultura probiótica (*L. acidophilus*) não foi alterada em função da pressão utilizada no 1° e no 7° dia de armazenamento (Figura 4.2), mas a partir do 14° até o 28° dia a amostra tratada a 180/5 MPa apresentou uma contagem superior ao tratamento controle (15/5 MPa) ($p<0,05$), não apresentando diferença entre os outros tratamentos ($p>0,05$). No entanto, no 28° dia a amostra processada a 180/5 MPa apresentou também uma média estatisticamente superior ($p=0,034$) na contagem de *L. acidophilus* em relação à amostra 50/5 MPa. Embora, a variação

Efeito da APD na estabilidade de leite fermentado durante a estocagem

tenha sido muito pequena (contagem da amostra 50/5 MPa no 28° dia de $1,29 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ e 180/5 MPa no mesmo dia com $1,77 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹), pode indicar um comportamento diferenciado da cultura quando o leite é submetido à APD.



Letras maiúsculas iguais entre os tratamentos no mesmo dia não diferem entre si ($p > 0,05$)

Letras minúsculas iguais entre os dias no mesmo tratamento não diferem entre si ($p > 0,05$)

Figura 4.1. Contagem de *Streptococcus thermophilus* durante a estocagem (5 °C) em leite fermentado elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) (valores médios, $n=3$).

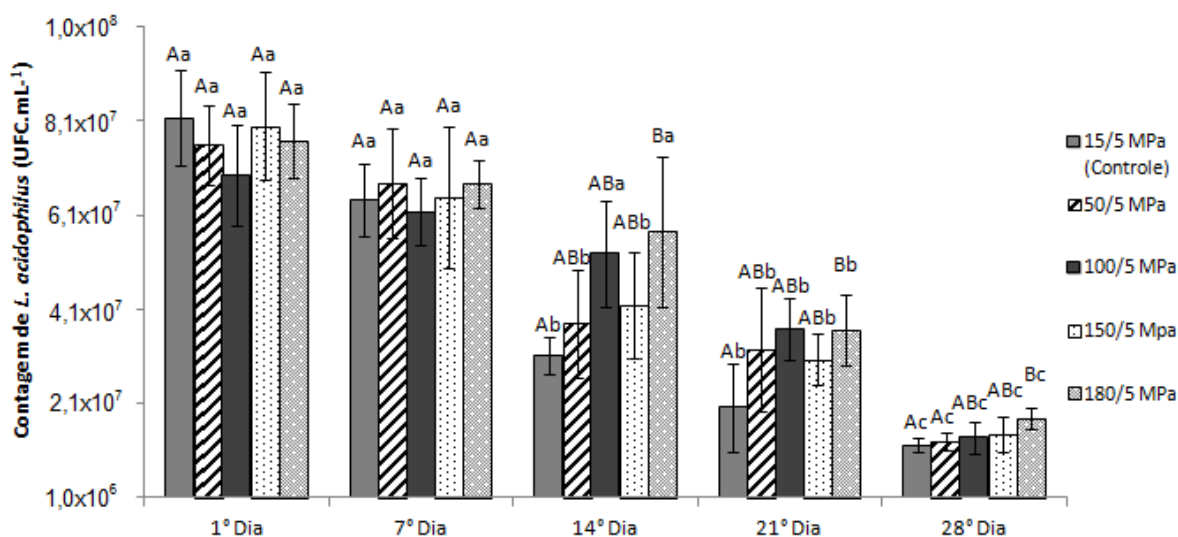
Em estudo realizado por Patrignani et al. (2009), a APD a 60 MPa não alterou a viabilidade da cultura de *L. acidophilus* em iogurte desnatado ($\leq 0,1$ % de gordura) estocado durante 35 dias a 5 °C. Por outro lado, Patrignani et al. (2007), verificaram que a pressão utilizada (20 MPa a 100 MPa) e a quantidade de gordura (0,75 % a 3,0 %) influenciam a viabilidade de *Lactobacillus paracasei*, sendo que quanto maior os valores dessas variáveis melhor a estabilidade da cultura durante a estocagem por 30 dias a 4 °C. Em queijo Crescenza, Burns et al. (2008) não constataram perda na viabilidade de *L. acidophilus* após 12 dias de estocagem quando o leite (4,2 % de gordura) foi processado por APD (100 MPa), enquanto o controle apresentou

redução de 1,17 ciclos log. A maior viabilidade da cultura na amostra submetida à APD foi justificada por Burns et al. (2008) devido a maior concentração de peptídeos de baixo peso molecular e ácidos graxos livres (C18:1), compostos essenciais para o crescimento de algumas espécies de *Lactobacillus* (ENDO et al., 2006; PATENEN, MARTTINEN, ALATOSSAVA, 2001. GOMES, MALCATA e KLAVER, 1998; DAVE e SHAH, 1998). Além disso, Ranadheera, et al. (2012) afirma que alterações causadas na matriz dos alimentos podem favorecer significativamente a viabilidade de culturas probióticas, como por exemplo, altas quantidades de gordura exercem efeito protetivo para a cultura em queijo (STANTON et al., 1998).

Alguns autores relatam que quando o leite é aquecido para a produção de leite fermentado as proteínas do soro (β -lactoglobulina) precipitam sobre a caseína formando um complexo que pode impedir ou retardar a acessibilidade de proteases às caseínas via repulsão ou impedimento estérico (DATTA et al., 2002; SANDRA e DALGLEISH, 2005). Sendo assim, a APD poderia atuar modificando a conformação da proteína, expondo novos sítios de substrato e aumentando sua suscetibilidade à ação de proteases (BOUAOUINA et al., 2006; GARCÍA-RISCO et al., 2002; GOMES e MALCATA, 1999), o que pode favorecer a viabilidade de culturas pouco proteolíticas.

Os resultados apresentados neste estudo e por Patrignanni et al. (2007), demonstraram que a alteração estrutural do gel formado quando o leite é submetido por APD, pode modificar a manutenção de culturas probióticas em leite fermentado durante a estocagem. Contudo, variações no teor de gordura, tratamento térmico, pressões aplicadas, culturas utilizadas e a atividade metabólica da cultura durante a fermentação devem ser avaliados, bem como durante a estocagem refrigerada e na sobrevivência das culturas probióticas durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Efeito da APD na estabilidade de leite fermentado durante a estocagem



Letras maiúsculas iguais entre os tratamentos no mesmo dia não diferem entre si ($p>0,05$)
Letras minúsculas iguais entre os dias no mesmo tratamento não diferem entre si ($p>0,05$)

Figura 4.2. Contagem de *Lactobacillus acidophilus* durante a estocagem (5 °C) em leite fermentado elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) (valores médios, $n=3$).

4.3.2 Potencial hidrogeniônico (pH)

O acúmulo de ácido láctico, oriundo do metabolismo remanescente das culturas durante a estocagem pode gerar defeitos nos produtos como a sinérese e redução da contagem de células viáveis, especialmente as culturas probióticas (DAVE e SHAH, 1997; GARDINI et al., 1999). Dessa forma, a redução do pH deve ser verificada durante a estocagem refrigerada de leite fermentado probiótico.

Os resultados de pH estão apresentados na Tabela 4.1 no qual se pode observar que os tratamentos não apresentaram diferença entre si nos dias avaliados ($p>0,05$), desta forma a APD aplicada no leite não afetam o pH dos leites fermentados durante a estocagem. Exceto no 28º dia, no qual o processamento a

180/5 MPa apresentou uma pequena redução do pH comparado com os outros tratamentos ($p < 0,05$), que pode ser atribuída à viabilidade ligeiramente mais alta de *L. acidophilus* (Figura 4.2).

Resultados encontrados por Zacarchenco e Massaguer-Roig (2006) em leite fermentado por *S. thermophilus* e *L. acidophilus* apresentaram redução de pH semelhante ao presente trabalho durante a estocagem por 21 dias, com valores de 4,62 no 1º dia e 4,22 no último dia.

Tabela 4.1. Média \pm desvio padrão ($n=3$) do pH de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5°C.

	Controle (15/5 MPa)	50/5 MPa	100/5 MPa	150/5 MPa	180/5 MPa
Dia 1	4,57 \pm 0,01 ^{Aa}	4,58 \pm 0,01 ^{Aa}	4,59 \pm 0,01 ^{Aa}	4,58 \pm 0,01 ^{Aa}	4,59 \pm 0,01 ^{Aa}
Dia 14	4,29 \pm 0,01 ^{Ab}	4,27 \pm 0,02 ^{Ab}	4,27 \pm 0,02 ^{Ab}	4,28 \pm 0,01 ^{Ab}	4,26 \pm 0,01 ^{Ab}
Dia 28	4,24 \pm 0,01 ^{Ac}	4,23 \pm 0,01 ^{Ac}	4,23 \pm 0,01 ^{Ac}	4,24 \pm 0,01 ^{Ac}	4,21 \pm 0,01 ^{Bc}

Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si ($p > 0,05$)

Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si ($p > 0,05$)

A acidificação durante a estocagem ocorre devido à atividade metabólica das culturas, denominada pós-acidificação (BEAL et al., 1999). Na literatura podem ser encontrados alguns trabalhos que apontam a APD como tecnologia promissora na redução da pós-acidificação, quando utilizado culturas de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (LANCIOTTI et al., 2004; SERRA et al., 2009b). Este efeito é justificado pela perda de viabilidade da cultura de *L. bulgaricus* (SERRA et al., 2009b; PATRIGNANI et al., 2009), principal micro-organismo responsável pela produção de ácido láctico durante a estocagem (BEAL et al., 1999). Esta redução é justificada pelo acúmulo de piruvato em concentrações tóxicas a bactéria (SERRA et al., 2009b), ou pela maior quantidade de peptídeos

liberados em iogurte processados por APD, estimulando o crescimento de *S. thermophilus* em relação ao *L. bulgaricus* (LANCIOTTI et al., 2004).

4.3.3 Atividade proteolítica

O ensaio espectrofotométrico baseado no método OPA detecta grupos α -amino livres, liberados das proteínas lácteas após atividade enzimática, expressando dessa forma, a atividade proteolítica das culturas (CHURCH et al., 1983).

A atividade proteolítica (expressa em absorbância a 340 nm) do leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à APD está demonstrada na Tabela 4.2. Verificou-se que os leites fermentados não apresentaram diferença na atividade proteolítica nos dias avaliados ($p > 0,05$), desta forma a pressão aplicada ao leite não influenciou a atividade proteolítica das culturas. Foi observado apenas um ligeiro aumento durante o armazenamento ($p < 0,05$) em todos os tratamentos, que está diretamente relacionado à baixa atividade proteolítica de algumas estirpes de *S. thermophilus* (PEARCE e FLINT, 2002) e *L. acidophilus* (BANINA et al., 1998; Capítulo 2 desta dissertação).

Estes resultados corroboram com estudo realizado por Serra et al., (2009c) em iogurte (3,5 % de gordura), no qual a APD (200 MPa e 300 MPa) não influenciou a atividade proteolítica das culturas utilizadas.

Segundo García-risco et al. (2002), o teor de gordura presente no leite influencia a susceptibilidade das proteínas a ação proteolítica, sendo que em leite integral a APD reduz a proteólise, mas em leite desnatado a APD favorece a atividade proteolítica, principalmente quando realizado após o tratamento térmico. O efeito observado no leite desnatado ocorre, pois a APD modifica a estrutura da micela de caseína, principalmente na região periférica próxima a κ -caseína (SERRA et al., 2009a), ocasionando redução parcial da micela (SANDRA e DALGLEISH, 2005; ROACH e HARTE, 2008), e conseqüentemente, aumentando o nível de fragmentos caseicos na fração solúvel (SANDRA e DALGLEISH, 2005; SERRA et al., 2008) e a susceptibilidade da micela de caseína a degradação proteolítica (KHEADR et al.,

2002). Porém, no presente estudo a presença de gordura no leite submetido à APD pode reduzir os glóbulos a tamanhos tão pequenos que são adsorvidos na superfície das proteínas, podendo reduzir a susceptibilidade da proteína a atividade enzimática (GARCÍA-RISCO et al., 2002; PAREDA et al., 2009; CIRON et al., 2010; ZAMORA et al., 2012).

Tabela 4.2. Média ± desvio padrão (n=3) da atividade proteolítica, expressa em absorbância a 340 nm, de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5 MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5 °C.

	Controle (15/5 MPa)	50/5 MPa	100/5 MPa	150/5 MPa	180/5 MPa
Dia 1	0,446±0,02 ^{Aa}	0,446±0,03 ^{Aa}	0,453±0,01 ^{Aa}	0,456±0,01 ^{Aa}	0,443±0,01 ^{Aa}
Dia 14	0,467±0,01 ^{Aab}	0,461±0,01 ^{Aab}	0,456±0,01 ^{Aa}	0,451±0,02 ^{Aa}	0,480±0,01 ^{Aab}
Dia 28	0,479±0,02 ^{Ab}	0,487±0,01 ^{Ab}	0,489±0,02 ^{Ab}	0,506±0,01 ^{Ab}	0,483±0,03 ^{Ab}

Letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si (p>0,05)

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (p>0,05)

4.3.4 Sinérese espontânea e capacidade de retenção de água (CRA)

Uma das mais importantes características estruturais de leite fermentado tipo firme é a sua propensão a sinérese durante a estocagem (AKALIN et al., 2012). Dessa forma, as análises realizadas neste trabalho tiveram por objetivo quantificar a remoção de soro do gel de leite fermentado probiótico, que está diretamente relacionada com as interações estruturais do gel e sua capacidade em reter o soro. A sinérese espontânea avalia a separação do soro na superfície do gel após manutenção do frasco sob ângulo de 45° e mantidos sob temperatura de 5 °C por 2 horas, e a CRA avalia o nível de soro excedido após o gel ser colapsado por força centrífuga (AMATAYAKUL et al., 2006).

Os resultados expressos nas Figuras 4.3a e 4.3b indicam uma tendência de que a redução da sinérese espontânea e o aumento da CRA apresentam correlação

direta com o aumento da pressão utilizada no processo de APD, ou seja, quanto mais alta a pressão a que o leite foi submetido maior a CRA, e conseqüentemente menor a sinérese do produto. Por definição, sinérese espontânea é o resultado da quebra estrutural do gel seguido de um rearranjo da rede, no qual resulta em expulsão de soro (LEE e LUCEY, 2003). Dessa forma, correlaciona-se as amostras com maior expulsão de soro com uma estrutura mais frágil, com menos interligações proteicas.

Estudo realizado por Serra et al. (2007) e Serra et al. (2009a), concordam com os resultados encontrados no presente estudo. Este fenômeno pode ser explicado pela redução do tamanho das partículas, com conseqüente aumento da área superficial retendo maior quantidade de soro (SANDRA e DALGLEISH, 2005; CIRON et al., 2010; ZAMORA et al., 2012), desintegração parcial das micelas de caseína e solubilização do fosfato de cálcio coloidal, elevando as interações entre caseína-caseína por interações hidrofóbicas e eletrostáticas (SERRA et al., 2007; SERRA et al., 2009a; GUERZONI et al., 1999). Outro fator relevante é a presença de glóbulos de gordura no leite que quando são submetidos à APD reduzem de tamanho (HAYES e KELLY, 2003; HAYES, FOX, KELLY, 2005) propiciando interações favoráveis com as proteínas aumentando a rigidez do gel. Além disso, atuam como enchimentos inertes quando não interagem com as partículas de proteínas, ou seja, ocorre formação de clusters de glóbulo de gordura cruzados por proteínas de soro de leite desnaturadas, que associados com a rede base de caseína, aumentam a extensão do cross-linking e área de contato, aumentando a firmeza do leite fermentado (LUCEY, MUNRO, SINGH, 1998).

Com relação às metodologias utilizadas de sinérese espontânea e CRA pode-se observar que durante a estocagem (1° e 14° dia) não foram constatadas diferenças ($p > 0,05$) na sinérese espontânea entre as amostras processadas a baixas pressões (15/5 MPa, 50/5 MPa e 100/5 MPa), porém no último dia de estocagem (28° dia) as amostras diferiram entre si ($p < 0,05$). Este comportamento pode ser observado devido à reorganização estrutural das proteínas durante a estocagem (SERRA et al., 2009a). Outro fator relevante é que a diferença significativa ($p < 0,05$)

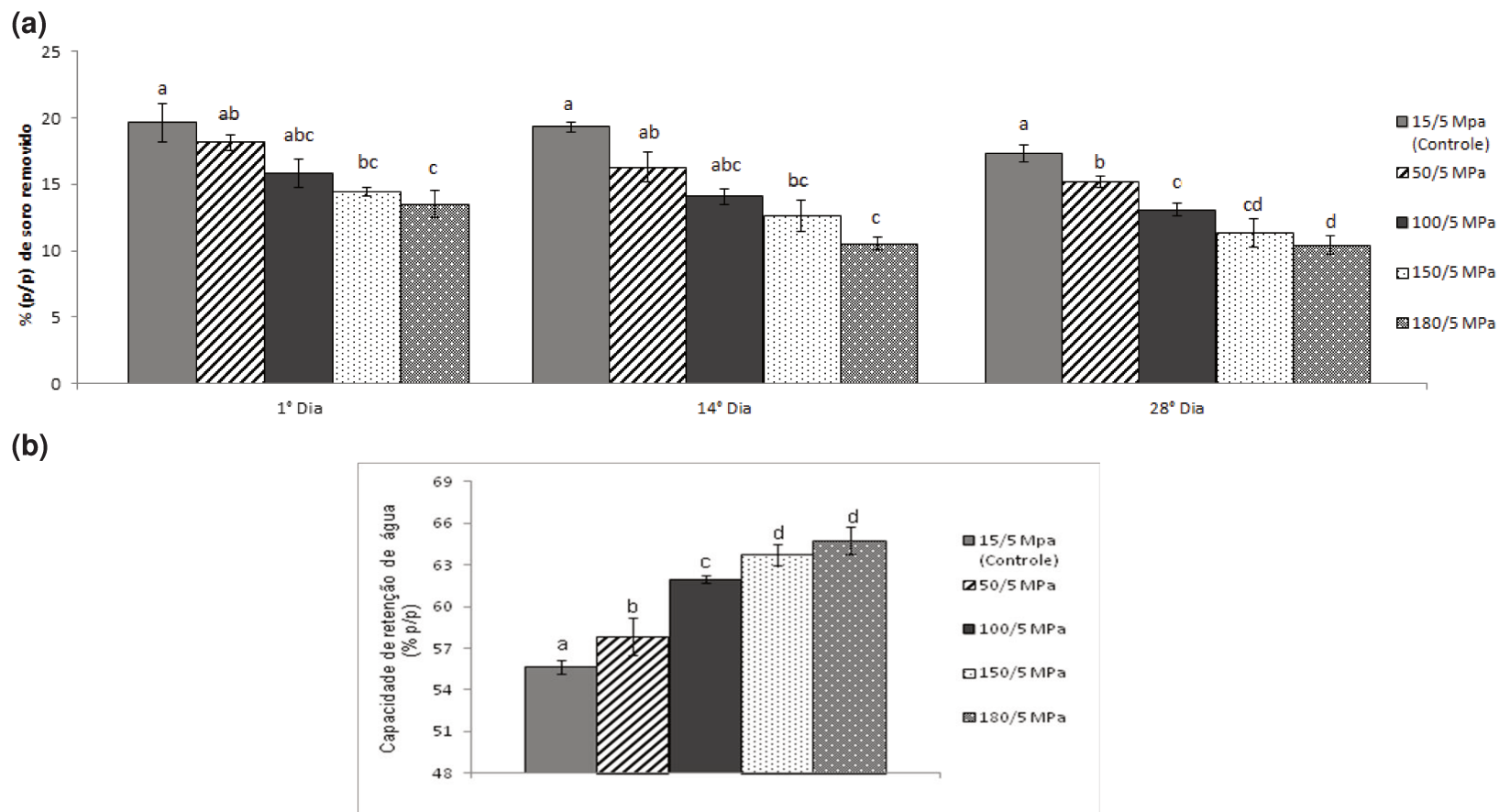


Figura 4.3. Porcentagem de soro removido por sinérese espontânea (a) e capacidade de retenção de água, expressa em porcentagem (% p/p) (b), do gel de leite fermentado probiótico elaborado com leite submetido à homogeneização convencional (controle 15/5 MPa) e a APD (50/5 MPa, 100/5MPa, 150/5 MPa e 180/5 MPa) durante a estocagem a 5 °C. Médias com letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$) (valores médios, $n=3$).

entre os tratamentos de pressões mais baixas (15/5 MPa, 50/5 MPa e 100/5 MPa) observadas na análise de CRA (1° dia) foram observadas pela metodologia de sinérese somente no 28° dia de estocagem. Dessa forma, nota-se que a diferença estatística entre as amostras (15/5 MPa, 50/5 MPa e 100/5 MPa) após a fermentação (1° dia) foi avaliada de forma mais clara quando aplicado à metodologia de CRA quando comparada com a sinérese espontânea. Este comportamento também foi observado por Amatayakul et al. (2006), sendo de fundamental importância escolher a metodologia adequada para se avaliar a expulsão de soro da amostra, destacando que se a metodologia de sinérese for escolhida deve-se proceder à análise durante a estocagem.

4.4 Conclusão

Os resultados demonstraram que a viabilidade do *S. thermophilus* durante a estocagem não foi alterada em leite processado por APD e a cultura de *L. acidophilus* apresentou contagem ligeiramente superior apenas na amostra processada a 180/5 MPa a partir do 14° dia (0,26 ciclos log, $p < 0,05$), o que consequentemente, contribuiu para a maior redução do pH neste tratamento. Porém este estudo corroborou com resultados encontrados na literatura e fortalece a hipótese de que a APD pode alterar a viabilidade de culturas probióticas em leite fermentado, sendo importante, também, avaliar o comportamento de outras culturas probióticas, bem como o sinergismo entre elas.

A APD foi capaz de causar modificações estruturais nos constituintes do leite fermentado que favoreceram a redução da sinérese e aumento da CRA quanto maior as pressões utilizadas na APD. Entretanto, a atividade proteolítica da cultura não foi influenciada pela APD.

4.5 Referências Bibliográficas

AKALIN, A.S.; UNAL, G.; DINKCI, N.; HAYALOGLU, A.A. Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium casein

ate or whey protein concentrate. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p.3617–3628, 2012.

AMATAYAKUL, T.; SHERKAT, F.; SHAH, N. P. Syneresis in set yogurt as affected by EPS starter cultures and levels of solids. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 216-221, 2006.

BANINA, A.; VUKASINOVIC, M.; BRANKOVIC, S.; FIRA, D.; Kojic, M.; TOPISIROVIC, L. Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. **Journal of Applied Microbiology**. V.84, p. 593–599, 1998.

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on Acidification and Viscosity of Stirred Yogurt. **Journal of Dairy Science**. v. 82, p. 673–681, 1998.

BOUAOUINA, H.; DESRUMAUX, A.; LOISEL, C.; LEGRAND, J. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, v.16, p. 275-284, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Atualizado em julho, 2008. Disponível em <[http:// www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 21 de outubro de 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 46 de 23/10/2007. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Disponível em: <[http:// www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em 21 de Outubro de 2012.

BURNS, P.; PATRIGNANI, F.; SERRAZANETTI, D; VINDEROLA, G.C.; REINHEIMER, J.A. LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M.E. Probiotic Crescenza Cheese Containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Manufactured with High-Pressure Homogenized Milk. **American Dairy Science Association**, v. 91, p. 500–512, 2008.

CHURCH, F.C, H. E.; SWAISGOOD, D. H.; PORTER, CATIGNANI, G. L. Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. **Journal Dairy of Scienc.** v. 66, p. 1219-1227, 1983.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, A.L. Comparison of the effects of high-pressure microfluidization and conventional homogenization of milk on particle size, water retention and texture of non-fat and low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 314–320, 2010.

CIRON, C.I.E.; GEE, V.L.; KELLY, A.L.; AUTY, M.A.E. Effect of microfluidization of heat-treated milk on rheology and sensory properties of reduced fat yoghurt. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p.1470e1476, 2011.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I.; BOLINI, H.M.A.; SANT'ANA, A.S.; CRISTIANINI, M. High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. **Trends in Food Science e Technology**, v. 21, p. 483-493, 2010.

DAMIN, M.R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA. M.R.; OLIVEIRA, M.N. Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 40–55, 2008.

DATTA, N.; ELLIOTT, A. J.; PERKINS, M. L.; DEETH, H. C. Ultra-high-temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. **Australian Journal of dairy technology**. v.53, n.3, 2002.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. **Journal Dairy Science**, v. 11, p. 2804-2816, 1998.

ENDO, Y.; S. KAMISADA, K. FUJIMOTO; T. SAITO. *Trans* fatty acids promote the growth of some *Lactobacillus* strains. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, p. 29–35, 2006.

GARCÍA-RISCO, M. R.; RAMOS, M.; LÓPEZ-FANDIÑO, R. Modifications in Milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. **International Dairy Journal**, v.12, p. 679-688, 2002.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, E.M.; TORRIANI, S. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 125–134, 1999.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2817-2825, 1998.

GRÁCIA-JULIÁ, A.; RENÉ, M.; CORTÉS-MUÑOZ, M.; PICART, L.; LÓPEZ-PEDEMONTE, T.; CHEVALIER, D.; DUMAY, E. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-time thermal treatments. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 1014-1032, 2008.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; SHAH, N.P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010a.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 9, p. 292-302, 2010b.

GUERZONI, M.E.; VANNINI, L.; CHAVES-LÓPEZ, C.; LANCIOTTI, R.; SUZZI, G.; GIANOTTI, A. Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 851–862, 1999.

HAYES, M. G.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Potential applications of high pressure homogenization in processing of liquid Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 25–33, 2005.

HAYES, M.G. KELLY, A.L. High pressure homogenization of raw whole bovine milk (a) Effects on fat globule size and other properties. **Journal of Dairy Research**, v. 70, p. 297–305, 2003.

KHEADR, E.E.; VACHON, J.F.; PAQUIN, P.; FLISS, I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 435–446, 2002.

LANCIOTTI, R.; VANNINI, L.; PITTIA, P.; GUERZONI, M.E. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. **Food Microbiology**, v.21, p. 753-760, 2004.

LIMA, K.G.C.; KRUGER, M.F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp bulgaricus and *Streptococcus thermophilus*. **Food Science and Technology**, v.42, p. 491–495, 2009.

LUCEY, J. A.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Rheological Properties and Microstructure of Acid Milk Gels as Affected by Fat Content and Heat Treatment. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 4, p. 660-664, 1998.

MARAFON, A. P.; SUMI, A.; GRANATO, D. ALCÂNTARA, M. R.; TAMIME, A. Y; OLIVEIRA M. N. Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 5330–5340, 2011.

MARSHALL, R.T. Standard Methods for Examination of Dairy Products. Washington: American Public Health Association. 1993.

MOHAMMADI, R.; SOHRABVANDI, S.; MOHAMMAD, A.; MORTAZAVIAN. The starter culture characteristics of probiotic microorganisms in fermented milks. **Enginering Life Science**. v. 12, n 4, p. 399–409, 2012.

- MURAMALLA, T.; ARYANA, K.J. Some low homogenization pressures improve certain probiotic characteristics of yogurt culture bacteria and *Lactobacillus acidophilus* LA-K. **Journal Dairy Science**, v. 94, p.3725–3738, 2011.
- PAREDA, J.; FERRAGUT, V.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Heat damage evaluation in ultra-high pressure homogenized Milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1974–1979, 2009.
- PARTANEN, L., N. MARTTINEN, AND T. ALATOSSAVA. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p.500–506, 2001.
- PATRIGNANI, F.; BURNS, P.; SERRAZANETTI, D.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, E. Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Research**, n. 76, p. 74–82, 2009.
- PATRIGNANI, F.; LUCCI, L.; LANCIOTTI, R.; VALLICELLI, M.; MATHARA, J.M.; HOLZAPFEL, W.H. GUERZONI, M.E. Effect of High-Pressure Homogenization, Nonfat Milk Solids, and Milkfat on the Technological Performance of a Functional Strain for the Production of Probiotic Fermented Milks. **American Dairy Science Association**, v.90, p.4513–4523, 2007.
- PEARCE, L.; FLINT, S. **Streptococcus thermophilus**. ELSEVIER LTD. v. 4, p. 2577–2582, 2002.
- PLESSAS, S.; BOSNEA, L.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. **Engineering Life Science**. v.12, n. 4, p. 433–440, 2012.
- RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619–625, 2012.
- ROACH, A.; HARTE, F. Disruption and sedimentation of casein micelles and casein micelle isolates under high-pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v.9, p. 1-8, 2008.

RYBKA, S.; K. KAILASAPATHY. Media for the enumeration of yoghurt Bacteria. **International of Dairy Journal**. v. 6, p. 839-850, 1996.

SANDRA, S.; DALGLEISH, D. G. Effects of ultra-high-pressure homogenization and heating on structural properties of casein micelles in reconstituted skim milk powder. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1095-1104, 2005.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Evaluation of physical properties during storage of set and stirred yoghurts made from ultra-high pressure homogenization-treated milk. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 82–91, 2009a.

SERRA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., FERRAGUT, V. Flavour profiles and survival of starter cultures of yoghurt produced from high-pressure homogenized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 100-106, 2009b.

SERRA, M., TRUJILLO, A.J., GUAMIS, B., FERRAGUT, V. Proteolysis of yogurts made from ultra-high-pressure homogenized milk during cold storage. **Journal Dairy Science**. v. 92, p. 71–78, 2009c.

SERRA, M.; TRUJILLO, A.J.; QUEVEDO, J.M.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenization. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 782–790, 2007.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P. B.; COLLINS, J. K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p. 491-496, 1998.

VALERIO, F.; DE BELLIS, P.; LONIGRO, S. L.; MORELLI, L.; VISCONTI, A.; LAVERMICOCCA, P. In vitro and in vivo survival and transit tolerance of potentially probiotic strains carried by artichokes in the gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 3042-3045, 2006.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Properties of *streptococcus thermophilus* fermented milk containing variable concentrations of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.338-344, 2006.

ZAMORA, A.; FERRAGUT, V.; GUAMIS, B.; TRUJILLO, A.J. Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenization and conventional treatments of milk. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p.135-143, 2012.

Conclusões Gerais

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a alta pressão dinâmica influencia a cinética de fermentação e a atividade proteolítica das culturas, sendo que quando utilizado maiores concentrações de gordura (3%) e cultura com atividade metabólica lenta (*L. acidophilus*) o tempo de fermentação aumenta e a atividade proteolítica é reduzida. Entretanto, quando utilizado menor concentração de gordura (2%) e cultura com maior atividade metabólica (*S. thermophilus*) a APD não altera a cinética de fermentação e a atividade proteolítica após a fermentação. Desta forma, conclui-se que a atividade metabólica da cultura e a concentração de gordura exercem grande influência na cinética de fermentação quando o leite é submetido à APD na fabricação de leite fermentado.

O comportamento reológico durante a fermentação e a estocagem demonstraram correlação positiva entre os índices de consistência (K' e K'') dos leites fermentados probióticos e a pressão utilizada (até 200 MPa), sendo que as diferenças entre o controle e as amostras processadas por APD aumentam durante a estocagem. Além disso, observou-se que modificação estrutural causada pela APD aumentou a capacidade de retenção de água e reduziu a sinérese espontânea do produto.

A viabilidade das culturas não foram influenciadas pela APD, sendo que apenas a cultura probiótica apresentou uma manutenção ligeiramente maior na pressão de 180/5 MPa a partir do 14º dia, o que conseqüentemente, contribuiu para a redução do pH neste tratamento. A atividade proteolítica da cultura também não foi influenciada pela APD.

Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados desta dissertação apresentaram de forma evidente que a APD (até 200MPa) em leite (2% de gordura) promove aumento da consistência, capacidade de retenção de água e redução da sinérese em leite fermentado probiótico. No entanto, sugere-se para trabalhos futuros a avaliação da influencia da APD aplicada em leite (variados teores de gordura) sobre a cinética de fermentação e a viabilidade de outras culturas probióticas durante a estocagem do produto, bem como sua influência na sobrevivência da cultura durante a passagem pelo tratogastrointestinal. Além disso, é importante avaliar o perfil de ácidos graxos, os peptídeos liberados e os compostos aromáticos durante a estocagem, uma vez que podem impactar na viabilidade da cultura e na aceitação sensorial do produto.