

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CAMILA ALVES MOREIRA

INTERFERÊNCIA DA LACTOSE E DA SACAROSE NO ARMAZENAMENTO
REFRIGERADO DE IOGURTES DE CONSISTÊNCIA FIRME

PATOS DE MINAS

2018

CAMILA ALVES MOREIRA

INTERFERÊNCIA DA LACTOSE E DA SACAROSE NO ARMAZENAMENTO
REFRIGERADO DE IOGURTES DE CONSISTÊNCIA FIRME

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Uberlândia - *Campus* de Patos de Minas
como parte dos requisitos para conclusão do
curso.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Milla Gabriela dos
Santos.

PATOS DE MINAS

2018

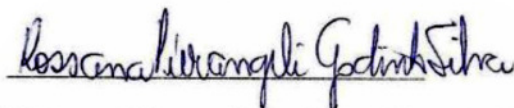
INTERFERÊNCIA DA LACTOSE E DA SACAROSE NO ARMAZENAMENTO
REFRIGERADO DE IOGURTES DE CONSISTÊNCIA FIRME

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Engenharia de
Alimentos da Universidade Federal de
Uberlândia - *Campus* de Patos de Minas
como parte dos requisitos para conclusão do
curso.

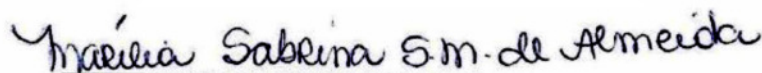
Patos de Minas, 19 de Dezembro de 2018.



Prof.^a Dr.^a Milla Gabriela dos Santos – UFU/MG
Orientadora



Prof.^a Dr.^a Rossana Pierangeli Godinho Silva – UNIPAM/MG
Membro



Esp. Marília Sabrina Soares Miranda de Almeida – Coopatos/MG
Membro

*Dedico este trabalho aos meus amados pais
Célio e Sandra.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, aquele que se fez presente em todos os momentos de dificuldades e também de conquistas, sempre me dando força e saúde para enfrentar os desafios.

Agradeço de forma especial aos meus pais Célio e Sandra, que foram meu apoio durante toda a minha vida e também na graduação, me fortalecendo com amor e me auxiliando de todas as formas possíveis.

Ao meu irmão Renato, que esteve comigo o tempo todo, demonstrando companheirismo e compreensão.

Ao meu namorado Wesley, que com muito amor, me apoiou em todas as minhas escolhas ao longo da graduação, e se fez sempre disponível a me ajudar em qualquer situação, sendo meu grande companheiro nesta jornada.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim e torceram pelo meu sucesso.

À minha grande amiga Isabela, que mesmo não sendo minha colega de curso, sempre me atendeu nos momentos de dúvidas.

Aos meus colegas de curso, pelo companheirismo.

Aos meus professores, pela dedicação e pelo carinho.

À coordenadora dos laboratórios didáticos do curso de Engenharia de Alimentos, Betânia Braz Romão, e técnicos dos laboratórios, pela grande contribuição na realização deste trabalho.

À empresa Coopatos, pela doação de material necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

À Prof.^a Dra. Milla Gabriela dos Santos, por ter me orientado na área da pesquisa, da iniciação científica ao trabalho de conclusão de curso.

À banca examinadora, Marília e Rossana, por aceitarem o convite e contribuírem para o engrandecimento do meu trabalho.

A todos, muito obrigada.

RESUMO

O iogurte é um alimento lácteo fermentado consumido mundialmente e se encontra em grande ascensão no mercado. A variedade de iogurtes encontrada nas gondolas dos supermercados aumenta a cada dia em razão da exigência cada vez maior por parte dos consumidores e visando atender as especificidades de cada grupo. O iogurte Zero Lactose é um exemplo de inovação desenvolvida para atender a um grupo específico de consumidores que apresentam má digestão de lactose. Outra versão criada para atender às necessidades dos consumidores é o iogurte sem adição de açúcar. Com esta grande expansão de iogurtes sem lactose e sem adição de açúcar no mercado, faz-se necessário desenvolver novas pesquisas voltadas para estes produtos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente alterações ocorridas em diferentes formulações de iogurtes em função da presença ou ausência de sacarose e lactose. Foram produzidas 4 formulações de iogurte (com lactose/sem sacarose, com lactose/com sacarose, sem lactose/sem sacarose e sem lactose/com sacarose) das quais foram realizadas análises cromatográficas para acompanhar os perfis de carboidratos, análise de pH e contagem de bactérias ácido-láticas viáveis ao longo de 42 dias. De forma complementar foram realizadas análises de coliformes, bolores e leveduras. Para todas as formulações, os valores de pH reduziram significativamente até o dia 14, aumentaram discretamente a partir do dia 21 e voltaram a cair no dia 35. Nas formulações adoçadas houve redução na concentração de sacarose do dia 1 ao dia 7, porém, não houve diferença significativa. Nas formulações contendo lactose, houve uma redução significativa na concentração deste açúcar ao longo de uma semana. Em relação à concentração de glicose, não houve diferença significativa na formulação sem lactose/com açúcar, já nas formulações com lactose/com açúcar e sem lactose/sem açúcar a concentração diminuiu significativamente. No primeiro dia de análise, a formulação com lactose/sem sacarose apresentava uma concentração de glicose abaixo no nível de detecção, já no dia 7 a concentração foi de $0,87 \pm 0,23$ g/L. Uma maior estabilidade das bactérias ácido-láticas foi observada na formulação com lactose e sem sacarose, na qual as culturas se mantiveram constantes estatisticamente ao longo dos 42 dias de análise. Em todas as formulações as contagens de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* foram superiores às contagens de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Não houve presença de coliformes, bolores e leveduras em nenhuma formulação.

Palavras-chave: Intolerância. Lactose. Hidrólise. Lactase. Iogurte. Carboidratos. Bactérias ácido-láticas. Armazenamento.

ABSTRACT

Yogurt is a fermented dairy food consumed worldwide and it is on the rise in the market. The variety of yogurts found on the shelves of supermarkets increases every day due to the high demand of consumers and aiming to attend the specificities of each group. Lactose-free yogurt is an example of innovation developed to serve a specific group of consumers who have lactose maldigestion. Another version created to meet consumer needs is the yogurt without added sugar. With this large expansion of lactose-free yogurts and no added sugar on the market, it is necessary to develop new research focused on these products. Therefore, the objective of this work was to analyze through comparison the changes occurred in different yogurt formulations due to the presence or absence of sucrose and lactose. Four formulations of yogurt (with lactose/without sucrose, with lactose/with sucrose, without lactose/without sucrose and without lactose/with sucrose) were produced from which chromatographic analyzes were performed to follow the carbohydrate profiles, pH analysis and viable lactic acid bacteria over 42 days. Coliforms, molds and yeasts were analyzed in a complementary manner. For all formulations, pH values decreased significantly by day 14, increased steadily from day 21 and dropped again by day 35. In the sweetened formulations, there was reduction in sucrose concentration from day 1 to day 7, but there was no significant difference. In formulations containing lactose there was a significant reduction in the concentration of this sugar over the course of one week. Regarding glucose concentration, there was no significant difference in the without lactose/with sucrose formulation, but in the formulations with lactose/with sucrose and without lactose/without sucrose, the concentration decreased significantly. On the first day of analysis, the formulation with lactose/without sucrose had a glucose concentration below the detection level, and on day 7 the concentration was 0.87 ± 0.23 g / L. Further stability of the lactic acid bacteria was observed in the formulation with lactose and without sucrose, which the cultures remained statistically constant over the 42 days of analysis. In all formulations the counts of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* were higher than the counts of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. There was no presence of coliforms, molds and yeasts in any formulation.

Key-words: Intolerance. Lactose. Hydrolysis. Lactase. Yogurt. Carbohydrates. Lactic acid bacteria. Storage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da molécula de lactose.	14
Figura 2 – Etapas de produção de iogurte.	19
Figura 3 – Perfil de lactose após 40 minutos de hidrólise enzimática. Padrão de lactose (—) e amostra de leite após hidrólise (—).	23
Figura 4 – Iogurte após a finalização do processo de fermentação.	27
Figura 5 – Amostra de iogurte pronta para o armazenamento refrigerado.	28
Figura 6 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.	29
Figura 7 – Análise de picnometria.	30
Figura 8 – Placas Compact Dry YMR com crescimento de bolores e leveduras.	33
Figura 9 – Valores de pH dos iogurtes ao fim da produção e durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.	35
Figura 10 – Contagem de <i>S. thermophilus</i> durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média; n = 3).	41
Figura 11 – Contagem de <i>L. bulgaricus</i> durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média; n = 3).	42
Figura 12 – Placas Compact Dry YMR após o período de incubação.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de lactose em algumas espécies de mamíferos.	14
Tabela 2 – Alteração do pH ao longo do período de incubação.	25
Tabela 3 – Massa específica calculada (g/cm ³).	31
Tabela 4 – Volumes de amostras (mL) obtidos por conversão.	31
Tabela 5 – Fatores de diluição calculados.	31
Tabela 6 – pH dos iogurtes ao fim da produção e durante o armazenamento a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 9).	34
Tabela 7 – Concentrações de carboidratos (g/L) nos iogurtes durante o armazenamento a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 3).	37
Tabela 8 – Mudança na contagem de bactérias ácido-láticas durante o armazenamento a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 3).	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVO	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivo específico	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Leite	12
3.2	Lactose	13
3.3	Má digestão de lactose	15
3.4	Produtos lácteos Zero Lactose	15
3.5	Produtos lácteos fermentados	16
3.5.1	<i>Iogurte</i>	17
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Materiais	21
4.2	Equipamentos	21
4.3	Testes preliminares	22
4.3.1	Inativação da lactase	22
4.3.2	Condições ideais para hidrólise da lactose	22
4.3.2.1	<i>Clarificação das amostras</i>	23
4.3.3	Produção dos iogurtes	24
4.3.3.1	<i>Concentração de cultura mista liofilizada</i>	25
4.3.4	Análises microbiológicas	25
4.3.4.1	<i>Contagem de bactérias ácido-láticas</i>	26
4.3.4.2	<i>Análise de coliformes totais e termotolerantes</i>	26
4.4	Parte experimental definitiva	27
4.4.1	Produção dos iogurtes	27

4.5	Análise de pH	28
4.6	Quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
4.6.1	Cálculo das concentrações de carboidratos	29
4.7	Análises microbiológicas	32
4.7.1	Contagem de bactérias ácido-láticas	32
4.7.2	Análises de coliformes totais e termotolerantes	32
4.7.3	Contagem de bolores e leveduras	33
4.8	Análise Estatística	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	Análise de pH	25
5.2	Quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	37
5.3	Análises microbiológicas	39
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento muito nutritivo e importante para os seres humanos, sendo utilizado como fonte de proteína, gordura e energia desde os primórdios (PENNA, 2009; TRONCO, 2013). O leite bovino é o mais consumido mundialmente, representando 85% da oferta para venda. Por este motivo, quando não há especificação da espécie produtora, a palavra leite sempre se refere ao leite bovino (FOX, 2011).

O leite fornece proteínas de alta qualidade, contém diversas vitaminas e todos os minerais com importância biológica, sendo uma excelente fonte de cálcio. A gordura do leite também é um importante fator nutricional por ser rica em ácidos graxos essenciais, viabilizar a ingestão das vitaminas lipossolúveis A, D, E e K presentes, e por conter caroteno, que é precursor de vitamina A (TRONCO, 2013).

Apesar de todos os benefícios, um inconveniente em relação ao consumo de leite e derivados é a má digestão da lactose, açúcar do leite, por parte considerável da população mundial (HEYMAN, 2006; ADILAC, 2016).

Na produção do iogurte, a lactose do leite é parcialmente fermentada por bactérias ácido-láticas, promovendo uma boa tolerância, em relação ao seu consumo, pela maioria dos consumidores intolerantes à lactose. Porém, o grau de intolerância é variável e para algumas pessoas com má digestão de lactose a redução que ocorre na produção do iogurte não é suficiente para evitar os sintomas (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; WEAVER, C, 2013; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013).

Em função do grande número de pessoas com má digestão de lactose, a indústria de alimentos vem inovando em produtos Zero Lactose, através da hidrólise deste açúcar pela atividade da enzima β -galactosidase (lactase) de origem microbiana (HEYMAN, 2006; ERICH; ANZMANN; FISCHER, 2012; KOBLITZ, 2013), excluindo a necessidade de redução ou remoção dos produtos lácteos da dieta destes consumidores.

O mercado de produtos lácteos especiais, como os “Zero Lactose”, vem crescendo exponencialmente, o que não ocorre com a mesma velocidade nas pesquisas nessa área. Diante disso, o objetivo do trabalho foi acompanhar as modificações ocorridas durante o armazenamento refrigerado, em iogurtes preparados com diferentes formulações (com lactose e com sacarose, com lactose e sem sacarose, sem lactose e com sacarose, sem lactose e sem sacarose).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar comparativamente diferentes formulações de iogurtes de consistência firme, acompanhando as alterações ocorridas ao longo de 42 dias (6 semanas) de armazenamento refrigerado ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.2 Objetivo específico

- Avaliar o efeito da lactose e da sacarose nas alterações ocorridas ao longo do armazenamento refrigerado dos iogurtes;
- Acompanhar os perfis de carboidratos (lactose, sacarose e glicose) nas diferentes formulações;
- Acompanhar a viabilidade de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* nas diferentes formulações;
- Acompanhar o pH das diferentes formulações;
- Relacionar a viabilidade das bactérias com a alteração do pH e com os perfis dos carboidratos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite

A produção mundial de leite em 2017 foi de 811 milhões de toneladas, superando em 1,4% a produção do ano de 2016. Neste mesmo ano o Brasil ocupou o 6º lugar no ranking dos maiores produtores de leite do mundo, com 35.233 mil toneladas produzidas. Os primeiros lugares foram ocupados pela Índia, com 165.612 mil toneladas de leite produzidas, União Europeia, com 165.400, Estados Unidos, com 97.735, China, com 41.289 e Paquistão, com 40.167 mil toneladas (FAO, 2018).

O leite bovino é composto por aproximadamente 87% de água, 5% de lactose, 3-4% de proteína, 3-6% de gordura e 0,7% de minerais. Esta composição, porém, é afetada por diversos fatores, tais como a raça, estação do ano, idade, fase de lactação, alimentação e genética (ORDÓÑEZ, 2005; ESKIN; GOFF, 2015).

O leite fornece uma grande quantidade de nutrientes em comparação ao seu valor energético, ocupando, portanto, posição de destaque na lista dos alimentos mais importantes para a dieta humana (MCKINLEY, 2005). Além de fornecer proteínas de alto valor biológico, o leite é uma excelente fonte de micronutrientes como cálcio, fósforo e vitaminas, A, B₁₂, riboflavina e tiamina, fornecendo ainda, micronutrientes como magnésio, zinco e selênio (ADOLFSSON; MEYDANI; RUSSELL, 2004; ORDÓÑEZ, 2005; GAUCHERON, 2011).

Estudos indicam uma relação entre o consumo de leite e a possibilidade de crianças e adolescentes ingerirem a quantidade recomendada de vitamina A, folato, vitamina B₁₂, cálcio e magnésio (BALLEW; KUESTER; GILLESPIE, 2000).

Uma das grandes importâncias relacionadas ao consumo do leite é a ingestão de cálcio, que traz benefícios especialmente à saúde óssea. Em média, uma porção de 250 mL de leite fornece 300 mg de cálcio, que representa aproximadamente 25% da ingestão diária recomendada para adolescentes (idade entre 10 e 18 anos), adultos e idosos (FAO, 2001; PEREIRA; VICENTE, 2017).

Leite e derivados lácteos são excelentes fontes de cálcio, não apenas pela quantidade presente, mas principalmente pela biodisponibilidade do mesmo. O fato de um alimento conter quantidade significativa de cálcio não o faz necessariamente boa fonte deste mineral, já que o cálcio que ele fornece pode não estar disponível para absorção pelo organismo. Muitos alimentos também, possuem cálcio em suas composições, porém em quantidades muito baixas. O leite, portanto é um alimento muito importante para a absorção de cálcio pelo organismo (MCKINLEY, 2005).

Estudos recentes apontam o consumo inadequado de cálcio ao longo da vida como a principal causa da osteoporose, sendo este fato, uma das justificativas para a grande importância da ingestão deste mineral em todas as faixas etárias (TRONCO, 2013).

3.2 Lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite, com concentração variando de 2,0% a 8,5%, de acordo com sua origem. Em leite de vaca, por exemplo, o teor de lactose se encontra normalmente entre 4,8 e 5% e no leite humano, de 6,8 a 7% (ORÓÑEZ, 2005; SHENDURSE; KHEDKAR, 2016), sendo responsável por aproximadamente 40% da energia fornecida pela amamentação humana (SHENDURSE; KHEDKAR, 2016).

A Tabela 1 a seguir traz os percentuais de lactose de algumas espécies de mamíferos.

Tabela 1 – Percentual de lactose em algumas espécies de mamíferos.

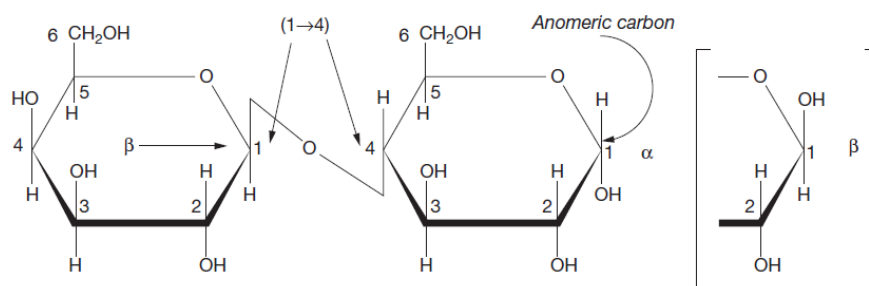
Espécies	Lactose (%)
Humano	6,8-7,0
Égua	~ 6,2
Vaca	4,8-5,0
Ovelha	4,6-4,8
Cabra	4,1-4,6

Fonte: Adaptado de Ordóñez (2005); Shendurse e Khedkar (2016).

A lactose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose ligada a uma molécula de galactose por uma ligação β -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídica, sendo conhecida também como açúcar do leite (ORÓÑEZ, 2005; ESKIN; GOFF, 2015). A lactose é originada principalmente da isomerização de parte da glicose do sangue em galactose, que então é ligada a uma molécula de glicose que não passou por isomerização (ORÓÑEZ, 2005).

A estrutura da molécula do dissacarídeo lactose é apresentada na Figura 1 a seguir:

Figura 1 – Estrutura da molécula de lactose.



Fonte: Shendurse e Khedkar (2016).

Para que a lactose seja digerida e absorvida após seu consumo, é preciso ser hidrolisada pela enzima β -galactosidase (lactase), produzida no intestino, para formar glicose e galactose (WEAVER, 2013; KOBLITZ, 2013).

A lactose contribui para a inibição de bactérias indesejáveis no intestino, estimulando o desenvolvimento da microflora intestinal desejável. Isso ocorre uma vez que sua utilização pela microflora intestinal promove a formação de ácido lático que reduz o pH do meio. A queda do pH intestinal também contribui para a otimização da absorção de cálcio pelo organismo, uma vez que promove maior solubilização e disponibilidade de compostos que contêm este mineral (TRONCO, 2013).

A lactose é muito importante na fabricação de produtos lácteos fermentados, uma vez que fornece carbono e energia às bactérias ácido-láticas, que fermentam o leite produzindo

ácido láctico (OH, 2016; SHENDURSE; KHEDKAR, 2016). Neste processo, a lactose é metabolizada em glicose e galactose (OH, 2016).

3.3 Má digestão de lactose

Um grande problema relacionado ao consumo de alimentos que contenham lactose, como o leite e derivados lácteos, é a dificuldade de digestão deste açúcar pela maioria das pessoas. Estima-se que aproximadamente 70% da população mundial apresente uma das formas de má digestão de lactose, conhecida como deficiência primária de lactase (HEYMAN, 2006). Neste caso, ainda na infância, geralmente a partir dos 3 anos de idade, a concentração de lactase começa a diminuir, reduzindo a capacidade de absorção da lactose (HEYMAN, 2006; KOBLITZ, 2013).

Outra forma de má digestão consiste na deficiência de lactase secundária, causada por alguma lesão do intestino que danifique a mucosa, sendo mais comum em crianças (HEYMAN, 2006). Como as células que produzem a lactase são encontradas nas pontas das vilosidades do intestino, são muito vulneráveis a doenças intestinais (VESA; MARTEAU; KORPELA, 2000).

Há também casos de crianças que já nascem com deficiência de lactase, porém, são extremamente raros (HEYMAN, 2006).

Em casos de dificuldade de digestão da lactose, esta não é totalmente absorvida, e se acumula no intestino, onde é fermentada pela microbiota intestinal, com consequente produção de gases, como gás carbônico, gás hidrogênio e metano, que pode resultar em desconfortos, tais como, dor abdominal, inchaço e flatulência. Além disso, o acúmulo de lactose no intestino atrai água para o lúmen intestinal, podendo causar diarreia. A condição em que a má digestão da lactose acarreta tais sintomas é conhecida como intolerância à lactose (WEAVER, 2013; KOBLITZ, 2013).

3.4 Produtos lácteos Zero Lactose

A legislação brasileira ainda vigente, por meio da Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998, estabelece uma concentração máxima de 0,5% de lactose para alimentos destinados a dietas com restrição deste açúcar (BRASIL, 1998). Porém, a Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 135, de 8 de fevereiro de 2017, que entra em vigor em fevereiro de 2019, estabelece um valor de 0,1% de lactose para que o alimento seja considerado isento de lactose, mais comumente rotulados como “Zero Lactose” (BRASIL, 2017).

Para atender aos consumidores com má digestão de lactose, a indústria alimentícia vem inovando cada dia mais em produtos lácteos isentos deste açúcar (HEYMAN, 2006; TRANI et al., 2017), possibilitando que estas pessoas usufruam dos benefícios proporcionados por produtos lácteos, sem a manifestação de sintomas.

A principal forma de produção de leite e derivados lácteos sem lactose é a hidrólise enzimática da lactose, utilizando a enzima β -galactosidase, conhecida popularmente como lactase (MORLOCK, G.; MORLOCK, L.; LEMO, 2014).

A indústria alimentícia utiliza predominantemente a lactase de origem microbiana, sendo obtida de fungos ou bactérias. Esta enzima hidrolisa o dissacarídeo, formando os monossacarídeos glicose e galactose, facilmente absorvidos pelo intestino (ORDÓÑEZ, 2005; KOBLITZ, 2013).

A hidrólise da lactose, também aumenta a doçura dos produtos, sem aumentar o valor calórico, já que a mistura dos dois monossacarídeos formados possui poder edulcorante de 4 a 5 vezes maior em comparação à lactose (KIBLITZ, 2015), podendo contribuir para uma menor adição de sacarose nos alimentos adoçados.

3.5 Produtos lácteos fermentados

Os leites fermentados são produtos obtidos por redução do pH e coagulação do leite, ou leite reconstituído, através da fermentação láctica realizada por microrganismos específicos, podendo ser adicionados ou não de outras substâncias alimentícias (BRASIL, 2007).

A categoria de leites fermentados engloba produtos lácteos como iogurte, leites fermentados ou cultivados, leite acidófilo, kefir, kumys, coalhada, *buttermilk* e leite *sweet acidófilo*, sendo os microrganismos fermentadores, a principal diferença entre eles (BRASIL, 2007; OLIVEIRA, 2009). O iogurte é o mais popular de todos os leites fermentados (MAGENIS et al., 2006; OLIVEIRA, 2014).

A fermentação do leite surgiu como uma técnica de conservação de alimentos, uma vez que neste processo é formado ácido láctico, que promove a redução do pH, possibilitando maior tempo de conservação do produto (BUTTRISS, 1997). Porém, atualmente, está voltada para a diversificação de produtos lácteos de valor agregado, por meio do crescimento de microrganismos específicos no leite e das atividades desempenhadas por eles (ORDÓÑEZ, 2005; STANTON; McMAHON; MILLS, 2013).

Em diversos países, os leites fermentados são preferidos em relação ao leite, sendo mais atraentes em função de seus aromas, texturas e sabores (AL-ASHMAWY; IBRAHIM, 2009).

Assim como o leite, os produtos lácteos fermentados são associados a diversas propriedades benéficas à saúde e podem ser melhor tolerados por pessoas com má digestão de lactose, em relação ao leite, especialmente pelo menor teor de lactose, parcialmente consumida na fermentação (YAMAMOTO, 2016).

3.5.1 Iogurte

De acordo com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007) iogurte é o leite fermentado

cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final.

O surgimento do iogurte se deu provavelmente no Oriente Médio ou na Índia e data de milhares de anos. Antes do século XIX as etapas envolvidas na sua produção já começaram a ser compreendidas, e é sugerido que as técnicas de produção foram passadas de geração em geração pela sua simplicidade (ORDÓÑEZ, 2005; OLIVEIRA, 2009).

O consumo de iogurte vem crescendo em todo o mundo (SHIBY; MISHRA, 2013; OLIVEIRA, 2014) principalmente em função da sua praticidade (OLIVEIRA, 2014), valor nutricional, sabor e baixo custo (TAMIME; ROBSON, 2007 apud KWON; NYAKUDYA; JEONG, 2014). Esta tendência tem motivado a indústria de laticínios a inovar na produção de iogurtes, atendendo à uma demanda cada vez mais exigente e específica (TAMIME; ROBSON, 2007 apud VÉNICA et al., 2018).

O iogurte é produzido pela coagulação das proteínas do leite através do processo de acidificação desempenhado por bactérias ácido-láticas, que fermentam a lactose, formando ácido láctico e alguns compostos voláteis característicos do iogurte (FELLOWS, 2006; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013; GEZGINC et al., 2015).

Além de converter lactose em ácido láctico, durante a fermentação, as culturas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* promovem a proteólise de caseínas, formando peptídeos e aminoácidos livres e a lipólise da gordura do leite, dando origem à ácidos graxos livres (SMIT, G.; SMIT, B.; ENGELS, 2005; CUTRIM et al., 2016).

O processo de fermentação para produção do iogurte inicia-se com a inoculação da cultura mista, conhecida como cultura *starter* (JAY, 2005; FELLOWS, 2006), que cresce

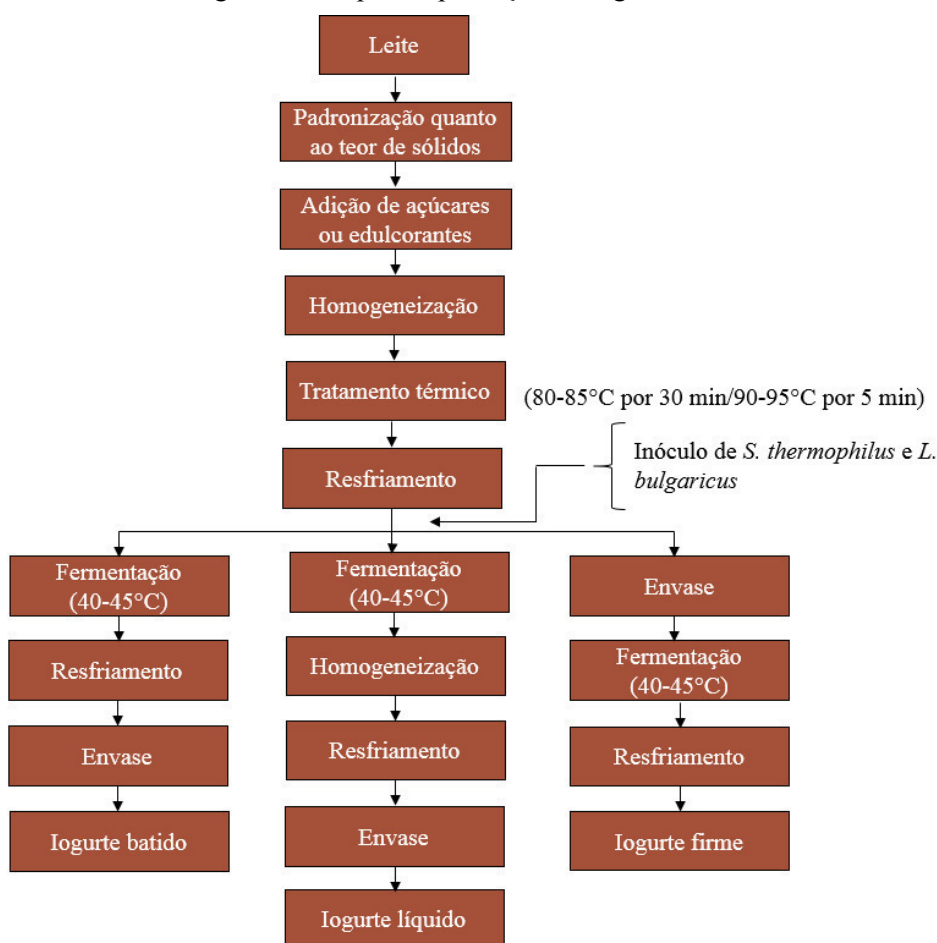
rapidamente, diminuindo o tempo de fermentação e inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis (FELLOWS, 2006).

Assim que ocorre a inoculação, *L. bulgaricus* libera peptídeos das proteínas do leite, estimulando o rápido crescimento de *S. thermophilus*, que produz alguns ácidos, como o láctico, diacetil, fórmico e acético. Com o aumento da acidez a velocidade de crescimento de *S. thermophilus* diminui e aumenta o crescimento de *L. bulgaricus*, estimulado pelo formiato produzido anteriormente (FELLOWS, 2006). Em aproximadamente 3 horas de fermentação as contagens das duas espécies geralmente são semelhantes (JAY, 2005). Ao longo do processo de fermentação outros compostos vão sendo formados, garantindo as características próprias do iogurte. A maior parte do ácido láctico e do acetaldeído é produzido por *L. bulgaricus*, responsáveis pelo sabor e aroma do iogurte, juntamente ao diacetil (FELLOWS, 2006).

A composição da base láctea utilizada na produção de iogurtes influencia o crescimento das bactérias ácido-láticas e suas atividades metabólicas, interferindo, consequentemente, no tempo de fermentação e nas características finais dos produtos (SODINI et al., 2012; MOREIRA et al., 2017).

Por meio de pequenas alterações no processo de fabricação, é possível produzir iogurtes com diferentes texturas. Apesar da legislação brasileira só definir iogurte de consistência firme (BRASIL, 2007), de acordo com Ordóñez (2005), os iogurtes podem ser classificados em: iogurte de consistência firme, líquido e batido. As etapas do processo de produção do iogurte são apresentadas Figura 2 a seguir.

Figura 2 – Etapas de produção de iogurte.



Fonte: Adaptado de Ordóñez (2005) e Oliveira (2009).

A padronização quanto ao teor de sólidos ocorre com o intuito principal de aumentar a viscosidade do iogurte através do incremento de proteínas. O aumento do teor de gordura também é comum, já que contribui para uma melhor textura. A adição de leite ou soro em pó e a concentração por evaporação são exemplos de formas de padronização (ORDÓÑEZ, 2005). A maior parte dos iogurtes comerciais possuem um percentual de sólidos totais entre 14 e 15% (OLIVEIRA, 2009).

Na fabricação de diferentes iogurtes pode haver adição de açúcar ou edulcorantes, promovendo um aumento no tempo de fermentação. Em leite com teor de sólidos totais de 14-16%, uma adição de 10-12% de açúcar pode inibir as bactérias ácido-láticas devido à redução da atividade de água e do efeito osmótico (OLIVEIRA, 2014). Por este motivo é importante adoçar na dosagem correta.

O processo de homogeneização promove a dispersão uniforme dos ingredientes adicionados até o momento, melhora a viscosidade e as propriedades sensoriais do produto final (FERREIRA, 2001 apud OLIVEIRA, 2009).

O tratamento térmico destrói formas vegetativas de microrganismos presentes nos ingredientes adicionados nas etapas anteriores e enzimas que poderiam promover perdas na qualidade do produto, contribui para o aumento da viscosidade em razão de interações entre proteínas do leite e promove crescimento da cultura iniciadora através da condição de microaerofilia (criada pela redução da concentração de oxigênio disponível) e da liberação de compostos nitrogenados de baixo peso molecular (provenientes das proteínas do soro) (ORDÓÑEZ, 2005). As condições ideais para o tratamento térmico são: temperatura de 80-85°C por 30 minutos ou 90-95°C por 5 minutos (ORDÓÑEZ, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Após o tratamento térmico deve haver uma etapa de resfriamento, antes da adição da cultura iniciadora, até uma temperatura ótima de crescimento dos mesmos, de 40-45°C (ORDÓÑEZ, 2005).

A partir deste ponto do processo, pode-se seguir três caminhos distintos, dependendo do tipo de iogurte a ser produzido, como mostrado na Figura 2.

A concentração de inóculo adicionada deve ser tal que garanta que ao final da vida útil do iogurte, informada na embalagem, haja uma contagem de bactérias ácido-láticas mínima de 10^7 unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g) (BRASIL, 2007).

Após o período de incubação, os iogurtes devem ser rapidamente resfriados para evitar a pós-acidificação por meio da redução da atividade metabólica da cultura. Para iogurtes de consistência firme, coagulados na própria embalagem, o resfriamento pode ser realizado por aspersão de ar frio ou transferência das embalagens para um ambiente climatizado, com temperatura entre 2 e 4°C. Já para iogurtes fermentados em tanques é comum o uso de camisa de resfriamento com circulação de água a ~2°C (OLIVEIRA, 2009).

No processo de fermentação do leite para produzir o iogurte, as bactérias ácido-láticas consomem 20-30% da lactose, sendo assim, espera-se que o produto final tenha um teor reduzido deste açúcar em relação ao leite (BUTTRISS, 1997). Porém, alguns ingredientes podem ser adicionados nas formulações de iogurtes, tais como o leite ou soro de leite em pó, aumentando significativamente a concentração de lactose (BUTTRISS, 1997; OLIVEIRA, 2009).

Pessoas com má digestão de lactose podem tolerar melhor o iogurte em comparação ao leite, mesmo quando os teores de lactose são iguais nos dois produtos, e as justificativas são o maior tempo de esvaziamento gástrico, o trânsito gastrointestinal mais lento e a produção de lactase pelos microrganismos fermentadores viáveis após a ingestão do iogurte (BUTTRISS, 1997; LABAYEN et al., 2001; JAY, 2005). Porém, devido à grande variação da tolerância individual em relação à lactose, não é possível garantir que o consumo de iogurte não cause os

desconfortos da intolerância em todos os consumidores com má digestão deste açúcar (HEYMAN, 2006).

Portanto, diante de tal individualismo, para a garantia de que todos possam consumir o produto sem manifestação de sintomas, a indústria alimentícia produz o iogurte Zero Lactose, pela aplicação da β -galactosidase, deixando os consumidores com má digestão de lactose, mais seguros quanto ao seu consumo.

A fermentação de um leite com lactose hidrolisada pode reduzir o tempo de fermentação e promover a obtenção de um iogurte de melhor textura e com sabor mais doce (KOBELITZ, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as análises foram realizadas nos Laboratórios do curso de Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal de Uberlândia, campus Patos de Minas.

4.1 Materiais

O leite integral ultrapasteurizado (UHT) e o açúcar cristal foram adquiridos no mercado local, a cultura mista liofilizada YO-MIX 885 (Danisco France SAS, Sassenage, FR) foi fornecida pela Cooperativa Mista Agropecuária de Patos de Minas Ltda. (Coopatos) e a preparação enzimática LACTLOW L (Granolab | Granotec, Araucária-PR) à base da enzima β -galactosidase (lactase), foi fornecida pela Granolab | Granotec.

4.2 Equipamentos

Foram utilizados: cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo LC-20 AT Prominence com detector RID (Shimadzu, Kyoto, Japan) e coluna Supelcogel K (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); balança analítica, modelo AUW320 (Shimadzu, São Paulo, SP); centrífuga, modelo Neofuge 15R (Heal Force, Shanghai, China); câmara de germinação, modelo SL-225/364 (Solab, Piracicaba, SP); BOD, modelo MA 415 (Marconi, Piracicaba, SP); BOD, modelo TE-371 (Tecnal, Piracicaba, SP), capela de fluxo laminar, modelo Biosseg 12, classe II, tipo A1 (Veco, Campinas, SP); banho ultratermostatizado, modelo SL-152/18 (Solab, Piracicaba, SP); banho maria de bocas microprocessado, modelo Q334M-28 (Quimis, Diadema, SP); placa de aquecimento e agitação magnética, modelo C-MAG HS 7 S32 (Ind. e

Com. Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda., São Paulo, SP); pHmetro, modelo mPA-210 (Tecnopon, Piracicaba, SP).

4.3 Testes preliminares

Nesta etapa, a dosagem da preparação enzimática, a temperatura e o tempo necessários para a hidrólise total da lactose foram testados, além das condições de inativação da enzima lactase e da concentração de cultura mista a ser utilizada no processo de fermentação. Nos testes preliminares também foram produzidas três formulações de iogurte, que passaram por análises microbiológicas para avaliação da viabilidade das bactérias ácido-lácticas e para analisar a presença de coliformes.

4.3.1 Inativação da lactase

Para o teste de inativação da lactase, uma amostra de solução de lactose contendo a enzima, acondicionada em tubo de ensaio com rosca, foi colocada em banho com água fervente por 5 minutos e logo em seguida em um banho de gelo por mais 5 minutos. Após esta etapa, a amostra foi filtrada em filtro seringa de 26 mm com membrana de acetato de celulose e poros de 0,20 μm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech SA, Gotinga, Alemanha) e injetada em cromatógrafo líquido de alta eficiência para quantificar a lactose presente. Em seguida, o tubo foi colocado sob leve agitação por um período de 1 hora, e novamente, uma amostra da solução foi filtrada e injetada. Após 1 semana de armazenamento refrigerado os passos se repetiram, para confirmar a inativação da enzima. Após a confirmação de que não houve alteração na concentração de lactose, a eficiência da inativação sob tais condições foi comprovada.

4.3.2 Condições ideais para hidrólise da lactose

A análise das condições ideais para hidrólise da lactose foi realizada para estabelecer a concentração da preparação enzimática e o tempo a serem utilizados nesta etapa. A hidrólise do leite foi realizada sobre placas aquecedoras reguladas para uma temperatura de 45°C, sob leve agitação, em conformidade com as instruções contidas na ficha técnica do produto.

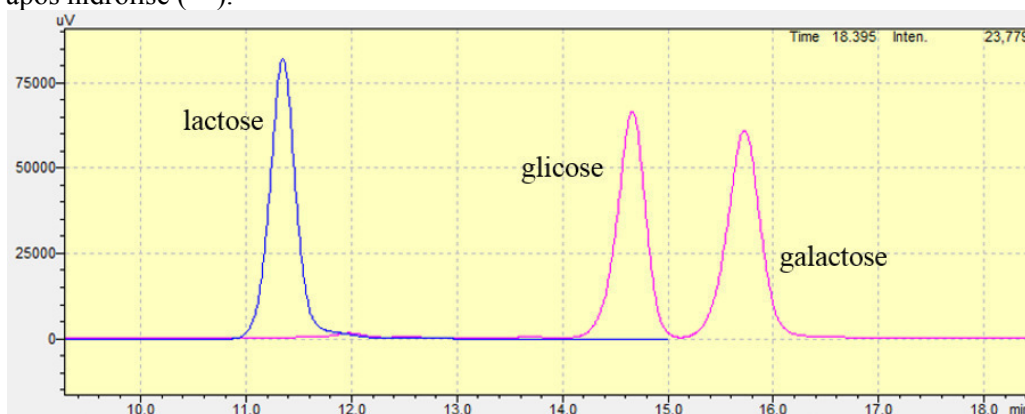
Primeiramente, foi testado a adição de 1% (p/v) de preparação enzimática ao leite. De 15 em 15 minutos uma amostra foi recolhida em um tubo de ensaio para análise cromatográfica, para acompanhar a queda na concentração de lactose. Antes de injetar a amostra no

cromatógrafo, a enzima foi inativada, conforme descrito no item 4.3.1. Após esta etapa, a amostra foi clarificada e injetada para análise.

Sob estas condições, o tempo para hidrólise total da lactose ultrapassou 1 hora. Visando reduzir este tempo, a concentração de preparação enzimática foi alterada para 2% (p/v) e os demais passos se repetiram. Com essa concentração, o tempo para hidrólise completa da lactose foi de 40 minutos. Portanto, para uma concentração de 2% (p/v) de preparação enzimática, com a temperatura da placa aquecedora a 45°C, foi estabelecido, como garantia, um tempo de hidrólise de 1 hora para a parte experimental definitiva.

O perfil de lactose das amostras analisadas, obtido após 40 minutos de hidrólise é apresentado na Figura 3 a seguir.

Figura 3 – Perfil de lactose após 40 minutos de hidrólise enzimática. Padrão de lactose (—) e amostra de leite após hidrólise (—).



Fonte: A autora (2018).

As etapas para clarificação da amostra estão descritas no item a seguir:

4.3.2.1 Clarificação das amostras

Antes de serem injetadas no sistema de cromatografia, as amostras foram clarificadas para evitar danos à coluna e possíveis interferências nas análises. O processo de clarificação consiste na separação e remoção das porções proteicas e lipídicas das amostras, a fim de se obter uma solução composta predominantemente por carboidratos (NEVES, 2015). Para tal procedimento, foram utilizadas a metodologia de Cataldi, Angelotti e Bianco (2003) e metodologia 997.05 da AOAC International (2003), adaptadas.

Para realizar a clarificação, uma porção de 15,625 g de amostra, pesada em balança analítica, foi diluída em 50 mL de água deionizada. Após homogeneização, 0,620 mL de

solução Carrez I foi adicionada, com posterior agitação. Em seguida, 0,620 mL de solução Carrez II também foi adicionada, agitando novamente.

As soluções Carrez foram preparadas de acordo com a metodologia 997.05 da AOAC International (2003), conforme descrito a seguir:

- Carrez I: 1,5 g de $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$ (ferrocianeto de potássio triidratado) P.A ACS (marca Vetec) para um total de 10 mL de solução;
- Carrez II: 3,0 g de $Zn(OAc)_2.2H_2O$ (acetato de zinco biidratado) P.A. cristalizado (marca Proquimios) para um total de 10 mL de solução.

Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas a 3300 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram filtrados em filtro seringa com poros de 0,20 μm .

4.3.3 Produção dos iogurtes

Foram produzidas três formulações de iogurtes de consistência firme, sendo elas: sem lactose/com sacarose (SLCS) com 0,1g/L de cultura mista, com lactose/sem sacarose (CLSS) com 0,01g/L de cultura mista e com lactose/sem sacarose (CLSS) com 0,1g/L de cultura mista.

Os iogurtes foram produzidos a partir de leite integral ultrapasteurizado comercial (carboidratos: 5 g/100 mL, proteínas: 3 g/100 mL, gorduras: 3 g/100 mL), seguindo metodologia proposta por Vénica et al. (2018) com algumas modificações.

Cada uma das formulações foi produzida em um béquer de vidro, com adição de 1 L de leite, com a respectiva dosagem de cultura mista liofilizada, pesada em balança analítica, 80 g de açúcar cristal (para o iogurte adoçado) e 2 mL de preparação enzimática (para o iogurte Zero Lactose). Os béqueres, previamente higienizados, foram fervidos por 30 minutos em panela industrial antes de serem utilizados.

Para a hidrólise da lactose, cada um dos béqueres contendo apenas o leite e a preparação enzimática, foi colocado sobre uma placa de aquecimento e agitação magnética a 45°C, permanecendo por um período de 1 hora sob leve agitação.

Após adição da sacarose à formulação de iogurte adoçado, todos os béqueres, com leite hidrolisado e não hidrolisado, com e sem sacarose, foram vedados e colocados em um banho de aquecimento, passando por um tratamento térmico de 85°C por 30 minutos em banho maria de bocas microprocessado.

Após este período, as bases lácteas foram arrefecidas à 43°C e adicionadas das devidas dosagens da cultura mista. As formulações foram agitadas com o auxílio de bastões e acondicionadas em potes de vidro individuais, que foram incubados em câmara de germinação

à $43 \pm 1^\circ\text{C}$ até alcançarem pH de $\sim 4,80$. Antes de serem utilizados, os potes de vidro previamente higienizados, foram fervidos em panela industrial por um tempo de 30 minutos.

4.3.3.1 Concentração de cultura mista liofilizada

De acordo com o fornecedor, um envelope de 5,8 g de cultura mista, já descrita anteriormente, rende até 1000 litros de iogurte, porém, para obedecer a esta proporção, para 1 L de leite, deveria ser adicionado 0,0058 g de cultura, sendo portanto, uma massa muito pequena para pesar com precisão em balança analítica. Por este motivo, foram testadas as concentrações de 0,01 e 0,1g de cultura/L de leite para facilitar a pesagem precisa da cultura e padronizar a concentração entre as diferentes formulações produzidas.

A Tabela 2 abaixo contém as alterações nos valores de pH obtidas ao longo do período de fermentação para três diferentes condições.

Tabela 2 – Alteração do pH ao longo do período de incubação.					
Formulação	Tempo*				
	13h15min	14h06min	15h07min	16h21min	17h45min
0,1 g/L SLCS	6,35	5,93	5,11	4,81	-
0,1 g/L CLSS	6,15	5,28	4,81	-	-
0,01 g/L CLSS	6,52	6,08	5,69	5,28	4,85

*A incubação se iniciou às 11h30min.

Como pode ser observado, com uma concentração de 0,01 g/L o pH decresce mais lentamente. A partir desta observação, decidiu-se adotar a concentração de 0,1g/L para a produção dos iogurtes na parte experimental definitiva, já que agiliza o processo, além da maior facilidade na pesagem.

4.3.4 Análises microbiológicas

Nos testes preliminares foram realizadas apenas análises de contagem de bactérias ácido-láticas e teste de coliformes, para definir as diluições a serem utilizadas nas análises definitivas e para analisar a qualidade microbiológica dos produtos, relacionada aos cuidados adotados no processo de produção.

4.3.4.1 Contagem de bactérias ácido-láticas

A contagem de bactérias ácido-láticas foi realizada conforme metodologia proposta por Akgun, Yazici e Gulec (2016). Para a contagem de *S. thermophilus* foi utilizado o meio de cultura M17 Agar (Sigma-Aldrich, pH 7,1) suplementado com solução de lactose (Sigma-Aldrich) 10% (p/v), com incubação em BOD à 37°C por 48 horas, sob condição de aerobiose. Para contagem de *L. bulgaricus* foi utilizado o meio MRS Agar (Oxoid, pH 5,2), com incubação em BOD à 45°C por 72 horas, sob condição de anaerobiose. Nos dois casos, as placas de Petri foram inoculadas utilizando a técnica de *pour plate*, conforme utilizado por Tabasco et al. (2007). As contagens foram expressas em unidades formadoras de colônias por grama de produto (UFC/g).

Em algumas placas com o meio M17 Agar, utilizadas para contagem de *S. thermophilus*, cresceram colônias de contaminantes, que podem ter sido decorrentes de algum ingrediente utilizado na fabricação dos iogurtes ou de falhas no processo de produção. A partir desta ocorrência, alguns cuidados foram propostos para a parte experimental definitiva, tais como: filtrar a preparação enzimática em filtro com microporos, esterilizar os potes utilizados para acondicionar os iogurtes em autoclave, esterilizar os bastões que entrariam em contato com as formulações, higienizar a câmara de germinação e as bancadas de trabalho com desinfetante (bactericida, fungicida e germicida) antes da produção e pesar a cultura mista dentro da capela de fluxo laminar estéril, utilizando frascos e espátulas estéreis.

Com o teste preliminar foi possível definir que para a contagem de *S. thermophilus* em meio M17 Agar seriam utilizadas diluições próximas a 10^{-7} e para a contagem de *L. bulgaricus* em meio MRS Agar seriam utilizadas diluições próximas a 10^{-3} .

4.3.4.2 Análise de coliformes totais e termotolerantes

As análises de coliformes foram realizadas, conforme metodologia disposta no capítulo VI, do Anexo I da Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003), com algumas modificações.

No teste presuntivo, foi utilizada a diluição 10^{-1} em concentração dupla de meio (referente à diluição 10^0) e as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em concentração simples. Cada uma destas diluições foram incubadas em tubos de ensaio contendo caldo Lauril Sulfato (Ionlab) e tubos de Durhan, em BOD a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

No teste presuntivo não houve indícios de contaminação por coliformes totais em nenhuma das formulações, sendo desnecessário portanto, realizar o teste confirmativo tanto para coliformes totais quanto para coliformes termotolerantes.

A partir do teste preliminar foi definido que as diluições utilizadas na parte experimental definitiva seriam a 10^{-1} em concentração dupla (referente à diluição 10^0) e as diluições 10^{-1} e 10^{-2} em concentração simples, uma vez que não houve surgimento de bolhas em nenhuma das diluições, sendo desnecessário analisar diluições maiores.

4.4 Parte experimental definitiva

4.4.1 *Produção dos iogurtes*

Os iogurtes foram produzidos no Laboratório de Análise Sensorial do curso de Engenharia de Alimentos e posteriormente, armazenados a $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 42 dias.

Foram produzidas quatro formulações de iogurtes de consistência firme, sendo elas: sem lactose e com sacarose (SLCS); com lactose e com sacarose (CLCS); sem lactose e sem sacarose (SLSS); com lactose e sem sacarose (CLSS). Cada formulação foi replicada três vezes, para maior representatividade dos resultados obtidos.

Os passos adotados para a produção dos iogurtes estão descritos no item 4.3.3. Como definido no teste preliminar, para todas as formulações foi utilizado 0,1 g de cultura mista para 1 litro de leite. As bases lácteas foram incubadas até alcançarem pH de $4,7 \pm 1$.

Uma amostra de iogurte após a produção e uma amostra de iogurte devidamente acondicionado em pote com tampa são apresentadas na Figura 4 e na Figura 5 a seguir, respectivamente:

Figura 4 – Iogurte após a finalização do processo de fermentação.



Fonte: A autora (2018).

Figura 5 – Amostra de iogurte pronta para o armazenamento refrigerado.



Fonte: A autora (2018).

Os béqueres utilizados na produção e os potes de vidro utilizados para acondicionar os iogurtes foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Os demais utensílios que entraram em contato com as formulações foram higienizados com detergente e água e posteriormente, esterilizados com álcool 70°GL. Todos os cuidados citados no item 4.3.4.1 foram adotados e os potes de vidro foram bem rosqueados para evitar possíveis contaminações.

4.5 Análise de pH

O pH foi medido em triplicata, utilizando um pHmetro modelo mPA-210 (Tecnopon, Piracicaba, SP) calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0.

4.6 Quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os carboidratos (lactose, sacarose e glicose) foram quantificados por CLAE utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo LC-20 AT Prominence), com detector RID (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) coluna Supelcogel K (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e padrões de lactose, glicose e sacarose, grau HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

O sistema de cromatografia utilizado nas análises de carboidratos está apresentado na Figura 6 a seguir:

Figura 6 – Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: A autora (2018).

4.6.1 Cálculo das concentrações de carboidratos

Os cálculos das concentrações de carboidratos foram realizados a partir das áreas obtidas nos cromatogramas, levando em consideração as diluições das amostras.

Na etapa de preparo das amostras, para cada 15,625 g de iogurte, foram adicionados 0,620 mL de solução Carrez I e 0,620 mL de solução Carrez II, além de 50 mL de água deionizada. A partir destes valores foram realizados os cálculos dos fatores de diluição para cada amostra, necessário para calcular as concentrações de carboidratos.

O cálculo do fator de diluição é apresentado na Equação 1 a seguir:

$$\text{Fator de diluição} = 1 / \left[\frac{\text{Volume de amostra (mL)}}{(0,620 \text{ mL} \times 2) + 50 \text{ mL} + \text{Volume de amostra (mL)}} \right] \quad (1)$$

Uma vez que é necessário o volume de amostra para calcular o fator de diluição foi necessário realizar uma conversão de massa em volume. Para isso, foi medida a massa específica de cada uma das formulações por picnometria, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Análise de picnometria.



Fonte: A autora (2018).

Primeiramente, os picnômetros limpos e secos internamente, foram identificados e bem higienizados externamente com o auxílio de papel toalha. Utilizando uma luva, os mesmos foram pesados em balança analítica e os pesos foram registrados. Em seguida, os picnômetros foram preenchidos completamente com as respectivas formulações de iogurte a 20°C, limpos externamente com papel toalha e pesados novamente. Após a pesagem dos picnômetros com os iogurtes, os mesmos foram bem higienizados com detergente e água e em seguida, foram completados com água destilada a 20°C, secos externamente com papel toalha e pesados novamente. O ajuste da temperatura dos iogurtes e da água para 20°C se deu através de um banho termostático.

Com o peso dos picnômetros com água, peso dos picnômetros vazios e temperatura da água, foi possível calibrar os picnômetros, já que existem valores tabelados de massa específica da água em diferentes temperaturas. Assim foi possível saber exatamente o volume de cada picnômetro. No presente trabalho foi utilizada a tabela apresentada na seção 6 do livro de Haynes (2012), que fornece um valor de 0,9982 g/mL para a massa específica da água a 20°C.

A partir desta informação, foram realizados os cálculos dos volumes de cada picnômetro a partir da Equação 2 a seguir:

$$V = \frac{M_{p+ág} - M_p}{\rho_{ág}} \quad (2)$$

Onde:

$M_{p+ág}$ é a massa do picnômetro com água; M_p é a massa do picnômetro vazio e $\rho_{ág}$ é a massa específica da água tabelada a 20°C.

Calculados os volumes dos picnômetros, a massa específica de cada formulação foi calculada, conforme a Equação 3 a seguir:

$$\rho = \frac{M_{p+am} - M_p}{V} \text{ (g/cm}^3\text{)} \quad (3)$$

Onde:

M_{p+am} é a massa do picnômetro com a respectiva amostra; M_p é a massa do picnômetro vazio e V é o volume de amostra = volume do picnômetro.

Os valores de massa específica calculados para as formulações produzidas encontram-se dispostos na Tabela 3 a seguir:

Tabela 3 – Massa específica calculada (g/cm³).

Amostra	Massa específica
CLCS	1,0548
CLSS	1,0259
SLCS	1,0552
SLSS	1,0280

Encontrados os valores de massa específica das amostras, foi realizada a conversão de massa em volume para cada uma delas, como apresentada na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4 – Volumes de amostras (mL) obtidos por conversão.

Amostra	Volume de amostra
CLCS	14,81
CLSS	15,23
SLCS	14,81
SLSS	15,20

Finalmente, com todos os valores necessários definidos, os fatores de diluição das amostras foram encontrados a partir da Equação 1 já apresentada. Os fatores de diluição calculados e utilizados no cálculo da concentração dos carboidratos são apresentados na Tabela 5 a seguir:

Tabela 5 – Fatores de diluição calculados.

Amostra	Fator de diluição
CLCS	4,4591
CLSS	4,3643
SLCS	4,4604
SLSS	4,3712

Para calcular as concentrações dos carboidratos das amostras foi utilizada a Equação 4 a seguir:

$$\text{Concentração de carboidrato} = \text{Fator de diluição} * a * A \quad (4)$$

Onde:

‘A’ é a área referente ao respectivo carboidrato no cromatograma e ‘a’ é o coeficiente angular da curva de calibração utilizada.

4.7 Análises microbiológicas

4.7.1 Contagem de bactérias ácido-láticas

A contagem de bactérias ácido-láticas foi realizada conforme descrito no item 4.3.4.1.

No primeiro dia de análise, foram plaqueadas as diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} para a contagem de *S. thermophilus* em meio M17 Agar e 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} para a contagem de *L. bulgaricus* em meio MRS Agar. Para evitar desperdício de meio de cultura, a quantidade de diluições plaqueadas foi reduzida nas semanas seguintes, baseando-se nas últimas contagens realizadas.

4.7.2 Análises de coliformes totais e termotolerantes

As análises de coliformes foram realizadas no 8º dia após a produção dos iogurtes, conforme descrito em 4.3.4.2.

No teste presuntivo, foi utilizada a diluição 10^{-1} em concentração dupla (referente à diluição 10^0) e as diluições 10^{-1} e 10^{-2} em concentração simples.

No teste confirmativo para coliformes totais, os tubos com presença de bolha, foram repicados em tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% lactose (Sigma-Aldrich) e tubo de Durham, sendo incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

No teste confirmativo para coliformes termotolerantes, os tubos com presença de bolha, foram repicados em tubos contendo caldo EC (Biolog) e tubo de Durham, sendo incubados a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$, por 48 h.

4.7.3 Contagem de bolores e leveduras

As análises para contagem de bolores e leveduras foram realizadas no 12º dia após a produção dos iogurtes. Para a análise de bolores e leveduras foram utilizadas placas Compact Dry YMR (Nissui Pharma, Japão), específicas para contagem de bolores e leveduras. A incubação ocorreu a 25°C por 4 dias, condições estas, utilizadas em estudo de Akgun, Yazici e Gulec (2016).

De acordo com informações fornecidas pela Food e Feed Analysis (2018) o crescimento de bolores e leveduras nas placas YMR é notado facilmente, já que as colônias crescem com diferentes colorações. Os bolores podem apresentar cores variadas enquanto as leveduras são predominantemente azuladas em função da presença do substrato cromogênico X-Phos, como mostrado na Figura 8 a seguir:

Figura 8 – Placas Compact Dry YMR com crescimento de bolores e leveduras.



Fonte: Food e Feed Analysis (2018).

4.8 Análise Estatística

Três ensaios replicados foram conduzidos na fabricação dos iogurtes, para maior representatividade dos resultados. Os valores obtidos nas análises foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (DP). Testes one-way ANOVA e de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de 95%, foram usados para verificar se houve diferença significativa entre os resultados obtidos, em função da composição dos iogurtes e do tempo de armazenamento. Foram utilizados os softwares Microsoft Excel (versão 2013, Microsoft, Redmond, Washington), e BioEstat (versão 5.3, Instituto Mamirauá, Tefé, AM).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise de pH

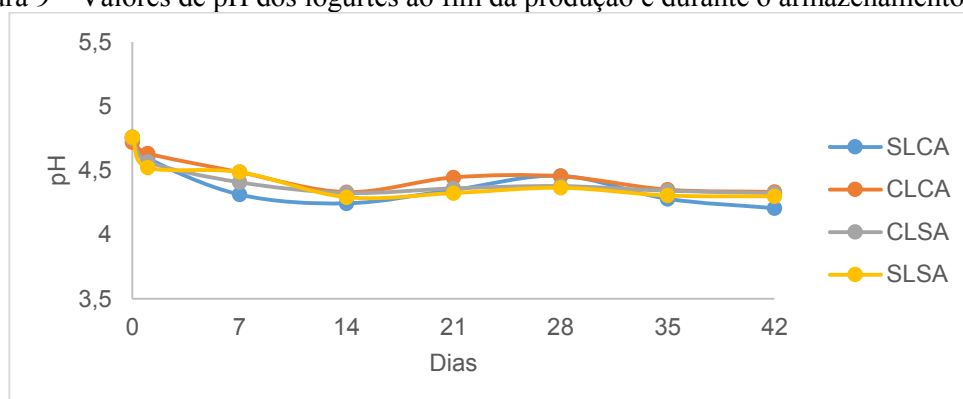
Os resultados obtidos nas análises de pH estão dispostos na Tabela 6 e na Figura 9 a seguir:

Tabela 6 – pH dos iogurtes ao fim da produção e durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 9).

Amostras	Dias							
	0	1	7	14	21	28	35	42
SLCS	$4,76 \pm 0,01^{aA}$	$4,60 \pm 0,06^{acA}$	$4,31 \pm 0,04^{bdA}$	$4,24 \pm 0,03^{bA}$	$4,35 \pm 0,07^{bdA}$	$4,46 \pm 0,10^{cdA}$	$4,28 \pm 0,02^{bdA}$	$4,21 \pm 0,15^{bA}$
CLCS	$4,72 \pm 0,05^{aA}$	$4,63 \pm 0,05^{abA}$	$4,49 \pm 0,05^{bdB}$	$4,33 \pm 0,04^{ceA}$	$4,45 \pm 0,07^{deA}$	$4,45 \pm 0,09^{cdA}$	$4,35 \pm 0,04^{cdA}$	$4,33 \pm 0,05^{ceA}$
CLSS	$4,75 \pm 0,03^{aA}$	$4,57 \pm 0,02^{bA}$	$4,41 \pm 0,11^{cB}$	$4,32 \pm 0,06^{cA}$	$4,36 \pm 0,02^{cA}$	$4,38 \pm 0,04^{cA}$	$4,34 \pm 0,05^{cA}$	$4,32 \pm 0,03^{cA}$
SLSS	$4,76 \pm 0,03^{aA}$	$4,52 \pm 0,02^{bA}$	$4,49 \pm 0,04^{bB}$	$4,29 \pm 0,03^{cA}$	$4,32 \pm 0,01^{cA}$	$4,36 \pm 0,05^{cA}$	$4,30 \pm 0,01^{cA}$	$4,30 \pm 0,03^{cA}$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre os resultados dentro de uma mesma linha. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre resultados dentro de uma mesma coluna.

Figura 9 – Valores de pH dos iogurtes ao fim da produção e durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.



Para todas as formulações, os valores de pH reduziram significativamente até o dia 14, passando por um ligeiro aumento a partir do dia 21 e voltando a cair no dia 35. Houve diferença estatística entre as formulações apenas no dia 7.

Mohammadi-Gouraji, Soleimani-Zad e Ghiaci (2018), também observaram um aumento no pH de iogurtes no dia 21, atribuindo tal comportamento à produção de possíveis metabólitos, como aminoácidos, bacteriocinas e vitaminas ao fim da vida útil dos produtos. Porém, como o dia 21 foi o último dia analisado pelos autores, não é possível prever o comportamento do pH deste momento em diante.

Vénica et al. (2018) analisaram o pH de quatro formulações de iogurtes ao longo de 28 dias, sendo eles: tradicional (com e sem sacarose) e sem lactose (com e sem sacarose). Para todas as formulações analisadas houve redução do pH até o dia 21, sendo que a partir do dia 14 as diferenças foram bem discretas. No dia 28, os valores foram ligeiramente maiores que no dia 21, porém não houve diferença estatística. Apesar desta tendência de aumento no dia 28, não é possível prever se o perfil apresentado após esse dia seria semelhante ao encontrado neste estudo.

Mesmo a uma temperatura de armazenamento de 4°C , utilizada neste trabalho, é normal que haja uma queda nos valores de pH dos iogurtes ao longo dos dias em função da atividade metabólica residual das bactérias ácido-láticas viáveis presentes (BEAL et al., 1999; WEI et al., 2017), como ocorreu até o dia 14. Esta redução do pH no período de armazenamento refrigerado está relacionada com o aumento na concentração de ácido láctico, conhecido como pós-acidificação, já que sua produção não é interrompida após a refrigeração (KNEIFEL, JAROS; ERHARD, 1993; SAINT-EVE et al., 2008; CUTRIM et al., 2016; AKGUN; YAZICI; GULEC, 2016). Porém, com o passar do tempo, com a redução de carboidratos disponíveis, as

bactérias ácido-láticas podem degradar proteínas, promovendo o aumento do pH (SHAHBANDARI et al., 2016), como observado entre os dias 14 e 28.

Birollo, Reinheimer e Vinderola (2000) analisaram diferentes formulações de iogurtes retirados da produção normal de uma fábrica localizada nos arredores da cidade de Santa Fé, na Argentina. Os autores relataram uma queda de 4,35 a 4,20 nos valores de pH de iogurtes líquidos adoçados produzidos com leite integral (3,2% v/v de gordura) nos dez primeiros dias de armazenamento a 6°C e a partir de então, os valores de pH se mantiveram constantes até o 60° dia. Os iogurtes apresentavam estabilizantes em suas formulações, porém, não haviam conservantes. Possíveis justificativas para a estabilidade do pH em 4,20 até o fim do armazenamento são a redução da atividade metabólica das bactérias ácido-láticas nestes valores mais baixos de pH (JAY, 2005; TEIXEIRA, 2014) e a ação inibitória do açúcar adicionado sobre as bactérias ácido-láticas. O percentual deste ingrediente na formulação não foi indicado no trabalho, mas os iogurtes adoçados argentinos normalmente possuem muito açúcar (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2000), podendo inibir as culturas lácteas (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2000; OLIVEIRA, 2014).

Analizando a alteração do pH de iogurte sem sabor ao longo de 8 dias, sob armazenamento a 4°C, Wei et al. (2017) relataram uma queda de ~4,57 para 4,24 do dia 2 ao dia 8, condizente com este estudo.

Akgun, Yazici e Gulec (2016) acompanharam alterações de 4 formulações de iogurte de leite de búfala sem sabor ao longo de 20 dias de armazenamento a 4°C e também observaram uma redução do pH ao longo do período de armazenamento, variando de 4,60-4,64 a 4,35-4,39. Os autores atribuíram esta queda à produção de ácido láctico mesmo em temperaturas de refrigeração, o que condiz com a discussão já realizada anteriormente.

Não foram encontrados na literatura, estudos com tempo de análise suficiente, que relatassem uma queda no valor de pH, seguida de um aumento e posterior queda novamente, como encontrado neste trabalho. Portanto, não é possível afirmar o motivo pelo qual os valores de pH voltaram a cair a partir do dia 35. Uma hipótese levantada para estudos futuros, seria a degradação dos compostos possivelmente responsáveis pelo aumento do pH, formados no momento anterior.

5.2 Quantificação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência

Durante a pesquisa, a pré-coluna utilizada na análise cromatográfica foi danificada, impedindo a continuidade das análises a partir da terceira semana, uma vez que neste caso, fica vedado o uso da coluna até a aquisição de uma nova pré-coluna.

As concentrações de carboidratos dos iogurtes, referentes às semanas 1 e 2, estão dispostos na Tabela 7 a seguir:

Tabela 7 – Concentrações de carboidratos (g/L) nos iogurtes durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 3).

Carboidratos	Dias	Variedades de iogurtes			
		CLCS	CLSS	SLSS	SLCS
Sacarose	1	$69,17 \pm 2,12^{aA}$	$0,00 \pm 0,00^{aB}$	$0,00 \pm 0,00^{aB}$	$71,92 \pm 2,47^{aA}$
	7	$66,94 \pm 0,85^{aA}$	$0,00 \pm 0,00^{aB}$	$0,00 \pm 0,00^{aB}$	$69,60 \pm 1,46^{aA}$
Lactose	1	$29,24 \pm 1,34^{aA}$	$29,46 \pm 0,31^{aA}$	$0,00 \pm 0,00^{aC}$	$0,00 \pm 0,00^{aC}$
	7	$24,09 \pm 0,25^{bA}$	$24,70 \pm 0,25^{bB}$	$0,00 \pm 0,00^{aC}$	$0,00 \pm 0,00^{aC}$
Glicose	1	$1,26 \pm 0,00^{aB}$	nd*	$16,16 \pm 0,29^{aA}$	$16,26 \pm 0,91^{aA}$
	7	$0,99 \pm 0,04^{bB}$	$0,87 \pm 0,23^B$	$15,35 \pm 0,24^{bA}$	$15,47 \pm 0,66^{aA}$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro de um mesmo tratamento. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre tratamentos diferentes.

*Não detectado: concentração abaixo do nível de detecção.

Como observado na Tabela 7, houve alterações nas concentrações de carboidratos ao longo do período de armazenamento refrigerado dos iogurte, promovidas pela atividade metabólica residual das bactérias ácido-láticas viáveis (BEAL et al., 1999) assim como encontrado em estudo realizado por Vénica et al. (2018).

Uma redução considerável de lactose nas amostras CLCS e CLSS entre os dias 1 e 7 pode ser notada. Nas amostras CLCS e SLCS, houve uma redução na concentração de sacarose, ainda que não tenha sido estatisticamente significativa, indicando uma possibilidade de que as bactérias ácido-láticas tenham consumido parte deste açúcar.

O consumo de lactose foi ligeiramente maior na amostra CLCS, porém a diferença foi muito discreta, não sendo possível afirmar que este continuaria sendo o comportamento ao longo dos 35 dias de armazenamento restantes. Em estudo realizado por Vénica et al. (2018), o consumo de lactose ao longo do armazenamento foi menor para o iogurte tradicional com sacarose, se comparado ao iogurte tradicional sem este açúcar. Os autores não quantificaram a

sacarose, mas sugeriram que este menor consumo de lactose em iogurte adoçado, poderia ser decorrente do seu consumo como fonte de carbono. Como no caso do presente estudo, o iogurte com menor consumo de lactose não teve adição de sacarose, não pode ser feita a mesma sugestão.

Ao comparar o consumo de carboidratos na amostra CLCS, que tem sacarose e lactose em sua composição, é possível notar uma preferência das bactérias ácido-láticas pela lactose, já que seu consumo foi maior.

Assim como também observado por Rodriguez, Cravero e Alonso (2008), Cutrim et al. (2016) e Vénica et al. (2018), a concentração de glicose foi significativamente maior nas amostras com hidrólise enzimática da lactose, uma vez que neste processo há produção de glicose e galactose, seus monômeros constituintes.

No dia 1 de análise, a concentração de glicose na amostra CLSS foi indetectável, assim como ocorreu em estudo realizado por Vénica, Perotti e Bergamini (2014). Segundo estas autoras, isso ocorre uma vez que a glicose formada durante a fermentação é muito rapidamente utilizada para o crescimento das bactérias ácido-láticas.

Apesar do consumo de lactose nas amostras CLCS e CLSS, a concentração de glicose aumentou apenas em CLSS. O que acontece é que nestas duas amostras, a glicose é produzida e consumida simultaneamente, uma vez que as bactérias produzem glicose através da metabolização da lactose, mas também a consomem, já que é um carboidrato facilmente metabolizado pelas mesmas (CUTRIM et al., 2016). Sendo assim, pode-se afirmar que na amostra CLCS o consumo foi maior que a produção.

Como a sacarose é composta pelos monômeros glicose e frutose, possivelmente também houve formação de glicose na amostra SLCS, uma vez que a concentração de sacarose no dia 7 foi inferior à concentração do dia 1, apesar da redução não ter sido estatisticamente significativa. Mais uma vez, a redução de glicose, portanto, se deve ao seu maior consumo em relação à sua produção, o que condiz com a pequena redução na concentração de sacarose.

Já na amostra SLSS, que não possui sacarose nem lactose em sua composição, a glicose é apenas consumida, o que justifica a redução significativa entre a sua concentração nos dias 1 e 7.

Vénica et al. (2018) concluíram em estudo realizado, que o perfil do consumo de carboidratos por bactérias ácido-láticas durante a fermentação e ao longo da vida útil de iogurtes está diretamente relacionado com a composição da base láctea utilizada para produzi-los.

De acordo com Sobowale, Efuntoye e Adesetan (2011), a presença ou ausência de um açúcar, pode interferir na absorção de outro açúcar, o que pode justificar a diferença na taxa de consumo de carboidratos nas diferentes formulações.

5.3 Análises microbiológicas

Os resultados das contagens de bactérias ácido-láticas estão dispostos na Tabela 8 a seguir:

Tabela 8 – Mudança na contagem de bactérias ácido-láticas durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média $\pm$ desvio padrão; n = 3).

Dias	Contagem microbiológica (log UFC/g)							
	<i>Streptococcus thermophilus</i>				<i>Lactobacillus Bulgaricus</i>			
	SLCS	CLCS	CLSS	SLSS	SLCS	CLCS	CLSS	SLSS
1	$9,31 \pm 0,02^{\text{aA}}$	$9,13 \pm 0,09^{\text{abB}}$	$9,16 \pm 0,03^{\text{aB}}$	$9,03 \pm 0,00^{\text{aB}}$	$5,08 \pm 0,14^{\text{acA}}$	$4,53 \pm 0,03^{\text{abA}}$	$5,25 \pm 0,25^{\text{aA}}$	$5,59 \pm 0,01^{\text{aB}}$
7	$9,17 \pm 0,03^{\text{aA}}$	$9,29 \pm 0,09^{\text{aA}}$	$9,23 \pm 0,10^{\text{aA}}$	$9,28 \pm 0,08^{\text{bcA}}$	$5,29 \pm 0,20^{\text{abA}}$	$4,56 \pm 0,07^{\text{abA}}$	$5,23 \pm 0,25^{\text{aA}}$	$5,31 \pm 0,04^{\text{bA}}$
14	$9,31 \pm 0,14^{\text{aA}}$	$9,21 \pm 0,06^{\text{abA}}$	$9,23 \pm 0,04^{\text{aA}}$	$9,23 \pm 0,04^{\text{bcA}}$	$5,41 \pm 0,08^{\text{bAB}}$	$4,61 \pm 0,10^{\text{aC}}$	$5,29 \pm 0,22^{\text{abB}}$	$5,59 \pm 0,04^{\text{aA}}$
21	$9,14 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$9,20 \pm 0,03^{\text{abA}}$	$9,21 \pm 0,04^{\text{aA}}$	$9,18 \pm 0,05^{\text{acA}}$	$4,81 \pm 0,09^{\text{cdAB}}$	$4,44 \pm 0,00^{\text{abcB}}$	$5,12 \pm 0,14^{\text{aA}}$	$5,34 \pm 0,05^{\text{bC}}$
28	$9,17 \pm 0,07^{\text{aA}}$	$9,16 \pm 0,04^{\text{abA}}$	$9,19 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$9,23 \pm 0,04^{\text{acA}}$	$4,59 \pm 0,05^{\text{cdA}}$	$4,40 \pm 0,05^{\text{abcA}}$	$5,15 \pm 0,09^{\text{aB}}$	$5,22 \pm 0,07^{\text{bB}}$
35	$9,13 \pm 0,00^{\text{aA}}$	$9,08 \pm 0,05^{\text{bA}}$	$9,21 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$9,20 \pm 0,07^{\text{acA}}$	$4,13 \pm 0,18^{\text{dA}}$	$4,28 \pm 0,28^{\text{bcA}}$	$5,15 \pm 0,02^{\text{aB}}$	$4,38 \pm 0,30^{\text{cA}}$
42	$9,15 \pm 0,06^{\text{aA}}$	$9,18 \pm 0,08^{\text{abA}}$	$9,22 \pm 0,05^{\text{aA}}$	$9,11 \pm 0,08^{\text{acA}}$	$3,94 \pm 0,05^{\text{dA}}$	$4,19 \pm 0,11^{\text{bA}}$	$5,06 \pm 0,04^{\text{aB}}$	$4,02 \pm 0,04^{\text{cA}}$

Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) dentro de um mesmo tratamento. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($P < 0,05$) entre tratamentos diferentes.

Como pode ser observado na Tabela 8 de forma geral, houve menor estabilidade da cultura de *L. bulgaricus* ao longo do período de armazenamento refrigerado, sendo também a mais afetada pelos diferentes tratamentos em relação à cultura de *S. thermophilus*.

Em relação às contagens de *S. thermophilus*, apenas houve diferença estatística ao longo do tempo para a amostra CLCS, com uma contagem mínima no dia 35, e para a amostra SLSS, com um aumento na contagem no dia 7.

Se tratando das contagens de *L. bulgaricus*, não houve diferença significativa ao longo do tempo para a amostra CLSS. Para as demais amostras foram observados perfis distintos, porém, no dia 42, tanto o iogurte SLCS quanto o SLSS apresentaram contagens significativamente menores comparadas ao dia 1. A maior queda na contagem se deu no iogurte SLCS.

As contagens de *S. thermophilus* foram estatisticamente iguais entre os diferentes tratamentos em todos os dias de análise, com exceção do dia 1. Já as contagens de *L. bulgaricus*, foram estatisticamente diferentes entre os tratamentos em todos os dias de análise, com exceção do dia 7.

Em trabalho realizado por Vénica et al. (2018) não houve diferença significativa entre as formulações analisadas (tradicional e sem lactose, com e sem sacarose), indicando que as composições de carboidratos das diferentes bases lácteas não afetaram a viabilidades das bactérias ácido-láticas. Também não houve diferença significativa entre as contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* ao longo do armazenamento refrigerado, indicando boa estabilidade das mesmas nas diferentes matrizes. Estes autores encontraram valores variando de 9,1 a 9,3 log UFC/g e de 2,2 a 2,8 log UFC/g, para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, respectivamente. As contagens de *S. thermophilus* foram condizentes com o presente estudo, porém as contagens de *L. bulgaricus* foram inferiores.

Os iogurtes produzidos com leite sem hidrólise da lactose e sem adição de açúcar (CLSS) apresentaram contagens de bactérias ácido-láticas mais estáveis ao longo do tempo em relação aos demais.

Mohammadi-Gouraji, Soleimani-Zad e Ghiaci (2018), observaram uma queda significativa nas contagens de *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* ao longo de 21 dias de análise, de aproximadamente dois ciclos logarítmicos para as duas culturas em iogurte tradicional natural feito com leite desnatado, o que não condiz com o encontrado neste trabalho, já que para as amostras com lactose e sem sacarose não houve diferença significativa nas contagens ao longo do período de armazenamento.

Akgun, Yazici e Gulec (2016) analisaram a população de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em iogurtes tradicionais de leite de búfala com 3% de gordura (p/p) ao longo de 20 dias de armazenamento refrigerado. A contagem de *S. thermophilus* variou de 8,25 a 8,60 log UFC/g, não apresentando diferença significativa, o que indica uma boa estabilidade da cultura

ao longo da vida útil do iogurte. Os autores relataram contagens de *L. bulgaricus* variando de 6,33 a 5,20 log UFC/g, sendo portanto, inferiores às contagens de *S. thermophilus*, o que condiz com o presente trabalho. Apesar de uma redução nas contagens das duas bactérias ácido-láticas, apenas para *L. bulgaricus*, houve uma diferença estatística significativa, indicando menor estabilidade desta cultura ao longo do período de armazenamento, o que não condiz com o observado no presente estudo, em relação à formulação similar (CLSS), já que neste caso, as duas culturas se mantiveram estáveis ao longo dos 42 dias.

Oliveira et al. (2015) adquiriram no mercado local, iogurte natural baixo em gordura, no início da sua vida útil e acrescentaram diferentes concentrações de um mix de morango de produção própria, produzindo formulações diferentes de iogurtes sabor morango. Os iogurtes controle (sem adição do mix) apresentaram contagens de *L. bulgaricus* variando de ~6 a ~3,5 log UFC/mL, enquanto as contagens de *S. thermophilus* variaram de ~7,5 a ~7 log UFC/mL, indicando maior estabilidade da cultura de *S. thermophilus* ao longo do período de armazenamento refrigerado, assim como observado por Akgun, Yazici e Gulec (2016).

Os perfis de viabilidade das bactérias ao longo do armazenamento refrigerado, podem ser melhor observados na Figura 10 e na Figura 11 abaixo.

Figura 10 – Contagem de *S. thermophilus* durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média; n = 3).

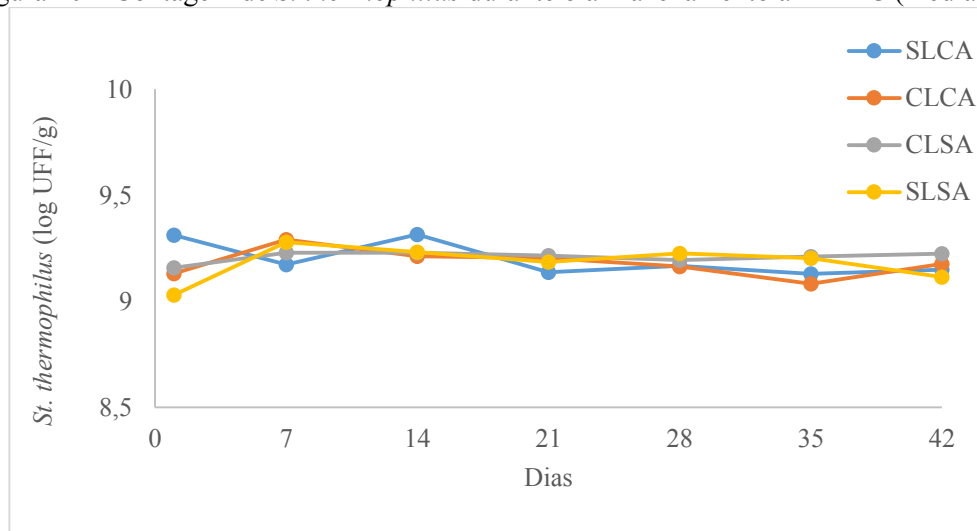
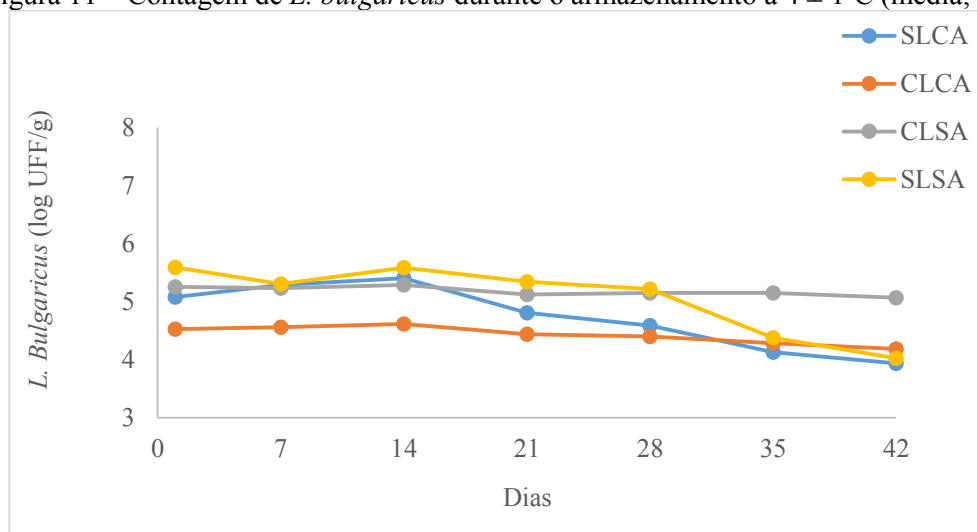


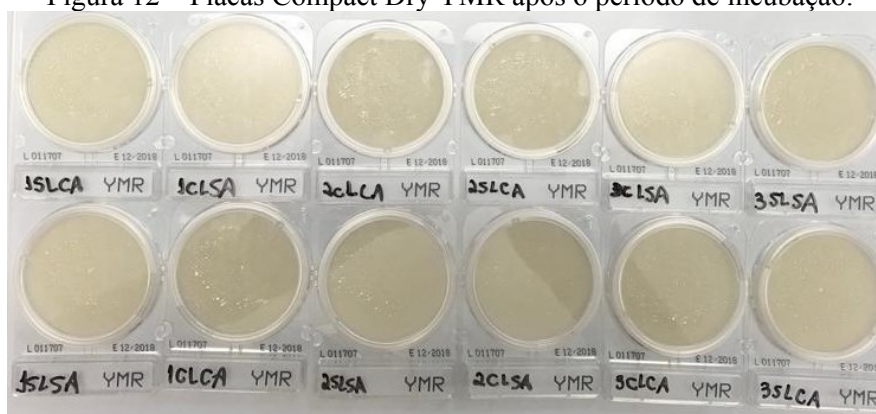
Figura 11 – Contagem de *L. bulgaricus* durante o armazenamento a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (média; $n = 3$).



Não foi detectada a presença de coliformes em nenhuma das formulações produzidas, assim como de bolores e leveduras, indicando boa qualidade microbiológica e eficácia nos cuidados higiênico-sanitários nas etapas de produção e acondicionamento (AKGUN; YAZICI; GULEC, 2016; BARKALLAH et al., 2017).

A Figura 12 abaixo mostra as placas YMR após o período de incubação, sem crescimento de bolores e leveduras.

Figura 12 – Placas Compact Dry YMR após o período de incubação.



Fonte: Os autores (2018).

Birollo, Reinheimer e Vinderola (2000), Akgun, Yazici e Gulec (2016) e Barkallah et al. (2017) também não detectaram a presença de coliformes em iogurtes produzidos em seus estudos. Dentre os trabalhos destes autores, apenas no de Akgun, Yazici e Gulec (2016) houve crescimento de bolores e leveduras, enquanto nos demais, estes microrganismos não foram detectados nem mesmo após 4 semanas de armazenamento a 4°C .

Akgun, Yazici e Gulec (2016) encontraram contagens de bolores e leveduras variando de 0,4 log UFC/g a 5,7 log UCF/g do dia 1 ao dia 20 de armazenamento para o iogurte tradicional produzido a partir de leite de búfala com 3% (p/p) de gordura e sem sacarose. Apesar do crescimento significativo destes microrganismos, a contagem de *S. thermophilus* não variou estatisticamente durante o armazenamento, porém, a população de *L. bulgaricus* reduziu em aproximadamente 1 ciclo logarítmico. Alguns autores relacionaram a redução na população de *L. bulgaricus* ao crescimento da população de leveduras (CANGANELLA et al., 1998; VILJOEN et al., 2003). Esta relação é coerente, considerando os resultados obtidos no presente trabalho, já que não houve crescimento de bolores e leveduras em nenhuma das formulações e tanto a população de *S. thermophilus* quanto a de *L. bulgaricus* na amostra similar (CLSS) permaneceram estatisticamente invariáveis ao longo do armazenamento.

6 CONCLUSÃO

As mudanças nas concentrações de carboidratos nos iogurtes produzidos, bem como as alterações de pH ao longo do armazenamento refrigerado, comprovam a atividade residual das bactérias ácido-láticas viáveis mesmo sob baixa temperatura ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

As composições de carboidratos das formulações interferiram na estabilidade das contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, sendo a formulação com lactose/sem sacarose (CLSS) a que promoveu maior estabilidade às culturas ao longo do armazenamento. A estabilidade de *S. thermophilus* foi menos afetada pela composição de carboidratos em relação à estabilidade de *L. bulgaricus*.

As análises microbiológicas indicaram boa qualidade higiênico-sanitária dos iogurtes, comprovando a eficácia dos cuidados tomados nas etapas de produção, já que não houve crescimento de coliformes, bolores e leveduras.

Para trabalhos futuros, sugere-se que o pH de iogurtes sejam acompanhados por um tempo semelhante ao adotado neste estudo, ou superior, e que sejam identificados e quantificados compostos que são formados ao longo do armazenamento refrigerado, bem como aqueles que são degradados, para tentar justificar o perfil de oscilação do pH ao longo dos dias. Tal sugestão se deve ao resultado obtido neste trabalho, já que foi observada uma redução no pH até o dia 14, seguida de uma elevação no dia 21 e queda novamente, a partir do dia 35 para todas as formulações, deixando claro que a produção de ácido láctico não é o único fator que interfere no pH de iogurtes ao longo do tempo de armazenamento.

Um estudo futuro será realizado assim que uma nova pré-coluna for adquirida, com o intuito de acompanhar as concentrações de carboidratos em iogurtes por um período maior de armazenamento refrigerado, relacionando-as com os valores de pH e contagens de bactérias ácido-láticas.

REFERÊNCIAS

- ADILAC - ASOCIACIÓN DE INTOLERANTES A LA LACTOSA ESPAÑA. **La intolerância**: Qué es la lactasa? 2016. Disponível em: <<https://lactosa.org/la-intolerancia/primeras-preguntas/>>. Acesso em: 05 jul. 2018.
- ADOLFSSON, O.; MEYDANI, S. N.; RUSSELL, R. M. Yogurt and gut function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [S.l.], v. 80, p. 245–256, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcn/article/80/2/245/4690304>>. Acesso em: 03 dez. 2018.
- AKGUN, A.; YAZICI, F.; GULEC, H. A. Effect of reduced fat content on the physicochemical and microbiological properties of buffalo milk yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], 2016. No prelo, doi: 10.1016/j.lwt.2016.08.015.
- AL-ASHMAWY, M. A. M.; IBRAHIM, J. I. Influence of potassium sorbate on the growth of yeasts and moulds in yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, [S.l.], v. 62, n. 2, mai. 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-0307.2009.00463.x>>. Acesso em: 03 dez. 2018.
- AOAC International. **Official Methods of Analysis**. 17. ed., (revisão 2). AOAC International, Gaithersburg, MD, 2003.
- BALLEW, C.; KUESTER, S.; GILLESPIE, C. Beverage Choices Affect Adequacy of Children's Nutrient Intakes. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**, [S.l.], v. 154, p. 1148-1152, nov. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11074858>>. Acesso em: 01 dez. 2018.
- BARKALLAH, M. et al. Effect of Spirulina platensis fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. **LWT - Food Science and Technology**, 2017. No prelo, doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.071.
- BEAL, C. et al. Combined Effects of Culture Conditions and Storage Time on Acidification and Viscosity of Stirred Yogurt. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 82, p. 673-681, 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030299752835>>. Acesso em: 01 dez. 2018.
- BIROLLO, G. A.; REINHEIMER, J. A.; VINDEROLA, C. G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, [S.l.], v. 33, p. 799-805, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996900001010>>. Acesso em: 02 dez. 2018.
- BRASIL. 1998. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Publicada no DOU nº 10, de 15 de janeiro de 1998 e republicada no DOU nº 60, de 30 de março de 1998. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção 1.

BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 set. 2003, Seção 1, p. 14.

BRASIL. 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 4.

BRASIL. 2017. Ministério da Saúde – MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 135, de 8 de fevereiro de 2017. Altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 9 fev. 2017, nº 29, Seção 1, pág. 44.

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal of Dairy Technology**, [S.l.], v. 50, n.1, 1997. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-0307.1997.tb01731.x>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

CANGANELLA, F. et al. Survival of undesirable micro-organisms in fruit yoghurts during storage at different temperatures. **Food Microbiology**, [S.l.], v. 15, p. 71–77, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002097901428>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

CATALDI, T. R. I., ANGELOTTI, M.; BIANCO, G. Determination of mono- and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Analytica Chimica Acta**, [S.l.], v. 485, p. 43–49, 2003. No prelo. 10.1016/S0003-2670(03)00405-7.

CUTRIM, C. S. et al. Survival of Escherichia coli O157:H7 during manufacture and storage of traditional and low lactose yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], v. 70, p. 178-184, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816301268>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

ERICH, S.; ANZMANN, T.; FISCHER, L. Quantification of lactose using ion-pair RP-HPLC during enzymatic lactose hydrolysis of skim milk. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 135, p. 2393–2396, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612011739>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

ESKIN, N. A. M.; GOFF, H. D. Leite. In: ESKIN, N. M. M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 169-193.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Dairy Market Review**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9210EN/i9210en.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO - World Health Organization. **Human Vitamin and Mineral Requirements**. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-y2809e.pdf>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: Princípios e prática. Tradução: Florencia Cladera Oliveira et al. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FOOD E FEED ANALYSIS. **Compact Dry YMR**. 2018. Disponível em: <<https://food.r-biopharm.com/products/compact-dry-ymr/>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

FOX, P. F. Bovine milk. In: FUQUAY, J. W. FOX, P. F., MCSWEENEY, P, L. H. **Reference Module in Food Science**: Encyclopedia of Dairy Sciences, [S.l.], 2. ed., Academic Press, 2011. p. 478-483. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744074003125>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

GAUCHERON, F. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. **Journal of the American College of Nutrition**, [S.l.], v. 30, n.5, p.400S-409S, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081685>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

GEZGINC, Y. et al. Quantitative analysis of the lactic acid and acetaldehyde produced by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* strains isolated from traditional Turkish yogurts using HPLC. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1426-1434, mar. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214008881>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

HAYNES, W. M. (editor chefe). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. Lide, D. R e Bruno. T, J (editores associados). 93. ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

HEYMAN, M. B. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. **Pediatrics**, [S.l.], v. 118, n. 3, set. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951027>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Tradução: Eduardo Cesar Tondo et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

KNEIFEL, W., JAROS, D.; ERHARD, F. Microflora and acidification properties of yogurt and yogurt-related products fermented with commercially available starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 18, n. 3, p.179-189, 1993. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059390043G>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

KOBLITZ, M. G. B. Carboidratos. In: KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos**: Teoria e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p 19-76.

KWON, D. Y.; NYAKUDYA, E.; JEONG, Y. S. Fermentation: Food Products. **Reference Module in Food Science**: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems, p. 113-123, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444525123001558>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

LABAYEN, I. et al. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.l.], v. 15, p. 543-549, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11284784>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

LOMER, M. C. E; PARKES, G. C; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, [S.l.], v. 27, p. 93–103, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956597>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

MAGENIS, R. B. et al. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v. 41, p. 560–568, 2006. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301065614>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

MATUMOTO-PINTRO, P. T.; RABIEY, L.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. Use of modified whey protein in yoghurt formulations. **International Dairy Journal**, [S.l.], v. 21 p. 21-26, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694610001755>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

MCKINLEY, M. C. The nutrition and health benefits of yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, [S.l.], v. 58, n. 1, fev. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-0307.2005.00180.x>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

MOHAMMADI-GOURAJI, E.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], 2018. No prelo, doi: 10.1016/j.lwt.2018.09.057.

MOREIRA, T. C. et al. Elaboration of yogurt with reduced level of lactose added of carob (*Ceratonia siliqua* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, parte B, p. 326-329, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816305199>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

MORLOCK, G. E.; MORLOCK, L. P.; LEMO, C. Streamlined analysis of lactose-free dairy products. **Journal of Chromatography A**, [S.l.], v. 1324, p. 215-223, jan. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002196731301827X>>. Acesso em 01 dez. 2018.

NEVES, L. N. O. **Desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas para avaliação de indicadores de tratamento térmico em leite UHT**. 2015. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

OH, N. S. et al. Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* L. leaf extracts 2016. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 99, n. 8, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216302995>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

OLIVEIRA, A. et al. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 171, p. 370-378, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614013326>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

OLIVEIRA, M. N. 2014. Fermented Milks and Yogurt. **Reference Module in Food Science: Encyclopedia of Food Microbiology**, [S.l.], v. 1, p. 908-922, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012384730000121X>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

OLIVEIRA, M. N. Características funcionais de leites fermentados e outros produtos lácteos. In: OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Artheneu, 2009. p. 21-84.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**: Alimentos de origem animal. Tradução: Fátima Murad. v. 2. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

PENNA, A. L. B. O leite: Importância biológica, industrial e comercial. Fisiologia da produção de leite- composição, propriedades físico-químicas, análises. In: OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Artheneu, 2009. p. 21-84.

PEREIRA, P. C.; VICENTE, F. Milk Nutritive Role and Potential Benefits in Human Health. In: WATSON, R. R.; COLLIER, R. J.; PREEDY, V. R. **Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease**. [S.l.]: Academic Press, 2017. p. 161-176. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128097625000139>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p. 109-115, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612008000500018>. Acesso em: 02 dez. 2018.

SAINT-EVE, A. et al. Quality changes in yogurt during storage in different packaging materials. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 110, p. 285-293, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460800160X>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

SERT, D.; MERCAN, E.; DERTLI, E. Characterisation of lactic acid bacteria from yogurt-like product fermented with pine cone and determination of their role on physicochemical, textural and microbiological properties of product. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], 2017. No prelo. doi: 10.1016/j.lwt.2016.12.023.

SHAHBANDARI, J. et al. Effect of Storage Period on Physicochemical, Textural, Microbial and Sensory Characteristics of Stirred Soy Yogurt. **International Journal of Farming and Allied Sciences**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. 476-484, 2016. Disponível em: <<http://ijfas.com/wp-content/uploads/2016/09/476-484.pdf>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

SHENDURSE A. M.; KHEDKAR, C. D. Lactose. **Reference Module in Food Science: Encyclopedia of Food and Health**, [S.l.], p. 509-516, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849472004153>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 53, n. 5, p. 482-496, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23391015>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 29, p. 591-610, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168644505000252>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

SOBOWALE, A. A.; EFUNTOYE, M. O.; ADESETAN, O. O. Energy sources of yoghurt bacteria and enhancement of their galactose uptake. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 10, n. 21, p. 4457-4463, 2011. Disponível em: <<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93648>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

SODINI, I. et al. Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and Probiotic Cell Counts in Fermented Milk Processing. **Journal of Dairy Science**, [S.l.], v. 85, n. 10, out. 2002, p. 2479-2488. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030202743300>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

STANTON, C.; McMAHON, D.; MILLS, S. Dairy components, products and human health. In: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; McMAHON, D. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, p. 207-242. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

SUPELCO. **HPLC: Small Molecules**. Disponível em: <<http://www.supelco.com.tw/B-1%2013-66.pdf>>. Acesso em 20 de junho de 2018.

TABASCO, R. et al. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei subsp. paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. **International Dairy Journal**, [S.l.], v. 17, p. 1107-1114, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694607000222>>. Acesso em: 01 dez. 2018.

TEIXEIRA, P. *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, [S.l.], 2. ed. v. 2, p. 425-431, 2014.

TRANI, A. et al. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and enzymatic assays for the analysis of residual lactose in lactose-free milk. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 233, p. 385–390, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617307136>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 5. ed. Santa Maria: editoraufsm, 2013. 208 p.

VÉNICA, C. I. et al. Effect of the carbohydrates composition on physicochemical parameters and metabolic activity of starter culture in yogurts. **LWT - Food Science and Technology**, [S.l.], 2018. No prelo, doi: 10.1016/j.lwt.2018.04.034.

VÉNICA, C. I.; PEROTTI, M. C.; BERGAMINI, C. V. Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. **Dairy Science & Technology**, [S.l.], v.94, p. 561-580, 2014. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201500027205>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

VESA, T. H, MARTEAU P, KORPELA, R. Lactose intolerance. **The Journal of the American College of Nutrition**, v.19, n.2, p. 165S-175S, abr. 2000 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759141>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

VILJOEN, B. C. et al. Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt. **Food Research International**, [S.l.], v. 36, p. 193–197, 2003. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996902001382>>. Acesso: 02 dez. 2018.

WEAVER, C. Milk and dairy products as part of the diet. In: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, p. 103-206. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

WEI, Z. et al. Monitoring the fermentation, post-ripeness and storage processes of set yogurt using voltammetric electronic tongue. **Journal of Food Engineering**, [S.l.], 2017. No prelo, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.01.022.

WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Milk and dairy product composition. In: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Milk and dairy products in human nutrition**. Roma: FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013, p. 41-102. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3396e/i3396e.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2018.

YAMAMOTO, N. Fermented Milks: Health Effects of Fermented Milks. **Reference Module in Food Sciences**, [S.l.], 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965007757>>. Acesso em: 03 dez. 2018.