Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v76i2.847

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE BEBIDA LÁCTEA PROBIÓTICA, FONTE DE PROTEÍNA

Development and microbiological and physicochemical characterization of probiotic dairy beverage, source of protein

Gabryelle Araújo Coutinho[1], Pollyanna Cardoso Pereira[1], Ana Luísa Pacheco Solar Fernandes[1], Juliana Nogueira Santos Zambaldi[1], Fernanda de Fátima Fonseca[1]*

RESUMO

Bebida láctea fermentada consiste em uma inovação e alternativa de produto lácteo refrigerado, com alto valor agregado. O soro de leite fermentado por bactérias probióticas, em quantidades apropriadas, proporciona benefícios à saúde, tendo as proteínas como os componentes de maior valor nutricional. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar duas formulações (F1 e F2) de bebidas lácteas probióticas, fonte de proteínas, com as culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1); e *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2). Após o desenvolvimento realizou-se análise microbiológica, físico-química e composição centesimal das duas formulações e constatou-se que as bebidas lácteas atenderam à legislação quanto à viabilidade das bactérias probióticas, no consumo de uma porção (100 g), durante o armazenamento refrigerado a 7 ºC por 21 dias, com contagens médias de 10^7 e 10^8 UFC/g. As formulações apresentaram acidez elevada e pH baixo: 0,846%; pH 4,53 (F1) e 1,017%; pH 4,30 (F2). O teor médio de proteínas foi de 11,33% e 11,53% na F1 e F2 respectivamente, sendo consideradas fontes de proteínas, segundo a Resolução nº 54/2012 da ANVISA.

Palavras-chave: inovação; soro do leite; *Lactobacillus acidophilus*; *Lacticaseibacillus paracasei*.

1 Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Rodovia LMG 818, km 06, s/n, 35690-000, Florestal, MG, Brasil. E-mail: coutinhogabryelle@gmail.com.

* Autor para correspondência.

Recebido / Received: 05/10/2020
Aprovado / Approved: 18/12/2020

ABSTRACT

Fermented dairy beverage is an innovation and alternative to a refrigerated dairy product, with high added value. Whey fermented by probiotic bacteria, in appropriate amounts, provides health benefits, with proteins as the components with the highest nutritional value. The objective of this work was to develop and characterize two formulations (F1 and F2) of probiotic dairy beverages, protein source, with cultures of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1); and *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus*, and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2). After the development, microbiological, physicochemical, and centesimal composition analyses of the two formulations were carried out and it was found that the dairy drinks were in accordance with the legislation regarding the viability of probiotic bacteria, in the consumption of a portion (100 g), during refrigerated storage. at 7 ºC for 21 days, with average counts of 10^7 and 10^8 CFU/g. The formulations showed high acidity and low pH: 0.846%; pH 4.53 (F1) and 1.017%; pH 4.30 (F2). The average protein content was 11.33% and 11.53% in F1 and F2 respectively, being considered protein sources, according to ANVISA Resolution nº 54/2012.

Keywords: innovation; whey; *Lactobacillus acidophilus*; *Lacticaseibacillus paracasei*.

INTRODUÇÃO

A bebida láctea probiótica, fonte de proteína, visa atender às mulheres que necessitam de um enriquecimento proteico adicional à alimentação e aqueles que buscam por alimentos saudáveis, que sejam seguros e de consumo fácil e prático. As proteínas fazem parte da formação dos tecidos nos corpos das mulheres (útero, mamas, placenta, líquido amniótico), assim essas necessitam de aproximadamente 0,8 g de proteína por kg por dia (0,8 g/kg/dia), de origem animal (TRUMBO *et al*., 2002; TEIXEIRA NETO, 2003). Concomitantemente, pesquisas têm proposto que a ingestão de aproximadamente 1,2 g de proteína/kg/dia seria mais eficiente na manutenção da massa magra (McDONALD *et al*., 2016; PHILLIPS *et al*., 2016).

Para a indústria de laticínios, o aproveitamento do soro líquido do leite em bebidas lácteas é uma alternativa atrativa para a utilização do soro no consumo humano, devido a facilidade do processo, redução de impactos ambientais, pois é um resíduo com alto teor orgânico, das propriedades funcionais das proteínas do soro, além do teor de lactose e outros nutrientes que faz do soro uma matéria-prima potencial ao desenvolvimento de micro-organismos probióticos (MAGALHÃES *et al*., 2011; NUNES *et al*., 2018). Nesse contexto, a aplicação das bactérias probióticas, também, tem sido muito explorada pela indústria de laticínios como uma ferramenta para o desenvolvimento de produtos funcionais.

O uso do soro de leite associado à fermentação por bactérias probióticas, quando administrados em quantidades apropriadas, proporciona benefícios à saúde, como a redução da frequência e duração de diarreia associada a antibióticos, estimulação da imunidade celular, diminuição de metabólitos desfavoráveis, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori* e do colesterol sérico, redução de atividade carcinogênica do colón

pela possibilidade de influenciar funções metabólicas, imunológicas e protetoras, dentre outros (VIVEK *et al*., 2019; REIS *et al*., 2017; DJALDETTI; BESSLER, 2017; SANTOS FILHO *et al*., 2019).

Tem-se vários estudos com o uso de bactérias probióticas utilizadas em leites fermentados (ACU *et al*., 2021; ALMEIDA, 2019; BARBOSA *et al*., 2011; PIRES, 2016; FLESCH *et al*., 2014; VILLENA; KITAZAWA, 2017). Contudo, o desenvolvimento de produtos com *Lactobacillus acidophilus*, consorciado a outros micro-organismos probióticos, com substâncias benéficas a saúde, ainda é incipiente no Brasil, devido a sua baixa aceitação sensorial, ocasionada pela acidez elevada. Outra bactéria probiótica usualmente utilizada em leites fermentados por acarretar um nível menor de acidez no produto final é o *Lacticaseibacillus paracasei* (MACHADO *et al.*, 2017; SCARIOT *et al.*, 2018).

Objetivou-se neste trabalho desenvolver formulações de bebidas lácteas fermentadas probióticas fonte de proteínas com as culturas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1); e *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2) caracterizando-as quanto à composição centesimal, estabilidade durante armazenamento refrigerado por 21 dias e análise físico-química.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Para a avaliação da estabilidade da bebida láctea em relação ao pH, a acidez e a viabilidade das bactérias probióticas, utilizou-se o esquema fatorial 2x4 em que os fatores foram a composição das culturas probióticas F1 e F2 e o tempo de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias). Os oito tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, totalizando 24 unidades experimentais (U.E.). As repetições constituíram-se por diferentes dias de elaboração das formulações das bebidas lácteas probióticas.

Para a caracterização da composição centesimal utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, no tempo zero, por serem parâmetros não condicionados a grandes variações pelo fator armazenamento.

Caracterização do leite e do soro para a fabricação das bebidas lácteas

Para elaboração da bebida láctea utilizou-se o leite pasteurizado da marca Coopará (Pará de Minas, MG, Brasil). O soro de leite foi obtido do processamento do queijo Minas Frescal, na Universidade Federal de Viçosa – UFV, *Campus* Florestal.

A determinação do pH foi realizada diretamente nos produtos utilizando-se um potenciômetro digital, segundo Zenebon *et al*. (2008). Foram realizadas análise de acidez determinadas pela titulação ácido-alcalimétrica; o percentual de gordura realizadas por meio do método de Gerber. A densidade foi determinada por meio do termolactodensímetro, o extrato seco total foi determinado pelo disco de Ackermann e o extrato seco desengordurado por meio da subtração do percentual de gordura do valor obtido para o extrato seco total. As análises foram feitas conforme a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006) e foram realizadas em triplicatas.

Preparação das culturas lácteas

A cultura mista liofilizada contendo *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus*

delbrueckii subsp. *bulgaricus* (Rica Nata) e as culturas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12® Chr. Hansen), *Lactobacillus acidophilus* (LA-5® Chr. Hansen) e *Lacticaseibacillus paracasei* (F-19® Chr. Hansen) foram dissolvidas assepticamente em um litro de leite integral esterilizado e resfriado a 5 ºC, e distribuídas em frascos esterilizados, mantidos à temperatura de -18 ºC.

As culturas foram descongeladas e inoculadas diretamente na mistura de leite e soro já pasteurizado, para a fabricação da bebida láctea fermentada, na proporção recomendada pelos fabricantes.

Preparação das bebidas lácteas

As bebidas lácteas foram elaboradas e avaliadas nas instalações do Setor de agroindústria, laticínios, laboratórios de leite e derivados e microbiologia de alimentos, da UFV *Campus* de Florestal.

Na formulação das bebidas lácteas (F1 e F2) utilizou-se a proporção de leite (70%) e soro de leite (30%). O soro de leite foi aquecido a 71 ºC para inativação das enzimas presentes no coalho. À mistura de soro e leite foi adicionado isolado proteico (Probiótica), na proporção mínima de 6 g/ 100 g, atendendo a alegação de fonte de proteína. O açúcar cristal, na proporção de 8%, e o estabilizante gelatina incolor sem sabor em pó, na proporção de 0,5% também foram adicionados. A mistura foi aquecida até 85 ºC e mantida por 10 minutos em banho termostatizado.

Em seguida, a mistura foi resfriada em banho de água e gelo até atingir 40 ± 1 ºC e as culturas láticas foram inoculadas em condições assépticas. Na formulação 1 (F1) as culturas láticas foram compostas por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e na formulação 2 (F2) as culturas láticas foram compostas de *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

A fermentação foi realizada em estufa a 40 ± 1 ºC. O tempo de fermentação da bebida láctea foi calculado a partir do início da inoculação, até se obter o valor de pH próximo a 4,6-4,7 sendo posteriormente refrigerada a 4 ºC. Em seguida, realizou-se a quebra do coágulo, durante 30 segundos por agitação manual a qual seguiu a adição do preparado de morango (Borsato). As bebidas foram embaladas em garrafas de polietileno e armazenada sob refrigeração para análises posteriores (FERREIRA, 2001).

Vida útil das bebidas lácteas

Foram realizadas análises de pH de acordo com Zenebon *et al*. (2008) e acidez titulável (BRASIL, 2006) nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, a 7 ºC e a determinação de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lacticaseibacillus paracasei* foram realizadas pela técnica de *pour plate*, de acordo com Pereira *et al*. (2009) e Soave (2007).

Avaliação do efeito do armazenamento sobre a viabilidade das bactérias probióticas

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* utilizou-se o meio de cultura ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) modificado com adição de 0,15% (m/v) de bile (MRS-Bile) (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999). Para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* utilizou-se o meio MRS modificado com adição de 0,2% (m/v) de lítio e 0,3% (m/v) de propionato de sódio (MRS-LP) de acordo com Lapierre *et al*. (1992), usando o meio base sugerido em Vinderola; Reinheimer (1999) e agentes inibidores sugeridos por Zacarchenco; Massaguer-Roig (2004). Para a contagem de

Lacticaseibacillus paracasei utilizou-se o meio Manitol ágar com o pH ajustado para 6,5, sem adição de cloreto de sódio segundo o método de Kristo *et al*. (2003).

As placas com MRS-Bile e MRS-LP foram incubadas a 37 ºC por 72 h (LIMA *et al*., 2009; VINDEROLA; REINHEIMER, 1999), e as placas com MRS-Manitol ágar foram incubadas a 30 ºC por 48 h (RAVULA; SHAH, 1998). As contagens foram descritas em log UFC/g e os plaqueamentos foram realizados em triplicatas.

Análise da composição centesimal

Para a caracterização das bebidas lácteas, foram realizadas as análises de umidade, teor de proteína, cinzas, lipídeos e carboidratos, no tempo zero, segundo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Análises dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas no software SAS, versão 9.2 (*Statistical Analysis System – SAS Institute Inc*., Cary, NC, USA), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, em 5% de significância. Os efeitos principais e das interações, duplas e tripla, dos fatores formulações das bebidas lácteas probióticas e do tempo sobre os indicadores de qualidade físico-químicos e microbiológicos foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA).

De acordo com as significâncias das interações obtidas na ANOVA, os efeitos das formulações foram testados pelo teste F e o efeito dos tempos foram testados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização físico-química do leite e do soro de queijo utilizados na elaboração da bebida láctea estão descritos na Tabela 1. O leite utilizado na elaboração das bebidas lácteas está dentro dos padrões exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2018).

Tabela 1 – Caracterização do leite e soro de leite

Análises	Leite	Soro de leite
pH	6,68	6,73
Acidez (g de ác. lático/ 100 mL)	0,15	0,10
Gordura (%)	3,0	1,2
Densidade (g/mL)	1,0325	1,0264
Sólidos totais (%)	11,99	8,7

Almeida (2019), no desenvolvimento de bebida láctea fermentada com polpa de açaí, encontrou valores similares aos deste trabalho para pH, acidez e gordura do leite – 6,59, 0,14 g de ácido lático/ 100 mL e 3,3%, respectivamente, e do soro do leite – 6,14, 0,12 g de ácido lático/ 100 mL e 0,57%, respectivamente.

Vida útil das bebidas lácteas

Os resultados médios de pH, acidez titulável e células viáveis de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* e *Lacticaseibacillus paracasei* estão descritos na Tabela 2.

Determinações de pH e acidez

Segundo Enujiugha; Badejo (2017) e Swain *et al*. (2014), o valor do pH interfere na viabilidade dos micro-organismos probióticos em leites fermentados e com a diminuição desse, verifica-se uma redução nas contagens de culturas mistas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* durante o armazenamento sob refrigeração.

Tabela 2 – Características físico-químicas e microbiológicas de diferentes formulações de bebida láctea em 4 tempos de armazenamento

Característica[1]	Formulação		Tempo (dias)				P(F)*		
	F1	F2	0	7	14	21	F	T	F×T
Análises Físico-químicas									
pH	4,53 ± 0,10	4,30 ± 0,11	4,69 ± 0,15	4,39 ± 0,16	4,33 ± 0,11	4,26 ± 0,17	0,14	0,24	0,72
Acidez[2]	0,846 ± 0,045	1,017 ± 0,057	0,847 ± 0,014	0,885 ± 0,045	0,999 ± 0,092	0,995 ± 0,120	0,04	0,40	0,80
Análises Microbiológicas[3]									
Bifidobacterium	6,50 ± 0,12	8,13 ± 0,16	6,98 ± 0,27	7,51 ± 0,39	7,40 ± 0,76	7,37 ± 0,40	<0,0001	0,105	0,025
Lactobacillus acidophillus	7,50 ± 0,22		8,18 ± 0,11	7,34 ± 0,65	6,80 ± 0,006	7,44 ± 0,09		0,19	
Lacticaseibacillus paracasei		7,85 ±0,26	7,63 ± 0,64	7,62 ± 0,67	7,98 ± 0,54	8,17 ± 0,44		0,89	

***P(F)**: Probabilidade do teste F da ANOVA; **F**: Formulação; **T**: Tempo; **FxT**: Interação entre Formulação e Tempo.

[1] Médias ± Erro Padrão.

[2] Acidez em % (m/m) de ácido lático

[3] Análises microbiológicas em log UFC/g

No presente trabalho, tal fato ocorreu com *Lactobacillus acidophilus*, contudo o micro-organismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, não apresentou redução na multiplicação durante o armazenamento refrigerado, mesmo com o baixo pH das formulações, causado pelas culturas mistas liofilizadas utilizadas na fermentação das bebidas.

Os resultados médios do pH e da acidez, da bebida láctea fermentada por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1) foram 4,53 e 0,846 g de ácido lático/ 100 g respectivamente. A bebida láctea fermentada por *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2) obteve o pH 4,30 e 1,017 g de ácido lático/ 100 g, conforme descrito na Tabela 2.

Valores semelhantes a F1 foram encontrados por Thamer; Penna (2006), nas bebidas lácteas contendo *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* e um ingrediente prebiótico, o valor de pH variou de 4,72 a 4,83 e a acidez titulável variou de 44,33 a 50,39 graus Dornic (0,44% a 0,50% de acidez expres sa em ácido lático). Pelais *et al*. (2020), encontraram valores de pH entre 3,23 e 2,97 em néctares de taperebá adicionados de *Lactobacillus acidophilus.*

Zarpelon (2017), avaliando o desenvolvimento de bebida probiótica fermentada de beterraba, cenoura e maçã, alcançou resultados parecidos, onde ocorreu um decréscimo acentuado no pH de 4,81 a 3,57.

Tendências semelhantes à formulação F2 foram obtidas no estudo realizado por Bandiera *et al*. (2013), no qual verificaram que os iogurtes contendo *L. casei* tiveram redução do valor de pH de 4,9 após a fermentação para 4,3 no período de armazenamento. Ferreira (2016) encontrou valores de pH entre 5,3 e 4,7 na formulação controle da pesquisa sobre *L. casei* em leites fermentados enriquecidos com biomassa de banana verde, percebendo ainda que os valores de pH decaíram significativamente ao longo do período de 28 dias de estocagem.

Observou-se também, a partir da análise de correlação, uma correlação negativa entre o pH e a multiplicação de *L. casei*, ou seja, quando o pH do meio reduziu observou-se maiores valores na contagem dessa bactéria lática. A bactéria produz ácido lático o qual estimula seu crescimento no meio. Faria *et al*. (2006) e Ames (2019), reportaram similaridade com o presente trabalho, no qual a redução do pH, de 4,5 a 4,0, e o aumento da acidez contribuiu para a viabilidade da cultura de *L. casei*.

A bebida láctea da formulação F1, fermentada por *Lactobacillus acidophillus* apresentou diferença significativa ($P \leq 0,05$) quanto à acidez titulável em relação à formulação F2 contendo *Lacticaseibacillus paracasei* – se acidificou mais que a formulação contendo *L. acidophillus*. No decorrer dos 21 dias de armazenamento, em ambas as formulações, observou-se um aumento da acidez e a redução do pH, contudo essa diferença não foi significativa ($P > 0,05$).

De acordo com Kumar; Kumar (2016) e Pelais *et al*. (2020), a redução de pH e o aumento da acidez titulável durante o período de armazenamento ocorre devido à produção de ácido lático, ao gênero, a quantidade de bactérias láticas, ao tempo de armazenamento e os substratos incrementados. Quanto a diferença de valores de pH e acidez titulável é devido às características distintas de cada cultura de bactéria utilizada, tempo e temperatura de armazenamento refrigerado. Vale ressaltar que a acidificação do meio interfere inversamente nas mudanças dos valores de pH.

Avaliação do efeito do armazenamento sobre a viabilidade das bactérias probióticas

Conforme descrito na Tabela 2, a bebida láctea fermentada por *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1), apresentou contagem média de 10^7 UFC/g de *Lactobacillus acidophilus*, estando dentro dos limites recomendados para produtos fermentados por bactérias probióticas, logo tornou-se potencialmente um atrativo como adjunto na dieta humana.

Em trabalho realizado por Machado *et al*. (2017) em leite de cabra com mel, obtiveram aproximadamente 8,5 log UFC/mL para *L. acidophilus* no primeiro dia de refrigeração do produto, sendo aproximadamente 1 ciclo log a mais do encontrado no presente estudo.

A bebida láctea fermentada por *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2) apresentou contagens satisfatórias para a alegação de produto probiótico, segundo a legislação brasileira, com média de 10^8 UFC/g, de acordo com a Tabela 2 (BRASIL, 2002).

Scariot *et al*. (2018), em seus estudos sobre a quantidade celular de *L. paracasei* em iogurtes, encontraram contagens semelhantes, com valores médios de 8 log UFC/mL, durante os 30 dias de armazenamento. Contagens um pouco superiores foram encontradas por Pires (2016), em sua pesquisa sobre a viabilidade de *L. casei* em leite, sendo em torno de 10^8 a 10^9 UFC/mL, no período de estocagem de 28 dias.

Os resultados das contagens da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, em log UFC/g, nos quatro tempos de armazenamento sob refrigeração, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (log UFC/g) das duas formulações de bebida láctea probiótica, fonte de proteína, em 4 tempos de armazenamento*

Tempo (dias)	Formulação	
	F1	F2
0	6,52 ± 0,3[a]	7,44 ± 0,23[b]
7	6,69 ± 0,19[a]	8,34 ± 0,14[ab]
14	6,12 ± 0,3[a]	8,68 ± 0,24[a]
21	6,5 ± 0,16[a]	8,25 ± 0,15[ab]
P(F)	0,4201	0,0092

* Médias ± Erro Padrão. P(F): Probabilidade do teste F da ANOVA. Médias seguidas por diferentes letras na coluna diferem pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

As duas formulações de bebidas lácteas fermentadas (F1 e F2) apresentaram contagens médias satisfatórias e constantes de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ao longo dos 21 dias de armazenamento sob refrigeração, respectivamente em torno de 10^6 UFC/g (F1) e 10^8UFC/g (F2). O número de células atende aos requisitos descritos na literatura e o que preconiza a legislação brasileira, para a bebida láctea ser considerada probiótica, no consumo de uma porção (BRASIL, 2002) (Tabela 3). A diferença de 2 ciclos logarítmicos da F1 para a F2, possivelmente decorre da associação distinta de culturas mistas liofilizadas para a fermentação das bebidas, no tempo de armazenamento (0, 7, 14, 21 dias).

Kristo *et al*. (2003) realizaram um experimento similar, associando *Lacticaseibacillus paracasei*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e Flesch *et al*. (2014) analisaram o uso terapêutico dos simbióticos, constatando que a associação de *L. casei* a outros micro-organismos probióticos, como as bifidobactérias, proporcionam simbiose, ou seja, uma bactéria promove beneficamente o desenvolvimento da outra.

Gallina *et al*. (2011) encontraram contagens de *Bifidobacterium* de 6 log UFC/ mL em leite probiótico fermentado contendo FOS durante 28 dias de armazenamento refrigerado. Saccaro (2008) também obteve contagem média e constante de 10^6 UFC/ mL de *Bifidobacterium*, na cultura mista de *L. acidophillus* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. E, Acu *et al*. (2021) em estudo sobre a viabilidade probiótica em sorvetes simbióticos de cabra, encontraram contagem média de 10^8 UFC/g de *Bifidobacterium* spp., sendo semelhante ao encontrado no presente estudo.

Tendência semelhante foi observada por Martínez-Villaluenga et al. (2006) e Lim *et al*. (2009) em leites fermentados contendo cultura mista de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus*, em relação a manutenção da contagem de culturas probióticas.

Nesse sentido, o presente trabalho atendeu aos requisitos legais quanto à viabilidade das bactérias probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F1), *Lacticaseibacillus paracasei*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (F2), apresentando boa interação com as culturas empregadas e com o próprio meio.

Análise da composição centesimal

A Tabela 4 apresenta os resultados da composição centesimal.

Os valores de umidade encontrados nas formulações F1 e F2, foram 78,05% e 79,46% respectivamente. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$), pois o percentual de soro (30%) e leite (70%) utilizado foi o mesmo para ambas as formulações de bebidas lácteas. Almeida (2019), obteve valor superior, sendo de 92,03% de umidade para a bebida láctea fermentada produzida com aproximadamente 75% de soro e com adição de polpa de açaí.

Os teores de gordura das formulações desenvolvidas F1 e F2 de bebidas lácteas não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$), pela análise de variância (ANOVA), como pode ser observado na Tabela 4.

O teor de proteína nas bebidas lácteas variou entre 11,33% e 11,53% nas formulações F1 e F2 respectivamente, devido a composição das bebidas, às quais foram adicionadas o isolado proteico. Segundo a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999) e Resolução nº 54, de 12 de novembro de 2012 (BRASIL, 2012) da ANVISA, para afirmar que um produto possui funcionalidade devido ao enriquecimento proteico e usar alegação de fonte de proteínas, este alimento necessita conter no mínimo 6 gramas de proteína em uma porção de 100 gramas do alimento.

Valores superiores ao presente trabalho foram encontrados por Ames (2019), na caracterização de iogurte com adição de *L. casei* imobilizado em aveia, em que foi obtido um valor médio de proteína de 15,83%.

Os teores de cinzas variaram entre 4,79% e 4,40% (Tabela 4), devido à elevada concentração proteica. Pereira (2012) e Ames (2019) obtiveram valores médios de cinzas de

Tabela 4 – Composição centesimal das diferentes formulações de bebidas lácteas*

Formulações	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
F1	78,05 ± 1,95	1,72 ± 0,12	11,33 ± 1,11	4,79 ± 0,62
F2	79,46 ± 1,29	1,65 ± 0,13	11,53 ± 0,84	4,40 ± 0,43

*Não houve diferença estatística significa ($P > 0,05$) entre as composições das formulações de bebida láctea.

0,64% e 0,53% na caracterização de bebidas lácteas probióticas e iogurte com cultura imobilizada em aveia, respectivamente. Essa diferença do teor de cinzas deve-se ao acréscimo do isolado proteico na elaboração da bebida láctea.

CONCLUSÕES

As bebidas desenvolvidas nesse trabalho ainda não estão disponíveis comercialmente no mercado brasileiro, sendo consideradas inovações com alto valor agregado, para o segmento de produtos lácteos. Ambas as formulações se mantiveram viáveis por 21 dias de armazenamento sob refrigeração, podendo ser classificadas como bebidas probióticas e atenderam a exigência para alegação de fonte de proteínas.

Propõe-se para os próximos estudos: ajustar o teor de proteína ao mínimo exigido pela legislação para alegação de fonte, 6 g/ 100 g; avaliar o efeito de diferentes concentrações de proteína em relação a textura e o sabor da bebida láctea; analisar a ação acidificante com diferentes concentrações de bactérias lácticas adicionadas a bebida lática; e avaliar sensorialmente a influência da informação, quanto aos benefícios da proteína e dos probióticos na bebida láctea, em relação a preferência e intenção de compra, comparando com testes sensoriais sem informação.

REFERÊNCIAS

ACU, M.; KINIK, O.; YERLIKAYA, O. Probiotic viability, viscosity, hardness properties and sensorial quality of synbiotic ice creams produced from goat's milk. **Food Science Technology**, v. 41, n. 1, p. 167-173, 2021. DOI: 10.1590/fst.39419 .

ALMEIRA, R. B. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada probiótica sabor açaí**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2019.

AMES, C. W. ***Lactobacillus casei* CSL3**: Imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte. 2019. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

BANDIERA, N. S. *et al*.. Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: Defining the best processing step to its addition. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 63, n. 1, p. 58-63, 2013.

BARBOSA, F. H. F. *et al*. O gênero *Bifidobacterium*: Dominância à favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 15-25, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 8, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 230, p. 9, 30 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da República**

Federativa do Brasil: seção 1, Brasília, DF, n. 82, p. 11, 3 maio 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 6, p. 191, 9 jan. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento técnico Mercosul sobre informação nutricional complementar. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 219, p. 122, 13 nov. 2012.

DJALDETTI, M; BESSLER, H. Probiotic strains modulate cytokine production and the immune interplay between human peripheral blood mononucear cells and colon cancer cells. FEMS microbiology letters. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 3, 2017. DOI: 10.1093/femsle/fnx014.

ENUJIUGHA, V. N; BADEJO, A. A. Probiotic potentials of cereal-based beverages. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 4, p. 790-804, 2017.

FARIA, C. P. *et al*. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 511-516, 2006.

FERREIRA, C. L. L. F. Tecnologia para produtos lácteos funcionais: probióticos. *In*: PORTUGAL, J. A. B. *et al.* (ed.). **O Agronegócio do Leite e os Alimentos Lácteos Funcionais**. Juiz de Fora: EPAMIG ILCT, 2001. p. 183-203.

FERREIRA, T. A. **Viabilidade de *Lactobacillus casei* em leite fermentado com redução de açúcar e adição de biomassa de banana verde**. 2016. Monografia (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

FLESCH, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. C. O uso terapêutico dos simbióticos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 27, n. 3, p. 206-209, 2014.

GALLINA D. A *et al*. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias láticas e probióticas durante a vida de prateleira. **UNOPAR Científica**, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 7, p. 517-528, 2003. DOI: 10.1016/S0958-6946(03)00074-8.

KUMAR, A.; KUMAR, D. Development of antioxidant rich fruit supplemented probiotic yogurts using free and microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* culture. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p.667-675, 2016. DOI: 10.1007/s13197-015-1997-7.

LAPIERRE, L.; UNDELAND, P.; COX, L. J. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of *Bifidobacteria* in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 5, p. 1192-1196, 1992.

LIM, O.; SUNTORNSUK, W.; SUNTORNSUK, L. Capillary zone electrophoresis for enumeration of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yogurt. **Journal of Cromatography B**, v. 877, n. 8-9, p. 710-718, 2009. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.02.014.

LIMA, K. G. C. *et al*. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 491-495, 2009. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.08.011.

MACHADO, T. A. D. G. *et al*. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT Food and Science Technology**, v. 80, p. 221-229, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.02.013.

MAGALHÃES, K. T. *et al*. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 249-253, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.012.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C. *et al*. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 768-774, 2006. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.08.002.

McDONALD, C. K. *et al*. Lean body mass change over 6 years is associated with dietary leucine intake in an older Danish population. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 9, p. 1556-1562, 2016. DOI: 10.1017/S0007114516000611.

NUNES, L. A. *et al*. O soro do leite, seus principais tratamentos e meios de valorização. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 301-326, 2018. DOI: 10.17765/2176-9168.2018v11n1p301-326.

PELAIS, A. C. A *et al*. Viabilidade de bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus* em néctar de taperebá: efeito nas propriedades físico-químicas e sensoriais. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 5, p. 25945-25960, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n5-158.

PEREIRA, M. A.; ALMEIDA, D. M.; LEAL, E. S. Avaliação da concentração de bactérias láticas viáveis em iogurtes com polpas de frutas. **Revista Higiene Alimentar**, v. 23, n. 170/171, p. 83-86, 2009.

PEREIRA, B. S. **Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PHILLIPS, S. M.; CHEVALIER, S.; LEIDY, H. J. Protein "requirements" beyond the RDA: Implications for optimizing health. **Applied Physiology in Nutrition and Metabolism**, v. 41, n. 5, p. 565-572, 2016. DOI: 10.1139/apnm-2015-0550.

PIRES, E. C. S. **Viabilidade de *Lactobacillus casei* em leite fermentado enriquecido com biomassa de banana verde**. 2016. Monografia (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

RAVULA, R. R.; SHAH, N. P. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. **Biotechnology Techniques**, v. 12, p. 819-822, 1998. DOI: 10.1023/A:1008829004888.

REIS, A. S. *et al*. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. **Nutrition Research**, v. 37, p. 1-19, 2017. DOI: 10.1016/j.nutres.2016.11.009.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na**

acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANTOS FILHO, A. L. *et al*. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT Food and Science Technology**, v. 99, p. 371-378, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.007.

SCARIOT, M. C. *et al*. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology,** v. 264, p. 1-7, 2018. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.021.

SOAVE, B. P. Acompanhamento da vida útil de bebidas lácteas: Influência do soro do queijo e culturas contendo organismos probióticos. *In*: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15., 2007, Piracicaba. **Anais** [...]. São Paulo: Universidade Metodista de Piracicaba, 2007.

SWAIN, M. R. *et al*. Fermented fruits and vegetables of Asia: A potential source of probiotics. **Biotechnology Research International**, v. 2014, Article ID 250424, 2014. DOI: 10.1155/2014/250424.

TEIXEIRA NETO, F. **Nutrição Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006. DOI: 10.1590/S0101-20612006000300017.

TRUMBO, P. *et al*. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 102, n. 11, p. 1621-1630. DOI: 10.1016/s0002-8223(02)90346-9.

VILLENA, J.; KITAZAWA, H. Probiotic microorganisms: A closer look. **Microorganisms**, v. 5, n. 17, p. 1-3, 2017. DOI: 10.3390/microorganisms5020017.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**. v. 9, n. 8, p. 497-505. 1999. DOI: 10.1016/S0958-6946(99)00120-X.

VIVEK, K. *et al*. Effect of probiotification with *Lactobacillus plantarum* MCC 2974 on quality of Sohiong juice. **LWT Food and Science Technology**, v. 108, p. 55-60, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.046.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós acidificação durante a vida-de-prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004. DOI: 10.1590/S0101-20612004000400033.

ZARPELON, A. F. *et al*. Desenvolvimento de bebida probiótica fermentada de beterraba, cenoura e maçã: Análises físico-químicas e sensoriais. *In*: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 14., 2017, Curitiba. **Anais** [...]. Curitiba: sbCTA Paraná, 2017.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coord.). **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed., 1ª ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.